ISSN 2186-7976

March 5, 2022
令和４年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2022

大会講演要旨集

■２０２２年度(令和４年度)大会[京都]■





公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞講演、受賞者一覧 ---------- 2
一般講演の見方 ---------- 6
一般講演発表プログラム ---------- 7
一般講演発表要旨 ---------- 59
大会シンポジウムプログラム ---------- 1,404
大会シンポジウム要旨 ---------- 1,411
分野融合連携（他学会連携）シンポジウムプログラム ---------- 1,516
分野融合連携（他学会連携）シンポジウム要旨 ---------- 1,517
実行委員会企画シンポジウムプログラム ---------- 1,529
実行委員会企画シンポジウム要旨 ---------- 1,530
スポンサードセミナープログラム ---------- 1,534
スポンサードセミナー要旨 ---------- 1,536

日本農芸化学会

（2022 年度）学会賞等授賞式、受賞者講演、受賞者一覧

日時：2022 年 3 月 15 日（火）10 時～18 時 05 分
場所：オンライン開催

進行予定

（10：00）**2022 年度学会賞等授与式**
1 授賞選考委員長報告
2 日本農芸化学会賞授与
3 日本農芸化学会功績賞授与
4 農芸化学技術賞授与
5 農芸化学奨励賞授与

2022 年度農芸化学女性研究者賞等授与式
1 授賞選考委員長報告
2 農芸化学女性研究者賞授与
3 農芸化学若手女性研究者賞授与
4 農芸化学女性企業研究者賞授与

（10：40）**第 19 回農芸化学研究企画賞表彰式**
1 産学官学術交流委員長報告
2 農芸化学研究企画賞表彰

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

（10：50）**会長祝辞**
（10：55）** 休憩 5 分間 **
（11：00）**受賞講演開始**
（11：00）日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件、各 25 分）
（11：50）****** 休憩 60 分間 *****
（12：50）農芸化学女性研究者賞受賞者講演（3 件、各 10 分）
（13：20）日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件、各 20 分）
（14：00）*** 休憩 10 分間 ***
（14：10）農芸化学技術賞受賞者講演（2 件、各 15 分）
（14：40）農芸化学女性企業研究者賞受賞者講演（2 件、各 10 分）
（15：00）*** 休憩 10 分間 ***
（15：10）農芸化学奨励賞受賞者講演（9 件、各 15 分）
（17：25）*** 休憩 10 分間 ***
（17：35）農芸化学若手女性研究者賞受賞者講演（3 件、各 10 分）
（18：05）**受賞講演終了**

受賞者

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）

上口（田中）美弥子（名古屋大学生物機能開発利用研究センター）
「植物ホルモン応答機構の分子基盤」

阪井 康能　（京都大学大学院農学研究科）
「C1 微生物の生存戦略における分子・細胞基盤の解明と機能開発」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件，50 音順）

阿部 敬悦　（東北大学大学院農学研究科）
「醸造微生物の細胞表層機能に関する生化学的研究とその産業応用」

奥村 克純　（三重大学大学院生物資源学研究科）
「動物細胞ゲノムの構造・核内動態とその制御に関する分子細胞生物学的研究」

【農芸化学技術賞】（2 件，50 音順）
森田 悠治・鈴木 弘章・山崎 雄大・藤原 大介（キリンホールディングス株式会社）
「インフラマソーム制御を介した新しい眼の健康維持アプローチ：KW 乳酸菌の開発と事業化」
不二製油株式会社
「高度な酸化安定性を付与した DHA・EPA 油“プロレア®”の開発と応用展開」

【農芸化学奨励賞】（9 件，50 音順）
小川 剛伸　（京都大学大学院農学研究科）
「食品の内部構造が品質を支配する機構の解明」
尾﨑 太郎　（東北大学大学院薬学研究科）
「酸化酵素を中心とした生物活性天然物の構造多様性創出機構に関する研究」
勝田 亮　（東京農業大学生命科学部）
「量子化学計算により効率化した生物活性天然有機化合物の合成と構造の解明」
熊野 匠人　（筑波大学生命環境系）
「天然化合物代謝に関わるユニークな酵素の発見と機能の解明」
瀬戸 義哉　（明治大学農学部）
「ストリゴラクトンの生合成および信号伝達メカニズムの解明」
田中 沙智　（信州大学農学部）
「食品由来成分の免疫機能制御に関する研究」
田中 瑞己　（東京農工大学大学院農学研究院）
「麹菌による有用タンパク質高生産を目指した転写および転写後発現制御機構の解析」
松井 大亮　（立命館大学生命科学部）
「L-アミノ酸代謝関連酵素の産業利用技術に関する研究」
山下 陽子　（神戸大学大学院農学研究科）
「難吸収性食品成分の組織間ネットワークを介した生理機能に関する研究」

【農芸化学女性研究者賞】（3 件，50 音順）
松﨑 千秋　（石川県立大学生物資源工学研究所）
「乳酸菌の産生する機能性菌体外多糖の医薬・食品産業への応用に向けた基盤構築」
丸山 明子　（九州大学大学院農学研究院）
「アブラナ科植物が生産する含硫機能性化合物グルコシノレートの代謝調節機構の解析」
横井 彩子　（農研機構 生物機能利用研究部門）
「植物における精密ゲノム編集技術ジーンターゲッティングの高度化と汎用化に関する研究」

【農芸化学若手女性研究者賞】（3 件，50 音順）
周 英鈺　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「天然物の健康に及ぼす影響とその分子機構の解明」
根本 理子　（岡山大学学術研究院環境生命科学学域）
「生体鉱物形成に関わるタンパク質に関する研究」
能見 祐理　（新潟薬科大学応用生命科学部）
「メイラード反応機構解明に向けた反応生成物の一斉分析法の開発と構造決定およびその機能解析」

【農芸化学女性企業研究者賞】（2 件，50 音順）
中﨑 瑛里　（キリンホールディングス株式会社）
「機能性食品としてのシチコリンの用途開発研究」
安田 亜希子　（株式会社林原）
「微生物酵素を用いた新規有用糖質素材の創出」

【農芸化学研究企画賞】(2 件、50 音順)

荒井 緑　　(慶應義塾大理工学部)
「タンパク質ビーズ法による人工天然物エキスからの新規タウ分解分子のりの開発」

丹羽 隆介　　(筑波大学生存ダイナミクス研究センター)
「昆虫エクジステロイド生合成酵素に対する阻害剤に注目した新規殺蚊剤開発に向けた研究」

【2022 年度日本農学賞受賞者 (本会推薦)】

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました。
2022 年 4 月 5 日に開催される日本農学大会において、日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています。
受　賞　者：松井 健二 (山口大学大学院創成科学研究科 (農学系)・教授)
受 賞 題 目：みどりの香りの科学

【2021 年 (Vol.85) BBB 論文賞(掲載順)】(11 件)

pp.61～68　Kumi Yoshida, Takeya Oniduka, Kin-ichi Oyama, and Tadao Kondo
Blue flower coloration of *Corydalis ambigua* requires ferric ion and kaempferol glycoside

pp.440～446　Toshihide Suzuki, Makoto Shimizu, Yoshio Yamauchi, and Ryuichiro Sato
Polymethoxyflavones in orange peel extract prevent skeletal muscle damage induced by eccentric exercise in rats

pp.895～901　Takamitsu Amai, Tomoka Tsuji, Mitsuyoshi Ueda, and Kouichi Kuroda
Development of a mito-CRISPR system for generating mitochondrial DNA-deleted strain in *Saccharomyces cerevisiae*

pp.1005～1015　Kentaro Ochi, Maho Tokuda, Kosuke Yanagiya, Chiho Suzuki-Minakuchi, Hideaki Nojiri, Masahiro Yuki, Moriya Ohkuma, Kazuhide Kimbara, and Masaki Shintani
Oxygen concentration affects frequency and range of transconjugants for the incompatibility (Inc) P-1 and P-7 plasmids pBP136 and pCAR1

pp.1405～1414　Yoshino Tanaka, Yoshihiko Nanasato, Kousei Omura, Keita Endoh, Tsuyoshi Kawano, and Takashi Iwasaki
Direct protein delivery into intact plant cells using polyhistidine peptides

pp.1594～1601　Yuto Ohata, Yuuki Tetsumoto, Sayo Morita, Naoki Mori, Yoichi Ishiguri, and Naoko Yoshinaga
Triterpenes induced by young apple fruits in response to herbivore attack

pp.2076～2083　Takanori Ichikawa, Mizuki Tanaka, Takayasu Watanabe, Sitong Zhan, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, and Katsuya Gomi
Crucial role of the intracellular α-glucosidase MalT in the activation of the transcription factor AmyR essential for amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*

pp.2121～2130　Takahiro Sawada, Koichi Nishimura, Jinichi Mori, Yoshiaki Kanemoto, Alexander Kouzmenko, Rei Amano, Akira Hayakawa, Suguru Tokiwa, Hiroaki Shimmura, and Shigeaki Kato
Androgen-dependent and DNA-binding-independent association of androgen receptor with chromatic regions coding androgen-induced noncoding RNAs

pp.2137～2144　Yu Takahashi, Yu Inoue, Keitaro Kuze, Shintaro Sato, Makoto Shimizu, Hiroshi Kiyono, Yoshio Yamauchi, and Ryuichiro Sato
Comparison of gene expression and activation of transcription factors in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells and organoids

pp.2153～2160　Shota Uesugi, Mayuka Hakozaki, Yuko Kanno, Honoka Takahashi, Yui Kudo, Ken-ichi Kimura, Hidetoshi Yamada, and Akira Yano
A yeast-based screening system identified bakkenolide B contained in *Petasites japonicus* as an inhibitor of interleukin-2 production in a human T cell line

pp.2311～2321　Shotaro Murata, Takashi Sasaki, Yuki Yamauchi, Makoto Shimizu, and Ryuichiro Sato
Maslinic acid activates mTORC1 and human TGR5 and induces skeletal muscle hypertrophy

【2021 年 Most-Cited Paper Award】被引用回数 27 回

Vol.83 No.11, pp. 2144～2152

Yusuke Fujii, Thuy Tien Thi Nguyen, Yuta Fujimura, Naotaka Kameya, Shoji Nakamura, Kensuke Arakawa, and Hidetoshi Morita

Fecal metabolite of a gnotobiotic mouse transplanted with gut microbiota from a patient with Alzheimer's disease

【2021年Most-Cited Review Award】被引用回数 21 回

Vol.83, No.5, pp. 1385～1401

Katsuya Gomi

Regulatory mechanisms for amylolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月１６日（水）
３ ⟶ ３月１７日（木）
４ ⟶ ３月１８日（金）

次のアルファベット（大文字）はミーティングルームを示す記号

Ａ～Ｊ

ミーティングルームはＡからＪまであります。

次の数字は各ミーティングルームにおける質疑応答コアタイムを示す数字

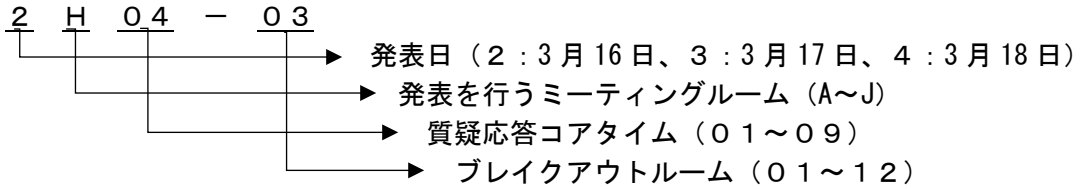
０１～０９

各数字におけるコアタイムは下記の通りです。

０１：9:00～9:30、 ０２：9:30～10:00、 ０３：10:00～10:30、
０４：10:30～11:00、０５：11:00～11:30、０６：13:00～13:30、
０７：13:30～14:00、０８：14:00～14:30、０９：14:30～15:00

ミーティングルームＡ、Ｃ、Ｅ、Ｇ、Ｉでは０１から０８まで、
ミーティングルームＢ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｊでは０２から０９まであります。

ハイフンの後の数字は質疑応答コアタイム内のブレイクアウトルーム番号（０１～１２）

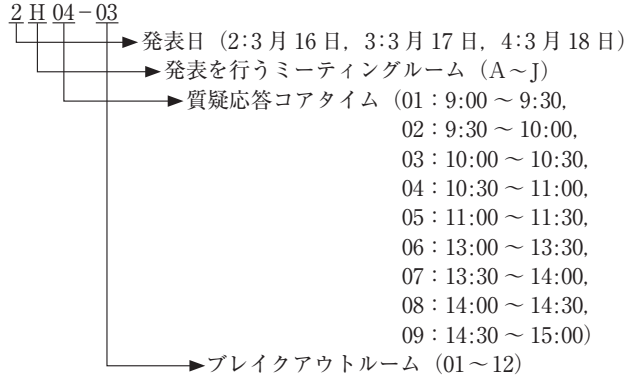


たとえば、**２Ｈ０４-０３**は、

３月１６日（水）、ミーティングルームＨ、質疑応答コアタイム 10：30～11：00、ブレイクアウトルーム３ での発表になります。

一般講演発表プログラム

1. 発表･質疑応答時間（質疑応答コアタイム）は 30 分となります.
2. ○は口頭発表者を示します.
3. 質疑応答コアタイムにおける進行役は，17〜19ページの進行役一覧（大会プログラム集）をご覧ください.
4. 講演番号は以下のようになります.



（例）「2H04-03」は，3月16日（水），ミーティングルームH，質疑応答コアタイム 10：30〜11：00，ブレイクアウトルーム 3 での発表になります.

第 2 日(3 月 16 日)

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 9:00〜9:30

微生物―細胞 - 分離，分類，生態

2A01-01　IAA 生産分離菌との共培養による微細藻類増殖促進効果の評価
○TAN Pei-Yu[1]，石田 奨[1]，加藤 勇太[1,2]，邱 泰瑛[1]，小西 正朗[1]
([1]北見工大院，[2]環境大善株式会社)

2A01-02　循環型汚水浄化装置から分離された易分解性有機物分解抑制細菌が他の分離株と汚水浄化装置内微生物叢に与える影響の解析
○石田 望，鈴木 智順 （東理大・応生）

2A01-03　循環型汚水浄化槽から分離された難培養細菌が生育に必要とする物質の構造決定
○鍵山 貴大，鈴木 智順 （東理大・応生）

2A01-04　汚水浄化に関与するマイクロバイオームに添加したアミノ酸が与える影響の解析
○野口 滉矢，鈴木 智順 （東理大・応生）

2A01-05　循環型汚水浄化槽由来セルロース分解微生物の機能解析
○下村 和正，鈴木 智順 （東理大・応生）

2A01-06　高塩濃度水産発酵物由来希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. TUA-HKG02Y 株の微生物学的特徴と二次代謝生合成遺伝子の比較
○鈴木 敏弘[1]，篠田 佳那[2]，松谷 峰之介[3]，長田 隆弘[4]，
荒川 賢治[5]，石川 森夫[1] ([1]東農大・醸造，[2]東農大院・醸造，[3]東農大・NGRC，[4]長田商店，[5]広大院・統合生命)

2A01-07　比較ゲノムによる *Cutaneotrichosporon cavernicola* の交配型遺伝子座の解析
○栢森 綺音[1]，青木 敬太[2]，志波 優[1]，藤田 信之[1]，杉田 隆[3]，
高島 昌子[2]，田中 尚人[1] ([1]東農大・微生物，[2]東農大・酵母，[3]明治薬科大・微生物)

2A01-08　環境試料へのシデロフォア添加によるバイオフィルム形成および構成菌種の特性
○久富 敦[1]，志波 優[2]，藤田 信之[2]，田中 尚人[1,2] ([1]東農大環境共生，[2]東農大微生物)

2A01-09　新奇 *Aminobacter* 属細菌におけるトリメチルセレノニウム資化経路の同定
○寺部 千夏[1]，越智 杏奈[1]，井上 真男[1,2]，田中 麻衣[1]，青野 陸[1]，
北山 香織[3]，栗原 達夫[3]，佐藤 総一[4]，小椋 康光[5]，三原 久明[1]
([1]立命大生命，[2]立命大R-GIRO，[3]京大化研，[4]東京都立大理，[5]千葉大薬)

2A01-10　*Saccharomyces pastorianus* の偽菌糸生育能の解析
○宮澤 紘輔[1,2]，高橋 朋子[1,2,3]，加藤 拓[3]，只見 秀代[3]，永富 康司[3]，
岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]，野田 陽一[1,2] ([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構，[3]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ(株))

2A01-11　オオムギ根内生微生物の同定と役割の解明
○木代 勝元[1]，最相 大輔[1]，山下 純[1]，山地 直樹[1]，山本 敏央[1]，
門田 有希[2]，持田 恵一[3]，中川 智行[4]，谷 明生[1] ([1]岡大植物研，[2]岡大環境生命，[3]理研CSRS，[4]岐阜大応生)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 10:00〜10:30

微生物―細胞 - 分離，分類，生態 / 細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物

2A03-01　日光社寺文化財に発生する変色部位と周辺環境の網羅的真菌叢解析
○大島 祥[1]，須崎 裕人[1]，小笠原 麻衣[1]，三浦 菜摘[1]，鈴木 孝宗[2]，
寺島 千晶[2]，藤島 昭[2]，鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生，[2]東理大総研)

2A03-02　放線菌コロニーの色性状の数値化によるグルーピング化に関する研究
○廣瀬 侑生[1]，山村 英樹[1]，中川 洋史[1]，小久保 晋[1]，早川 正幸[2]
([1]山梨大，[2]山梨県立大)

2A03-03　土粒子１個からの放線菌の分離
○林 大稀[1]，濱渦 亮子[2]，海田 枝里[3]，保坂 毅[1,2,3] ([1]信州大院・総合理工，[2]信州大・バイオメディカル研，[3]信州大・農)

2A03-04　奥塩原温泉における新規鉄代謝アーキアの探索
○逆井 青空[1]，加藤 真悟[2]，伊藤 隆[2]，大熊 盛也[2]，高品 知典[1]
([1]東洋大院生命科学，[2]理研BRC)

2A03-05　海洋環境から分離された紫外線耐性菌 *Deinococcus* sp. AKn-1 株の諸性質と分子系統解析
○松原 光希[1]，大道 悠周[1]，岡村 好子[2]，前田 誠[3]，大橋 弘範[4]，
杉森 大助[4]，阪口 利文[1] ([1]県立広島大・生命環境，[2]広島大院・統合生命科学，[3]広島大・N-BARD，[4]福島大学・共生システム理工学類)

2A03-06　「ゲノムを包む膜」を持つ新規 *Atribacterota* 門地下細菌の培養化と機能解明
○川本 大輝[1,2]，渡邊 美穂[2,3]，持丸 華子[4]，中原 望[2]，孟 憲英[2]，
吉岡 秀佳[4]，野村 暢彦[5,6]，玉木 秀幸[2,5,6] ([1]筑波大院・理工情報生命，[2]産総研・生物プロセス，[3]秋田県大・生物資源科学，[4]産総研・地圏資源環境，[5]筑波大・生命環境系，[6]筑波大・MiCS)

2A03-07　ゲル微粒子の凝集培養を用いた難培養性細菌の単離方法の構築
○下村 有美，鈴木 陸太，マルチネス ジョバル，中島田 豊，
加藤 節，青井 議輝 （広大統合生命）

2A03-08　なぜ培養困難なのか？ *Nitrospira* の生存戦略と難培養性の関係性を解き明かす
○定廣 晋吾[1]，田村 淳[1]，村上 千穂[2]，加藤 節[1]，中島田 豊[1]，
金田一 智規[1]，大橋 晶良[1]，青井 議輝[1] ([1]広島大院，[2]安田女大)

2A03-09　*Burkholderia* 株由来の細胞外多糖類画分による難培養性 *Verrucomicrobia* 門細菌の集積培養
○笹川 航，加藤 広海，大坪 嘉行，永田 裕二 （東北大院・生命科学）

2A03-10　地衣類フォトビオントの分離と培養
○廣瀬 琴美，油井 信弘，藤井 克彦 （工学院大学 工学研究科 化学応用学専攻）

2A03-11　シングルセル解析技術を用いた二次代謝産物生合成能を有する未培養海綿共在細菌の同定
○小川 雅人[1]，Hemmerling Franziska[2]，安藤 正浩[1]，西川 洋平[1,3]，細川 正人[4]，松永 茂樹[5]，Piel Jörn[2]，竹山 春子[1,3,4,6]（[1]早大ナノライフ創新研，[2]Institute of Microbiology，ETH Zurich，[3]産総研-早稲田CBBD-OIL，[4]早大理工学術院，[5]東大院農学生命科学，[6]早大先進生命動態研）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物

2A05-01　創出土壌を対象としたX線CTによる土壌物理性解析の試み
○西田 亮也[1]，鈴木 飛鳥[2]，宮本 憲二[3]，加藤 康夫[4]，安藤 晃規[5,6]，小川 順[5,6]，篠原 信[7]，高野 雅夫[1] （[1]名大院環，[2]名大院工，[3]慶大理工，[4]富山県大・生医工研セ，[5]京大院農，[6]京大・生理化学研究ユニット，[7]農研機構）

2A05-02　ゲル充填マイクロウェルアレイと顕微ラマン分光測定の融合：土壌微生物への応用
○前田 大樹[1]，菅野 菜々子[1]，佐々 文洋[2]，重藤 真介[1] （[1]関西学院大院理工，[2]九州大院システム情報科学）

2A05-03　マイクロドロップレットを用いた土壌微生物複合培養とその菌叢解析
○市川 俊輔[1]，本間 宣行[2]，勝尾 徳斗[1]，石毛 真行[2] （[1]三重大，[2]オンチップ・バイオテクノロジーズ）

2A05-04　マイクロウェルアレイを用いた新たな微生物の分離培養法の構築
○沼舘 美法[1]，佐々 文洋[2]，土肥 裕希[1]，桝尾 俊介[1]，竹下 典男[1]，高谷 直樹[1] （[1]筑波大・生命環境系/ MiCS，[2]九州大・システム情報科学）

2A05-05　ヒッチハイク現象の環境汚染物質分解細菌への応用
○岩本 和音，加藤 広海，大坪 嘉行，永田 裕二 （東北大・院生命）

2A05-06　γ-HCH分解細菌コミュニティ形成における *Cupriavidus* 株の重要性
○佐子川 さやか，羽賀 千晃，加藤 広海，大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院生命）

2A05-07　C1化合物利用能・ヨウ素抗菌性・捕食をめぐる微生物種間相互作用とそのコミュニティ形成への影響を水処理微生物集団からみる
○松下 真由美[1,3]，山本 京祐[2]，青柳 智[1]，稲葉 知大[1]，堀 知行[1]，青木 寛[1]，羽部 浩[1]，佐藤 由也[1] （[1]産総研・環境創生，[2]産総研・生物プロセス，[3]学振RPD）

2A05-08　アンチセンスペプチド核酸を用いた微生物菌叢改変手法の開発
○岡野 憲司[1,2]，日詰 達哉[3]，佐藤 悠[1]，本田 孝祐[1,2] （[1]阪大・生物工学国際交流センター，[2]阪大・先導的学際研究機構，[3]阪大院・工）

2A05-09　RP4接合伝達システムを用いた大腸菌 -*Alkalihalobacillus* 属菌間への遺伝子導入
○網島 健太[1]，深田 悠太[2]，片岡 正和[1] （[1]信大院　総合理工　生命医工，[2]信大院　総合医理工　生命医工）

2A05-10　性線毛先端タンパク質は接合伝達における受容菌選択に関与する
○杉山 京佳[1]，作田 郁子[1]，高島 綾[1]，河野 響[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，野尻 秀昭[1,2] （[1]東大院・農生科・AgTECH，[2]東大・微生物連携機構）

2A05-11　代謝ネットワーク形成プロセスと微生物共存
○鈴木 研志[1,5]，上原 悠太郎[2]，栗栖 太[3,5]，野尻 秀昭[4,5] （[1]東大院・農生科，[2]東大院・工・都市工，[3]東大院・工・水環セ，[4]東大院・農生科・アグテック，[5]東大・CRIIM）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物

2A06-01　腸内細菌叢中に存在するビフィズス菌の選択的回収系の確立
○吉田 佳鼓，嶋田 みな，宮下 聖也，前田 智也，横田 篤，吹谷 智 （北大農）

2A06-02　好熱菌発酵産物を給与したノトバイオートマウスから単離された嫌気性細菌に関する研究
○松﨑 雄大朗[1]，宮本 浩邦[1]，児玉 浩明[1,2,3,4] （[1]千葉大園芸，[2]理研，[3]サーマス(株)，[4]日環科学(株)）

2A06-03　高脂肪食摂取ラットにおける盲腸内脂肪酸プロファイルの変化が腸内細菌叢構成に与える影響の解明：脂肪酸仮説の検証
○川上 憲太郎[1]，B. Gowda Siddabasave Gowda[2]，Chen Zhen[2]，吹谷 智[1]，Liang Chongsheng[2]，Hai Han[2]，石塚 敏[1]，小椋 義俊[3]，後藤 恭宏[4]，前田 智也[1]，林 哲也[4]，千葉 仁志[5]，惠 淑萍[2]，横田 篤[1] （[1]北大院農，[2]北大院保，[3]久留米大医，[4]九大院医，[5]札幌保医大栄）

2A06-04　ヒト腸内常在酪酸産生菌 *Roseburia intestinalis* の増殖はタマリンドシードガム酵素分解物により選択的に促進される
○尾藤 あやか[1]，網 優太[1]，山西 健太[2]，中井 梨歩[1]，平野 里佳[1,3]，宇野 陽一郎[2]，栗原 新[1] （[1]近畿大・生物理工，[2]DSP五協フード＆ケミカル(株)，[3]石川県大・生資環）

2A06-05　ヒト腸管細胞と腸内優占 *Bacteroides* 属細菌との宿主粘液物質を介した接着と相利共生
○幸田 有希渚[1]，梶川 幹太[1]，佐藤 賢宏[1]，髙瀬 隆一[1]，渡辺 大輔[2]，橋本 渉[1] （[1]京大院・農，[2]奈良先端大・バイオ）

2A06-06　モンゴル国における2型糖尿病肥満者と非2型糖尿病肥満者の腸内細菌叢の比較
○篠田 あかり[1]，ラハクバジャウ ツォクトバートル[2]，三島 梨子[1]，ジャムヤン ドゴースレン[2]，デンベレル シルチン[2]，中山 二郎[1] （[1]九大院農，[2]モンゴル生命科学大学）

2A06-07　ダニ由来乳酸菌の単離ならびに共生微生物叢の解析
○櫻間 晴子[1]，清水 伸泰[1]，坂本 文夫[1,2]，萩下 大郎[1] （[1]京都先端大バイオ環境，[2]京都ニホンミツバチ研究所）

2A06-08　害虫と共生細菌にみる相互協力的な農薬解毒メカニズム
○佐藤 由也[1]，ジャン ソンハン[2,3]，竹下 和貴[4]，伊藤 英臣[2]，小池 英明[2]，多胡 香奈子[5]，早津 雅仁[5]，堀 知行[1]，菊池 義智[2,3]（[1]産総研・環境創生，[2]産総研・生物プロセス，[3]北大・農，[4]秋田県立大・生物資源，[5]農研機構・農業環境）

2A06-09　草本堆肥の堆肥化過程における微生物群集変化
○松永 理佳[1]，Akter Chowdhury Sharmin[2]，Ibne Baki MD. Zakaria[2]，Asiloglu Rasit[1]，鈴木 一輝[3]，原田 直樹[4] （[1]新潟大農，[2]新潟大院自，[3]新潟大超域，[4]新潟大自）

2A06-10　根圏合成コミュニティにおけるマイクロバイオータ形成機構
○頼永 萌々佳[1,2]，工藤 凱門[1,2]，西岡 智樹[3]，壽崎 拓哉[1]，玉木 秀幸[3]，竹下 典男[1,2] （[1]筑波大学生命環境，[2]微生物サステナビリティ研究センター，[3]産総研）

2A06-11　*Lactiplantibacillus plantarum* LP-2株の凝集能欠損が山廃酒母および山廃仕込清酒に及ぼす影響
○藤原 久志，若井 芳則 （黄桜株式会社）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖，培養

2A08-01　フッ素系不活性液体添加による細菌増殖促進メカニズムの解析
○細木 亮輔[1]，川田 晃士[1]，山重 貴久[2]，菊池 正二郎[3]，小川 雄一[2]，原田 昌彦[1]　([1]東北大・院・農，[2]京大・院・農，[3]兵庫医科大・先端研)

2A08-02　Perfluorocarbon の増殖促進効果メカニズム：アセテートの増殖抑制効果に対する影響の解析
○川田 晃士[1]，細木 亮輔[1]，山重 貴久[2]，菊池 正二郎[3]，小川 雄一[2]，原田 昌彦[1]　([1]東北大・農，[2]京都大・院・農，[3]兵庫医科大・先端研)

2A08-03　希少糖，芽胞の新規な発芽誘起物質，その活性制御機構
○坂元 仁[1,2]，朝田 良子[1,3]，古田 雅一[1,3]，土戸 哲明[1]　([1]府大微制研，[2]関大化生工，[3]府大院工)

2A08-04　ラマン分光法による珪藻の減衰期予測
○久保 昂也[1,2]，安藤 正浩[3]，堀井 俊平[1,2]，外丸 裕司[5]，羽野 健志[5]，竹山 春子[1,2,3,4]　([1]早大院先進理工，[2]産総研・早大 CBBD-OIL，[3]早大ナノライフ創新研，[4]早大先進生命動態研，[5]水産機構水技研)

2A08-05　アンモニアガス耐性細菌 *Paenibacillus lentus* NH33 の生育特性
○安東 剛，Chaophaya Panjuy，清 啓自，吉田 ナオト　(宮大農)

2A08-06　放線菌 *Streptomyces* 属を対象とした菌種間での細胞内 pH の比較
○蓮池 祐紀[1]，臼田 隆亮[2]，須藤 雅己[1]，山本 純子[3]，猪又 俊輔[1]，片岡 正和[1]　([1]信州大院　総合理工　生命医工，[2]信州大工，[3]信州大工　物質化学)

2A08-07　放線菌 *Streptomyces* 属の異種間における染色体移行頻度の向上
○依田 健人[1]，溝脇 朱音[2]，深田 悠太[3]，片岡 正和[2]　([1]信州大工 物質化学，[2]信州大院 総合理工 生命医工，[3]信州大院 総合医理工 生命医工)

2A08-08　ジェランガム培地を用いた製パン用サワー種からの微生物の分離と解析
○三枝 静江，佐藤 万里，細井 知弘　(都産技研・食技セ)

2A08-09　点滅 LED 照射光による微細藻類 *Nannochloropsis oceanica Suda& Miyashita* の増殖能および脂質生産能への影響
○篠本 亮太，滝口 泰之　(千葉工大先進工)

2A08-10　気生微細藻類が蓄積する抗菌活性物質の培養法の検討
○関沢 寿裕，油井 信弘，藤井 克彦　(工学院大学)

2A08-11　カロテノイドを蓄積する気生微細藻類のスクリーニング
○比企 優太，油井 信弘，藤井 克彦　(工学院大学化学応用学専攻)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物―物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）

2B02-01　近大構内から分離した酵母の多様性解析
○塩谷 瑞紀[1]，松尾 啓史[1]，大谷 里菜[1]，長谷川 哲哉[1]，大西 徹[1]，井田 悠斗[1]，副田 尚位[1]，定塚 勝樹[2]，倉田 淳志[1]，上垣 浩一[1]　([1]近大農，[2]アストロバイオロジーセンター)

2B02-02　白神山地からの *S. cerevisiae* の分離と製パンへの応用
○上村 詩奈，殿内 暁夫　(弘大農生)

2B02-03　椿の枝から単離した野生酵母のワイン醸造適性の分析
○舩渡 遼平，中村 日向子，関 淑楓，工藤 泰良，山本 歩　(八戸工業高等専門学校)

2B02-04　ワインパミスの麹菌固体培養における熱水処理の影響
○奥川 日菜乃[1]，橋本 敦子[1]，三宅 剛史[2]，伊藤 一成[2]，谷野 有佳[2]，山下 秀行[3]，中川 拓郎[3]，平野 幸司[4]，仁戸田 照彦[1]，神崎 浩[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]岡山県工技セ，[3]樋口松之助商店，[4]果実工房)

2B02-05　オリーブ葉の麹菌固体培養における蒸煮処理の影響
○橋本 敦子[1]，奥川 日菜乃[1]，三宅 剛史[2]，伊藤 一成[2]，谷野 有佳[2]，山下 秀行[3]，内田 真美[3]，三木 翔平[3]，吉田 靖弘[4]，徐 恵美[4]，菊地 敬一[4]，仁戸田 照彦[1]，神崎 浩[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]岡山県工技セ，[3]樋口松之助商店，[4]日本オリーブ)

2B02-06　壺造り純米黒酢醸造に関わる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の特徴に関する研究
○福井 里佳子[1]，亀谷 将史[1,3]，藤井 暁[2]，長野 正信[2]，新井 博之[1,3]，石井 正治[1,3]　([1]東大農，[2]坂元醸造，[3]東大微生物連携機構)

2B02-07　模擬的熟成による非スターター菌種のチーズフレーバー生成能の検証
○大崎 友美加，海野 良輔，鈴木 敏弘，石川 森夫　(東農大院・醸造)

2B02-08　異なるスターター乳酸菌が野沢菜漬の水溶性・揮発性成分プロファイルに与える影響
○冨田 理[1]，渡辺 純[2]，栗林 剛[3]，田中 沙智[4]，河原 岳志[4]　([1]農研機構食品研，[2]帯畜大生命，[3]長野県工技セ，[4]信州大農)

2B02-09　長良川鵜匠家鮎なれずしの菌叢解析とその発酵における乳酸菌の機能
○河合 雄介[1]，堀 光代[2,3]，中村 浩平[1,2,4]，島田 昌也[1,2,4]，鈴木 徹[1,2,4]，中川 智行[1,2,4]　([1]岐阜大院自然科学，[2]岐阜大院連農，[3]岐阜市女子短大，[4]岐阜大応生)

2B02-10　過酸化脂肪酸を還元する *Lactobacillus plantarum* P1-2 株によるプロバイオティクス資材の開発
鈴木 智典[1]，○糸田 侑花[1]，野口 龍生[1]，植松 悠[1]，石塚 雄一[1]，村崎 友彦[1]，渡邊 昭夫[1]，野村 佳歩[1]，阿部 晃[2]，新村 洋一[1]，内野 昌孝[1]　([1]東京農大，[2]ミシガン大)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物―物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）

2B04-01　胎内ブランド・NAFU ブランド清酒を目指した自然界からの酵母の分離と育種
○森 崇智[1]，米内 裕都[1]，古田 悟[2]，栗林 喬[1]，小熊 哲哉[1]，渡邉 剛志[1]　([1]新潟食料農業大学，[2]今代司酒造)

2B04-02　清酒酵母における新規エタノール適応機構の解明
○島田 翔心[1]，三浦 健[1,2]　([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・バイオレジリエンス研究プロジェクト)

2B04-03　酒米品種・産地が玄米形状と白米形状の制御に及ぼす影響
○平吉 明日香[1]，柚山 泰成[1,2]，小松 夕子[1]，小林 拓嗣[1]，岩下 和裕[1,2]　([1]酒総研，[2]広島大院・統合生命)

2B04-04　酒米産地の違いによる高精白（50%精米）の清酒醸造および清酒メタボロームへの影響
○柚山 泰成[1,2]，小松 夕子[1]，小林 拓嗣[1]，岩下 和裕[1,2]　([1]酒類総合研究所，[2]広島大院・統合生命)

2B04-05　*Aspergillus oryzae* RIB40 株で製麹した米麹のグルコアミラーゼ活性に及ぼす音波照射の影響
○松本 拓，池田 葵，河口 由季，小島 幸治，三枝 敬明，寺本 祐司　(崇城大院)

2B04-06　日本酒醸造ビッグデータを用いた迅速な清酒醸造法の開発
○小畑 龍太郎[1,2]，小松 夕子[2]，平吉 明日香[2]，小林 拓嗣[2]，岩下 和裕[1,2]　([1]広島大学，[2]酒類総合研究所)

2B04-07　ワイン用酵母発酵助成剤が清酒醸造に及ぼす影響（第 2 報）
○飯塚（古川）幸子，神田 涼子，寺本 聡子，藤田 晃子，山田 修（酒総研）

2B04-08　大吟醸酒の上槽工程による脂肪酸及び脂肪酸エチルエステルの変化
○谷野 有佳，伊藤 一成，竹内 赳登，花房 裕子，三宅 剛史 （岡山県工技セ）

2B04-09　清酒から新たに見出されたオリゴ糖の構造解析
○竹久 まや[1]，山田 明日香[1]，勝田 亮[2]，小林 泉美[3]，本田 千尋[1]，金本 湧太[3]，進藤 斉[1]，穂坂 賢[1]，徳岡 昌文[1] （[1]東農大院応生，[2]東農大院生命，[3]東農大院農）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

微生物―物質生産 - 発酵（二次代謝産物）

2B07-01　食用担子菌発酵ダイズの栄養特性と抗酸化活性
○澤田 雄太，福士 涼介，新井 博文，佐藤 利次 （北見工業大学）

2B07-02　複合微生物系による機能性代謝物の生産に関する研究（1）- 水素生産菌を利用したエクオール発酵生産 -
○千葉 夏乃[1]，濱川 匡史[1]，山本 侑平[2]，中島 賢則[1]，山本 浩明[1]（[1]ダイセル・事業創出C，[2]ダイセル・工業化G）

2B07-03　食品廃棄物の循環利用に向けたセルフクローニング麹菌によるオメガ３脂肪酸生産
○真野 潤一[1]，小竹 英一[1]，都築 和香子[2]，鈴木 聡[1]，楠本 憲一[3]，服部 領太[1] （[1]農研機構食品研，[2]農研機構食品研(現　東京家政大学)，[3]農研機構食品研(現　大阪大学)）

2B07-04　大腸菌によるルテイン高生産システムの開発
○竹村 美保[1]，久保 亜希子[2]，渡邉 あすか[1]，作野 華誉[1]，美濃部 侑香[1]，佐原 健彦[3]，村田 昌浩[4]，荒木 通啓[4]，原田 尚志[5]，寺田 喜信[2]，矢追 克郎[3]，大段 光司[2]，三沢 典彦[1]（[1]石川県大，[2]グリコ(株)，[3]産総研，[4]京大医，[5]鳥取大工）

2B07-05　ポリグルタミン酸を生産する野生バチルス科細菌の探索
○佐藤 涼香，杉山 健二郎，油井 信弘，藤井 克彦 （工学院大学工学研究科化学応用学専攻）

2B07-06　放線菌由来のポリ(γ -L- ジアミノ酪酸)の構造解析と抗菌活性
○佐々木 摩帆[1]，吉田 修[1]，星山 貴文[1]，松井 旺大[1]，山中 一也[2]，竹原 宗範[1] （[1]滋賀県大工，[2]関西大化学生命工）

2B07-07　発酵食品に由来するポリアミン高産生菌 *Staphylococcus epidermidis* FB146 のポリアミン関連遺伝子の同定
○白澤 秀斗[1]，西山 知里[2]，平野 里佳[1,2]，小柳 喬[2]，奥田 修二郎[3]，高木 宏樹[2]，栗原 新[1] （[1]近畿大生物理工，[2]石川県大生資環，[3]新潟大医）

2B07-08　インゲンマメ類のキノコ発酵とその解析
○古橋 多聞，澤田 雄太，武田 昂大，齋藤 実奈，佐藤 利次 （北見工大・食品科学）

2B07-09　ヒアルロン酸発酵条件のスケールダウン検討
○成田 琴美，井上 和幸，宮本 哲也，武内 章 （キユーピー(株)）

2B07-10　泡盛蒸留粕を用いた可溶性紅麹色素の産生条件とその性質
○喜屋武 大誠，橘 信二郎 （琉大農）

2B07-11　乳酸菌とギ酸の併用による泡盛蒸留粕発酵飼料の開発
○新城 海聖[1]，伊村 嘉美[1]，高安 高治[2]，平良 東紀[1]，上地 敬子[1]（[1]琉大院・農，[2]金城ミート）

2B07-12　紅麹抽出物による前処理は CHO 細胞のコレラ毒素に対する感受性を変化させる
○金城 麗菜[1,2]，橘 信二郎[1,2] （[1]琉球大学，[2]農芸化学）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

微生物―物質生産 - 微生物変換，酵素反応，機能性高分子

2B09-01　コリネ型細菌における RNA 分解酵素によるリジン生合成経路遺伝子の発現制御解析
岡林 寿咲[2]，○田中 裕也[1]，乾 将行[1,2] （[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

2B09-02　コリネ型細菌による *cis,cis*- ムコン酸の生産
○小林 淳平[1]，須田 雅子[1]，平賀 和三[1]，乾 将行[1,2] （[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

2B09-03　コリネ型細菌によるイソプレン生産
○横野 里佳[1,2]，Theresia Natalia Maria[2]，猿谷 直紀[2]，須田 雅子[2]，平賀 和三[2]，乾 将行[2] （[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

2B09-04　*Fusarium* sp. No. 17 株由来のアクリル酸水和酵素の遺伝子発現系の構築
○中西 由芽，柳川 顕秀，堀部 優太，三浦 夏子，片岡 道彦 （阪府大院・生環科・応生科）

2B09-05　組換え大腸菌におけるグリコール酸生産性の向上をもたらす lactaldehyde reductase 遺伝子の塩基置換
○村主 渉[1]，山田 美和[1,2] （[1]岩手大院・総合科学，[2]岩手大・農）

2B09-06　*Acinetobacter baylyi* 由来ペリプラズム型デヒドロシキミ酸脱水酵素の異種発現とプロトカテク酸生産への利用
○永木 翔[1]，松谷 峰之介[2]，片岡 尚也[1,3,4]，松下 一信[1,3,4]，薬師 寿治[1,3,4] （[1]山口大院創成科学，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]山口大農，[4]山口大中高温微セ）

2B09-07　大腸菌へのニトロゲナーゼ活性の付与に向けた検討
○早川 紗和子，本田 裕樹，藤井 浩 （奈良女子大理）

2B09-08　有機溶媒耐性 *Kocuria* 属細菌の代謝改変およびカロテノイド類生産
○戸田 弘，小野木 奈々 （富山県大生医工研セ）

2B09-09　好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株におけるケラチン分解性プロテアーゼ(MrH_0874)のリクルート解析
○高岡 菜都美，渡部 邦彦 （京府大院・生命環境）

2B09-10　シアノバクテリアー酵母を用いたストリゴラクトンの効率的生産プラットフォームの構築
○坂巻 裕[1]，高市 真一[2]，梅野 太輔[3]，千葉櫻 拓[1]，伊藤 晋作[1]，渡辺 智[1] （[1]東京農大・バイオ，[2]東京農大・分子微生物，[3]早稲田大・応用科学）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―代謝 - 発酵生理，代謝調節

2C03-01　エタノール発酵性に関与する清酒酵母型遺伝子の解析
○金井 宗良[1]，柴田 智子[1]，森本 朋子[1]，水沼 正樹[2]，渡辺 大輔[3]，赤尾 健[1,2] （[1]酒総研，[2]広島大院・統合生命，[3]奈良先端大）

2C03-02　C_1 酵母 *Komagataella phaffii* TK3 株の高メタノール環境適応メカニズムの解明
○疋田 慶史[1]，大島 悠輔[2]，川瀬 貴斗[2]，菊川 寛史[3]，柳瀬 笑子[1,2]，島田 昌也[1,2]，早川 享志[1,2]，中川 智行[1,2] （[1]岐阜大応生，[2]岐阜大院自然科学，[3]静岡県大食品栄養科学）

2C03-03　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸発酵時におけるエタノール・グルコース資化に関する代謝調節機構の解明
○松尾 弥俊[1]，小林 聖弥[1]，松谷 峰之介[2]，鈴木 敏弘[1]，石川 森夫[1]（[1]東農大院・醸造，[2]東農大ゲノム解析セ）

2C03-04　高温酢酸発酵におけるストレス耐性と膜小胞生成
○松下 一信[1,2,3]，水町 優希[2]，片岡 尚也[1,2,3]，薬師 寿治[1,2,3] （[1]山口大農，[2]山口大院創成科，[3]山口大中高温微セ）

2C03-05　プロパン資化性細菌 Gordonia sp. TY-5 株における C1 代謝と発現制御
○木田 航平，岩崎 光司，由里本 博也，阪井 康能 （京大農）

2C03-06　グルコース応答を介したプロリン資化抑制機構の解析
○市川 和希，中澤 颯，西村 明，高木 博史 （奈良先端大・バイオ）

2C03-07　大腸菌エネルギー獲得代謝切り替えにおけるリポ酸化修飾を介した 2- オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）の活性化機構
○上原 幹[1]，田中 寛[2,3] （[1]東京工業大学生命理工学院生命理工学系，[2]東京工業大学生命理工学研究科，[3]東京工業大学化学生命科学研究所）

2C03-08　分裂酵母の転写因子の高発現とキノン骨格基質の添加による CoQ 生合成への影響の解析
○高塚 こまち[1]，角 陽香[2]，松浦 啓太[2]，柳井 良太[2]，西原 昇瑚[2]，戒能 智宏[1,2,3]，川向 誠[1,2,3] （[1]島根大院・自然科学，[2]島根大・生資科，[3]島根大・農生命系）

2C03-09　シアノバクテリアの集光アンテナ色素改変による利用光波長の拡張
○佐藤 瑞穂[1]，川口 毅[1]，前田 海成[1]，渡辺 麻衣[2]，成川 礼[3]，池内 昌彦[4]，渡辺 智[1] （[1]東京農大バイオ，[2]フライブルク大，[3]東京都立大，[4]東京大学生命環境科学系）

ミーティングルーム C 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

微生物―代謝 - 代謝経路，メタボローム

2C05-01　カテキンの腸内微生物による代謝
○藤井 裕大[1]，宮尾 歩実[1]，橋本 義輝[1,2]，熊野 匠人[1,2]，小林 達彦[1,2] （[1]筑波大生命，[2]MiCS）

2C05-02　ヒト腸管モデルにおけるシンバイオティクスのトリプトファン代謝産物産生亢進作用
○堀米 綾子，橋倉 那波，村上 隆太，桜井 琢磨，戸田 一弥，清水 金忠，小田巻 俊孝 （森永乳業株式会社　研究本部　基礎研究所）

2C05-03　腸内細菌によるカテキン代謝
○小綿 彗莉[1]，宮尾 歩実[1]，橋本 義輝[1,2]，熊野 匠人[1,2]，小林 達彦[1,2] （[1]筑波大生命，[2]MiCS）

2C05-04　食品産業酵母の形質に関与する脂質分子の網羅解析
小森 柊花[1]，○岡橋 伸幸[1,2,3]，遠山 敦彦[4]，飯田 順子[2,4]，松田 史生[1,2,3] （[1]阪大情報，[2]阪大島津協働研，[3]阪大先導研，[4]島津）

2C05-05　*Bifidobacterium longum* 105-A のシステイン / メチオニン代謝に関与する酵素遺伝子の同定
○宮森 那知[1]，松本 菜々恵[1]，吹谷 智[1]，横田 篤[1]，和田 大[2] （[1]北大院農，[2]摂南大農）

2C05-06　胡椒由来アルカロイド分解微生物によるユニークな代謝
○JIAN PU[1]，木村 澪[1]，栗崎 誠[1]，橋本 義輝[1,2]，熊野 匠人[1,2]，小林 達彦[1,2] （[1]筑波大生命，[2]MiCS）

2C05-07　C- 配糖体代謝酵素の機能および結晶構造解析
○熊野 匠人[1,2]，渡辺 聖実[1]，堀 早苗[1]，寺下 柚子[1]，森 貴裕[3]，何 海兵[3]，千田 美紀[4]，橋本 義輝[1,2]，千田 俊哉[4]，阿部 郁朗[3]，小林 達彦[1,2] （[1]筑波大生命，[2]MiCS，[3]東大院薬，[4]高エネ機構物構研構造生物）

2C05-08　セサミン代謝微生物の生産する新規代謝産物
○西岡 悠輝[1]，岡崎 紗英[1]，ZHOU Shuo[1]，斉藤 礼華[1]，橋本 義輝[1,2]，熊野 匠人[1,2]，小林 達彦[1,2] （[1]筑波大生命，[2]MiCS）

2C05-09　昆虫腸内からのセサミン代謝微生物の単離
○河股 純仁[1]，橋本 義輝[1,2]，熊野 匠人[1,2]，小林 達彦[1,2] （[1]筑波大生命，[2]MiCS）

ミーティングルーム C 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

酵素―糖質代謝関連酵素

2C06-01　酵母 split-ubiquitin システムによるヒト・ドリコールリン酸マンノース合成酵素（hDPMS）に関する物理的相互作用のスワッピング解析
○大城 理樹，寺島 幸希，高橋 哲夫 （東海大工生命化学）

2C06-02　ヒト・ドリコールリン酸グルコース合成酵素 hDPGS との物理的相互作用に重要な複数酵素における領域の限定
○寺島 幸希，大城 理樹，細谷 海咲，高橋 哲夫 （東海大・工・生命化学）

2C06-03　酵母 split-ubiquitin システムを利用したヒト MPDU1 に関する物理的相互作用の変異解析
○高橋 哲夫，傳能 康成，岩本 栄介 （東海大工）

2C06-04　*Enterococcus faecalis* 由来 GH31 α -*N*- アセチルガラクトサミニダーゼと基質との複合体構造解析
○宮崎 剛亜[1,2]，池谷 真里奈[2]，Alonso-Gil Santiago[3] （[1]静大・グリーン科技研，[2]静大・創造院・バイオサイエンス，[3]ウィーン大・マックスペルーツ研）

2C06-05　GH65 α -1,2- グルコシダーゼとグルコシダーゼ阻害剤の複合体構造解析
○中村 駿太郎[1]，朴 龍洙[1,2]，宮崎 剛亜[1,2] （[1]静大・創造院・バイオサイエンス，[2]静大・グリーン科技研）

2C06-06　糖質加水分解酵素ファミリー 31 に属するα -1,3- グルコシダーゼの構造と基質特異性の相関の解析
○池谷 真里奈[1]，朴 龍洙[1,2]，宮崎 剛亜[1,2] （[1]静大・創造院・バイオサイエンス，[2]静大・グリーン科技研）

2C06-07　3- ケトグルコシドのアルカリ条件下で生じる 340 nm 吸光に関わる分子種の同定
高野 亜優[1]，山川 凱生[2]，伏信 進矢[3]，吉田 信行[4]，○北岡 本光[1] （[1]新潟大・農，[2]東大・農，[3]東大院・農生科，[4]静大院・総合科技）

2C06-08　脱皮に関連した陸ガニ由来キチナーゼの解析
○三宅 克英，永倉 佑真 （名城大理工）

2C06-09　バイオエタノール生産を目指したキシリトール脱水素酵素の構造生物学的解析
○吉原 健太郎[1]，渡辺 誠也[1,2]，渡邊 康紀[3] （[1]愛媛大院農，[2]愛媛大沿岸環境科研セ，[3]山形大理）

2C06-10　*Paenibacillus borealis* 由来新規酵素 4-*O*- β -D- グルコシル -L- フコースホスホリラーゼの同定
○佐田 俊[1]，仁平 高則[2]，北岡 本光[1]，中井 博之[1] （[1]新潟大院自然，[2]新潟大農）

2C06-11　ヘテロ二量体構造を有する新規ヒアルロン酸リアーゼ
○増沢 望[1]，毛利 智海[1]，中西 優太[1]，近藤 敬子[2]，片平 正人[2]，武田 穣[1] （[1]横国大工，[2]京大エネ研）

ミーティングルーム C 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

酵素―糖質代謝関連酵素

2C08-01　*Bacillus halosaccharovorans* 由来 β - アミラーゼの熱安定性の増強
○前田 泰輝，田中 真奈，谷 修治，炭谷 順一，川口 剛士 （府大農）

2C08-02　好酸性アーケア *Thermoplasma volcanium* GH15 トレハラーゼの立体構造解析
○横山 紘平[1]，宮坂 祐希[1]，小薗 拓馬[1]，西河 淳[1]，酒匂 拓海[2]，坂口 政吉[2]，殿塚 隆史[1] （[1]東京農工大学院農，[2]工学院大先進工生命化学）

2C08-03　ミツバチ腸内細菌 *Frischella perrara* GH32 β - フルクトフラノシダーゼの基質選択性の改変
○窪田 有紗[1]，川合 礼華[1]，松浦 明香[1]，小薗 拓馬[1]，西河 淳[1]，藤井 匡[2]，栃尾 巧[2]，殿塚 隆史[1]（[1]東京農工大学院農，[2]物産フードサイエンス研究開発センター）

2C08-04　単糖異性化酵素の平衡における有機ゲルマニウム Ge-132 の影響
○永田 洋也[1]，森本 兼司[2]（[1]香川大院農，[2]香川大国際希少糖）

2C08-05　ヒト腸内細菌 *Phocaeicola plebeius* のキシラナーゼの解析
○辻 省吾[1]，林 秀謙[1,2]（[1]前工大院工，[2]前工大工）

2C08-06　*Microdochium nivale* 由来 GH55 ラミナリナーゼによるラミナリン分解機構の解明
○太田 智也[1]，佐分利 亘[1]，今場 司朗[2]，ジュウェル リンダ[3]，シャン トム[4]，今井 亮三[2]，森 春英[1]（[1]北大院農，[2]農研機構，[3]カナダ農務省，[4]ゲルフ大）

2C08-07　*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KT13 のマンナナーゼ複合体の解析
○岡村 侑紀[1]，林 秀謙[1,2]（[1]前工大院工，[2]前工大工）

2C08-08　糖転移能向上を目指した *Paenibacillus* sp. が生産するガラクトオリゴ糖高生産酵素の変異導入
○尾髙 伶，佐野 涼子，馬場 将弘（合同酒精）

2C08-09　好熱菌由来アセチルキシランエステラーゼの触媒反応と基質認識に関する機能解析
○武田 悠杜[1]，佐々本 康平[2,3]，下澤 勇弥[2,3]，氷見山 幹基[3]，森芳 邦彦[4]，大本 貴士[4]，上垣 浩一[5]，西矢 芳昭[1,2]，中村 努[3]（[1]摂南大理工，[2]摂南大院理工，[3]産総研，[4]大阪産技研，[5]近大農）

2C08-10　*Clostridium cellulovorans* が生産するマンナナーゼ A とセルロソーム骨格タンパク質 CbpC の相互作用解析
○柴田 奈緒美，三宅 英雄（三重大院生資）

2C08-11　細菌由来推定 GH2 β - ガラクトシダーゼの牛乳中乳糖の分解特性の解析
○奥野 剛基[1]，佐分利 亘[1]，尾髙 伶[2]，馬場 将弘[2]，森 春英[1]（[1]北大院農，[2]合同酒精）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

環境科学・バイオマス利用―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質 / 資源変換，資源再生利用

2D02-01　安定的な国際標準試験法の構築に向けた実海域における生分解性プラスチック付着菌叢の季節変動の調査
○三浦 隆匡[1]，島村 麻美子[1]，臼井 絵里香[1]，森 美穂子[1]，内野 佳仁[1]，山口 薫[1]，笠石 里江子[1]，森 知里[1]，寺尾 拓馬[1]，日高 晧平[1]，齋藤 祐介[2]，山田 美和[2]，加藤 太一郎[3]，吉田 真明[4]，植木 龍也[5]，田川 訓史[5]，木下 浩[1]，髙橋 幹男[1]，紙野 圭[1]（[1]製品評価技術基盤機構，[2]岩手大，[3]鹿児島大，[4]島根大，[5]広島大）

2D02-02　実海域に浸漬した生分解性プラスチックナイロン 4 における付着菌叢の解析
○齋藤 祐介[1]，三浦 隆匡[2]，山口 薫[2]，紙野 圭[2]，山田 美和[1]（[1]岩大農，[2]NITE・NBRC）

2D02-03　光刺激応答性バイオナイロンの海洋生分解性評価および分解性微生物の特定
○若井 暁[1,2]，塚谷 京[1]，西風 隆司[3]，山崎 雄三[3]，磯部 紀之[4]，野牧 秀隆[1]，Asif Ali Mohammad[5]，金子 達雄[5]（[1]海洋研・超先鋭，[2]JST・さきがけ，[3]島津製作所，[4]海洋研・海洋機能，[5]北陸先端大・環境エネ）

2D02-04　麹菌 *Aspergillus oryzae* による PET 分解酵素の異種発現
○戸所 健彦[1]，伊出 健太郎[1]，南 はつね[2]，河野 恵美[2]，小高 敦史[1]，吉田 昭介[2]，石田 博樹[1]（[1]月桂冠・総研，[2]奈良先端大・バイオ）

2D02-05　LC/MS/MS を用いた生分解性プラスチック分解物分析による海洋微生物のプラスチック分解様式の解析
○寺尾 拓馬，森 美穂子，島村 麻美子，内野 佳仁，山口 薫，三浦 隆匡，日高 皓平，臼井 絵里香，笠石 里江子，森 知里，木下 浩，髙橋 幹男，紙野 圭（NITE・NBRC）

2D02-06　ミルワーム腸内細菌によるプラスチック分解
○増田 映旗[1,2]，鈴木 研志[3,4]，三條場 千寿[3]，後藤 康之[3]，野尻 秀昭[4,5]（[1]城北高等学校，[2]東大GSC，[3]東大院・農生科，[4]東大・CRIIM，[5]東大院 農生科・アグテック）

2D02-07　脂肪族ポリエステルの生分解性の迅速評価法に関する研究
○高屋 朋彰，江田 脩真，田谷 明香，西井 圭（小山高専・物質）

2D02-08　大気及び土壌中の酸化亜鉛ナノ粒子が引き起こす菌叢変化と食物連鎖内の毒性の解析
○正田 幸太郎[1]，倉橋 健介[2]，徳本 勇人[1]（[1]阪府大院理，[2]阪府大高専）

2D02-09　活性酸素種を指標に用いた線虫の金属耐性機構の網羅的解析
○遠藤 悠衣[1]，倉橋 健介[2]，徳本 勇人[1]（[1]大阪府立大学院，[2]大阪府立大学工業高等専門学校）

2D02-10　キトサンナノファイバーヒドロゲルによる金属の吸着と金，パラジウムの回収
○岩本 博行[1]，深光 純弥[1]，織田 楓[1]，立神 翔太[1]，新田 祥子[2]（[1]福山大生命工，[2]福山大GSC）

2D02-11　金ナノ粒子の生成に関与する微生物の生体分子に関する研究
○唐 冬林[1]，加藤 由悟[1]，安藤 司[2]，亀田 学[2]，鈴木 道生[1]（[1]東大院農，[2](株)ジパング）

2D02-12　アオイソメとフタホシコオロギの下顎における亜鉛濃集について
○柏原 亘[1]，飯島 まゆみ[1]，加藤 由悟[1]，根岸 瑠美[2]，前川 優[3]，佐々木 猛智[3]，武田 志乃[6]，保倉 明子[5]，永田 晋治[4]，鈴木 道生[1]（[1]東大院農，[2]東大定量研，[3]東大総合研究博物館，[4]東大院創域，[5]東京電機大工，[6]量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

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

2D04-01　廃鉱山から単離した鉛耐性微生物による鉛回収と鉛ナノ化機構の解明
○加藤 由悟[1]，山本 俊義[1]，木村 聡[1]，根岸 瑠美[2]，胡桃坂 仁志[2]，小暮 敏博[3]，鈴木 道生[1,4]（[1]東大院農，[2]東大定量研，[3]東大院理，[4]東大微生物連携機構）

2D04-02　X線吸収分光法を用いたオオカナダモ（*Egeria densa*）に集積する Mn の化学形態調査
○原田 英美子[1]，奥井 啓介[1]，東 友夢[1]，田中 佐和[1]，水田 洋一[2]，保倉 明子[3]（[1]滋賀県大・環境科学，[2]ヴィトロプランツ，[3]東京電機大・工）

2D04-03　紅藻類ツルシラモの成長と栄養塩吸収への水温の影響
○末次 桃子[1]，黒須 泰行[1]，本間 悠里[1]，小比賀 秀樹[2]，垣田 浩孝[1]（[1]日大院・総合基，[2]産総研・健康工学）

2D04-04　培養槽壁面に付着する微細藻類の観察（第１報：レースウェイ式培養槽の場合）
○大橋 弘明[1]，森野 魁人[2]，逢坂 竜之介[3]，酒井 祐介[3]，城山 真恵加[3]，植田 芳昭[2]（[1]摂南大院理工，[2]摂南大理工，[3]株式会社熊谷組）

2D04-05　培養槽壁面に付着する微細藻類の観察（第２報：オイル塗布による付着低減）
○逢坂 竜之介[1]，酒井 祐介[1]，城山 真恵加[1]，大橋 弘明[2]，
植田 芳昭[3]　([1]株式会社熊谷組，[2]摂南大院理工，[3]摂南大理工)

2D04-06　単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における TOR シグナル経路によるスターチ分解制御機構の解明
○小宮 聡太[1]，パンチャ イムラン[1,2]，高谷 和宏[3]，田中 寛[1]，
今村 壮輔[1,3]　([1]東工大生命，[2]SRM大，[3]NTT宇宙環境研)

2D04-07　細菌によるブルーカーボン・レアメタル含有褐藻類の高度利用
○中辻 早希子[1]，日尾 守[2]，髙瀬 隆一[1]，渡辺 大輔[3]，橋本 渉[1]
([1]京大院・農，[2]京大・農，[3]奈良先端大・バイオ)

2D04-08　ユーグレナワックスエステル合成系におけるミトコンドリア補酵素変換の重要性
○中澤 昌美[1]，髙橋 夢月[1]，柏山 祐一郎[2]，乾 博[1]，上田 光宏[1]，
阪本 龍司[1]　([1]阪府大生命，[2]福井工大工)

2D04-09　代謝改変した油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* によるブルーカーボンアルギン酸からの油脂生産
森 大輔[1]，橋本 渉[2]，○河井 重幸[1]　([1]石川県大，[2]京大農)

2D04-10　油脂酵母　*Lipomyces starkeyi*　を用いた食用代替パーム油の開発
○三根 健太郎[1]，高城 博也[1]，小倉 治朗[1]，相部 かおり[1]，島 隆[1]，
池上 香織[1]，佐藤 里佳子[2]，高久 洋暁[2]　([1]日清食品HD(株) グローバルイノベーション研究センター，[2]新潟薬大・応生科)

2D04-11　油糧酵母による廃グリセロールからの脂質生産
○吉本 真[1]，梶浦 裕之[2]，三﨑 亮[2]，藤山 和仁[2]　([1]阪大院工，[2]阪大生国セ)

2D04-12　油脂生産酵母 Lipomyces starkeyi の脂質生産に及ぼす糖および金属イオンの影響
○河村 駿，星田 尚司，赤田 倫治　(山口大創)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他

2D07-01　NMR 分光法によるバクテリオファージφ X174 スパイクタンパク質とレセプター糖鎖の相互作用解析
○松澤 朋生，篠田 知奈美，増田 裕一，稲垣 穣　(三重大院生資)

2D07-02　RSLs ミセルサイズに着目した細胞毒性の解析
○齋藤 里花子[1]，平田 圭亮[1]，
モハメッド モハメッド　シェイク[1,2]，中島 義賢[3]，前川 透[1,2]，
水木 徹[1,2]　([1]東洋大院　学際・融合，[2]東洋大　BNERC，[3]阪大INSD)

2D07-03　ドリコールピロリン酸結合型糖鎖を追跡する膜反応場の構築を目指した UDP-GlcNAc プローブの合成
○佐野 加苗[1]，菊間 隆志[1]，高橋 諭[2]，石井 希実[2]，松尾 一郎[2]，
武田 陽一[1]　([1]立命館大学 生命科学部，[2]群馬大学大学院 理工学府)

2D07-04　GalNAc 側鎖を有する哺乳動物 GPI の全合成研究
○平塚 諒大[1]，田中 秀則[2,3]，浜島 将伍[1,2]，河村 奈緒子[3]，
今村 彰宏[1,2,3]，石田 秀治[1,2,3,4]，安藤 弘宗[2,3]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大院・連合農学，[3]岐阜大・iGCORE，[4]岐阜大・G-CHAIN)

2D07-05　Rbo5P-3GalNAc の系統的合成と FKRP による Rbo5P 付加
○田村 純一[1]，田村 敬裕[1]，永瀬 真央[2]，真鍋 法義[2]，大野 詩歩[2]，
星野 駿介[3]，山口 芳樹[2]，萬谷 博[3]，遠藤 玉夫[3]　([1]鳥取大院・連大農，[2]東北医科薬科大・薬，[3]都健康長寿研・分子機構)

2D07-06　ENGase の触媒機構に基づく糖鎖型阻害剤の合成
○石井 希実，佐藤 樹，高橋 諭，松尾 一郎　(群馬大院理工)

2D07-07　大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明を目的とした糖脂質 MPIase 類縁体の合成
○藤川 紘樹[1]，大澤 月穂[1]，西山 賢一[2]，島本 啓子[1]　([1](公財)サントリー生科財，[2]岩手大農)

2D07-08　タンパク質膜挿入に関与する糖脂質 MPIase の化学合成類縁体を用いた構造機能解析
○韓 裕晶[1]，藤川 紘樹[2]，大澤 月穂[2]，村本 真規[1]，島本 啓子[2]，
西山 賢一[1]　([1]岩手大農，[2]公益財団法人サントリー生命科学財団)

2D07-09　ルイス a 抗原含有型および液胞型植物抗原性糖鎖ポリマーの合成と樹状細胞の抗原提示抑制解析
○蓮井 泉帆，木村 吉伸，前田 恵　(岡大環境生命)

2D07-10　ミクログリア細胞にヒト特異的な発現をする Siglec-11 の解析
○羽根 正弥[1,2,3,4]，北島 健[1,2,3]，佐藤 ちひろ[1,2,3]，ヴァルキ アジト[4]
([1]名大・糖鎖生命コア，[2]名大院・生命農，[3]名大・生物機能セ，[4]UCSD，CMM)

2D07-11　架橋部ハロゲン置換が二環性シアル酸供与体の反応性にもたらす効果の検証
○安武 作真[1]，河村 奈緒子[2]，宇田川 太郎[3]，田中 秀則[2]，
今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2,4]，安藤 弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・iGCORE，[3]岐阜大・工，[4]岐阜大・G-CHAIN)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

生物科学―タンパク質・ペプチド科学 - 構造，機能，その他

2D09-01　細胞評価及び動物行動試験評価を用いた新規塩味ペプチドの発見
○竹内 友里，池田 彩，秋山 裕和，清水 一憲，本多 裕之　(名大院工)

2D09-02　シリカゲル吸脱着法による米タンパク質由来抗菌ペプチドの迅速探索
○本多 裕之[1]，羽川 瞳[1]，今井 健人[1]，谷口 正之[2]，秋山 裕和[1]，
清水 一憲[1]　([1]名大工，[2]新潟青陵大)

2D09-03　ヒトとそのオルソログが有する cathelicidin ファミリー抗菌ペプチドに対する NMR 法を用いた構造・機能解析のための新規カルモジュリン融合発現系による大量発現
○柴垣 光希[1]，上田 和佳[1]，加納 康平[2]，谷 昊[2]，相沢 智康[3]　([1]北海道大理，[2]北海道大院生命科学，[3]北海道大院先端生命科学)

2D09-04　ε -poly-L-lysine による CPP 修飾タンパク質の細胞内送達促進
○武内 大和，長谷部 文人，丸山 千登勢，濱野 吉十　(福井県大院生物資源)

2D09-05　ペプチド抗原タグ付き一本鎖 Fv 抗体の発現と構造機能解析
○織田 昌幸，林 隆宏　(京府大院生環)

2D09-06　バイオミネラルタンパク質の low complexity region の構造，機能解析
○二川 慶[1]，森岡 太一[1]，池谷 鉄兵[2]，降旗 一夫[1]，渡辺 裕之[1]，
永田 宏次[1]，鈴木 道生[1]　([1]東大農，[2]東京都立大院理)

2D09-07　溶液散乱法によるダイズ種子貯蔵タンパク質の構造解析
○奥田 綾，佐藤 信浩，守島 健，井上 倫太郎，清水 将裕，
柚木 康弘，杉山 正明，裏出 令子　(京大複合研)

2D09-08　麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の微細な表面構造観察
○高橋 尚央[1]，寺内 裕貴[2]，吉見 啓[3]，田中 拓未[4]，三ツ石 方也[5]，
石崎 裕也[5]，藪 浩[6,7]，阿部 敬悦[8]　([1]東北大農，[2]京大院地球環境学堂，[3]京大院農，[4]農研機構，[5]東北大院工，[6]東北大AIMR，[7]東北大多元，[8]東北大院農)

2D09-09　細菌由来糖質加水分解酵素の FnIII ドメインの物性解析
○太田垣 太朗[1]，鈴木 一史[1,2]，杉本 華幸[1]　([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・日本酒学センター)

2D09-10　結晶構造解析と組み合わせた X 線吸収分光法による低温適応無機ピロホスファターゼの触媒反応機構の解明
○丸岡 早紀[1]，馬込 栄輔[2]，瀬戸山 寛之[2]，河本 正秀[2]，
堀谷 正樹[1]，渡邉 啓一[1,3]　([1]佐大農，[2]SAGA-LS，[3]九州栄養福祉大)

2D09-11　アクチノロージン結合タンパク質の結晶化
○深澤 茉愛[1]，長安 伶奈[1]，西山 辰也[1]，富田 武郎[2,3]，西山 真[2,3]，上田 賢志[1]　([1]日大生資科，[2]東大・院農生科，[3]東大・微生物連携機構)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

有機化学，天然物化学―単離構造決定（微生物）

2E01-01　ニガクリタケ(*Hypholoma fasciculare*)子実体由来の生物活性物質の探索
○王 俊紅[1]，呉 静[2]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2E01-02　キナメツムタケ(*Pholiota spumosa*)子実体由来の生体機能性物質の探索
○池尾 太良[1]，呉 静[2]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2E01-03　ヒメマツタケ *Agaricus blazei* 菌糸体由来の生物活性物質の探索
○呉 静[1]，小椋 隆平[2]，小堀 一[3]，多田 有人[3]，池田 豊[3]，崔 宰熏[1,2,4]，平井 浩文[1,2,4]，河岸 洋和[1,2,4]　([1]静大・グリーン研，[2]静大院・総合農，[3]岩出菌学研究所，[4]静大院・創造)

2E01-04　*Daedaleopsis tricolor* の生産するシクロフムラノイド (3)
○金原 龍飛[1]，殿内 暁夫[1]，紺野 勝弘[2]，越野 広雪[3]，橋本 勝[1]　([1]弘前大農生，[2]富山大和漢研，[3]理研SCRS)

2E01-05　水生菌 *Neohelicascus aquaticus* KT4120 から単離した Sesquikarahanadienone 類について
○早坂 絢音[1]，橋本 和樹[1]，紺野 勝弘[2]，田中 和明[1]，橋本 勝[1]　([1]弘前大農生，[2]富山大和漢研)

2E01-06　抗 B 型肝炎ウイルス活性を示す vanitaracin A の絶対配置決定
○紙透 伸治[1,2]，柴崎 久宣[1]，芦川 広大[1]，菅野 和紀[1]，村上 裕信[1,2]，藤野 寛[1,2]，渡士 幸一[3,4,5]，菅原 二三男[5]，倉持 幸司[5]　([1]麻布大獣医，[2]麻布大ヒトと動物の共生科学センター，[3]感染研治療薬・ワクチン開発研究センター，[4]感染研ウイルス第二部，[5]東理大理工)

2E01-07　*cayG* 導入による *Pseudomonas protegens* Cab57 株における caryoynencin 類の高生産
○末永 真友菜，片山 直香，甲斐 建次　(阪府大院・生命環境)

2E01-08　キシメジ属キノコに含まれる生物活性物質の化学的研究
○大場 由美子[1]，中村 有里[2]，呉 静[3]，浦井 誠[2]，冨澤 元博[2]，河岸 洋和[1,3,4]，橋本 貴美子[2]　([1]静大院・創造，[2]東農大・生命，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・総合農)

2E01-09　ヤマブシタケ(*Hericium erinaceus*)の fruiting liquid 由来の生物活性物質の探索
○吉川 蒼人[1]，呉 静[2]，近藤 満[2,3]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大・農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2E01-10　昆虫の腸管由来担子菌酵母からの新規化合物の探索
○近藤 直純[1]，酒井 一成[1,2]，君嶋 葵[1,2]，岩月 正人[1,2]，野中 健一[1,2]，浅見 行弘[1,2]　([1]北里大院感染制御，[2]北里大大村研)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

有機化学，天然物化学―単離構造決定（微生物）/ 単離構造決定（動物，植物）

2E03-01　新規微生物資源 *Tumebacillus* からの新規二次代謝産物の探索
○菊池 雄太[1]，川島 未来[2]，岩月 正人[1,3]，君嶋 葵[1,3]，堤 隼馬[1,3]，浅見 行弘[1,3]，稲橋 佑起[1,3]　([1]北里大院 感染制御科学府，[2]北里大理学部化学科，[3]北里大 大村研)

2E03-02　リゾチーム添加寒天培地より分離された希少放線菌 *Embleya* sp. K20-0267 が生産する新規物質 Emblestatin
○粟野 友太[1]，管藤 裕貴[1]，菊池 雄太[1]，君嶋 葵[1,2]，堤 隼馬[1,2]，岩月 正人[1,2]，浅見 行弘[1,2]，稲橋 佑起[1,2]　([1]北里大院　感染制御，[2]北里大　大村研)

2E03-03　菌寄生菌類を探索源とした抗真菌活性物質の探索
○渡邊 善洋[1,2]，高橋 周平[3]，吉田 百合香[3]，常盤 俊之[1]，稲橋 佑起[1,2]，穂苅 玲[1,2]，石山 亜紀[1,2]，石川 春樹[3]，伴 さやか[4]，知花 博治[4]，矢口 貴志[4]，野中 健一[1,2]，岩月 正人[1,2]　([1]北里大 感染制御，[2]北里大 大村研，[3]北里大 理，[4]千葉大 真菌医学)

2E03-04　好熱菌 *Meiothermus ruber* の主なカロテノイド：Deinoxanthin 配糖体エステル
○浅香 龍[1]，眞岡 孝至[2]，川﨑 信治[1]，高市 真一[1]　([1]東農大 分子微生物，[2]生産開発科研)

2E03-05　ジャガイモ水耕液からのジャガイモシストセンチュウに対する新規ふ化促進物質の同定
○清水 宏祐[1]，増田 裕貴[1]，岡村 勇哉[1]，小川 千景[1]，秋山 遼太[1]，渡辺 文太[2]，坂田 至[3]，串田 篤彦[3]，谷野 圭持[4]，杉本 幸裕[1]，水谷 正治[1]　([1]神戸大院農，[2]京大化研，[3]農研機構北農研，[4]北大院理)

2E03-06　ジャガイモシストセンチュウふ化促進物質の活性を増強する共力因子の解析
○小川 千景[1]，岡村 勇哉[1]，清水 宏祐[1]，坂田 至[2]，串田 篤彦[2]，谷野 圭持[3]，杉本 幸裕[1]，水谷 正治[1]　([1]神戸大院農，[2]農研機構北農研，[3]北大院理)

2E03-07　Undescribed dimeric and trimeric sesquiterpene phenols and a bicoumarin derivative isolated from the leaves of *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm.
○Ferry Ferdiansyah Sofian[1,2,3]，Anas Subarnas[3]，Mayuka Hakozaki[4]，Shota Uesugi[4]，Takuya Koseki[2]，Yoshihito Shiono[1,2]　([1]Iwate Univ.，[2]Yamagata Univ.，[3]Univ. Padjadjaran，[4]Iwate Biotech. Res. Center)

2E03-08　ニンジンの生産する新規非典型的ストリゴラクトンの同定
山本 裕起[1]，吉田 祐規[2]，謝 肖男[3]，○秋山 康紀[1]　([1]阪府大院・生命環境，[2]阪府大・生命環境，[3]宇都宮大・バイオ)

2E03-09　テトロドトキシン含有イモリ由来の新規三環性骨格を持つ 2 種のグアニジノ化合物
○工藤 雄大[1,2]，Charles T. Hanifin[3]，長 由扶子[2]，此木 敬一[2]，山下 まり[2]　([1]東北大学際研，[2]東北大院農，[3]ユタ州立大生物)

2E03-10　オアカムロ由来の HIF 阻害物質の探索
○下崎 康平[1]，呉 静[2]，正田 千穂[3]，三輪 幸裕[3]，二村 和視[4]，岡本 一利[4]，崔 宰熏[1,2,5]，平井 浩文[1,2,5]，栗原 俊英[3]，河岸 洋和[1,2,5]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]慶大医，[4]静岡県水産・海洋技術研，[5]静大院・創造)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

有機化学，天然物化学―単離構造決定（動物，植物）

2E05-01　*Buthacus leptochelys* サソリ毒液に含まれるジスルフィド結合を持つペプチドの単離と構造決定
○田中 柾人[1]，Mohammed Abdel-Wahab[2]，Moustafa Sarhan[2]，宮下 正弘[1]，中川 好秋[1]，宮川 恒[1]　([1]京大農，[2]Al-Azhar Univ.)

2E05-02　フェンネルに含まれるアカスジカメムシの吸汁刺激物質の同定
○野下 浩二，吉村 諒一朗　(秋田県大・生資科)

2E05-03　オオムギの根浸出物に含まれるストリゴラクトンの構造決定
○新井 菜摘[1]，米山 香織[2]，井上 美智[1]，内田 健一[3]，秋山 康紀[4]，謝 肖男[1]　([1]宇大農，[2]愛媛大農，[3]帝京大バイオ，[4]大阪府立大生命)

2E05-04　*N*-fatty acyl 5-hydroxytryptamines isolated from *Dialium corbisieri* Staner (Fabaceae)
○Atakuru Dradre[1,2]，Takuya Koseki[2]，Yoshihito Shiono[1,2]　([1]UGAS，Iwate Univ.，[2]Yamagata Univ.)

2E05-05　カテキン酸化反応における C 環 2 位の立体化学の影響
○坪井 未裕[1]，柳瀬 笑子[2]　([1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生)

2E05-06　プロシアニジン B4 の酸化反応における生成物の構造解析
○片岡 永[1]，柳瀬 笑子[1,2]　([1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生)

2E05-07　イネのインディカ亜種に特有のファイトアンティシピン
○倉田 尭直[1]，村田 晃一[1]，假谷 佳祐[2]，吉川 貴徳[3]，寺石 政義[3]，上野 琴巳[4]，石原 亨[4]　([1]鳥取大院持続性社会，[2]鳥取大学院連農，[3]京都大院農，[4]鳥取大農)

2E05-08　たもぎ茸エルゴチオネイン高純度試薬の開発
○中塚 進一，森 拓哉，松本 恵実　(長良サイエンス株式会社)

2E05-09　コセンダングサ由来のオカダンゴムシに対する忌避物質としてのフェルラ酸メチルの同定
○石田 雅司[1]，手林 慎一[1]，磯田 童奈[1]，阿部 晴希[1]，佐藤 正資[2]　([1]高知大農，[2]香川大農)

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

有機化学，天然物化学―生合成

2E06-01　ジャガイモシストセンチュウの孵化誘因物質
○渡邉 正悟，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

2E06-02　網羅的ゲノム解析によるシストセンチュウ孵化誘因物質 solanoeclepin A 生合成機構の解明
○岡本 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

2E06-03　シストセンチュウ孵化誘引物質 solanoeclepin A 生合成遺伝子の探索
○竹島 実加，岡本 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

2E06-04　*Nicotiana benthamiana* を宿主とする solanoeclepin A 推定生合成遺伝子の異宿主発現系の構築
○山本 泰誠[1,2]，岡本 拓実[1]，岸本 真治[1]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]アデノプリベント)

2E06-05　サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒淡水産藍藻における同定
○袴田 真有[1]，東海林 千容[1]，長 由扶子[1]，安達 栞菜[2]，石塚 颯[2]，工藤 雄大[1,3]，此木 敬一[1]，大島 泰克[4]，長澤 和夫[2]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東農工大院工，[3]東北大学際研，[4]東北大院生命)

2E06-06　渦鞭毛藻におけるサキシトキシン生合成酵素 SxtG の発現，局在及び活性の解析
○長 由扶子[1]，日出間 志寿[2]，大村 卓朗[3]，土屋 成輝[1]，小池 一彦[4]，此木 敬一[1]，大島 泰克[5]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]福島医大，[3]水圏科学，[4]広島大院統合生命，[5]東北大院生命)

2E06-07　異種発現環化酵素を用いた新規カイニン酸類縁体の調製
○山田 基生[1]，前野 優香理[1]，小瀧 裕一[2]，寺田 竜太[3]，工藤 雄大[1,4]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]福島学院大，[3]鹿児島大連合農，[4]東北大学際研)

2E06-08　トウガラシ属植物に含まれるカプシエイト生成における cinnamyl alcohol dehydrogenase の関与の証明
○大野 翔太朗[1]，佐野 香織[2]，橋本 雅司[2]，中谷 祥恵[1]，古旗 賢二[1]　([1]城西大院薬，[2]城西大理)

2E06-09　セイヨウチャヒキにおける avenaol 生合成前駆体としての 6-*epi*-heliolactone の同定
○森山 太介[1]，塩谷 七洋[2]，古里 優衣[1]，矢部 広暉[1]，若林 孝俊[1]，水谷 正治[1]，滝川 浩郷[2]，杉本 幸裕[1]　([1]神大院農，[2]東大院農)

2E06-10　SlCYP722C による 18-oxo-CLA の生成と非酵素的反応による orobanchol の BC 環形成
○本間 大翔[1]，若林 孝俊[1,2]，塩谷 七洋[3]，滝川 浩郷[2,3]，水谷 正治[1]，杉本 幸裕[1,2]　([1]神戸大農，[2]JST/JICA SATREPS，[3]東京大農)

2E06-11　細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における MPBD 及び dictyoquinone の構造活性相関
○本多 令奈[1]，ZULQAIDA Salma[2]，高谷 芳明[2]，齊藤 玉緒[1]　([1]上智大理工，[2]名城大薬)

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

有機化学，天然物化学―生合成

2E08-01　ヒメグルシンの骨格構築機構に関する研究
○廣川 瑞樹，森下 陽平，塚田 健人，菅原 章公，尾﨑 太郎，浅井 禎吾　(東北大薬)

2E08-02　疫病菌交配ホルモン α2 生合成遺伝子の探索
○今津 佑介，有吉 俊，田中 愛子，竹本 大吾，小鹿 一　(名大院・生命農)

2E08-03　マイコバクテリア由来新規 *Z,E* 混成型プレニル基還元酵素の機能解析
○阿部 透[1]，袴田 真理子[2]，西山 晃史[2]，立石 善隆[2]，松本 壮吉[2]，邊見 久[3]，上田 大次郎[1]，佐藤 努[1]　([1]新潟大院自然，[2]新潟大院医，[3]名大院生命農)

2E08-04　芳香族ポリケタイド yoropyrazone のスピロ環形成機構の *in vitro* 解析
○清藤 鈴奈[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)

2E08-05　空気酸化による ergosterol の構造多様化機構の解析
○難波 良太[1]，岸本 真治[1]，西川 俊夫[2]，及川 英秋[3]，河岸 洋和[4]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]名大院生命農，[3]北大院理，[4]静大グリーン研)

2E08-06　共生型子嚢菌 *Pyrenula* sp. 由来の pyrenulic acid 類の生合成研究
○伊藤 優衣[1]，佐藤 道大[1]，石塚 碧[1]，籠浦 倫美[1]，恒松 雄太[1]，竹仲 由希子[2]，棚橋 孝雄[2]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県立大薬，[2]神戸薬大)

2E08-07　I 型ポリケチド合成酵素ローディングモジュールにおけるケト合成酵素様脱炭酸酵素の機能構造解析
○千菅 太一，永井 瑛，宮永 顕正，工藤 史貴，江口 正　(東工大理)

2E08-08　I 型ポリケチド合成酵素ローディングモジュールにおけるケト合成酵素様脱炭酸酵素の変異体解析
○永井 瑛，千菅 太一，宮永 顕正，工藤 史貴，江口 正　(東工大理)

2E08-09　糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素の立体選択性に関する研究
○瀧野 純矢[1]，小谷 明里[1]，尾﨑 太郎[1]，Yu Jie[2]，Guo Yian[2]，Ye Tao[2]，南 篤志[1]，及川 英秋[1]　([1]北大院理，[2]北京大学深セン大学院)

2E08-10　糸状菌由来多機能性酵素の機能制御を目指した Thermolides の生合成研究 -1-
○小谷 明里，瀧野 純矢，尾﨑 太郎，南 篤志，及川 英秋　(北大院理)

2E08-11　Total biosynthesis of the highly modified indole diterpene Nudulisporic acids to generate structurally related analogs.
○Yaping Liu，Taro Ozaki，Atsushi Minami，Hideaki Oikawa　(Fac. Sci.，Hokkaido Univ.)

ミーティングルーム F 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

有機化学，天然物化学―生合成

2F02-01　真菌 *Eupenicillium ludwigii* 由来 PKS チオエステラーゼ ElbB の基質認識機構に関する構造解析
○小林 瑶平[1]，永田 隆平[1,2]，森下 陽平[3]，菅原 章公[3]，浅井 禎吾[3]，葛山 智久[1,4]　([1]東大院・農生科，[2]JSPS特別研究員 PD，[3]東北大院薬，[4]東大CRIIM)

2F02-02　ヒドロキサム酸基の生合成を担う酵素 TsnB9 の基質認識機構に関する研究
○永田 隆平[1,2]，西山 真[1,3]，葛山 智久[1,3]　([1]東大院・農生科，[2]学振特別研究員PD，[3]東大・CRIIM)

2F02-03　放線菌由来 1-azabicyclo[3.1.0]hexane 環含有化合物におけるアジリジン環合成機構の解明
○黒澤 董[1]，長谷部 文人[1]，岡村 仁則[1]，吉田 彩子[1,2]，富田 武郎[1,2]，滝川 浩郷[1]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]　([1]東大・農生科，[2]東大・微生物連携機構)

2F02-04　デカリン合成酵素の阻害剤同定と共結晶構造解析
○加藤 直樹[1,2]，藤山 敬介[3]，永野 真吾[3]，高橋 俊二[2]　([1]摂南大農，[2]理研CSRS，[3]鳥取大院工)

2F02-05　Reveromycin A 生合成酵素 RevKLM の in sillico 解析による相互作用予測と実験的検証
○岡村 英治[1]，佐藤(汐﨑) 裕美[1]，奥村 英夫[2]，熊坂 崇[2]，長田 裕之[1]，高橋 俊二[1]　([1]理研 CSRS，[2]高輝度光科学研究センター)

2F02-06　ClassIB テルペン合成酵素の基質 / マグネシウムイオン結合型立体構造を基にした変異酵素解析
○岩片 奨悟[1]，金本 壮平[2]，三木 邦夫[2]，深井 周也[2]，藤橋 雅宏[3]，品田 哲郎[4]，上田 大次郎[1]，佐藤 努[1]　([1]新潟大院自然，[2]京大院理，[3]大阪医薬大，[4]阪市大院理)

2F02-07　クラス IB テルペン合成酵素のゲノムマイニング
○大塚 生[1]，藤橋 雅宏[2]，品田 哲郎[3]，上田 大次郎[1]，佐藤 努[1]　([1]新潟大院自然，[2]阪医薬大，[3]阪市大院理)

2F02-08　立体構造に基づくアンブレイン合成酵素の触媒機構解析と構造安定化
○亀谷 太一[1]，久保田 智巳[2]，小山 裕彰[1]，山澤 友葉[1]，上田 大次郎[1]，品田 哲郎[3]，佐藤 努[1]　([1]新潟大院自然，[2]産総研，[3]阪市大院理)

2F02-09　二機能性トリテルペン / セスクアテルペン環化酵素におけるセスクアテルペン環化に重要なアミノ酸残基の解析
○船津 莉香[1]，鷹羽 優香[1]，品田 哲郎[2]，亀谷 太一[1]，久保田 智巳[3]，上田 大次郎[1]，佐藤 努[1]　([1]新潟大院自然，[2]阪市大院理，[3]産総研)

2F02-10　Functional characterization of a novel bifunctional drimenol synthase of bacterial origin: A step toward the discovery of drimane sesquiterpenes in bacteria
○Nhu Ngoc Quynh Vo[1]，Yuhta Nomura[2]，Kiyomi Kinugasa[1]，Hiroshi Takagi[1]，Yumi Shiozaki-Sato[1]，Shunji Takahashi[1]　([1]RIKEN CSRS，Nat. Prod. Biosynth.，[2]RIKEN CSRS，Biomol. Charact.)

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

有機化学，天然物化学―生合成

2F04-01　糸状菌 *Aspergillus lentulus* 由来新規化合物 lentopeptin A，B の生合成機構
○松原 有也，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

2F04-02　ベンゾフラン骨格を有する糸状菌由来天然物 fumimycin および lentofuranine の生合成研究
○南 歩実，渡邉 正悟，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大)

2F04-03　マレイマイシン類の生合成経路の解析
○曽根 祐輔[1]，Muhammad Prima PUTRA[1]，松田 研一[1]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構)

2F04-04　放線菌において AmCP を介して生産される新規天然化合物の探索と同定
○宮永 寛哉[1]，曽根 祐輔[1]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構)

2F04-05　放線菌由来β - カルボリン化合物キタセタリンの生合成機構の解明
○佐藤 克哉[1]，砂田 礼菜[1]，上田 祥平[1]，岡野 憲司[1,2]，本田 孝祐[1,2]，木谷 茂[1,2]　([1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]阪大・先導学研機)

2F04-06　*Planococcus maritimus* iso-3 の生産する C30 カロテノイド methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-4,4'-lycopenoate の生合成中間体(CHO 化合物)に関する研究 I
○前原 千夏[1]，萩原 萌[1]，荒井 梨子[1]，竹村 美保[2]，三沢 典彦[2]，新藤 一敏[1]　([1]日女大・家政・食物，[2]石川県大・生資研)

2F04-07　*Planococcus maritimus* iso-3 の生産する C30 カロテノイド methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-4,4'-lycopenoate の生合成中間体(COOH 化合物)に関する研究 II.
○萩原 萌[1]，前原 千夏[1]，荒井 梨子[1]，竹村 美保[2]，三沢 典彦[2]，新藤 一敏[1]　([1]日女大・家政・食物，[2]石川県大・生資研)

2F04-08　新規リポランチンの単離同定
○趙 ハンセム，浅水 俊平，尾仲 宏康　(東大院・農)

2F04-09　アゾキシアルケン化合物を生産する *Streptomyces rochei* に見出された新規 N-N 化合物の構造解析・生合成・生物活性
○長野 遥[1]，田中 悠[2]，岸本 拓也[3]，達川 綾香[3]，國武 博文[3]，福本 敦[4]，安齊 洋次郎[4]，荒川 賢治[1,2,3]　([1]広島大・工，[2]広島大院・統合生命，[3]広島大院・先端研，[4]東邦大・薬)

2F04-10　ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする糸状菌デプシペプチドの探索研究
○本間 悠人，菅原 章公，森下 陽平，塚田 健人，尾﨑 太郎，浅井 禎吾　(東北大院薬)

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

食品―食品工学 - 製造工学，加工学 / 食品工学 - その他

2F07-01　製パン性に及ぼすエキソプロテアーゼの影響解析
○若木 拓実[1]，辻井 良政[2]，伊賀 大八[3]，野口 智弘[4]　([1]東農大院農化，[2]東農大農化，[3]日本パン技研，[4]東農大応生，食加技セ)

2F07-02　豆乳の凍結融解分画に対する pH および塩濃度の条件検討
○松野 正幸[1,2]，守田 和弘[3]，村上 和弥[2]，下山田 真[2]　([1]静岡工技研，[2]静岡県大院・食栄，[3]実践女子大)

2F07-03　グルコース修飾大豆 11S グロブリンの抗酸化能と乳化特性について
○長谷川 京加[1]，佐伯 宏樹[2]，松村 康生[3]，谷 史人[4]，松宮 健太郎[4]，西村 公雄[1]　([1]同女大，[2]北大院水産，[3]京大生存圏研，[4]京大院農)

2F07-04　プラントベースヨーグルトへの酵素の応用
馬場 将弘，品田 敦子，篠田 美咲，平間 岳史，○小笠原 早織　(合同酒精)

2F07-05　様々な魚種を使用したさつま砂糖漬け製造－味噌漬け工程が真菌叢に及ぼす影響－
○福田 翼，小林 聡子，辰野 竜平，古下 学　(水産機構・水大校)

2F07-06　清酒中の 5- アミノレブリン酸濃度に影響する製造要因に関する研究
○佐々木 慧　(広島国際学院大)

2F07-07　バイオ・食品用途向け耐熱分離膜モジュール技術の開発
○竹内 康作，小林 憲太郎，畠平 智子，小林 敦，武内 紀浩，花川 正行，高橋 弘造　(東レ)

2F07-08　ビールの気泡界面近傍の成分がヘルムホルツ共鳴に及ぼす影響
○犬飼 一貴[1]，磯江 晃[2]，乾 隆子[2]，畑中 一成[2]，勝野 那嘉子[1]，今泉 鉄平[1]，西津 貴久[1]　([1]岐阜大院自然，[2]サントリービール(株))

2F07-09　HTST（High Temperature Short Time）製麦によるビール香味耐久性向上
○時園 佳朗[1]，森田 真梨子[1,2]，七森 理仁[1,2]，梅村 威一郎[3]，飯牟禮 隆[4]，保木 健宏[1]，須田 成志[1]（[1]サッポロビール株式会社 原料開発研究所，[2]サッポロビール株式会社　群馬工場　製麦部，[3]サッポロビール株式会社　北海道工場　醸造部，[4]サッポロビール株式会社　価値創造フロンティア研究所）
2F07-10　超音波マイクロバブル発生装置を用いた食品加工
○滝田 壮志[1]，長谷沼 大成[2]，幕田 寿典[1]（[1]山形大院・理工，[2]山形大・工）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

食品―食品工学 - 物性，分析

2F09-01　ハッサク果実の異なる部位から調製したアルコール不溶性固形物（AIS）の化学的特性とポリガラクツロナーゼ活性を含む酵素剤による分解性
○辻岡 梓沙，堀西 朝子，尾崎 嘉彦（近大生物理工）
2F09-02　生鮮野菜中のβ - ニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）及びニコチンアミドリボシド（NR）とその関連代謝物分析の検討
○高橋 洋武，佐野 勇気，平松 幸之助，橘田 規，照井 善光（一般財団法人日本食品検査）
2F09-03　HACCP 導入に向けた食品危害因子の簡便・高感度検出システムの開発
○笹村 雄斗[1]，渡邉 颯人[1]，齋藤 七海[1]，藤澤 怜香[1]，中川 東紀[1]，小林 愛奈[1]，黒田 俊一[2]，中山 勉[1]，飯嶋 益巳[1]（[1]東農大・応生・健康，[2]阪大・産研）
2F09-04　二次元膜足場分子を用いたフードバイオセンサーの高感度化技術の開発
○濱砂 佑奈[1]，田村 侑子[1]，伊佐 太郎[1]，小林 加奈子[1]，黒田 俊一[2]，中山 勉[1]，飯嶋 益巳[1]（[1]東農大・応生・健康，[2]阪大・産研）
2F09-05　渋味ポリフェノールにおける生物活性と化学構造間の数理モデルの構築
○伏見 太希[1]，小川 未来[2]，藤井 靖之[1]，越阪部 奈緒美[1,2]（[1]芝浦工大理工学，[2]芝浦工大シス理工）
2F09-06　ラマン分光法によるアシル修飾シリカゲルとクロロゲン酸との相互作用の解析
○蟹江 善美[1]，藤原 真[2]，奥田 結帆[2]，大島 海人[2]，蟹江 治[2]（[1]東海大 技共，[2]東海大工）
2F09-07　光分光法および画像解析を組合わせた食品の非破壊分析
○鈴木 絢子[1]，納谷 友希[2]，金村 洋平[2]，髙成 広起[2]，井上 高教[1]（[1]大分大理工，[2]徳島大医）
2F09-08　ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた食品メタボローム分析におけるデータ解析の効率化
○谷口 百優[1,2]，川北 祥人[1,2]，尾島 典行[1,2]，飯田 順子[1,2]，福崎 英一郎[2,3,4]（[1]株式会社島津製作所，[2]大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所，[3]大阪大学，[4]大阪大学先導的学際研究機構）
2F09-09　振動分光法による塩水溶液中の水の状態解析
○篠原 凜[1]，楊 嘉敏[1]，石川 大太郎[2]，藤井 智幸[1]（[1]東北大農，[2]福島大農）
2F09-10　ウイルス膜モデルを用いた紅茶の抗ウイルス活性のナノレベル可視化
○飯嶋 益巳，吉本 遼太郎，金田 萌美，原野 菜々子，鈴木 悠介，山田 亜希，解良 康太，中山 勉（東農大・応生・健康）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

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

2G01-01　柿果実由来縮合タンニンによる LDL コレステロール低減効果
○鈴木 利雄[1,2]，森口 仁文[3]，尾﨑 嘉彦[4]，米谷 俊[5,6]（[1]大阪市大院工，[2]フジッコ株式会社，[3]JA和歌山県農，[4]近大生物理工，[5]近大農，[6]株式会社ファーマフーズ）
2G01-02　スサビノリ脂質成分の摂食は *db/db* 肝臓のアラキドン酸／リノール酸代謝を抑制する
○飯笹 さやか[1]，永尾 晃治[2]，柘植 圭介[3]，永野 幸生[4]，柳田 晃良[2,5,6]（[1]鹿児島大医歯研・泌尿器科，[2]佐賀大農・生命機能，[3]佐賀工技セ，[4]佐賀大・総分セ，[5]西九州大・健康栄養，[6]佐賀産イノベセ）
2G01-03　脂質代謝関連遺伝子を制御する化合物の探索と分子機構解析
○松永 優輝[1]，小高 愛未[2]，鈴木 司[2]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]（[1]東農大 院・応生科・農化，[2]東農大・応生科・農化）
2G01-04　小腸胆汁酸組成の変動に起因する小腸 FXR シグナルの減弱を介するタウリンのコレステロール低下作用
○宮田 昌明，田中 知幸，高橋 一帆，舩木 萌浩，杉浦 義正（水産機構水大校）
2G01-05　東播磨地域産ネギ属野菜の糖質・脂質分解酵素阻害活性
○栗山 磯子，山崎 一諒，細川 敬三（兵庫大・健康科学）
2G01-06　8R-HEPE による動脈硬化抑制作用
○山田 秀俊[1]，植村 亜衣子[2]，齋藤 麻希[3]，石田 奈々恵[3]，揖斐 実歩[3]，弘瀬 雅教[3]（[1]帝科大・生命環境，[2]岩手生工研，[3]岩手医大・薬）
2G01-07　カヌカエキスの胆汁酸ミセル崩壊活性に関する研究
○山口 紗那花[1]，野崎 勉[2]，福士 江里[3]，矢野 善久[1]，藤田 裕之[1]（[1]京都先端大バイオ環境，[2]ビーエイチエヌ（株）素材開発，[3]北大院農）
2G01-08　脂質代謝改善及び長寿に寄与する腸アルカリフォスファターゼと配列特異的な直接的相互作用をするコレステロール代謝改善ペプチド IIAEK（ラクトスタチン）
○竹内 朝陽[1]，久松 賢太郎[1]，奥村 菜月[1]，杉光 祐紀[1]，中野 綾音[1]，柳瀬 笑子[2]，上野 義仁[2]，長岡 利[1]（[1]岐阜大応生食品分子機能学，[2]岐阜大応生生物有機化学）
2G01-09　奇数鎖脂肪酸が結合している微生物由来プラスマローゲンのラット小腸におけるリンパ吸収動態
○佐藤 奈々[1]，柏木 明子[2]，山田 美和[3]，西向 めぐみ[3]（[1]岩手大院・総合科学，[2]弘前大・農学生命，[3]岩手大・農）
2G01-10　アスコルビン酸酸化に起因するタンパク質ピロール化
○吉武 淳[1]，柴田 貴広[2]，近澤 未歩[3]，内田 浩二[4]（[1]名大未来社会，[2]名大農，[3]名城大農，[4]東大農）
2G01-11　Renalase Deficiency Is Associated with Impaired Glucose Metabolism and Disturbed Gut Microbiota in Mice
○Hui Fang，Kazuhiro Takekoshi（University of Tsukuba）
2G01-12　異なる年齢層における果糖ぶどう糖液糖飲料過剰摂取の耐糖能に及ぼす影響
○日髙 芽衣，花井 悠真，大島 佑人，江藤 望，服部 秀美（宮崎大農）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲 / 食品機能・栄養 - タンパク質・アミノ酸代謝

2G03-01　グミ咀嚼が唾液分泌に与える効果に関する探索的研究
○北川 哲[1]，高宮 隆一[1]，小嶋 禎[1]，辻本 義憲[1]，和田 哲也[1]，大久保 幸三[1]，斎藤 一郎[2]（[1]株式会社明治，[2]鶴見大学歯学部）

2G03-02　UPLC-MS/MS システムを用いたマウス脳内カテコールアミンおよび代謝物解析メソッドの開発
○藤井 靖之，手島 知洋，牟田 織江，伏見 太希，越阪部 奈緒美（芝浦工大院）

2G03-03　成長期における慢性的な活動期前半欠食の脳機能への影響
○佐々木 海帆，石島 智子，岡田 晋治　（東大農）

2G03-04　ダイゼイン摂取は卵巣摘出ラットの胃排出を遅延させ，食欲を抑制する
○藤谷 美菜，鈴木 遥，石田 彩華，林 真理，吉良 真結，屋敷 哲良，阿部 恭大，小林 拓広，岸田 太郎　（愛媛大院農）

2G03-05　食物価値に基づく食物選択マウスモデルの開発
○好田 歩，喜田 聡　（東大農）

2G03-06　高嗜好性食物の期待により誘導される摂食抑制マウスモデルの開発
○鶴山 和人，喜田 聡　（東大農）

2G03-07　ラットはリック回数を調節することで一定量のビタミン C を選択摂取する
○沼上 真佑[1]，竹中 麻子[2]　([1]明治大院，[2]明治大)

2G03-08　2- アラキドノイルグリセロールはマウスにおいて CB1-CCK シグナル経路を介して胃排出を抑制する
○落合 啓太，比良 徹　（北大院・農）

2G03-09　出芽酵母での過剰なトリプトファンによるロイシンの相対的欠乏
○大橋 一登　（群大生調研）

2G03-10　非ストレス下マウスのうつ関連行動と脳内分子発現は標準飼料の種類やタンパク質源によって影響を受ける
○山本 咲希[1]，小崎 寛明[1]，安田 時生[1]，瀬々 航紀[1]，藤原 和人[1]，古屋 茂樹[1,2,3]　([1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]イノベ・バイオアーキ)

2G03-11　肥満ラットの肝オートファジーに対するカロテノイド摂取の効果
○金沢 匠，細山田 康恵　（千葉県立保健医療大・栄養）

ミーティングルーム G 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症

2G05-01　*Lactiplantibacillus plantarum* FL-664 培地中のグルタミン酸はマウス脾臓細胞における IL-12（p40）産生誘導能へ影響する
○川本（宮本）乃理子[1]，細田 浩司[2]，三吉 和之[1]，野本 康二[2]　([1]大洋香料株式会社，[2]東農大・生命)

2G05-02　*Apilactobacillus* 属乳酸菌由来リポテイコ酸による特異な粘膜免疫誘導能
○田中 美羽[1]，白石 宗[2]，中島 由香里[1]，東村 泰希[3]，山本 憲二[4]，横田 伸一[2]，邱 泰瑛[5]，松崎 千秋[1]，高橋 知也[6]　([1]石川県大・資源研，[2]札幌医大，[3]石川県大・生資環，[4]和歌山大，[5]北見工大，[6](株)アルソア慧央グループ)

2G05-03　玄米中に含まれる成分の免疫力活性化機構の解析
○萩原 真[1]，永野 忠聖[1]，松下 健二[2]　([1]新潟県大，[2]国立長寿研)

2G05-04　野沢菜由来多糖による抗腫瘍効果のメカニズム
○田中 沙智[1]，遠藤 勝紀[1]，沈 輝棟[2]，王 向東[2]，北村 秀光[2]　([1]信州大農，[2]北大遺制研)

2G05-05　漬物由来乳酸菌 SSL-1 による IL-12 発現亢進の作用機序解析
○柴田 奈那[1]，村田 美樹[2]，浅見 進也[2]，日浦 月穂[1]，林 秀謙[3]，薩 秀夫[3]　([1]前橋工大院工，[2](株)新進・総合研究所，[3]前工大工)

2G05-06　微細藻類ユーグレナとパラミロンの免疫制御の機序についての検討
○中島 綾香[1]，安田 光佑[1]，鈴木 健吾[1]，安達 貴弘[2]　([1]株式会社ユーグレナ，[2]東京医科歯科大学)

2G05-07　乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 によるパイエル板 IgA 産生増強作用
○溝渕 響子[1]，中川 稜悟[1]，塩原 幸[1]，WANG YIMEI[1]，藤岡 郁美[2]，内田 健治[2]，元島 英雅[2]，薩 秀夫[3]，足立（中嶋）はるよ[1]，八村 敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]よつ葉乳業・中央研，[3]前橋工大・生物工)

2G05-08　水溶性米ぬか抽出物の免疫賦活化能の解析
○野沢 里緒[1]，樋口 央紀[2]，戸田 雅子[1]　([1]東北大農，[2]東北大 NICHe)

2G05-09　米糀甘酒の免疫賦活効果
○山田 南実，北川 学，倉石 徹，伊藤 成輝　（マルコメ）

2G05-10　食品コウジカビの経口投与により誘導された Th1 応答増強効果の持続性
○石塚 悠有[1]，吉澤 昂史[1]，西村 遼[1]，内田 妃音[1]，関口 昭博[2]，榎本 淳[1,3]　([1]群大院理工，[2]群馬産技セ，[3]群大食健康セ)

2G05-11　フラクトオリゴ糖の経口摂取は盲腸リンパ節を介して IgA 産生を誘導する
○古川 凱斗[1]，津田 真人[1]，宇野 直哉[1]，岡田 開[1]，大川 真由[1]，田代 桃佳[1]，八村 敏志[2]，細野 朗[1]　([1]日大農獣医，[2]東大農)

ミーティングルーム G 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

食品―食品機能・栄養 - 免疫、炎症

2G06-01　*Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* FC 株の継続摂取が健常者の便通および免疫賦活作用に及ぼす影響
○渡辺 真通，丸尾 俊也，鈴木 利雄　（フジッコ(株)）

2G06-02　*Lacticaseibacillus paracasei* K71 摂取による健常者の体調維持と免疫指標への影響
○杉本 淑惠，三原 敏敬，山本 佳奈，内山 公子，髙橋 肇　（亀田製菓）

2G06-03　OVA 特異的 T 細胞クローンマウスにおける経口抗原に対する応答と TCR 遺伝子使用の解析
○塩原 幸[1]，五島 直樹[1]，佐伯 祐輔[1]，WANG YIMEI[1]，中川 稜悟[1]，曽我 皓平[1]，王 蓉[1]，神沼 修[2]，足立（中嶋）はるよ[1]，八村 敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]広大・原医研)

2G06-04　赤シソ由来新規フラバノンは Th17 細胞機能を阻害しコラーゲン誘発性関節炎を抑制する
○平野 皓大[1]，藤村 孝志[2]，前田 俊介[1]，奥泉 文菜[2]，前田 陽[2]，平川 規子[3]，馬場 堅治[3]，河本 正次[2]　([1]広島大工，[2]広島大院・統合生命科学，[3]三島食品株式会社)

2G06-05　ガレート型プロシアニジンが T 細胞のアミノ酸代謝に及ぼす影響
○遠藤 勝紀，澤 陶有子，小林 周平，真壁 秀文，田中 沙智　（信州大 農）

2G06-06　FTY720 は経口免疫寛容の誘導を部分的に阻害した
○平塚 弘樹，服部 誠，好田 正　（東農工大農）

2G06-07　糖尿病モデルマウスを用いた疾患が抗体産生に及ぼす影響の解析
○近澤 未歩，湊 健一郎　（名城大農）

2G06-08　ApoE 欠損マウスを用いた多重交差性 IgM-BCR レパトア形成におけるピロール化タンパク質の機能解明
○林 世映[1]，山口 公輔[1]，板倉 正典[1]，近澤 未歩[3]，松田 知成[2]，内田 浩二[1]　([1]東大農，[2]京大，[3]名城大)

2G06-09　ポリフェノールによるタンパク質修飾を介した自然免疫調節機構の解明
山口 公輔，○畠山 千晴，下宮 豪介，林 世映，板倉 正典，内田 浩二　（東大農）

2G06-10　酸化型ビタミン C 由来 AGEs による炎症応答制御メカニズムの解明
○板倉 正典，内田 浩二　（東大農）

2G06-11　酸化コレステロールが樹状細胞の分化や活性化に与える影響の解析
○柳沢 林太郎[1]，戸田 雅子[1]，浅井 明[2]　([1]東北大農，[2]日本医科大)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

食品―食品機能・栄養 - アレルギー・アレルゲン

2G08-01　植物発酵物(FBP)のスギ花粉症抑制効果
○鳥居 英人[1]，藤村 孝志[2]，堀 采音[2]，北條 綾乃[1]，藤岡 耕太郎[1]，児玉 智基[3]，西岡 祐起[2]，前田 陽[2]，岸田 晋輔[1]，河本 正次[2]　([1]万田発酵株式会社，[2]広島大院・統合生命科学，[3]広島大・工)
2G08-02　植物発酵物(FBP)は肥満細胞を作用点としてI型アレルギー反応を抑制する
○児玉 智基[1]，西岡 祐起[2]，前田 陽[2]，北條 綾乃[3]，鳥居 英人[3]，藤岡 耕太郎[3]，岸田 晋輔[3]，藤村 孝志[2]，河本 正次[2]　([1]広島大工，[2]広島大院・統合生命科学，[3]万田発酵株式会社)
2G08-03　褐藻類ノコギリモクの抗アレルギー活性
○垣田 浩孝[1]，有本 清也[1]，田中 守[2]　([1]日大院総合基，[2]中部大院応用生物)
2G08-04　経皮感作による食物アレルギーの皮膚への影響
○黒木 穣，西本 沙弥香，鳥屋尾 千佳，江藤 望，服部 秀美　(宮崎大農)
2G08-05　食品アレルギーの増悪化に関わる皮膚感作のメカニズム解析
○小柴 莉沙，服部 誠，好田 正　(東農工大農)
2G08-06　成人アトピー性皮膚炎患者におけるイチジク茶摂取の有効性について
○阿部 竜也，小山 ゆかり，西村 耕作　(東洋食品研究所)
2G08-07　腸内細菌由来アマニリグナン代謝物によるマスト細胞脱顆粒抑制
○澤根 健人[1,2]，長竹 貴広[2]，細見 晃司[2]，宮下 留美子[1]，間 和彦[1]，國澤 純[2,3,4]　([1]株式会社ニップン，[2]医薬健栄研，[3]阪大薬，[4]東大医科研)
2G08-08　α - ラクトアルブミンによるアレルギー性小腸炎の抑制作用
○中村 翔太朗，曽我 皓平，玉井 雅人，八村 敏志，足立(中嶋) はるよ　(東大院農生科・食の安全研セ)
2G08-09　Effect of polyphenols on mast cells cultured at atmospheric CO_2 level
○Hirofumi Nishikawa, Sumire Koizumi, Naoto Tanimoto (DaltonTokyo JSHS.)
2G08-10　リン酸修飾がソバ主要抗原 Fag e 2 の好塩基球脱顆粒に及ぼす影響
○川端 洋基[1]，日比野 佑香[1]，鄭 屹峰[2]，片山 茂[1,2]　([1]信州大農，[2]信州大バイオ研)
2G08-11　高温高圧水処理抗原を用いた食品アレルギーの予防法の開発
○尾近 和信[1]，長田 光正[2]，後藤 真生[3]，石川(高野) 祐子[3]，服部 誠[1]，好田 正[1]　([1]東農工大農，[2]信大繊維，[3]農研機構・食品研究部門)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

食品―食品化学 - 糖質，脂質 / 食品化学 - その他

2H02-01　褐藻類ナガコンブのアルギン酸含有量と M/G への生育時期の影響
○川又 澄人[1]，黒須 泰行[1]，本間 悠里[1]，四ッ倉 典滋[2]，垣田 浩孝[1]　([1]日大院・総合基，[2]北大院・北方生物圏)
2H02-02　α - グルコシダーゼおよびブランチングエンザイムの添加による炊飯米の老化抑制効果の粒内分布
○田口 拓実[1]，大西 未紗[1]，大元 智絵[2]，山口 秀幸[2]，勝野 那嘉子[1]，今泉 鉄平[1]，西津 貴久[1]　([1]岐阜大院自然，[2]味の素(株))
2H02-03　新規育成した超多収低アミロース米系統品種の米胚乳酵素活性量について
○辻井 良政[1]，菱川 美千代[1]，小舘 琢磨[2]　([1]東農大農化，[2]岩手農研セ)
2H02-04　玄米γ - オリザノール高含有品種の探索ならびに含量関連遺伝子の研究
○高橋 正和[1]，定永 麻里[1]，柴田 莉奈[1]，吉田 英樹[2]，松岡 信[2]，森中 洋一[1]，三浦 孝太郎[1]　([1]福井県大生物資源，[2]福島大食農学類)
2H02-05　LC-MS/MS による油脂の酸化感受性の評価：とくに脂肪酸鎖長の影響の解明に向けて
○楠本 惟吹[1]，加藤 俊治[1]，泉井 亮太[2]，田中 礼央[2]，仲川 清隆[1]([1]東北大院農，[2]雪印メグミルク(株))
2H02-06　超臨界流体クロマトグラフィーを用いた食用油脂酸化の評価
○境野 眞善[1,2]，加藤 俊治[2,3]，伊藤 隼哉[2]，清水 直紀[2]，西村 紗希[1]，竹内 茂雄[1]，今義 潤[1,3]，仲川 清隆[2,3]　([1]J-オイルミルズ，[2]東北大院農・機能分子解析学，[3]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座)
2H02-07　小麦リポキシゲナーゼアイソザイムの生化学解析
○小菅 拓海[1]，積田 悠平[1]，加藤 雄已[2]，椎葉 究[3]，夏目 亮[1,2]　([1]東電大院・工，[2]東電大・工，[3]東電大・理工)
2H02-08　フェノール酸焙煎反応物の化学構造・キサンチンオキシダーゼ阻害活性
○新道 雪乃，谷口 明日香，増田 俊哉　(大阪市大院生活)
2H02-09　新規後発酵茶の製造方法の開発
○永嶺 海夕[1]，宮澤 知暉[2]，椎葉 究[1,2]，安部 智子[1,2]　([1]東京電機大院・理工研，[2]東京電機大・理工)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

食品―食品化学 - タンパク質・アミノ酸

2H04-01　低メトキシペクチンとの複合体化によるβ - ラクトグロブリンの機能改変
○米谷 礼，好田 正，服部 誠　(東農工大農)
2H04-02　ペクチンとの複合体化によるβ - ラクトグロブリンの機能改変
○大野 雄一郎，柴田 航矢，好田 正，服部 誠　(東農工大)
2H04-03　カルボキシメチルセルロースとの複合体化によるβ - ラクトグロブリンの機能改変
○新井 達也，尾野 萌子，好田 正，服部 誠　(東農工大農)
2H04-04　カルボキシメチルセルロースとの複合体化によるβ - コングリシニンの高機能化
○畑石 結衣，好田 正，服部 誠　(東農工大能)
2H04-05　貯蔵による米飯テクスチャーの劣化と可溶性タンパク質，アミノ酸の挙動
○大能 俊久，寺岡 若葉，古澤 和也　(福井工大)
2H04-06　山形県産酒粕からのレジスタントプロテインの検出と解析
○長 俊広，城 祥子，野内 義之，菅原 哲也　(山形県工技セ)
2H04-07　各種マメタンパク質中の難消化性タンパク質量の推定
○中嶋 唯人[1]，石橋 勇作[2]，北川 竜揮[2]，宮原 一大[3]，尾関 健二[1,2]([1]金沢工業大学大学院・バイオ化学専攻，[2]金沢工業大学・応用バイオ学科，[3]イングレディオン・ジャパン株式会社)
2H04-08　大豆由来難消化性ペプチドによる腸内細菌叢改善効果の解析
○網 優太[1]，平野 里佳[1,2]，金 倫基[3]，栗原 新[1]　([1]近畿大生物理工，[2]石川県大生資環，[3]慶應大薬)

2H04-09　塩濃度の違いがカナバリンの溶解性および構造に与える影響
○西澤 果穂[1]，有井 康博[2]　([1]龍谷大・農・食品栄養，[2]武庫川女子大・食物栄養・食創造科学)
2H04-10　オリーブ成分による牡蠣アレルゲンタンパク質の重合化とモデルマウスによるアレルゲン性評価
○菰田 俊一，折本 未奈，赤澤 隆志　(宮城大　食産業)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化

2H07-01　シトロネリルグルコシドの皮膚バリア機能改善効果
○竹内 ちひろ[1]，井上 卓思[1]，新谷 恵[1]，石川 文博[1]，宮崎 優佳[2]，佐藤 芽衣[2]，加藤 敦[2,3]　([1]株式会社伏見製薬所，[2]富山大学学術研究部薬学・和漢系　臨床薬剤学研究室，[3]富山大学附属病院薬剤部)
2H07-02　正常ヒト表皮角化細胞に対して紫外線障害への保護効果や創傷治癒効果を持つ物質の解析
○山田 康枝，村井 雅輝，鍬崎 夕菜，三村 桂子，神谷 尚希　(近畿大工)
2H07-03　SOD/ カタラーゼ模倣薬は接触皮膚炎を緩和する
○岩田 拓磨[1,2]，澁谷 修一[1]，渡辺 憲史[1]，清水 孝彦[1]　([1]国立長寿医療研究センター 老化ストレス応答研究プロジェクトチーム，[2]アドバンテック株式会社)
2H07-04　イワヒバの美容効果に関する機能性評価
○塩田 皐希，関根 結夏子，矢野 敏史，原 太一　(早稲田大学)
2H07-05　アコヤガイ貝殻真珠層抽出液の皮膚に対する抗老化作用
○山本 花菜，下村 七海，長谷川 靖　(室蘭工大院)
2H07-06　天然ヒト型セラミドの機能性解明
○福留 瑞葵[1]，亀田 菜月[1]，植木 達朗[2]，開 忍[3]，宮鍋 征克[4]，片倉 喜範[4]　([1]九大農・生資環，[2]福岡県醤油醸造協同組合，[3]株式会社ジェヌインR&D，[4]九大農)
2H07-07　ヒト線維芽細胞におけるスチルベン化合物の抗老化作用の可能性
○齋藤 靖和[1,2]，福田 大智[1]，岩本 大輝[2]，田邊 朝弓[2]，金井 直人[2]，濱田 博喜[3]　([1]県立広島大院生命システム科学，[2]県立広島大生命環境，[3]岡山理科大理)
2H07-08　緑茶カテキン EGCG による抗加齢タンパク質 SMP30 発現制御は proteasome 活性阻害を介し 67LR 非依存的である
○荒川 航太[1]，井上 博文[1]，石神 昭人[2]，佐藤 綾美[2]，滝野 有花[2]，田中 未央里[1]，高橋 信之[1]，上原 万里子[1]　([1]東農大応生，[2]東京都健康長寿医療医療センター)
2H07-09　ポリフェノール修飾タンパク質の構造解析並びにヒストンとの相互作用メカニズムの解明
○山口 公輔[1]，板倉 正典[1]，北澤 麗磨[1]，林 世映[1]，永田 宏次[1]，柴田 貴広[2]，赤川 貢[3]，内田 浩二[1]　([1]東大農，[2]名大院生命農，[3]大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科)
2H07-10　脳腸相関活性化ポリフェノールの探索とその機能性
○田中 綾乃[1]，原口 瑞木[1]，片倉 喜範[2]　([1]九大院・生資環，[2]九大院・農院)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

食品―食品機能・栄養 - 神経、内分泌、味覚・食欲

2H09-01　ヒト味覚受容体発現細胞を用いた清涼飲料水をモデル溶液とした呈味強度評価法の改良
○山口 美波，三坂 巧　(東大院農生科・応生化)
2H09-02　霊長類における旨味受容体のヌクレオチド感受性と食性の関わり
○戸田 安香[1]，早川 卓志[2]，糸井川 壮大[3]，栗原 洋介[4]，中北 智哉[1]，Amanda Melin[5]，河村 正二[6]，今井 啓雄[3]，石丸 喜朗[1]，三坂 巧[7]　([1]明大農・農芸化，[2]北大院地球環境・環境生物，[3]京大・霊長類研，[4]静大農，[5]カルガリー大学，[6]東大院新領域・先端生命，[7]東大院農生科・応生化)
2H09-03　消化管苦味受容体を介したホップ由来苦味成分の機能性研究
○山崎 雄大[1]，髙橋 千佳[1]，谷口 慈将[1]，成川 真隆[2]，三坂 巧[3]，阿野 泰久[1]　([1]キリンホールディングス(株)，[2]京都女子大家政学部，[3]東大農)
2H09-04　コイ苦味受容体 T2R の機能解析
○浅岡 亮太，清水 駿希，中北 智哉，戸田 安香，石丸 喜朗　(明大農)
2H09-05　ヒト T1R1/T1R3 の受容体活性を調節する受容体内の構造的特徴
○陳 思宇，三坂 巧　(東大院農生科・応生化)
2H09-06　塩味受容に関与する新規分子の同定
○成川 真隆[1]，笠原 洋一[2]，石丸 喜朗[3]，三坂 巧[2]，阿部 啓子[2,4]，朝倉 富子[2]　([1]京都女子大家政，[2]東大院農生科，[3]明治大農，[4]神奈川県立産業技術総合研究所)
2H09-07　新規塩味受容分子 Transmembrane channel-like 4 の機能解析
○笠原 洋一[1]，成川 真隆[2]，三坂 巧[1]，阿部 啓子[1,3]，朝倉 富子[1]　([1]東大農，[2]京都女子大家政，[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
2H09-08　Transmembrane channel-like 4 チャネルの温度及び pH 依存性
○朝倉 富子[1]，笠原 洋一[1]，成川 真隆[2]，三坂 巧[1]，阿部 啓子[1]　([1]東大院農生科，[2]京都女子大)
2H09-09　新規塩味増強物質 3-guanidinyl-1-propanol の Transmembrane channel-like 4 に対する応答性
○山下 治之[1]，笠原 洋一[1]，成川 真隆[2]，阿部 啓子[1]，朝倉 富子[1]　([1]東大院農生科，[2]京都女子大)
2H09-10　オトガイ舌骨筋からの表面筋電位を用いた PLS 回帰分析による嗜好と飲み込みやすさの可視化
○森 安珠[1]，上田 玲子[1]，梅谷 華奈[1]，阿部 啓子[1,2]，朝倉 富子[1]　([1]東大院・農生科，[2]KISTEC)

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

植物――次代謝，二次代謝，メタボローム

2I01-01　オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子の探索
○金井 詞音，石川 恵里加，須恵 雅之　(東京農大・農化)
2I01-02　オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子の単離と解析
○石川 恵里加，金井 詞音，須恵 雅之　(東農大・農化)
2I01-03　ムラサキ代謝における 4-coumaroyl-CoA ligase の機能分担とシコニン生合成への関与
○中西 浩平[1]，李 豪[1]，市野 琢爾[1]，巽 奏[1]，刑部 敬史[2]，渡辺 文太[3]，下村 講一郎[4]，矢崎 一史[1]　([1]京都大学 生存圏研究所，[2]徳島大学 生物資源産業部，[3]京都大学 化学研究所，[4]東洋大学 生命科学研究所)
2I01-04　ムラサキ科におけるシコニン／アルカニンアシル基転移酵素の分子進化
○押切 春佳[1]，李 豪[2]，眞辺 美咲[3]，山本 浩文[4]，矢崎 一史[2]，高梨 功次郎[1,3]　([1]信州大院・総合医理工，[2]京大・生存研，[3]信州大・理，[4]東洋大・生命科学)
2I01-05　二次代謝のモデル植物ムラサキの ABC タンパク質の解析
○坪山 愛，李 豪，松田 陽菜子，棟方 涼介，杉山 暁史，矢崎 一史　(京大　生存圏)

2I01-06　ステロイドグリコアルカロイド生合成に関わる新規生合成遺伝子の機能解析
○米田 彩乃[1]，秋山 遼太[1]，中安 大[1,2]，刑部 敬史[3]，
刑部 祐里子[4]，梅基 直行[5]，斎藤 和季[5]，村中 俊哉[6]，
安本 周平[6]，三浦 謙治[7]，杉本 幸裕[1]，水谷 正治[1]（[1]神大農，[2]京大生存圏，[3]徳島大生物資源産業，[4]東京工業大生命理工，[5]理研基盤研，[6]阪大工，[7]筑波大生命環境系）

2I01-07　大腸菌を用いたアピゲニン -7-*O*- グルコシドの生産
○小林 美稀[1]，柿木 優佑[1]，石水 毅[2]，大橋 貴生[1]（[1]摂南理工，[2]立命館生命）

2I01-08　ラズベリー花に含まれるポリフェノール化合物の分析研究
○小堀 亮[1]，道下 僚[1]，高江 桃花[2]，齊藤 安貴子[1,2]（[1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻，[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科）

2I01-09　チャ由来 UGT85K11 の配列情報を用いたコーヒーからのテルペン類配糖化酵素遺伝子の単離と機能解析
○井田 美帆，佐々木 香織，能代 志歩，川上 寛子，水野 幸一（秋田県大）

2I01-10　ウルシ樹液に含まれる Fe2D タンパク質のアラビドプシスホモログの機能解析
○横山 優花[1]，今村 大樹[1]，飯伏 純平[1]，村山 佳加[1]，椎名 隆[2]，
石崎 陽子[2]，北島 佐紀人[1]（[1]京工繊大応生，[2]摂南大農）

2I01-11　SPME-GC/MS を用いた 17 品種のマンゴー葉の揮発性物質の品種間比較
○藤阪 芽以[1]，松川 哲也[1,2]，志水 恒介[2]，伊藤 仁久[2]，重岡 成[2]，
梶山 慎一郎[1]（[1]近大生物理工，[2]近大附属農場）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 10:00～10:30

植物―植物工学 - 育種，物質生産，形質転換

2I03-01　1 残基のアミノ酸置換がもたらすハバネロと夢祭りの pAMT 酵素活性の違い
○中里 彩夏，佐野 香織，古旗 賢二（城西大）

2I03-02　野性イネとの QTL 解析による栽培イネのストレス適応時のオートファジー機能の解明
○森角 真友奈[1]，小野 聖二郎[2]，木村 成介[3]，朽津 和幸[4]，
野々村 賢一[2]，来須 孝光[1]（[1]公立諏訪理大・工，[2]国立遺伝研・植物細胞遺伝，[3]京産大・総合生命，[4]東京理科大学・理工）

2I03-03　アスコルビン酸噴霧による植物一過的タンパク質発現における壊死の抑制
○三浦 謙治[1]，野﨑 翔平[1]，金子 美華[2]，鶴田 文憲[1]，加藤 幸成[2]（[1]筑波大・生命環境，[2]東北大医）

2I03-04　揮発性テルペノイドの分泌に関わる候補因子の探索と基盤構築
○段 奈々子，上岡 颯人，李 豪，橘 頼人，杉山 暁史，
棟方 涼介，矢﨑 一史（京大生存研）

2I03-05　NBRP トマト大規模変異体プールから単離した形態変異体コレクション
○杉本 貢一，有泉 亨，江面 浩（筑波大・生命環境）

2I03-06　細胞膜透過ペプチドを利用した遺伝子組換えに依存しない植物ゲノム編集技術
○田中 淑乃[1]，七里 吉彦[2]，大村 昂誠[1]，遠藤 圭太[3]，河野 強[1]，
岩﨑 崇[1]（[1]鳥取大院，[2]森林総研森林バイオ，[3]森林総研林育セ）

2I03-07　海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における Cas9 nickase（Cas9n）を利用したエピソーム型ゲノム編集
○上河 ほのか[1]，北川 諒治[1]，米井 龍[2]，坂田 大季[2]，岡本 賢治[2]，
原田 尚志[2]（[1]鳥大院持社創科，[2]鳥大工）

2I03-08　Prime editing によるイネ内在性遺伝子の精密ゲノム編集
○横井 彩子[1]，土岐 精一[1,2,3]（[1]農研機構・生物研，[2]横浜市大・生命ナノ，[3]龍谷大・農）

2I03-09　シコニン関連遺伝子を標的としたムラサキのゲノム編集毛状根の評価
○李 豪[1]，中西 浩平[1]，草野 博彰[1]，刑部 敬史[2]，下村 講一郎[3]，
矢崎 一史[1]（[1]京大農，[2]徳島大，[3]東洋大）

2I03-10　植物有用産物の効率的生産を目指した複合微生物培養系の開発
潤井 みや[1]，山田 泰之[1]，池田 義人[1]，中川 明[2]，佐藤 文彦[3,4]，
南 博道[2]，○土反 伸和[1]（[1]神戸薬大，[2]石川県大，[3]京大院生命，[4]大阪府大理）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 11:00～11:30

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化

2I05-01　デハイドリン TypK 配列による LDH 凍結保護メカニズムに関する研究
○大須田 穂波[1]，吉原 有紗[3]，原 正和[2,1,3,4]（[1]静大院農，[2]静大創造院，[3]静岡大農，[4]静大グリーン研）

2I05-02　ダイコン液胞カルシウム結合タンパク質によるリポソームの凍結凝集抑制に関する研究
○木村 友紀[1]，大須田 穂波[1]，原 正和[2,1,3]（[1]静大院農，[2]静大創造院，[3]静大グリーン研）

2I05-03　シロイヌナズナアスコルビン酸生合成の光調節に関与する VTC3 のリン酸化標的タンパク質の探索と解析
○田中 泰裕[1]，丸田 隆典[1,2]，小川 貴央[1,2]，森 大[3,4]，重岡 成[5]，
石川 孝博[1,2]（[1]鳥取大院連合農学，[2]島根大院・自然科学，[3]慶應大・先端生命研，[4]慶應大・政策・メディア，[5]近畿大・附属農場）

2I05-04　アスコルビン酸生合成の鍵酵素・GDP-L- ガラクトースホスホリラーゼの光制御
○有馬 功貴[1]，田中 泰裕[1,2]，濱田 珠未[1]，小川 貴央[1,2]，
石川 孝博[1,2]，丸田 孝典[1,2]（[1]島根大・生資科，[2]鳥取大院連合農学）

2I05-05　酸化ストレス下のアスコルビン酸再生におけるグルタチオン依存経路の生理学的重要性
○濱田 あかね，小川 貴央，石川 孝博，丸田 隆典（島根大院・自然科学）

2I05-06　植物のアスコルビン酸生合成の律速酵素 VTC2 の発現制御機構の解明
○鈴木 花奈子[1]，古澤 帆乃香[2]，石川 孝博[3]，吉村 和也[1,2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・応生・食栄，[3]島根大・生資科・生命工）

2I05-07　陸上植物の生殖細胞分化に必要な bHLH 転写因子複合体の解析
○山岡 尚平[1]，齊藤 美咲[1]，樅木 亮介[1]，吉竹 良洋[1]，光田 展隆[2]，
海老根 一生[3,4]，西浜 竜一[1,5]，荒木 崇[1]，河内 孝之[1]（[1]京大・院・生命科学，[2]産総研・生物プロセス，[3]基生研・細胞動態，[4]総研大・生命科学，[5]東京理科大・理工・応用生物）

2I05-08　シロイヌナズナの鉄恒常性に及ぼすビスマスの影響
○長田 武，西村 信人，山野 菜摘（摂南大理工）

2I05-09　活性酸素種により制御されるシロイヌナズナにおけるランタノイド応答
○松田 旭生[1]，川井 はな[2]，大沼 貴之[1,2,3]，武田 徹[1,2]（[1]近大院農，[2]近大農，[3]近大アグリ技研）

2I05-10　植物のα - リノレン酸 - グルタミン縮合体の同定
○高橋 公咲[1]，伊藤 詩織[2]，謝 肖男[3]，中川 博之[4]，北岡 直樹[2]，
松浦 英幸[2]（[1]東京農大，[2]北大農，[3]宇都宮大農，[4]農研機構）

2I05-11　高糖度トマトを生産する新しい栽培方法の分子生理学的な解析
○中田 大輔[1]，戸高 大輔[1]，城所 聡[1]，徳長 そよ香[1]，谷水 俊之[2]，
篠崎 一雄[3]，篠崎 和子[1,4]，溝井 順哉[1]（[1]東大院農，[2]株式会社プラントライフシステムズ，[3]理研CSRS，[4]東農大）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

動物―細胞機能 - シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム

2I06-01　小腸オルガノイド由来単層上皮細胞の生理学的特性評価
○高橋 裕，山内 祥生，佐藤 隆一郎 （東大院・農生科・応生化）

2I06-02　霊長類膵管オルガノイドを用いた tuft 細胞の新たな生体防御機構の解明
○坂口 恒介[1]，稲葉 明彦[2]，山根 拓実[1]，大石 祐一[1]，今井 啓雄[2]，岩槻 健[1] （[1]東農大　応生，[2]京大　ゲノム）

2I06-03　Blocking mevalonate pathway impairs protein homeostasis through the Akt-FoxO1 axis in human iPS cell-derived myocytes
○XIAOLIN ZHAO[1]，Miharu Kubo[1]，Hidetoshi Sakurai[2]，Ryuichiro Sato[1]，Yoshio Yamauchi[1] （[1]Graduate School of Agri. and Life Sci.・The Univ. of Tokyo，[2]CiRA・Kyoto Univ.）

2I06-04　水酸化部位特異的な内因性酸化ステロールによるコレステロール恒常性制御
○齋藤 穂高，佐藤 隆一郎，山内 祥生 （東大院・農生科・応生化）

2I06-05　Crucial role of the mevalonate pathway in the regulation of TAZ signaling in human iPS cell-derived myocytes
○Naipapohn Chuenmeechow[1]，Kubo Miharu Kubo[1]，Hidetoshi Sakurai[2]，Ryuichiro Sato[1]，Yoshio Yamauchi[1] （[1]Graduate School of Agri. and Life Sci.・The Univ. of Tokyo，[2]CiRA・Kyoto Univ.）

2I06-06　芳香族炭化水素受容体（AhR）は時計遺伝子 Bmal1 の変調を介して消耗性症候群を誘導する
○野村 拓也[1]，北風 智也[2]，芦田 均[1] （[1]神戸大院，[2]大阪府大院）

2I06-07　分化型および脱分化型平滑筋細胞におけるギャップ結合因子コネキシン 43 の発現解析
○中込 睦生[1]，徳永 亘祐[2]，穐本 翔太[2]，饗場 万知子[2]，鈴木 貴弘[2]，辰巳 隆一[2]，中村 真子[1] （[1]九州大学共創学部，[2]九州大学院生物資源環境科学府）

2I06-08　25- ヒドロキシビタミン D による脂肪細胞の分化制御機構
○三谷 塁一[1,2]，中嶋 桃菜[2] （[1]信州大農，[2]信州大院総合理工（農学専攻））

2I06-09　L- セリン欠乏は胚性線維芽細胞において膜脂質のリモデリングを誘発する
○須崎 智史[1]，安田 時生[1]，佐矢野 智子[4]，松本 悠[1]，藤井 遥[1]，大崎 友輔[1]，松尾 優樹[1]，田代 康介[1,2]，古屋 茂樹[1,2,3] （[1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]イノベ・バイオアーキ，[4]慶応大医）

2I06-10　セリン制限下での Igfbp4 誘導は insulin/IGF シグナルを減弱させる
○松本 悠[1]，須崎 智史[1]，藤井 遥[1]，大崎 友輔[1]，松尾 優樹[1]，古屋 茂樹[1,2,3] （[1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]イノベ・バイオアーキ）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

動物―細胞構造 - 細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，生体膜，メンブレントラフィック，相分離 / その他

2I08-01　尿酸トランスポーター発現ヒト培養細胞における purine nucleotide 代謝物解析
○北山 沙笑[1]，宮本 大資[2]，久保 裕亮[1]，佐藤 奈々[1]，永田 宏次[1]，安西 尚彦[3]，市田 公美[4]，岡本 研[1] （[1]東大農，[2]日本医大，[3]千葉大，[4]東薬大）

2I08-02　プロテインキナーゼ MEK1 および LKB1 による抗がん剤トランスポーター ABCG2 の制御機構の解析
○西出 高大，漆間 裕紀，平野 秀鷹，丸山 貴大，牧平 実紀，三谷 匡，田口 善智 （近畿大 生物理工 遺伝子）

2I08-03　HPLC-ELSD を用いた糖脂質および ABCG4 の輸送基質の解析
○西岡 紗来[1]，末永 光[1]，木岡 紀幸[1]，植田 和光[1,2]，木村 泰久[1] （[1]京大院・農・応用生命，[2]京大iCeMS）

2I08-04　MRP6（ABCC6）の局在する細胞内管状膜構造の解析
○永田 紅[1]，木岡 紀幸[1]，植田 和光[2] （[1]京大農，[2]京大高等研究院 iCeMS）

2I08-05　巨大リポソーム（GUV）を用いた膜輸送体再構成手法の開発
○宮岡 穂花[1]，白永 直子[1]，木岡 紀幸[1]，阿部 一啓[2]，木村 泰久[1] （[1]京大院・農・応用生命，[2]名大・CeSPI）

2I08-06　高密度で培養したイヌ横紋筋肉腫株から分泌されるエクソソーム内の 5-oxoproline の低下について
○宮本 汐里，佐藤 稲子，片山 欣哉，寺師 宗嵩，田村 好，田崎 弘之 （日獣大・獣医学科）

2I08-07　哺乳類細胞における接着斑タンパク質 CAP の精製系構築
○松山 大輝，小段 篤史，木村 泰久，木岡 紀幸 （京大農）

2I08-08　脂質修飾酵素の接着斑及び細胞膜への局在化システムの構築
○増元 亮裕，木村 泰久，木岡 紀幸 （京大院農・応用生命）

2I08-09　哺乳類細胞で発現している接着斑タンパク質ビネキシンαは脂質ホスファチジン酸と相互作用する
○鎌田 一希，木村 泰久，木岡 紀幸 （京大院農・応用生命）

2I08-10　ヒト骨肉腫細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞の接着斑細胞膜の単離と脂質組成の解析
○立花 大[1]，長尾 耕治郎[2]，黒田 美都[1]，木村 泰久[1]，木岡 紀幸[1] （[1]京大農，[2]京都薬科大）

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖，培養

3A01-01　*Azoarcus* sp. DN11 のヨウ素酸呼吸に関与する鍵酵素の同定
○笹村 星夜，天知 誠吾 （千葉大・院・園芸）

3A01-02　過酢酸作用における枯草菌芽胞のスポアコートの役割と発芽能損傷
○福田 一輝[1]，朝田 良子[1,2]，坂元 仁[2,3]，土戸 哲明[2]，古田 雅一[1,2]
([1]大阪府大院・工，[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ，[3]関西大・化生工)

3A01-03　寿命をコントロールする液胞膜局在性トランスポーターの機能解析
○益村 晃司[1]，金井 宗良[2]，荒川 賢治[1]，米山 香織[3]，
河田 美幸[3,4,5]，関藤 孝之[3,4]，水沼 正樹[1] ([1]広島大院・統合生命，[2]酒総研，[3]愛媛大院・農，[4]愛媛大・PROS，[5]愛媛大・学術支援)

3A01-04　*Saccharomyces cerevisiae* におけるピルビン酸デカルボキシラーゼ I 欠損は 2- デオキシグルコース感受性を高める
○宇田 竜成[1]，向山 佳歩[1]，井上 善晴[1]，野村 亘[1,2] ([1]京大院・農・応生科，[2]京大・生理化学研究ユニット)

3A01-05　分裂酵母を利用した 5 型キネシン阻害薬探索ツールの開発
○湯川 格史[1,2]，黄 宇商[1]，登田 隆[1,2] ([1]広島大・院統合生命，[2]広島大・健康長寿研究拠点)

3A01-06　分裂酵母における細胞外代謝物による鉄飢餓の克服
○中村 優里[1]，西村 慎一[1,2]，平塚 知成[1,3]，松山 晃久[1,3]，吉田 稔[1,2,3]
([1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス)

3A01-07　牛尿発酵液のラン藻培養への利用とその影響の評価
○加藤 勇太[1,2]，邱 泰瑛[1]，小西 正朗[1] ([1]北見工大院，[2]環境大善株式会社)

3A01-08　放線菌 *Streptomyces lividans* の細胞が死滅する高温ストレス下における糖代謝能の向上
○櫻井 惇[1]，内倉 寛斗[1]，山本 省吾[2]，山田 佑樹[2]，曽田 匡洋[2]，
柘植 陽太[1,3] ([1]金沢大院・自科，[2]長瀬産業株式会社，[3]金沢大・新学術)

3A01-09　*Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 の増殖に対するアミノ酸の影響評価
○小林 美水[1,2]，邱 泰瑛[2]，小西 正朗[2] ([1]北海道糖業(株)，[2]北見工大院)

3A01-10　プラスミド由来の H-NS 様因子が宿主細菌の集団内での生残性に与える影響
○盧 梁凝[1]，高島 綾[1]，杉山 京佳[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，
野尻 秀昭[1,2] ([1]東大院・農生科・AgTECH，[2]東大・微生物連携機構)

3A01-11　CO_2 が *Akkermansia muciniphila* の生理状態に及ぼす影響に関する研究
○荻原 修也[1]，櫻井 海月[2]，川﨑 信治[1,2]，佐藤 拓海[2] ([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖，培養 / 細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子

3A03-01　マイクロ流体デバイスと融合させたラマン分光顕微鏡によるバイオフィルム中の油分解細菌の不均一性の解析
○中務 百花[1]，プラサド マノージュ[2]，ウタダ アンドリュー[2,3]，
重藤 真介[1] ([1]関西学院大院・理工，[2]筑波大・生命環境系，[3]筑波大・MiCS)

3A03-02　インデックスマッチング材料に形成した緑膿菌バイオフィルムの 3 次元形態
○岡野 千草[1]，高部 響介[1]，平山 智弘[2]，野村 暢彦[1,3]，八幡 穣[1,3]
([1]筑波大・生命環境系，[2]筑波大・生命環境科学研究科，[3]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター)

3A03-03　Analysis of unknown interaction between soil-original bacteria
○ThomasKouyou SAVAGE[1]，Nobuhiko Nomura[1,2]，
Masanori Toyfuku[1,2,3] ([1]Tsukuba Univ.，[2]Tsukuba Univ. MiCS，[3]SunRiSE)

3A03-04　抗生物質が *Streptomyces* 属放線菌のコロニー形成率を高める現象の解析
○向井 慶一郎[1]，吉松 亜美[2]，保坂 毅[1,2,3] ([1]信州大・総合医理工，[2]信州大・農，[3]信州大・バイオメディカル研)

3A03-05　高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* におけるスクアレンの生理的機能の解析
○佐野 歩[1]，鈴木 理紗[1]，楊 影[1]，中村 聡[1,2]，八波 利恵[1] ([1]東工大生命理工，[2]沼津高専)

3A03-06　大腸菌における persister cell の特徴と persister 化に関わる因子の探索
○鹿野 将希[1]，松村 吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST)

3A03-07　出芽酵母における微小管重合阻害剤によるミトコンドリアの融合・分裂異常
○村田 和加恵[1,2]，黒見 まい[1]，山口 良弘[2]，荻田 亮[2,3]，藤田 憲一[2]
([1]米子高専，[2]阪市大院・理，[3]阪市大・健康研セ)

3A03-08　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞膜におけるステロールの役割の解析
○東 慶紀[1]，堀内 裕之[1,2]，福田 良一[1,2] ([1]東大農，[2]東大　微生物連携機構)

3A03-09　紡錘体チェックポイントと連動したアクチン依存的細胞核移動の解析
○黄 宇商[1]，湯川 格史[1,2]，登田 隆[1,2] ([1]広島大・院統合生命，[2]広島大・健康長寿研究拠点)

3A03-10　分裂酵母の核 - 細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析
○藤本 堯玄，水沼 正樹，久米 一規 （広大院・統合生命）

3A03-11　分裂酵母における複数の液胞タンパク質輸送に関わる新規 VPS 遺伝子の解析
○稲川 智章，大久保 和真，樋口 裕次郎，竹川 薫 （九州大生資環）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子 / 細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

3A05-01　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファジーを介した核分解の分子機構の解析
○藤田 純佳[1]，橋本 真宇[1]，吉田 稔[1,2,3]，有岡 学[1,2] ([1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研環境資源セ)

3A05-02　黄麹菌におけるα-アミラーゼ mRNA のライブセルイメージング
○守田 湧貴，竹川 薫，樋口 裕次郎　（九大院・生資環）

3A05-03　*Aspergillus nidulans* のα-1,3- グルカン生合成におけるα-アミラーゼ AmyD の GPI アンカーの重要性
○宮澤 拳[1,2]，竹内 歩[2]，小泉 亜未[2]，吉見 啓[3,4]，山形 洋平[5]，阿部 敬悦[2,4]　([1]感染研真菌部，[2]東北大院農，[3]京大院農，[4]東北大 NICHe，[5]東京農工大院農）

3A05-04　麹菌 *Aspergillus oryzae* における推定新規選択的オートファジー関連タンパク質の機能解析
○西尾 譲一郎，武田 陽一，菊間 隆志　（立命大生命）

3A05-05　マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御
○山本 里穂，福田 紗弓，高谷 直樹，竹下 典男　（筑波大 / 微生物サステイナビリティ研究センター（MiCS））

3A05-06　糸状菌リボソームペプチド生合成因子の細胞内局在
○梅村 舞子[1]，栗岩 薫[1]，加藤 薫[2]，町田 雅之[3]，五味 勝也[4]　([1]産総研生物プロセス，[2]産総研バイオメディカル，[3]金工大工，[4]東北大院農）

3A05-07　糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Sec14 ファミリータンパク質欠損がもたらすオルガネラと細胞壁への影響
○楊 淳児[1]，須澤 徹生[1]，岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携）

3A05-08　ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* のα-1,3- グルカン合成酵素遺伝子の同定と機能解析
○名和 義順[1]，河内 護之[1]，中沢 威人[1]，坂本 正弘[1]，阿部 敬悦[2]，田中 千尋[1]，吉見 啓[1]，本田 与一[1]　([1]京大院・農，[2]東北大院・農）

3A05-09　COPII 小胞輸送を制御する遺伝子の探索と機能解析
○中里 光希，池田 敦子，船戸 耕一　（広大院　統合生命）

3A05-10　土壌微生物と共存する新規ウイルス様粒子の生物学的意義
○永久保 利紀[1,2]，浅水 俊平[3,4]，山本 達也[1]，豊福 雅典[1,2,5]，野村 暢彦[1,2]，尾仲 宏康[3,4]　([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・MiCS，[3]東京大院・農，[4]東京大・CRIIM，[5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in Life Sciences）

3A05-11　加熱式たばこが有する化学・生物学的特徴の理解
○橋爪 恒夫，谷本 美智子，石川 晋吉，高橋 智裕，福島 俊朗（日本たばこ産業株式会社　製品評価センター）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

3A06-01　大腸菌の Trk 系 K トランスポーターの機能解析
○Ellen[1]，星 直美[1]，古田 忠臣[2]，山本 兼由[3]，辻井 雅[1]，石丸 泰寛[1]，魚住 信之[1]　([1]東北大学大学院工学研究科，[2]東京工業大学 生命理工学院，[3]法政大学生命科学部生命機能学科）

3A06-02　細胞膜脂肪酸組成が大腸菌の Na^+/H^+ アンチポーター活性に与える影響
○堀 一将[1,2]，篠田 恵子[1,3]，浜本 晋[1,3]，氏原 哲朗[2]，川崎 寿[1,3]，富田 武郎[1,3]，西山 真[1,3]　([1]東大院・農生科・アグテック，[2]協和発酵バイオ，[3]東大・微生物連携機構）

3A06-03　Na^+ および K^+ に着目した酸性ストレス下での大腸菌細胞内 pH 調節機構の解明
○臼田 隆亮[1]，須藤 雅己[2]，蓮池 祐紀[2]，安江 虹輝[3]，住田 和弥[2]，福田 紘子[3]，片岡 正和[2]　([1]信大工，[2]信大院　総合理工　生命医工，[3]信大工　物質化学）

3A06-04　酸性条件下における細胞内 pH 調節機構の解明
○福田 紘子[3]，須藤 雅己[2]，臼田 隆亮[1]，住田 和弥[2]，深田 悠太[2]，片岡 正和[2]　([1]信州大工，[2]信州大院　総合理工　生命医工，[3]信州大工　物質化学）

3A06-05　"Evaluation of the effect of cyclic-di-GMP inhibitors on biofilm formation of critical pathogens, Clostridium perfringens and Clostridioides difficile"
○SHAMMI AKTER，MEGUMI KISHIMOTO，RYO ITO，JIRO NAKAYAMA　(Kyushu University）

3A06-06　セカンドメッセンジャー・c-di-GMP を介した放線菌薬物排出機構の発見
○LEI YUKUN，浅水 俊平，尾仲 宏康　（東大院・農）

3A06-07　放線菌に対して生育阻害や二次代謝・胞子形成誘導を起こすペプチド系抗生物質 goadsporin の作用機構解析
○河野 佐知子，浅水 俊平，尾仲 宏康　（東大院農）

3A06-08　新規な放線菌分枝誘導物質の発見
○加藤 愛美[1]，浅水 俊平[1,2]，尾仲 宏康[1,2]　([1]東大院農，[2]CRIIM）

3A06-09　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3（2）におけるミコチオールを介した細胞内 NO の恒常性制御
○吉住 友希[1]，渋井 佑生子[2]，小川 卓矢[2]，伊藤 晋作[1,2]，矢嶋 俊介[1,2]，佐々木 康幸[1,2]　([1]東農大生命，[2]東農大農）

3A06-10　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3（2）における，内在性 NO による鉄取り込み制御
○杉本 聡，伊藤 晋作，矢嶋 俊介，佐々木 康幸　（東農大院生命）

3A06-11　コリネ型細菌が放出する膜小胞を介した鉄輸送の解析
○川島 花雪[1]，永久保 利紀[2,3]，野村 暢彦[2,3]，豊福 雅典[2,3,4]　([1]筑波大院・生物資源，[2]筑波大・生命環境系，[3]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター，[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

微生物―細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

3A08-01　*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* における酸素耐性株の取得と解析
○山本 裕司，磯 奏子，前田 一蕗，奥島 彩歌，喜島 真子，川口 祐果，柳 俊太朗，向井 孝夫　（北里大獣）

3A08-02　*L. plantarum* P1-2 株の酸化ストレス防御機構に関する研究
鈴木 智典[1]，○奥山 貴人[1]，相本 健吾[1]，松永 一太[1]，渡邊 昭夫[1]，武田 晃治[1]，野村 佳歩[1]，阿部 晃[2]，新村 洋一[1]，内野 昌孝[1]　([1]東京農大，[2]ミシガン大）

3A08-03　*Lactobacillus plantarum* における莢膜相変異を介した複合バイオフィルム形成によるストレス耐性獲得機構
○澁澤 薫[1]，江橋 由夏[1]，安部 公博[2]，野村 暢彦[2,3]，尾花 望[3,4]　([1]筑波大学大学院生命環境科学研究科生物資源科学専攻，[2]筑波大学生命環境系，[3]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センター）

3A08-04　*Lactobacillus paracasei* のカフェインに対するストレス応答
○佐藤 裕謙[1]，水木 徹[2]，三浦 健[3]　([1]東洋大学・生命科学，[2]東洋大学・バイオナノエレクトロニク ス研究センター，[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所）

3A08-05　カフェイン耐性 *Lactobacillus paracasei* におけるクロロゲン酸の影響
○髙久 美鈴[1]，佐藤 裕謙[2]，水木 徹[4]，三浦 健[1,2,3]　([1]東洋大・生命科学，[2]東洋大院・生命科学，[3]東洋大・ ライフイノベーション研究所，[4]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

3A08-06　壺造り純米黒酢より単離した *Acetobacter pasteurianus* の MVs の免疫賦活作用
○相松 光太[1]，石田 隼斗[1]，木村 友希[1]，藤井 暁[2]，長野 正信[2]，今井 友也[3]，倉田 淳志[1]，上垣 浩一[1]　([1]近畿大農，[2]坂元醸造株式会社，[3]京都大生存研）

3A08-07　壺づくり黒酢から Jurkat 細胞の増殖抑制作用を示す MVs 生産細菌の探索
○石田 隼斗[1]，相松 光太[1]，木村 友希[1]，藤井 暁[2]，長野 正信[2]，今井 友也[3]，倉田 淳志[1]，上垣 浩一[1]　([1]近大農，[2]坂元醸造株式会社，[3]京大生存研）

3A08-08　*Lactobacillus* sp. RD055328 によって生産される膜小胞の特性
○竹内 慎平[1]，安井 萌香[1]，田村 健人[1]，倉田 淳志[1]，山崎 思乃[2]，今井 友也[3]，上垣 浩一[1]　([1]近畿大農，[2]関西大化生工，[3]京都大生存研)

3A08-09　*Streptococcus mutans* におけるクオラムセンシングを介したメンブレンベシクルの産生と機能解析
○伊藤 碧美[1]，山本 千佳[2]，永沢 亮[3]，尾花 望[4,6]，野村 暢彦[5,6]，豊福 雅典[5,6,7]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境科学研究科，[3]産総研・生物プロセス，[4]筑波大・医学医療系，[5]筑波大・生命環境系，[6]筑波大・MiCS，[7]SunRiSE)

3A08-10　小腸組織内共生細菌アルカリゲネス菌の産生する膜小胞とその内容物同定
○柴田 納央子[1]，安藤 正浩[1]，堀井 俊平[2,3]，Ashok Zachariah Samue[1]，竹山 春子[1,2,3,4]　([1]早大ナノライフ創新研，[2]早大院先進理工，[3]産総研-早稲田CBBD-OIL，[4]早大先進生命動態研)

3A08-11　宿主腸内で腸内細菌叢が産生する膜小胞の解析
○菊地 薫[1]，尾花 望[2,3]，野村 暢彦[3,4]　([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]筑波大・生命環境系)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物―物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）

3B02-01　呼吸鎖変異大腸菌株を用いたグルコースからの GABA の高生産
○若原 洋輝，溝越 拓哉，前田 智也，吹谷 智，横田 篤　(北大農)

3B02-02　微生物電気合成系を用いたグリセロールからの 1,3- プロパンジオール発酵系の構築
○柳瀬 卓馬，井上 謙吾，吉田 ナオト，清 啓自　(宮大院農)

3B02-03　コリネ型細菌における長鎖脂肪酸排出輸送体の探索
○佐藤 美奈子，村田 紀子，村松 哲広，竹野 誠記，池田 正人　(信州大農)

3B02-04　コリネ型細菌による中鎖脂肪酸生産への代謝工学
○村田 春樺，内藏 萌，竹野 誠記，池田 正人　(信州大農)

3B02-05　コリネ型細菌におけるリポ酸の炭素骨格 C8 供給経路の解明
○津久井 裕太，竹野 誠記，池田 正人　(信州大農)

3B02-06　デオキシリボヌクレオチド生合成経路遺伝子を破壊した大腸菌の生育評価と代替経路導入の検証
○出口 賢児[1]，斯 大勇[1]，堀之内 伸行[1]，小園 祥子[1]，竹内 道樹[1]，日比 慎[1,2]，M. POOLE Anthony[3]，小川 順[1]　([1]京大院農，[2]富山県立大工，[3]オークランド大学)

3B02-07　コリネ型細菌における " ビオチン再回収説 " とその検証
○宮澤 萌，小林 央恒，横山 夏音，岡本 理瑚，竹野 誠記，池田 正人　(信州大農)

3B02-08　コリネ型細菌を用いた適応実験室進化による芳香族化合物発酵生産株の創製
○立川 千生，平沢 敬　(東工大生命理工学院)

3B02-09　GMD による酵素生産向上変異株の高速スクリーニング
○町田 雅之[1]，佐野 元昭[1]，北川 治恵[1]，佐藤 春華[1]，阿部 敬悦[2]，石井 智子[2]　([1]金工大ゲノム，[2]東北大院農)

3B02-10　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 変異株のゲノム比較解析による新規油脂生産関連遺伝子の同定
○佐藤 里佳子[1]，森 一樹[2]，荒 学志[3]，山崎 晴丈[1]，志田 洋介[4]，小笠原 渉[4]，矢追 克郎[5]，荒木 秀雄[3]，田代 康介[6]，石谷 孔司[5]，油谷 幸代[2]，高久 洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]産総研・早大 CBBD-OIL，[3]不二製油グループ本社，[4]長岡技科大・工，[5]産総研・生物プロセス，[6]九州大・院農)

3B02-11　*Trichoderma virens* PS1-7 株を用いたスクアレン高産生条件の検討
○須波 和，崎浜 靖子，橋本 誠，橋床 泰之　(北大院農)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物―物質生産 - 発酵（二次代謝産物）

3B04-01　*Streptomyces* 属放線菌における休眠遺伝子発現活性化を指向した塩基編集システムの開発
○大塚 遼[1]，佐藤 悠[1]，岡野 憲司[1,2]，本田 孝祐[1,2]，木谷 茂[1,2]　([1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]阪大・先導学研機)

3B04-02　SARP 型転写活性化因子 SRO_3163 の過剰発現によるシクロヘキセン含有エナミド化合物の生産
○見崎 裕也[1]，ニンディタ ヨシ[1]，藤田 昂大[1]，ファウジ アミルディン アフマド[2]，荒川 賢治[1,2]　([1]広島大院・統合生命，[2]広島大院・先端研)

3B04-03　Comprehensive metabolome analysis to explore the biologically active metabolites in *Streptomyces rochei*.
○Mingge ZHANG，Rikito NISHIURA，Kenji ARAKAWA (Grad. Sch. Integr. Sci. Life，Hiroshima Univ.)

3B04-04　糸状菌の休眠遺伝子を覚醒するハイグロマイシン B を利用した新規天然活性物質の探索
○加藤 翔[1]，渡邊 善洋[1]，渡部 実加[2]，石川 春樹[2]，岩月 正人[1]，野中 健一[1]　([1]北里大・大村研，[2]北里大・理)

3B04-05　麹菌における異種テルペノイド生産に資する代謝経路の解明
○齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，南 篤志[3]，及川 英秋[3]，丸山 潤一[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理)

3B04-06　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヒストンシャペロン HirA のコウジ酸生産への関与
○工藤 駿斗[1]，荒川 弦矢[1]，白井 沙夜[1]，小川 真弘[2]，進藤 斉[1]，穂坂 賢[1]，徳岡 昌文[1]　([1]東農大院農，[2]野田産研)

3B04-07　Yeastcidin 生産に関わる麹菌遺伝子の探索
○橋本 純[1]，雲林院 正喜[3]，清水 美里[3]，数岡 孝幸[1]，小川 真弘[2]，穂坂 賢[1]，進藤 斉[1]，徳岡 昌文[1]　([1]東農大院応生，[2]野田産研，[3]東農大応生)

3B04-08　天然由来抗菌物質により誘導される *Penicillium* 属菌二次代謝の解析
○波形 匠[1]，老木 紗予子[2]，二宮 章洋[2,3]，矢口 貴志[4]，浦山 俊一[2,5]，萩原 大祐[2,5]　([1]筑波大院・生命地球，[2]筑波大・生命環境，[3]東大院・農，[4]千葉大・MMRC，[5]筑波大・MiCS)

3B04-09　海洋無脊椎動物由来細菌における化学相互作用による抗生物質生産への影響調査
○松原 雄太[1]，ウラノバ ダナ[2]　([1]高知大院，[2]高知大)

3B04-10　細胞性粘菌種間で保存されたポリケタイド合成酵素による細胞シグナリングの進化発生学的解析
○山﨑 大樹[1]，成田 隆明[2]　([1]千葉工大・院・工，[2]千葉工大・先進工・生命)

3B04-11　鉄酸化細菌 *Leptothrix cholodnii* が作る鞘状酸化鉄の in-situ 多形分析
○宮前 靖弘[1]，久能 樹[2]，重藤 真介[1]　([1]関西学院大院・理工，[2]筑波大・生命環境系)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

微生物―物質生産 - 微生物変換，酵素反応，機能性高分子

3B07-01　強化された CoA 生合成による組換え大腸菌での PHB 生産
○工藤 大嵩，朝山 宗彦，西原 宏史，長南 茂　(茨城大農)

3B07-02　組換え *Cupriavidus necator* による乳酸ベースバイオプラスチックの生合成
○板倉 真優[1]，岡本 沙樹[2]，河原 あい[2]，田中 賢二[3]，田口 精一[4]，松崎 弘美[1,2]　([1]熊本県大・環境共生，[2]熊本県大院・環境共生，[3]近畿大・産理工，[4]東農大・生命科学)

3B07-03　An alternative biosynthetic route for P(3HB-*co*-4HB) in *Ralstonia eutropha* H16 via expression of O2-tolerant 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from Archaea
○KAI HEE HUONG，ORITA IZUMI，FUKUI TOSHIAKI
(School of Life Science and Technology，Tokyo Institute of Technology)

3B07-04　組換え *Ralstonia eutropha* によるポリヒドロキシアルカン酸ブロック共重合体の生合成
○石原 静流[1]，折田 和泉[1]，松本 謙一郎[2]，福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工，[2]北大院工)

3B07-05　バイオポリマー生産系を駆動力とした膜小胞（MV）の微生物合成
○高 相昊[1]，佐藤 道夫[2]，臼倉 雄紀[3]，豊福 雅典[3]，野村 暢彦[3]，田口 精一[1] ([1]東農大，[2]明治大，[3]筑波大)

3B07-06　PET 加水分解酵素の異種発現による Paracoccus denitrificans へのプラスチック分解能の付与
○松場 匠哉[1]，中井 忠志[1,2] ([1]広島工大院，[2]広島工大)

3B07-07　*Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 由来生分解性プラスチックナイロン 4 分解酵素の諸性質解明
○佐々浪 由梨香[1]，本田 正義[2]，外村 彩夏[3]，阿部 英喜[4]，山田 美和[1,5] ([1]岩手大院・総合科学，[2]東京理科大・工，[3]東海大・農，[4]理研CSRS，[5]岩手大・農)

3B07-08　麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に特異的に吸着したポリエステラーゼ CutL1 の可視化方法の構築
○齋藤 有美[1]，寺内 裕貴[2]，吉見 啓[3]，田中 拓未[4]，石崎 裕也[5]，三ツ石 方也[5]，藪 浩[6,7]，阿部 敬悦[1] ([1]東北大院農，[2]京大院地球環境学堂，[3]京大院農，[4]農研機構・農環研，[5]東北大院工，[6]東北大WPI-AIMR，[7]東北大多元研)

3B07-09　中鎖モノマー導入による軟質性・配列制御型グリコール酸ポリマーの生合成
○田中 聖也[1]，冨田 宏矢[2]，佐藤 圭悟[1]，Nomura Christopher[3]，松本 謙一郎[2] ([1]北大総合化，[2]北大院工，[3]Univ. of Idaho)

3B07-10　セルロース生産能を有する新規酢酸菌の同定
○水野 正浩，田川 聡美，天野 良彦 (信大工)

3B07-11　*Leuconostoc citreum* KD3 株に由来する難消化性菌体外多糖の性状解析
○吉田 健太郎[1]，田中 裕大[1]，巻田 春香[1]，栗山 亘[2]，阿部 秀飛[2]，本多 裕司[1]，松本 健司[1]，小柳 喬[1] ([1]石川県立大 生資環，[2]サンエイ糖化)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

微生物―物質生産 - 微生物変換，酵素反応，機能性高分子

3B09-01　レスベラトロール位置選択的配糖化酵素の探索と機能解析
○木許 翔太[1]，竹内 道樹[2]，板垣 優大[3]，岸野 重信[1]，岡田 奈津実[1]，原 良太郎[2]，上田 誠[2,3]，小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]小山高専物質工学科)

3B09-02　第三級テルペンアルコールへの配糖化反応に関する研究
○板垣 優大[1]，三塚 海渡[1]，竹内 道樹[2]，原 良太郎[2]，小川 順[3]，上田 誠[1,2] ([1]小山高専物質工学科，[2]京大院農・産業微生物，[3]京大院農・応用生命)

3B09-03　アラビトール生産菌 *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 の糖アルコール生産経路
○岩田 寛[1]，眞榮田 麻友美[2]，柏木 豊[2]，前橋 健二[1,2]，吉川 潤[2] ([1]東農大院応生，[2]東農大応生)

3B09-04　ビフィズス菌抽出液を用いた非遺伝子組換え酵素によるラクト -*N*- ビオース I の生産
○町田 峻太郎[1,3]，齋藤 勝一[1]，西本 完[1]，北岡 本光[1,2] ([1]農研機構食品研，[2]新潟大農，[3]宇部高専)

3B09-05　新奇菌体外ラクターゼ生産菌の探索とそのラクターゼの酵素化学的特徴
○丹羽 由樹[1]，中村 浩平[1,2]，川﨑 信治[3]，島田 昌也[1,2]，堀口 博文[4]，中川 智行[1,2] ([1]岐阜大院自然科学，[2]岐阜大応生，[3]東京農大生命，[4]合同酒精株式会社)

3B09-06　α -1,3- グルカン結合ドメインと 4 量体赤色蛍光タンパク質からなる融合タンパク質の構築と特性評価
○大塚 唯，古澤 宏幸，今野 博行，矢野 成和 (山形大院理工)

3B09-07　茶殻から生成する過酸化水素を利用したシトクロム P450 酸化反応プロセスの確立
○川名 秀明[1]，本田 裕樹[2]，古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大院理工，[2]奈良女子大理)

3B09-08　担子菌ジオキシゲナーゼはキノコ主要香気成分であるマツタケオール生成に必須である
○手嶋 琢[1]，府内 里紗[1]，中沢 威人[2]，内海 俊彦[1]，伊藤 隼哉[3]，向井 裕美[4]，仲川 清隆[3]，本田 与一[2]，松井 健二[1] ([1]山大院・創成，[2]京大院・農，[3]東北大院・農，[4]森林総研)

3B09-09　*p*- ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素ファミリーに属する新たなタンパク質の同定と機能解析
○勝木 希[1]，桝尾 俊介[1,2]，高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―代謝 - 代謝経路，メタボローム

3C01-01　超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* における新たなキチン資化経路の発見
○渡邉 侑[1]，宮本 大暉[1]，金井 保[1,2]，跡見 晴幸[1] ([1]京大院工，[2]富山県立大工)

3C01-02　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 2-PG 代謝経路の同定
○道盛 裕太，井崎 力久，三輪 有哉，濱北 宗太郎，下坂 天洋，牧野 勇樹，竹野 領，佐藤 喬章，別府 春樹，金井 保，跡見 晴幸 (京大院工)

3C01-03　分裂酵母におけるセラミド合成酵素 Lag1 と Lac1 の機能解析
○花岡 和樹，池田 敦子，船戸 耕一 (広島大生生)

3C01-04　緑膿菌の相同な硝酸イオン／亜硝酸イオントランスポーター群の機能的差異
○岡本 洸彰[1]，亀谷 将史[1,2]，石井 正治[1,2]，新井 博之[1,2] ([1]東大農，[2]東大微生物連携機構)

3C01-05　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成におけるタンパク質間相互作用に関する研究
○森田 裕太郎[1]，叶 思言[1]，吉田 彩子[1,2]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2] ([1]東大院農，[2]東大・微生物連携機構)

3C01-06　グラム陽性メチロトローフ細菌 *Arthrobacter* sp. YM1 のランタノイド依存的メタノール生育に関する研究
○森田 翔太[1]，八木 茜[1]，矢野 嵩典[1]，谷 明生[2]，中川 智行[3]，阿野 嘉孝[4]，三井 亮司[1] ([1]岡山理大理，[2]岡山大植物研，[3]岐阜大応生科，[4]愛媛大農)

3C01-07　微生物分解を介した葉酸の新たな環境動態
○土肥 裕希[1,2]，前田 典歩[1,2]，高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

3C01-08　水素細菌による CO2 由来バイオポリマー高生産メカニズムの解析
○山本 将大[1]，亀谷 将史[1,2]，新井 博之[1,2]，石井 正治[1,2] ([1]東大院農生科 応生工，[2]東大微生物連携機構)

3C01-09　*Cupriavidus* sp. LA-1 株によるルマジン分解機構の解明
○前田 典歩[1,2]，土肥 裕希[1,2]，高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―代謝 - 発酵生理，代謝調節 / 代謝 - 代謝経路，メタボローム

3C03-01　*Ashbya gossypii* のリボフラビン生産とミトコンドリアフラビンタンパク質の関係
○加藤 竜也[1,2,3]，横森 愛美[3]，朴 龍洙[1,2,3]　([1]静岡大農，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡大院・総合科技)

3C03-02　*Ashbya gossypii* サーチュイン遺伝子破壊株の解析
○狩野 麻衣[1]，畔上 純也[1]，朴 龍洙[1,2,3]，加藤 竜也[1,2,3]　([1]静岡大院・総合科技，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡大農)

3C03-03　土壌培養と液体集積培養の違いによる L-glucose 資化菌の菌叢変化
○濱 彰人[1]，土肥 裕希[1,2]，中村 顕[1,2]　([1]筑波大　生命環境，[2]筑波大 MiCS)

3C03-04　*Shewanella oneidensis* の発酵能力の検証
○池田 壮汰，高妻 篤史，渡邉 一哉　(東薬大生命)

3C03-05　低電位電極存在下における *Aeromonas hydrophila* の代謝発現変動
○土屋 美愉，高妻 篤史，渡邉 一哉　(東薬大生命)

3C03-06　好熱菌 *Bacillus smithii* S-2701M 株におけるレボグルコサン代謝の全容解明
栗谷 祐矢[1]，○矢野 真里絵[1]，佐藤 浩平[1]，道羅 英夫[2]，梅村 征一郎[3]，北岡 本光[4]，伏信 進矢[5]，吉田 信行[1]　([1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研，[3]日本食品化工(株)，[4]新潟大農，[5]東大院・農生科)

3C03-07　微生物生態系におけるルミクロム分解機構の解明
○鈴木 麻菜美[1]，前田 典歩[1]，土肥 裕希[1,2]，高谷 直樹[1,2]　([1]筑波大・生命環境，[2]微生物サステナビリティ研究センター(MiCS))

3C03-08　凍結乾燥きのこ子実体における加水自己消化反応のメタボローム解析
○大沼 広宜[1,2]，門脇 里恵[1]，佐藤 美夢[1]，若山 正隆[1]　([1]慶應義塾大学 先端生命科学研究所，[2]公益財団法人 庄内地域産業振興センター)

3C03-09　酸素制限条件におけるコリネ型細菌のアミノ酸代謝についてのメタボローム解析
○川口 秀夫[1]，蓮沼 誠久[2]，大西 康夫[3]，佐塚 隆志[4]，荻野 千秋[5]，近藤 昭彦[1,5]　([1]神戸大院科技イノベ，[2]神戸大先端バイオ，[3]東大院農，[4]名古屋大生物機能開発セ，[5]神戸大院工)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

酸素―糖質代謝関連酵素 / その他

3C05-01　希少糖 D- アルロース生産が可能な *Shinella zoogloeoides* NN6 由来 L- リブロース 3- エピメラーゼの基質複合体の構造解析
○吉田 裕美[1,3]，吉原 明秀[2,3]，鈴木 琢磨[2]，森本 兼司[2,3]，神鳥 成弘[1,3]　([1]香川大・医・総合生命研究セ，[2]香川大・農，[3]香川大・国際希少糖研究教育)

3C05-02　メラノーマ細胞におけるオリゴシアル酸転移酵素 ST8Sia6 の機能
○畑中 理菜[1,2]，荒木 映莉乃[1,2]，羽根 正弥[1,2]，呉 迪[1,2,3]，北島 健[1,2,3]，佐藤 ちひろ[1,2,3]　([1]名大農，[2]名大生物機能セ，[3]iGMED and iGCORE)

3C05-03　*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA による alkyl α -D-glucopyranosides の酵素的生産
○曹 偉[1]，渡邉 理沙[1]，石井 義孝[2]，桐村 光太郎[1,2]　([1]早大・先進理工・応化，[2]早大・理工研)

3C05-04　ヒト腸内細菌 *Bacteroides cellulosilyticus* による海藻多糖β -1,3- キシランの資化機構 － 菌体内β -1,3- キシロシダーゼの機能解析 －
長縄 真以[1]，○岡﨑 文美[2]　([1]三重大生資，[2]三重大院生資)

3C05-05　可逆的脱炭酸酵素 UbiD の探索システムの構築
土井 淳平，村瀬 諒太，○笹原 遥介，市村 遼，青野 陸，木野 邦器　(早大先進理工応化)

3C05-06　タンパク質架橋酵素活性の制御剤探索に向けた新規 FRET プローブの開発
○青山 瑠里子，辰川 英樹，人見 清隆　(名大院・創薬科学)

3C05-07　葉面常在菌由来のクチナーゼ様酵素はクチナーゼ活性を持つ
○植田 浩一[1]，田端 純[2]，勢〆 康代[1]，正木 和夫[3]，山下 結香[1]，北本 宏子[1]　([1]農研機構・農環研，[2]農研機構・植防研，[3]酒総研)

3C05-08　サツマイモ塊根由来の粗酵素と緑茶浸出液を用いた効率的なテアフラビン合成
○廣實 咲紀，松田 寛子，奈良井 朝子　(日獣医大院・応生科)

3C05-09　腸内細菌における葉酸生合成遺伝子の同定
○佐藤 喬章，加地 楓，跡見 晴幸　(京大院工)

3C05-10　活性型ビタミン D の生産に向けた CYP105A1 とその変異体の安定性の比較
○滝田 禎亮[1]，安田 佳織[2]，榊 利之[2]，保川 清[1]　([1]京大農，[2]富山県大工)

3C05-11　アセトアミノフェン酸化代謝物 N-acetyl-p-benzoquinone の硫酸化
○瀬川 浩志[1]，黒木 勝久[1]，Ming-Cheh Liu[2]，水光 正仁[1]，榊原 陽一[1]　([1]宮崎大農，[2]トレド大薬)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

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

3C06-01　メチオニン生合成酵素 MetX と MetW の相互作用領域の探索
○長谷部 文人，丸山 千登勢，濱野 吉十　(福井県大院・生物資源)

3C06-02　分子進化系統解析により見出した新規 PLP 非依存型オルニチンラセマーゼ
○奥野 雄大，老川 典夫，山中 一也　(関西大化工)

3C06-03　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* がもつ二つのアラニン脱水素酵素の機能解析
○前野 美久[1]，大島 敏久[1,2]，大森 勇門[1,2]　([1]大阪工大・院工・生命工学，[2]大阪工大・工・生命工学)

3C06-04　リジン生合成の強化による大腸菌への高温ストレス耐性の付与
○磯貝 章太，高木 博史　(奈良先端大バイオ)

3C06-05　高熱性古細菌 *Pyrococcus abyssi* 由来 *N*-acyl-D-amino 酸加水分解酵素の生化学的特性の解明
○米田 菜織[1,2]，氷見山 幹基[2]，長澤 壮柄[1,2]，佐々本 康平[2,3]，加塩 健悟[1]，大嶋 真紀[2]，倉田 淳志[1]，中村 努[2]，上垣 浩一[1]　([1]近大院農，[2]産総研，[3]摂南大院理工)

3C06-06　L- メチオニン脱炭酸酵素の活性中心に存在する Tyr196 残基の機能解析
○大川 敦司[1]，井上 朝晶[2]，尾上 友基[2]，志波 智生[2]，根本 理子[1]，田村 隆[1]，稲垣 賢二[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]京工繊大院・応生)

3C06-07　*Grimontia hollisae* コラゲナーゼの立体構造解析
○安本 瑞貴[1]，池内 健晃[1]，滝田 禎亮[1]，水谷 公彦[1]，三上 文三[2,3]，田中 啓友[4]，服部 俊治[4]，保川 清[1]　([1]京大院農，[2]京大生存研，[3]京大エネ研，[4]株式会社ニッピバイオマトリクス研究所)

3C06-08　エカルディーグティエール症候群の患者で同定された変異をもつリボヌクレアーゼ H2 を発現する動物細胞の性状解析
○原 晴佳[1]，神田橋 眞子[1]，鴨田 佳奈[2]，矢野 晴菜[2]，
小川 紗央里[1]，姫田 康平[1]，馬場 美聡[1]，滝田 禎亮[1,2]，保川 清[1,2]
（[1]京大院・農，[2]京大・農）

3C06-09　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼとそのホモログの結晶構造解析による触媒機構と機能分化様式の解析
○富田 武郎[1,2]，西山 真[1,2]（[1]東大院農生科・アグテック，[2]東大・微生物連携機構）

3C06-10　活性型組換えヒトチロシナーゼの調製とその酵素学的性質の解明
○柴田 陽樹[1]，矢内 あすか[2]，田中 孝明[1,2]，谷口 正之[3]，
落合 秋人[1,2]（[1]新潟大院自然科学研究科，[2]新潟大工，[3]新潟青陵大人間総合学科）

3C06-11　ネッタイシマカの脱皮ホルモン生合成経路を標的とした新規殺虫剤の研究
○海老原 佳奈[1]，稲葉 和恵[1]，小祝 孝太郎[2]，髙谷 大輔[3]，
渡邉 千鶴[3]，安孫子 ユミ[1]，今村 理世[4]，岡部 隆義[4]，
小島 宏建[4]，佐久間 知佐子[5]，嘉糠 洋陸[5]，藤川 雄太[6]，
井上 英史[6]，本間 光貴[3]，千田 俊哉[2]，丹羽 隆介[1]（[1]筑波大学，[2]高エネルギー加速器研究機構，[3]理化学研究所，[4]東京大学　創薬機構，[5]東京慈恵会医科大学，[6]東京薬科大学）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

酵素―アミノ酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素

3C08-01　ドリコール生合成に寄与する *cis* 型プレニルトランスフェラーゼのリン酸化修飾による活性制御
○高橋 朋宏，山家 史大，酒井 勇貴，皆川 知歩，和氣 駿之，
中山 亨，高橋 征司（東北大院・工）

3C08-02　*Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T　株由来の組換えホスホリパーゼ A（rPlaA）の諸性質解析と触媒残基の同定
○木村 風香，辻本 善之，渡部 邦彦（京府大院・生命環境）

3C08-03　放線菌 Amycolatopsis sp. NT-119 株由来酸性リン脂質特異的ホスホリパーゼの精製と諸特性解析
○渡辺 修平，板倉 海統，杉森 大助（福島大）

3C08-04　異種組換え発現ホスファチジルグリセロール特異的ホスホリパーゼ C の諸特性解析
○川嶋 俊輔[1]，梶山 聖人[2]，松本 悠歩[1]，松井 萌[2]，杉森 大助[1,2]
（[1]福島大学，[2]福島大学大学院）

3C08-05　パラゴムノキの天然ゴム生合成酵素複合体におけるタンパク質間相互作用ドメインとその機能的意義の解析
○Nadia NUR SHAZANA BINTI ABU TALIB KHAN[1]，
廣森 美樹[1]，和氣 駿之[1]，山下 哲[2]，戸澤 譲[3]，山口 晴彦[4]，
宮城 ゆき乃[4]，中山 亨[1]，高橋 征司[1]（[1]東北大院，[2]金沢大院・自然科学，[3]埼玉大院・理工，[4]住友ゴム工業(株)）

3C08-06　リパーゼ超誘導発現システムの機構解明
○桂木 脩[1]，工藤 悠紀野[1]，立野 光[1]，伊藤 春陽[1]，大塚 拓[1]，
神田 有希[1]，齋藤 彩[1]，堀越 愛[1]，井上 香織[1]，赤沼 元気[2]，
牛尾 一利[3]，石塚 盛雄[1]（[1]中央大・理工・応化，[2]学習院大・理・化学，[3]新居浜高専・生物応化）

3C08-07　*Staphylococcus piscifermentans*，*Staphylococcus condimenti*，*Staphylococcus epidermidis* 由来イソロイシン 2- エピメラーゼホモログの機能解析
○牟田口 祐太，梅津 光，春日 和（秋田県大生資）

3C08-08　緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-threonine aldolase 変異酵素の作製と性質
○金澤 諒[1]，西村 克史[1,2]，谷川 実[1]，東 翔子[1]，後藤 勝[3]，
平戸 祐喜[3]（[1]日大理工，[2]日大短大，[3]東邦大理）

3C08-09　好酸性鉄酸化細菌 Acidithiobacillus ferrooxidans 由来 D- アミノ酸脱水素酵素の性質
○松崎 勇之介[1]，谷川 実[1]，鈴木 里菜[1]，東 翔子[1]，西村 克史[1,2]
（[1]日大理工，[2]日大短大）

3C08-10　カイコセリンラセマーゼの同定と酵素学的性質の解析
○田中 優衣，伊藤 智和，邊見 久，吉村 徹（名大院・生命農）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

環境科学・バイオマス利用―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質 / 資源変換，資源再生利用

3D02-01　gamma-HCH 脱塩化水素酵素 LinA による DDT の分解
○伊藤 蓮[1]，カファヤ ユスフ[1]，宮内 啓介[2]，大坪 嘉行[1]，
永田 裕二[1]（[1]東北大院・生命科学，[2]東北学院大・工学部）

3D02-02　ポリエチレンを食む虫からのアルカン分解菌
○太田 貴将[1]，海老名 芹紗[1]，下浦 穂貴[1]，宮本 憲二[2]，寺本 真紀[1]
（[1]高知大農林海洋，[2]慶應大理工）

3D02-03　Emerging interspecific relationships on PAH degradation of the pyrene-degrading consortia
○Yuanhao ZHU[1]，Felipe VEJARANO[1]，
Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Kazunori OKADA[1]，
Onruthai PINYAKONG[3]，Hideaki NOJIRI[1,2]（[1]AgTech. Grad. Sch. Agric. Life Sci.，UTokyo，[2]CRIIM，UTokyo，
[3]Chulalongkorn Univ.）

3D02-04　カルバゾール分解プラスミドを保持する細菌の代謝能の揺らぎの 1 細胞レベル検出
○山口 雅貴[1]，水口 千穂[2]，野尻 秀昭[2]，重藤 真介[1]（[1]関西学院大院理工，[2]東大院・農生科・AgTECH）

3D02-05　微生物培養用ゲル充填マイクロウェルアレイを用いたナフタレン分解菌の培養と取得
○岸上 佳保里[1]，楊 重陽[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，
佐々 文洋[3]，野尻 秀昭[1,2]（[1]東大院・農生科・AgTECH，[2]東大・微生物連携機構，[3]九州大・システム情報科学研究院）

3D02-06　ハイスループットな微小結晶蛍光測定法による多環芳香族化合物分解微生物群の取得
○ベハラノ フェリペ，水口 千穂，岡田 憲典，野尻 秀昭（東大院・農生科・AgTECH）

3D02-07　Microdroplet-based system for cultivation and acquisition of naphthalene-degrading bacteria
○CHONGYANG YANG[1,2]，Kahori KISHIGAMI[1,2]，Yuri OTA[2]，
Tetsushi SUYAMA[2]，Masamune MORITA[2]，
Satoko MATSUKURA[2]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3]，
Kazunori OKADA[1]，Naohiro NODA[2]，Hideaki NOJIRI[1,3]
（[1]AgTECH，Grad. Sch. Agri. Life Sci.，UTokyo，[2]BRI.，
AIST，[3]CRIIM，UTokyo）

3D02-08　細菌由来の有機塩素系殺虫剤分解に関わるデハロゲナーゼを発現するシロイヌナズナ植物の作製
○鄧 文昊，高田 美信，大坪 嘉行，渡辺 正夫，永田 裕二（東北大院・生命科学）

3D02-09　既知微生物固定化担体を用いたアンモニア除去リアクターの構築
○飯山 桃子[1]，木間塚 律輝[2]，矢野 未涼[2]，三浦 健[1,2,3]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学，[3]東洋大・バイオレジリエンス研究プロジェクト）

3D02-10　生物学的処理水を浄化するための光触媒・BDD 電極併用処理技術の開発
○熊谷 尚[1]，久保田 智樹[1]，藤嶋 昭[2]，落合 剛[3]，鈴木 智順[1,2]（[1]東理大・応生，[2]東理大・総研，[3]KISTEC）

3D02-11　タンパク質と炭酸水素イオンによる金属回収法の検討
○鈴木 菜那，玉置 祥二郎，前山 和輝，上西 寛司（雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所）

3D02-12　An investigation of upland soil fertility from different soil types
○QUOC THINH TRAN，Kiwako S. ARAKI，Motoki KUBO
（Ritsumeikan University）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

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

3D04-01　海洋微生物と鉄鋼スラグを用いた藻類生育の促進
○大竹 晟佳[1]，月舘 秀典[1]，加藤 由悟[1]，吉村 航[2]，鈴木 道生[1]
([1]東大院農，[2]日本製鉄先端技術研究所)

3D04-02　インド高濃度セレン蓄積地帯由来 *Cellulomonas* 属細菌における亜セレン酸還元の呼吸鎖への関与およびセルロース分解能
○坂本 暁紀[1]，井上 真男[1]，青野 陸[1]，Prakash Tejo N.[2]，三原 久明[1]　([1]立命大生命，[2]Thapar Inst. Eng. Tech.)

3D04-03　木材腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 由来 LP-MO9 がセルロース分解に及ぼすシナジー効果
○八木 勇成[1,2]，近藤 敬子[2]，グエン フエン[1,2]，渡邊 隆司[3]，三上 文三[1,4]，永田 崇[1,2]，片平 正人[1,2]　([1]京大エネ研，[2]京大院エネ科，[3]京大生存研，[4]京大院農)

3D04-04　レーザーによるリグノセルロース分解への挑戦
○川崎 平康[1]，境 武志[2]，住友 洋介[2]，野上 杏子[2]，早川 建[2]，宍倉 文夫[2]，永田 崇[3]，全 炳俊[3]，早川 恭史[2]　([1]高エネ研，[2]日大LEBRA，[3]京大エネ研)

3D04-05　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
○松崎 浩明，石田 健登，亀川 颯人，今久保 友則，藤田 雄大，秦野 琢之　(福山大生命工)

3D04-06　低分子リグニン類から *Pseudomonas* sp. ITH-B52 株により生産された有機蛍光物質の検討
○村上 詠里子，松藤 寛，岩淵 範之　(日大生物資源)

3D04-07　木材腐朽菌を用いた竹およびダンチクからのエタノール生産における糖化の改善
○島崎 幹生，堀沢 栄　(高知工科大学)

3D04-08　Effect of site-directed mutagenesis of *Aspergillus sydowii* feruloyl esterase on substrate preference
○Apisan Phienluphon[1,2]，Keiko Kondo[1]，Bunzo Mikami[1,3]，Takashi Nagata[1,2]，Masato Katahira[1,2]　([1]Inst. of Advanced Energy，Kyoto Univ.，[2]Grad. Sch. of Energy Sci.，Kyoto Univ.，[3]Grad. Sch. of Agric.，Kyoto Univ.)

3D04-09　水溶性リグニンを用いたセルラーゼ回収方法の検討
○西山 竜士，加川 雄介，山田 勝成　(東レ株式会社)

3D04-10　Effect of weather on Bacterial biomass in Feces of Cows through different Season
○Abdullatif Shahid，Quac Thinh TRAN，kiwako s ARAKI，Motoki KUBO　(Ritsumeikan Universty)

3D04-11　Itaconic acid production from hydrolysates of lignocellulosic biomass by recombinant Corynebacterium glutamicum
○Dao Duy Hanh，Hideo Kawaguchi　(Kobe Univ. Graduate School of Science，Technology and Innovation)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他

3D07-01　Compositional analysis of glycosaminoglycans from several tissues in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)
○Danang Dwi CAHYADI[1]，Munehiro OKAMOTO[2]，Katsuhiko WARITA[1]，Naoko TAKEDA-OKUDA[3]，Jun-ichi TAMURA[3]，Yoshinao Z. HOSAKA[1]　([1]Joint Grad Sch Vet Sci，Tottori Univ，[2]Cell Biol，Primate Res Inst，Kyoto Univ，[3]Dept Life，Env Agri Sci，Fac Agri，Tottori Univ)

3D07-02　*Bacteroides ovatus* のイヌリン分解におけるジアンヒドリド構造含有生成物の解析
○石渡 明弘[1]，志手 由里奈[2]，北原 兼文[2]，田中 克典[1,3,4]，藤田 清貴[2]，伊藤 幸成[1,5]　([1]理研，[2]鹿児島大農，[3]東工大物質理工，[4]カザン大，[5]阪大院理)

3D07-03　*Prevotella melaninogenica* の産生するエンド - β -*N*- アセチルグルコサミニダーゼ PM の立体構造
大倉 和貴[1]，森 真司[1]，米澤 健人[2]，清水 伸隆[2]，神谷 信夫[1]，宮原 郁子[1]，○伊藤 和央[1]　([1]阪市大・院理，[2]KEK・物構研)

3D07-04　EndoS および EndoS2 の分岐型糖鎖に対する切断活性
○高島 晶，黒河内 政樹，月村 亘，森 昌子，大隅 賢二，菅原 州一，天野 純子，水野 真盛，高田 美生，松田 昭生　((公財)野口研)

3D07-05　人工糖鎖基質を用いた EDEM2 の基質特異性の検討
○青木 涼馬[1]，菊間 隆志[1]，伊藤 幸成[2]，武田 陽一[1]　([1]立命館大院生命，[2]阪大院理)

3D07-06　PNGase 活性検出に向けた非天然型 7 糖ペプチドの合成と評価
○高橋 諭[1]，石井 希実[1]，佐野 加苗[1]，内林 達也[2]，高橋 剛[1]，佐藤 匡史[3]，矢木 宏和[3]，加藤 晃一[3,4]，鈴木 匡[5]，松尾 一郎[1]
([1]群大院・理工，[2]群大・理工，[3]名市大院・薬，[4]自然科学研究機構ExCELLS，[5]理研)

3D07-07　分裂酵母糖鎖における β ガラクトース転移反応の分子メカニズムの解明
○福永 嵩大[1]，田中 直孝[2]，古本 敏夫[2]，中北 愼一[3]，大橋 貴生[4]，樋口 裕次郎[1]，前川 裕美[1]，竹川 薫[1]　([1]九州大農，[2]香川大農，[3]香川大総合生命，[4]摂南大理工)

3D07-08　*N*- ベンズオキシ修飾を有する新奇 *N*- アセチルグルコサミン供与体の開発とグリコシル化反応への応用
○浅野 剛志[1]，河村 奈緒子[2]，今村 彰宏[1,2,3]，石田 秀治[1,2,3,4]，安藤 弘宗[2,3]，田中 秀則[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・iGCORE，[3]岐阜大院・連合農学，[4]岐阜大・G-CHAIN)

3D07-09　完全な α 選択性を示す Kdo グリコシド化法の開発とその利用
○浜島 将伍[1,2]，野口 晴佳[3]，河村 奈緒子[4]，田中 秀則[2,4]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2,4,5]，一柳 剛[3]，安藤 弘宗[2,4]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・連合農学，[3]鳥取大・農，[4]岐阜大・iGCORE，[5]岐阜大・G-CHAIN)

3D07-10　リン酸クロスカップリング反応による ADP リボース分子の高効率合成
○萩野 瑠衣[1,2]，河村 奈緒子[3]，今村 彰宏[1,2,3]，石田 秀治[1,2,3,4]，安藤 弘宗[2,3]，田中 秀則[2,3]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大院・連合農学，[3]岐阜大・iGCORE，[4]岐阜大・G-CHAIN)

3D07-11　新規保護様式を利用したフコース含有糖アミノ酸 4 糖の合成研究
○朝比奈 雄也，北條 裕信　(阪大蛋白研)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

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

3D09-01　耐熱化変異酵素のハイスループット創出を可能にする好熱菌継代培養法の開発
○吉村 俊祐[1]，服部 大河[1]，吉村 徳洋[2]，髙田 真穂[2]，河本 真依[2]，大城 隆[2]，鈴木 宏和[2]　([1]鳥取大院・持続創生，[2]鳥取大・工)

3D09-02　Decoration of GII.4 Norovirus-like Particles via SpyTag/SpyCatcher Bioconjugation System for a Modular Protein-displaying Platform
○Jirayu Boonyakida[1]，Fahmida Nasrin[2]，Enoch Y. Park[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol.，Shizuoka Univ.，[2]Res. Inst. Green Sci. Technol.，Shizuoka Univ.)

3D09-03　Co-expression of dengue virus structural proteins serotype 1-4 in silkworm larvae, and its capability inducing a humoral immune response in a mouse model
○Doddy Irawan Setyo UTOMO[1], Sabar PAMBUDI[2], Enoch Y PARK[1,3]（[1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Japan, [2]Center of Pharmaceutical and Medical Technology, National Research and Innovation Agency, Jl. Kawasan Puspiptek, Gedung I LAPTIAB, Indonesia, [3]Laboratory of Biotechnology, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Japan）

3D09-04　耐熱化抗体
○吉浜 麻生[1], 児玉 晃[1], 仲嶺 三代美[1], 祝嶺 陽子[1], 久保田 智巳[2], 小河 晋悟[1], 石川 一彦[2]（[1]リムコ株式会社, [2]産業技術総合研究所）

3D09-05　無細胞タンパク質合成系を用いた COVID-19 感染患者由来単一 B 細胞からの抗 SARS-CoV-2 Spike ヒトモノクローナル抗体の取得
○木原 もなみ[1], 兒島 孝明[1], 長谷 哲成[2], 上田 宏[3], 中野 秀雄[1]（[1]名大院生命農, [2]名大院医, [3]東工大科学技術創成研究院）

3D09-06　Duplex Specific Nuclease を用いた SARS-CoV-2 の遺伝子増幅型検出
○砂金 敬太[1], Dutta Chowdhury Ankan[1], 朴 龍洙[1,2]（[1]静岡大学農学部応用生命科学科, [2]静岡大学グリーン科学技術研究所）

3D09-07　量子ドット - 金ナノ粒子複合体相互作用による蛍光増強を利用した新型コロナウイルス検出法の開発
○前畑 秀叡[1,2], オジョドモ アチャド[2]（[1]静岡大学農学部応用生命科学科, [2]静岡大学グリーン化学技術研究所）

3D09-08　Impedimetric biosensor for highly sensitive electrochemical detection of norovirus-like particles
○Fahmida Nasrin, Ankan Dutta Chowdhury, Enoch Y. Park（Lab. of Biotech., Res. Ins. of Green Sci. and Tech., Shizuoka Univ.）

3D09-09　磁性ナノ粒子を用いた磁気アシストによる電気化学的ウイルス検出
○敦賀 健太[1], 朴 龍洙[2]（[1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン科技研）

3D09-10　抗体エンジニアリングのためのバイオインフォマティクス
○山本 秀男[1], 中野 秀雄[1], 兒島 孝明[1], 上田 宏[2]（[1]名大院生命農, [2]東工大科学技術創生研究院）

3D09-11　Poisson-Boltzmann 式に基づいた数値計算よる脂質二分子膜内外のイオン濃度分布
○北隅 優希, 宋和 慶盛, 白井 理（京大院農）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

有機化学，天然物化学―生合成

3E01-01　微細藻類由来 DHA 合成酵素の炭素鎖伸長反応の解析
○仲間 陸[1], 小林 飛悠[1], 大塚 慎[1], 佐藤 康治[2], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2]（[1]北大院総化, [2]北大院工）

3E01-02　三員環構造を有するペプチド抗生物質ベラクトシンとホルマオマイシンの生合成研究
○島谷 諒[1], 大利 徹[2], 小笠原 泰志[2]（[1]北大院総化, [2]北大院工）

3E01-03　Characterization of cytochrome P450 function in verticilactam biosynthesis
○Yu ZHENG[1], Hiroshi TAKAGI[1], Katsuyuki SAKAI[1], Yumi SHIOZAKI-SATO[1], Toshihiko NOGAWA[2], Risa TAKAO[1], Shunji TAKAHASHI[1]（[1]RIKEN CSRS, Nat. Prod. Biosynth., [2]RIKEN CSRS, Mol. Str. Charact.）

3E01-04　Streptomyces flagilis 由来 azaserine の生合成機構の解析
勝山 陽平[2,3], ○四海 佑亮[1], 川合 誠司[2], 大西 康夫[2,3]（[1]東大農・生命化学工学, [2]東大院・農生科・応生工, [3]東大・微生物イノベ連携機構）

3E01-05　抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出した Phenylalanine 水酸化酵素の機能解析
○岸 千紘[1], 山中 一也[2], 五十嵐 雅之[3], 濱野 吉十[1], 丸山 千登勢[1]（[1]福井県大院生物資源, [2]関西大化生工, [3]微化研）

3E01-06　Streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型 アミド合成酵素の変異解析
○内山 駿[1], 丸山 千登勢[1], HAMDY Sherif[2], 中嶋 優[2], 森田 洋行[2], 濱野 吉十[1]（[1]福井県大院・生物資源, [2]富山大・和漢医薬総合研）

3E01-07　ラッソペプチド RES-701 の生合成研究
○山谷 優花[1], 小笠原 泰志[2], 佐藤 康治[2], 大利 徹[2]（[1]北大院総化, [2]北大院工）

3E01-08　Involvement of Peptide Epimerization in the biosynthesis of Linaridin Class Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides
○Wanlu Xiao[1], Yasushi Ogasawara[2], Yasuharu Satoh[2], Tohru Dairi[2]（[1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng. Chem. Sci., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng.）

3E01-09　アミプリマイシンに含まれる特殊アミノ酸の生合成機構の解析
○日比 玄紀[1], 梅村 龍槻[1], 白石 太郎[1], 西山 真[1,2], 葛山 智久[1,2]（[1]東大農, [2]東大・微生物連携機構）

3E01-10　アミノ基転移と酸素による酸化を触媒する新規二機能性 PLP 依存性酵素の反応機構
○野口 智弘[1], 寺田 透[1,2], 西山 真[1,2], 葛山 智久[1,2]（[1]東大院・農生科, [2]東大・微生物連携機構）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

有機化学，天然物化学―生合成 / 代謝

3E03-01　Heterologous Biosynthesis of Myxobacterial Antibiotic Miuraenamide A
○YING LIU, Satoshi YAMAZAKI, Makoto OJIKA（Nagoya Univ.）

3E03-02　抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB の構造活性相関解析
○手島 愛子, 江口 雄聡, 荒川 賢治（広島大院・統合生命）

3E03-03　シグナル分子を用いた二次代謝産物のゲノムマイニングへのアプローチ
○平田 朝陽[1], 手島 愛子[2], 江口 雄聡[2], 住吉 美保[3], 荒川 賢治[1,2,3]（[1]広島大・工, [2]広島大院・統合生命, [3]広島大院・先端研）

3E03-04　アーキア型メバロン酸経路を用いた大腸菌のイソプレノイド生産能強化
○高橋 拓矢, 吉田 稜, 伊藤 智和, 吉村 徹, 邊見 久（名大院農）

3E03-05　機能多様化を指向したシネオール合成酵素の多世代進化
○平野 裕真[1], 市川 智之[1], 木下 葵子[1], 小野里 由実[1], 河合(野間) 繁子[1], 梅野 太輔[1,2]（[1]千葉大工, [2]早大先進理工）

3E03-06　メタボローム解析で見出した代謝変動の解釈を支援するキーワード提示技術の開発
○松田 史生[1], 金澤 慎司[1,2,3], 山田 洋平[2], 清水 悟司[2], 梶原 茂樹[2], 向 紀雄[2], 飯田 順子[2,3]（[1]阪大院情報, [2]島津製作所, [3]阪大・島津分析イノベーション研究所）

3E03-07　アブラナ科作物ハクサイ，コマツナにおけるオーキシン代謝物の分析
○礒邊 拓也, 宮川 恒（京大農）

3E03-08　イネジャポニカ品種における新葉へのβ - チロシン集約機構の解明
○阪本 駿太[1], 吉川 貴徳[1], 寺石 政義[1], 吉永 直子[1], 落合 久美子[1], 小林 優[1], 奥本 裕[2], 森 直樹[1]（[1]京大院農, [2]摂南大農）

3E03-09　ヤマカガシ属ヘビが保有する強心性ステロイドの種関差異
○井上 綾[1], 井上 貴斗[2], 吉永 直子[2], 森 哲[3], 森 直樹[2]（[1]京大農, [2]京大院農, [3]京大院理）

3E03-10　ヤマカガシにおけるエサ由来毒素変換能力の多様性
○井上 貴斗[1]，吉永 直子[1]，森 哲[2]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]京大院理)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

有機化学，天然物化学―作用機構，構造と活性

3E05-01　Analysis of subcellular localization of tetrandrine that modulates autophagy-lysosome pathway
○ZHE YANG[1]，Tomoki Takahashi[2]，Tatsuya Yamamoto[3]，Hiroko Isoda[3,4]，Hideyuki Shigemori[3,5]，Yusaku Miyamae[3,4]　([1]Grad. Sch. Human. Comp. Sci.，Univ. Tsukuba，[2]Grad. Sch. Life Environ. Sci.，Univ. Tsukuba，[3]FLES，Univ. Tsukuba，[4]ARENA，Univ. Tsukuba，[5]MiCS，Univ. Tsukuba)

3E05-02　Effect of Cyanidin 3-Glucoside on the Production of Hepatocyte Growth Factor in Normal Human Dermal Fibroblasts
○Annisa Krama[1]，Natsu Tokura[2]，Hiroko Isoda[3,4]，Hideyuki Shigemori[3,5]，Yusaku Miyamae[3,4]　([1]SIGMA，Univ. Tsukuba，[2]Grad. Sch. Life. Environ. Sci. Univ. Tsukuba，[3]FLES，Univ. Tsukuba，[4]ARENA，Univ. Tsukuba，[5]MiCS，Univ. Tsukuba)

3E05-03　B 環を除去した Aplysiatoxin 単純化アナログの合成と生物活性
○関戸 智紀[1]，山本 剛資[1]，柳田 亮[2]，花木 祐輔[2]，川浪 康弘[2]，入江 一浩[3]　([1]香川大院農，[2]香川大農，[3]京大院農)

3E05-04　(*R*)-(－)-Carvone を用いる Aplysiatoxin 単純化アナログの合成と活性評価
○鈴木 芳幸[1]，守時 恵一[1]，梶原 瑞生[1]，柳田 亮[2]，川浪 康弘[2]，花木 祐輔[2]，入江 一浩[3]　([1]香川大院農，[2]香川大農，[3]京大院農)

3E05-05　Hitachimycin による膜機能破綻のメカニズム検討
○岩井 南会子[1]，南雲 陽子[2]，工藤 史貴[3]，江口 正[3]，臼井 健郎[2]　([1]筑波大・理工情報生命，[2]筑波大・生命環境，[3]東工大・理学院)

3E05-06　TJ 開口剤 MA026 の Claudin ファミリーに対する標的特異性の検討
○向山 海凪[1]，内山 千尋[3]，福田 茜[3]，中澤 圭輝[3]，倉持 由佳[3]，今野 翔[3]，谷口 敦彦[3]，南雲 陽子[2]，林 良雄[3]，臼井 健郎[2]　([1]筑波大学大学院・理工情報生命，[2]筑波大学・生命環境，[3]東京薬科大・薬)

3E05-07　アミロイドβの神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発
○福原 潔[1]，森 一憲[1]，沖山 佳生[2]，三澤 隆史[2]，水野 美麗[1]，出水 庸介[2]，柴沼 質子[1]，大野 彰子[2]　([1]昭和大薬，[2]国衛研)

3E05-08　酵母の増殖阻害活性を示す含ホウ素化合物の作用機序解析
○八代田 陽子[1,2]，木村 寛美[1]，吉村 麻美[1]，臼井 正哉[3]，丹羽 節[4,5]，高橋 一光[6]，俣賀 宣子[3]，細谷 孝充[4,5]，イリエシュ ラウレアン[6]，吉田 稔[2,7,8]，ブーン チャールズ[1,9]　([1]理研CSRS・分子リガンド標的，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]理研CBS・生体物質分析支援，[4]理研BDR・分子標的化学，[5]東京医歯大・生体材料工学研，[6]理研CSRS・機能有機合成化学，[7]東大院農・応生工，[8]東大・CRIIM，[9]トロント大・ドネリーセンター)

3E05-09　リンゴ果実が樹との相互作用により発現する食害応答の機構解明
○大畑 勇統[1]，板井 章浩[2]，石栗 陽一[3]，森 直樹[1]，吉永 直子[1]　([1]京大院・農，[2]京都府大院・生命環境，[3]青森産技セ　りんご研)

3E05-10　ヴィオラセインの抗菌性の作用機序
○横川 奈央，吉野 凌太，滝口 泰之　(千葉工大先進工)

3E05-11　サクラソウ科薬用植物 *Maesa lanceolata* 由来抗マラリア活性化合物の同定
○太田 真理[1]，田邉 麻衣子[1]，半澤 宏子[1]，Okeyo Kennedy Omondi[2]，Julius Otieno Oyugi[3]，Lucy Ochola[4]，武田 志津[1]　([1]日立研開・基礎研，[2]京大ウィルス・再生研，[3]ナイロビ大，[4]霊長類研究所・ナイロビ・ケニヤ)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

有機化学，天然物化学―作用機構，構造と活性

3E06-01　芳香族炭化水素受容体アンタゴニストの探索とその抗 C 型肝炎ウイルス活性
○中村 洸[1]，山崎 雅子[2,3]，大橋 啓史[4]，齋藤 史季[1]，芦川 広大[1]，佐藤 寛奈[1]，西岡 華実[2,3]，鈴木 優華[1]，鶴川 幸音[1]，菅野 和紀[1]，村上 裕信[1,5]，永根 大幹[1]，岡田 麻衣子[6]，倉持 幸司[3]，渡士 幸一[2,3,4]，紙透 伸治[1,5]　([1]麻布大獣医，[2]感染研・ウイルス第二部，[3]東理大理工，[4]感染研・治療薬・ワクチン開発研究センター，[5]麻布大ヒトと動物の共生科学センター，[6]東京工科大応用生物)

3E06-02　奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の脂質組成の攪乱および小胞体の形態異常
○星川 陽次郎[1]，西村 慎一[1,2]，松山 晃久[1,3]，リ シーナ[4,5]，八代田 陽子[3,4]，ブーン チャールズ[4,5]，津川 裕司[6,7,8,9]，有田 誠[8,9,10]，吉田 稔[1,2,3]　([1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[4]理研CSRS・分子リガンド標的，[5]トロント大・ドネリーセンター，[6]東農工大院工・システムバイオロジー，[7]理研CSRS・メタボローム情報，[8]理研IMS・メタボローム，[9]横市大院生命医・代謝エピゲノム科学，[10]慶大薬・代謝生理化学)

3E06-03　抗テトロドトキシンモノクローナル抗体のフグの主要テトロドトキシン類縁体に対する交差反応性評価
○八巻 慶汰[1]，佐藤 恭佳[1]，工藤 雄大[1,2]，川津 健太郎[3]，荒川 修[4]，高谷 智裕[4]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学際研，[3]大阪健康安全基盤研，[4]長崎大院水環)

3E06-04　プラディミシンと複合型糖鎖との相互作用の化学的検証
○藤井 将人[1]，小鹿 一[1]，五十嵐 康弘[2]，伊藤 幸成[3,4]，中川 優[1,3,5]　([1]名大院・生命農，[2]富山県大・生物工，[3]理研，[4]阪大院・理，[5]iGCORE)

3E06-05　プラディミシンの非凝集性アジド含有誘導体の開発
○音田 昂志[1]，小鹿 一[1]，五十嵐 康弘[2]，伊藤 幸成[3,4]，中川 優[1,3,5]　([1]名大院・生命農，[2]富山県大・生物工，[3]理研，[4]阪大院・理，[5]iGCORE)

3E06-06　受動拡散による膜透過性が高い環状ペプチドを構成するアミノ酸の立体配置の探索
○三浦 篤修，井上 雄介，稲垣 穣，増田 裕一　(三重大生物資源)

3E06-07　細胞死を誘導するフラバン -3- オール誘導体の活性発現メカニズム解析
○道下 僚[1]，二村 友史[2]，齊藤 安貴子[1]　([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科工学専攻，[2]理化学研究所環境資源科学研究センター)

3E06-08　疫病菌交配ホルモン受容体遺伝子の探索(2)
笠原 功輝[1]，○米倉 令恵[1]，田中 愛子[1]，竹本 大吾[1]，鈴木 孝征[2]，小鹿 一[1]　([1]名大院・生命農，[2]中部大・応生)

3E06-09　クロイソカイメンより単離したアラキドン酸と各種脂肪酸による電位依存性ナトリウムチャネルの阻害作用
○千葉 修[1]，島田 紀子[1]，工藤 雄大[1,2]，長 由扶子[1]，山下 まり[1]，此木 敬一[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学際研)

3E06-10　クアシノイド類のタンパク質合成阻害活性による 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解の促進
○木下 雄太，岩田 稜平，加藤 英介　(北大院農)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

有機化学，天然物化学― 作用機構，構造と活性 / その他

3E08-01 植物由来のジテルペン化合物 Momilactone B は細胞内の ROS レベルを減少させることで細胞の増殖を阻害する
○富田 啓介[1]，松尾 安浩[2]，八代田 陽子[3]，吉田 稔[3,4,5]，川向 誠[2]，野尻 秀昭[1,5]，岡田 憲典[1]（[1]東大・農生科・AgTECH，[2]島根大・生物資源，[3]理研・CSRS，[4]東大院・農生科・応生工，[5]東大・微生物連携機構）

3E08-02 コレラ菌 NADH- ユビキノン酸化還元酵素の Na^+ 輸送におけるユビキノン側鎖の重要性
○石川 萌[1]，桝谷 貴洋[1]，黒田 聖奈[1]，宇野 晋平[1]，志波 智生[2]，稲岡 健 ダニエル[3]，村井 正俊[1]，Barquera Blanca[4]，三芳 秀人[1]（[1]京大農，[2]京都工繊大応用生物，[3]長崎大熱帯医学，[4]レンセラー工科大生物工）

3E08-03 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 -I における人工ユビキノン類の多様な反応機構
○宇野 晋平[1]，生西 凌[1]，桝谷 貴洋[1]，伊藤(新澤) 恭子[2]，村井 正俊[1]，三芳 秀人[1]（[1]京大農，[2]兵庫県立大生命理学）

3E08-04 米糠由来成分フェルラ酸の美容効果
○中川 詩織，中村 紀夫，築野 卓夫（築野ライスファインケミカルズ株式会社）

3E08-05 マンゴー種子からの美白有効成分の探索
○藤田 光，藤巻 貴宏（東京農大・農芸化学科）

3E08-06 アマニ抽出油による皮膚の抗老化作用
○赤堀 友治，鈴木 聡（株式会社実正）

3E08-07 エゴマ種子超臨界 CO_2 エキスのメラニン産生抑制作用
○鈴木 聡[1]，藤澤 日土美[2]，阿部 純平[2]，木村 賢一[2]（[1](株)実正，[2]岩手大学）

3E08-08 ライステロール™ エステルによるヒト線維芽細胞およびヒト皮膚への効果
○小林 瑞佳，中川 詩織，中村 紀夫，築野 卓夫（築野ライスファインケミカルズ株式会社）

3E08-09 米糠由来植物ステロールエステルの皮膜形成によるヒト皮膚における保湿効果
○山内 優歩，周 京秀，中村 紀夫，築野 卓夫（築野ライスファインケミカルズ株式会社）

3E08-10 コウズク（*Alpinia galanga*，果実）含有ネオリグナン成分のケモカイン受容体 CCR3 アンタゴニスト作用
○坂本 裕介[1]，萬瀬 貴昭[1]，楡 光世[1]，綿原 光司[2]，原 雄大[2]，松尾 一彦[2]，中山 隆志[2]，森川 敏生[1,3]（[1]近畿大・薬総研，[2]近畿大・薬，[3]アンチエイジングセ）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

有機化学，天然物化学―ケミカルバイオロジー

3F02-01 Discovery of new lucilactaene derivatives with potent antimalarial activity and their structure-activity relationship
○Islam Adel Abdelhakim Amin[1,2,3,4]，Fauze Mahmud[1,5,6]，Motoyama Takayuki[1]，Nogawa Toshihiko[1]，Futamura Yushi[1]，Takahashi Shunji[2,3]，Osada Hiroyuki[1]（[1]Chemical biology，CSRS，RIKEN，[2]Natural products biosynthesis unit，CSRS，RIKEN，[3]Saitama Univ.，[4]Assiut Univ.，[5]INFORMM，USM，[6]FSSA，UMS）

3F02-02 Mode of action study of dihydrolucilactaene，a new highly potent antimalarial compound
○Fauze Mahmud[1,2,3]，Futamura Yushi[1]，Islam A. Abdelhakim[1,4,5,6]，Motoyama Takayuki[1]，Takahashi Shunji[1,4,5]，Ngit Shin Lai[2]，Osada Hiroyuki[1]（[1]Chemical Biology，RIKEN，CSRS，[2]INFORMM，USM，[3]FSSA，UMS，[4]Natural Product Biosynthesis Research Unit，RIKEN，CSRS，[5]Saitama Univ.，[6]Assiut Univ.）

3F02-03 酵母ユビキチンリガーゼ RSP5 変異株を高温ストレス下で生育を回復させる久慈産琥珀由来の生物活性物質の探索
○丹場 晴也[1]，田中 来実[2]，高木 博史[3]，越野 広雪[4]，木村 賢一[1,2]（[1]岩手大・農，[2]岩手大院・総合科学，[3]奈良先端大・バイオ，[4]理研CSRS）

3F02-04 がん細胞の中心体クラスタリング阻害活性を有する kolavenic acid analog の各種抗がん剤との併用効果
○古山 達貴[1]，髙屋敷 望[2]，小野寺 拓夢[2]，河村 幸男[2]，湯川 格史[3,4]，登田 隆[3,4]，木村 賢一[1,2]（[1]岩手大農，[2]岩手大院・総合科学，[3]広島大院・統合生命科学，[4]広島大・健康長寿（HiHA））

3F02-05 ビオチン標識プローブを用いたプルダウン実験による PF1171B の標的分子の探索
○織田 大河，稲垣 穣，増田 裕一（三重大院生物資源学）

3F02-06 3 回対称ならびに平行型 Aβ40 の 3 量体モデルの合成と機能解析
○内野 歩美[1]，入江 由美[1]，塚野 千尋[1]，川瀬 泰治[2]，廣瀬 賢治[2]，入江 一浩[1]（[1]京大院農，[2]日本ウォーターズ）

3F02-07 アミロイドβ-40 の毒性２量体モデルにおけるリンカー長の凝集能と細胞毒性に及ぼす影響
○筑後 文馨[1]，入江 由美[1]，内野 歩美[1]，塚野 千尋[1]，川瀬 泰司[2]，廣瀬 賢治[2]，入江 一浩[1]（[1]京大農，[2]日本ウォーターズ）

3F02-08 主成分分析を活用した LC-MS による アミロイドβ凝集阻害剤の効率的探索法
○花木 瑞穂[1]，村上 一馬[1]，郡司 裕樹[2]，入江 一浩[1]（[1]京大院農，[2]アルプス薬品工業）

3F02-09 機能性食品成分に含まれるフラボノイド抱合体の合成とアミロイドβ42 に対する凝集阻害活性
○谷輪 厚太，村上 一馬，入江 一浩（京大院農）

3F02-10 Studies on chemical regulation of fungal denitrification toward global environmental conservation
○Qing CAI[1]，Yoshida MINORU[1,2]，Akihisa MATSUYAMA[1,2]，Shinichi NISHIMURA[1]，Masaki MATSUOKA[1,2]，Seiji MATSUOKA[2]，Kousiki MINO[2]，Toshie KAIZUKA[2]，Kam Y. J. ZHANG[3]，Ashutosh KUMAR[3]（[1]Tokyo Univ，[2]RIKEN CSRS，[3]RIKEN BDR）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

有機化学，天然物化学―ケミカルバイオロジー

3F04-01 コレラ菌 Na^+- 輸送型 NADH- ユビキノン酸化還元酵素の位置特異的化学修飾
○田中 比奈子[1]，石川 萌[1]，桝谷 貴洋[1]，青木 航[1]，村井 正俊[1]，Blanca Barquera[2]，三芳 秀人[1]（[1]京大農，[2]レンセラー工科大・生物工）

3F04-02 抗がん剤タモキシフェンのラット肝臓ミトコンドリアにおける作用機構研究
○運天 優歩，村井 正俊，越高 知生，北尾 虎太郎，白井 理，桝谷 貴洋，三芳 秀人（京大院農・応用生命）

3F04-03 合成ユビキノンプローブを用いた出芽酵母のユビキノン取り込みに関与するタンパク質の探索
○黒田 聖奈[1]，村井 正俊[1]，桝谷 貴洋[1]，奥 公秀[2]，三芳 秀人[1]（[1]京大農，[2]京都先端大）

3F04-04　Allantopyrone A はヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞においてプロテアソーム活性を阻害することによって HIF-1 αタンパク質を安定化する
○奥田 千遥[1]，上田 悠斗[1]，武田 賢治[1]，塩野 義人[2]，木村 賢一[3]，片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生，[2]山形大学・農，[3]岩手大院・総合科学）

3F04-05　Cucurbitacin B は TNF-α で誘導される NF-κB シグナル伝達経路を阻害する
○草川 鋭一[1]，中野 香織[1]，三宅 靖延[2]，片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生，[2]佐賀大学・医）

3F04-06　12-ヒドロキシジャスモン酸グルコシドにより蓄積が誘導される活性化酸素種がアメリカネムノキの閉葉を誘導する
○星野 隼治[1]，Yang Gangqiang[2]，村岡 勇樹[2]，石丸 泰寛[3]，上田 実[1,2]（[1]東北大院生命科学，[2]東北大院理，[3]東北大院工）

3F04-07　コロナチン立体異性体フォーカスドライブラリーを用いたジャスモン酸受容体サブタイプ選択的リガンドの開発
○林 謙吾[1]，加藤 信樹[1]，野本 春菜[1]，中山 美涼[1]，Khurram Bashir[2,3]，Andrea Chini[4]，高橋 聡史[2]，齋藤 大明[5]，渡部 楽[6]，高岡 洋輔[1]，田中 真帆[2]，永野 惇[7,8]，関 原明[2]，Roberto Solano[4]，上田 実[1,6]（[1]東北大理，[2]理研 CSRS，[3]ラホール経営科学大学，[4]CNB-CSIC，[5]北陸大薬，[6]東北大生命，[7]龍谷大農，[8]慶應大先端生命）

3F04-08　がん免疫療法治療薬開発のための新規ペプチド阻害剤の PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用いた探索と機能解析
○安東 丈洋[1]，ヴェディ サンタナ[1]，横山 匠[2]，高守 幸男[2]，冨士 大輔[2]，山本 美月[1]，川上 隆史[3,4]（[1]山梨大院・医工農・統合応用生命科学，[2]山梨大院・医工農・生命環境学，[3]山梨大院・総合研究・生命環境，[4]JST・さきがけ）

3F04-09　Discovery of HER3/HRG inhibitors by SELEX and functional analysis for cancer treatment
○Santhana VEDI[1]，Takehiro ANDO[1]，Takumi YOKOYAMA[2]，Yukio TAKAMORI[2]，Daisuke FUJI[2]，Mizuki YAMAMOTO[1]，Takashi KAWAKAMI[3,4]（[1]Dept. Integr. Appl. Life Sci.，Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci.，Yamanashi Univ.，[2]Dept. Life Environ. Sci.，Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci.，Yamanashi Univ.，[3]Fac. Life Environ. Sci.，Grad. Fac. Interdiscip. Res.，Yamanashi Univ.，[4]JST，PRESTO）

3F04-10　生細胞中の脱ユビキチン化酵素の活性を検出する準生体直交型バイオセンサータンパク質の開発
○鈴木 琢海[1]，宇津木 優樹[1]，礒田 博子[2,3]，宮前 友策[2,3]（[1]筑波大人間総合科学，[2]筑波大生命環境，[3]筑波大地中海北ア）

ミーティングルーム F　質疑応答コアタイム 13:30～14:00

有機化学，天然物化学―ケミカルバイオロジー

3F07-01　カンジダの細胞形態変化を指標とした抗真菌剤の探索
○二村 友史[1]，ウソンーロペス レイチェル[1]，青野 晴美[1]，堀 康宏[1]，室井 誠[1]，平野 弘之[2]，西浦 正芳[3]，侯 召民[3]，長田 裕之[1,2]（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]理研 CSRS・化合物リソース，[3]理研CSRS・先進機能触媒）

3F07-02　FKBP12 よるセリン・スレオニン代謝制御の化学遺伝学的解析
○佐々木 舞雪[1]，西村 慎一[1,2]，松山 晃久[1,3]，八代田 陽子[3]，掛谷 秀昭[4]，吉田 稔[1,2,3]（[1]東大院農　応用生命工学専攻，[2]東大微生物連携機構，[3]理研CSRS　ケミカルゲノミクス，[4]京大院薬　システムケモセラピー・制御分子学分野）

3F07-03　3T3-L1 細胞を用いた脂肪分化抑制化合物の探索
○佐藤 千花子，山本 れい，渡邉 彩葉，藤巻 貴宏（東京農業大学・農芸化学科）

3F07-04　キューバ産植物由来抗炎症物質 jacaranone の作用メカニズム解析
○蛭川 美奈子，柴田 貴広，北 将樹（名大院生命農）

3F07-05　分裂酵母の適応生育をうながすフェロモン様分子の組織的探索
○吉住 僚太朗[1]，三浦 俊一[1]，西村 慎一[1,2]，八代田 陽子[3]，松山 晃久[1,3]，吉田 稔[1,2,3]（[1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス）

3F07-06　酸化酵素 laccase を用いた高効率チロシン残基特異的修飾の開発
○中根 啓太[1]，宮野 翔伍[1]，友重 秀介[1]，石川 稔[1]，佐藤 伸一[1,2]（[1]東北大院　生命，[2]東北大　学際研）

3F07-07　カイコ休眠誘導シグナルの同定とシグナル制御化合物の探索
○山田 早人[1]，天池 一真[1]，伊丹 健一郎[1,2]（[1]名大院理，[2]名大 ITbM）

3F07-08　Kujigamberol とその構造類縁体は IFN-γと IL-2 の発現を阻害する
○山口 梨夏子[1]，谷垣 里穂[1]，YARANGSEE Waraluk[1]，東 幸奈[1]，木村 賢一[2]，片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生，[2]岩手大院・総合科学）

3F07-09　ポリカチオンイソペプチド修飾した中分子ペプチドの細胞膜透過性と生理活性の評価
○鈴木 海渡，小倉 知也，武内 大和，丸山 千登勢，濱野 吉十（福井県大院生物資源）

ミーティングルーム F　質疑応答コアタイム 14:30～15:00

有機化学，天然物化学―合成，反応機構

3F09-01　抗生物質 amycolamicin の A および DE ユニットの合成
○桑原 重文，目黒 康洋（東北大院農）

3F09-02　抗生物質 amycolamicin の全合成
○目黒 康洋，伊藤 隼哉，仲川 清隆，桑原 重文（東北大院農）

3F09-03　Amphidinin C の合成研究
○小野寺 壮太[1]，渡邉 侑李[2]，曽根 実奈美[2]，斉藤 竜男[3]，勝田 亮[3]，石神 健[3]，矢島 新[3]（[1]東農大院生命，[2]東農大農，[3]東農大生命）

3F09-04　Toddanol の全合成
○中田 浩基[1]，木本 果歩[2]，斉藤 竜男[2]，矢島 新[2]（[1]東農大院生命，[2]東農大生命）

3F09-05　Violaceoid D の全合成
○庄司 篤史[1]，荒井 佑香[2]，淺川 竜輝[3]，斉藤 竜男[2]，倉持 幸司[3]，矢島 新[2]（[1]東農大院生命，[2]東農大生命，[3]東理大理工）

3F09-06　無保護ペプチドチオールのロジウム触媒的水均一系酸素酸化反応
○福本 昂平，有澤 美枝子（九大院農）

3F09-07　無保護ペプチドジスルフィドへのロジウム触媒アリール基挿入反応
福本 昂平，○矢崎 雅菜，山田 直隆，有澤 美枝子（九大院農）

3F09-08　ヘキサフェニルヘキサアルシンを用いる環状アザアルシン誘導体のロジウム触媒合成
矢崎 雅菜[1]，○宮本 将志[1]，澤畑 恭佑[1]，大橋 慶一朗[2]，山田 直隆[1]，有澤 美枝子[1]（[1]九大院農，[2]東北大院薬）

3F09-09　アロタケタール類のトランスデカリン型単純化アナログの合成と PKC 結合活性
○眞木 準平[1]，押村 亜沙美[1]，塚野 千尋[1]，柳田 亮[2]，入江 一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農）

3F09-10　アロタケタール類のシスピラン環型単純化アナログの合成と PKC 結合活性
○奥田 創元[1]，塚野 千尋[1]，柳田 亮[2]，入江 一浩[1]（[1]京大農，[2]香川大農）

3F09-11　4置換テトラヒドロフラン型リグナンである 7,8'-epoxy-8,7'-neolignan の立体異性体の合成
○田中 美葉，西脇 寿，山内 聡（愛大院農）

3F09-12　Pre-schisanartanin A の右側フラグメント合成
○八木田 凌太郎，入江 一浩，塚野 千尋（京大農）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

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

3G01-01　糖類の摂取が尿中グルコース排泄量に与える影響の解析
○岡田 和花，佐藤 洸希，大川 咲希，大崎 雄介，駒井 三千夫，白川 仁　（東北大・院農・栄養学）

3G01-02　片側腎うっ血モデルに対するピリドキサミン投与の影響の解析
○小堀 涼[1]，大崎 雄介[1]，内田 朝理[1]，森 建文[2]，白川 仁[1]　([1]東北大・院農・栄養学，[2]東北医科薬科大・医・腎内)

3G01-03　フルクトース誘導 *in vitro* モデル系を用いた非アルコール性脂肪肝を予防する食品成分の探索及び解析
○太田 晴佳[1]，波津 優花[1]，本松 由衣[2]，薩 秀夫[2]　([1]前橋工大院工，[2]前橋工大工)

3G01-04　腸管における胆汁酸輸送機作の解析
○高島 優季[1]，宮脇 里奈[1]，荻原 琢男[2]，三坂 巧[1]，小林 彰子[1]　([1]東大農，[2]高崎健大薬)

3G01-05　安定同位体標識によるトリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の解明
○高橋 巧[1]，加藤 俊治[1]，伊藤 隼哉[1]，吉永 和明[2]，桐明 絢[3]，後藤 直宏[4]，仲川 清隆[1]　([1]東北大，[2]福島大，[3]秋田大，[4]東京海洋大)

3G01-06　かぼすヘキサン抽出物は分化脂肪細胞 3T3-L1 での脂肪滴蓄積を抑制する
○生野 彰宏[1]，辻 威彦[2]，早川 琢也[1,2,3]，籠谷 和弘[2,3]，勝崎 裕隆[1]，竹林 慎一郎[1]，奥村 克純[1]　([1]三重大生資，[2]辻製油株式会社，[3]辻H&Bサイエンス研究室)

3G01-07　ゆずポリフェノールの NAFLD 予防機能の解明
○米山 拓良，長田 恭一　（明治大農）

3G01-08　アルクチゲニンとノビレチンの併用による相乗的抗肥満作用の検証
○与儀 彪[1]，岩崎 公典[2]，屋 宏典[2]　([1]琉大農，[2]琉大熱)

3G01-09　発酵茶による抗酸化機能及び脂質と糖質吸収阻害作用の比較
○新藤 万里，塚田 明日香，畔上 優太，西出 夏来沙，長田 恭一（明治大農）

3G01-10　フキノトウ抽出物の血糖値上昇抑制成分の同定および定量
○近藤(比江森) 美樹[1]，山口 真帆[1]，春木 優菜[1]，新居 美香[2]　([1]徳島文理大，[2]徳農技セ)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝

3G03-01　乳酸の経口摂取は ROS 産生を介して UCP1 発現を誘導する
○江崎 菜々，稲葉 美咲，津田 孝範　（中部大院・応生）

3G03-02　大豆タンパク質(β - コングリシニン)摂取と運動の併用による褐色脂肪細胞化誘導と FGF21 発現
○加藤 暉士，北村 泰聖，津田 孝範　（中部大院・応生）

3G03-03　フェルラ酸の褐色脂肪細胞化誘導とシクロデキストリン包接化による生体内吸収性の向上
○田中 純平，山下 紗那，津田 孝範　（中部大・応生）

3G03-04　合成メラニンおよびイカスミによる白色脂肪細胞分化抑制の機序解析
○川本 善之[1]，古橋 由唯[1]，武田 湖州恵[1]，吉川 祐人[2]，高村 佳明[3]，上野 有紀[4]　([1]中部大生命健康科学，[2]株式会社タイショーテクノス，[3]日本葉緑素株式会社，[4]愛知学院大心身科学)

3G03-05　ガジュツ(*Curcuma zedoaria*)50% メタノール抽出物の 3T3-L1 細胞に対する分化促進作用
○山崎 一諒，栗山 磯子，細川 敬三　（兵庫大学）

3G03-06　メタボローム解析による代謝物一斉評価系を用いたトマトに含まれるアディポネクチン様活性化合物の探索
○毛利 晋輔[1]，高橋 春弥[1]，坂井 麻衣子[1]，脇 尚子[2]，高橋 慎吾[2]，相澤 宏一[2]，菅沼 大行[2]，荒 武[1]，真鍋 祐樹[1]，菅原 達也[1]，松村 康生[1]，柴田 大輔[1]，後藤 剛[1]，河田 照雄[1]　([1]京大院農，[2]カゴメ・イノベーション本部)

3G03-07　加齢に伴う油脂摂取に対する感受性変化と長鎖脂肪酸受容体シグナル
○森本 深玖[1]，宮本 潤基[1]，田邉 はるか[2]，五十嵐 美樹[1]，木村 郁夫[1,2]　([1]東農工大農，[2]京大生命科学)

3G03-08　中鎖脂肪酸油の質の違いによる代謝機能変化を制御する脂肪酸受容体 GPR84
○野仲 葉月[1]，北野(大植) 隆司[2]，増島 侑紀[2]，五十嵐 美樹[1]，木村 郁夫[1,2]　([1]東農工大農，[2]京大生命科学)

3G03-09　オレアミドは狭小ケージで行動範囲を制限したマウスにおいて誘発される肥満を抑制する
○窪田 舞[1]，小林 恭之[1]，杉本 圭一郎[2,3]，北風 智也[1]，原田 直樹[1]，山地 亮一[1,3]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]長岡香料，[3]大阪府大・生資センター)

3G03-10　骨格筋細胞における AMP キナーゼ活性化因子としてのペプチドの解析
○榊原 悠起[1]，山田 海生[2]，深澤 知夏[2]，柴田 貴広[3]，内田 浩二[4]，片吉 健史[5]，内藤 健太郎[5]，草野 由理[1,2]　([1]中部大院・応用生，[2]中部大・応用生，[3]名大院・生命農，[4]東大院・農生科，[5](株)DHC・第二研究所)

3G03-11　*Lacticaseibacillus paracasei* K71 摂取による抗肥満効果　―ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験―
○山本 佳奈，齊藤 雄飛，三原 敏敬，内山 公子，髙橋 肇　（亀田製菓）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症

3G05-01　リゾリン脂質がヒト腸管上皮細胞の生存に及ぼす影響の解析
○大澤 ひかり[1]，高橋 恭子[2]，戸田 雅子[1]　([1]東北大農，[2]日大生物資源科学)

3G05-02　アントシアニジンによる代謝物感受性受容体 GPR35 の活性化
○下村 沙也子[1]，服部 浩之[1]，若林 万由香[1]，DIDIK HUSWO Utomo[1]，北 将樹[1]，井上 飛鳥[2]，内田 浩二[3]，柴田 貴広[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬，[3]東京大院農生科)

3G05-03　5,7- ジメトキシフラボンは，ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞のオクルディンを増加，クローディン -2 を減少させてバリア機能を高める
ユニカ マヤングサリ[1]，真野 千夏[2]，作田 智洋[2]，山本 祥也[1]，○鈴木 卓弥[1]　([1]広大院統合生命，[2](株)資生堂　みらい開発研究所)

3G05-04　オーツ麦由来食物繊維による腸内微小環境の変動と実験的腸炎の抑制
○中段 晴太，石橋 璃子，古澤 之裕，生城 真一，西川 美宇，長井 良憲　（富県大工）

3G05-05　酪酸は GPCR 経路とエピジェネティック制御を介して皮膚疾患乾癬を緩和する
○廣木 郁美，長田 和樹，八須 匡和，西山 千春　（東理大先進工）

3G05-06　小腸刷子細胞に発現する Gprc5c 受容体欠損マウスの免疫系における表現型解析
○鈴木 遼，中北 智哉，戸田 安香，石丸 喜朗　（明大農）

3G05-07　盲腸リンパ節 B 細胞の抗体発現における腸内細菌の影響
○岡田 開[1]，津田 真人[1]，小島 菜月[1]，石濱 史也[1]，溝口 拓海[1]，服部 菜々子[1]，森 清彰[1]，高橋 宜聖[2]，八村 敏志[3]，細野 朗[1]（[1]日本大学，[2]感染研　治療薬・ワクチン開発研究センター，[3]東京大学・食の安全研究センター）

3G05-08　バラ香気成分 Damascone-βによる免疫抑制作用と分子機構の解明
○兒玉 直輝[1]，岡田 光[1]，八代 拓也[1]，長田 和樹[1]，八須 匡和[1]，市原 学[2]，西山 千春[1]（[1]東理大先進工，[2]東理大薬）

3G05-09　クレソンに含まれる 1,3- ジフェネチルウレアの摂取がマウス脂質メディエータに与える影響
○中屋 慎[1,2]，濱野 未宇[1]，瀬尾 朱未[1]，北村 進一[2]（[1]大手前栄養学院専門学校，[2]大阪府立大学）

3G05-10　植物マイクロ RNA による TGFβシグナル伝達経路抑制を介した肺線維化抑制作用
○渡邉 凌矢[1]，疋田 愛[1]，小川 史代[1]，島田 優[1]，熊添 基文[1]，藤村 由紀[1]，中曽根 光[2]，米倉 円佳[2]，立花 宏文[1]（[1]九大院農院・生機科，[2]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部）

3G05-11　茶由来サポゲニン R_1-barrigenol はミクログリア細胞における LPS 誘導性の炎症応答を抑制する
○林 遼太郎[1,2]，福光 聡[1]，横田 貴弘[3]，間 和彦[1]，小林 彰子[2]（[1](株)ニップン　中研　イノベーションセンター，[2]東大農，[3](有)東阜）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

食品―食品機能・栄養 - 癌，抗癌 / 食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル / 食品機能・栄養 - その他

3G06-01　DI-EI-MS メタボロミクスによるブルーベリー葉・茎の機能性評価
○甲斐 久博[1]，荒木 理佐[1]，後藤 陽[2]，中山 貴之[2]，菅本 和寛[3]，森下 和広[4]，國武 久登[5]（[1]九州保福大薬，[2]株式会社ビオラボ，[3]宮崎大工，[4]宮崎大医，[5]宮崎大農）

3G06-02　ボイセンベリーアントシアニンが結腸がん細胞の増殖に及ぼす影響
○鈴木 晶貴[1]，水木 徹[4]，三浦 健[1,2,3]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学，[3]東洋大・ ライフイノベーション研究所，[4]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

3G06-03　中国産食用茸ツブイボダケ（*Thelphora vialis*）含有 vialinin A の HCT116 細胞における アポトーシス誘導効果の検討
○附柴 央織[1]，小野瀬 淳一[1,2]，菅谷 紘一[1,2]，阿部 尚樹[1,2]（[1]東農大院・健康，[2]東農大・応生・健康）

3G06-04　ボイセンベリー葉抽出物ががん細胞へ及ぼす影響
○中村 聡太[1]，橋本 奈々美[2]，水木 徹[4]，三浦 健[1,2,3]（[1]東洋大学・生命科学，[2]東洋大院・生命科学，[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所，[4]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

3G06-05　高リン負荷による肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響
○前多 隼人[1,2]，柴田 真樹[1]，永長 一茂[2]，岡田 晋治[3]，中井 雄治[2]（[1]弘大院農，[2]弘大地域戦略，[3]東京大院農）

3G06-06　マルトビオン酸カルシウムと牛乳の同時摂取が健常成人男女のミネラル吸収効率に与える影響
○森脇 勇一郎[1]，高峰 弘起[2]，末廣 大樹[3]，深見 健[3]，大西 素子[1,2]（[1]中部大院　応生，[2]中部大　応生，[3]サンエイ糖化(株)）

3G06-07　許容一日摂取量以下のニコチンアミドの単回投与で健常者血中 NAD+ 量が増加する
○伊藤 孝[1]，吉田 稔[1,2]（[1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]東大院農・応生工）

3G06-08　ビタミン B_{12} 欠乏が引き起こす酸化ストレス誘導の分子メカニズムの解明
○陳 霽戎，谷川 尚子，美藤 友博，薮田 行哲，渡辺 文雄（鳥取大院持続）

3G06-09　ビタミン E 類の側鎖構造による細胞内取り込み量の違い：アルブミンとの親和性に着目して
○中冨 毅[1]，板谷 麻由子[1]，堀越 洋輔[2]，永塚 貴弘[1]，田中 良和[3]，松浦 達也[2]，仲川 清隆[1]（[1]東北大院農，[2]鳥取大医，[3]東北大院生命）

3G06-10　PQQ によるコロナウイルス感染抑制
○池本 一人，辻 シャフィカ，中村 友恵（三菱ガス化学）

3G06-11　Pyrroloquinoline quinone により活性化される G タンパク質共役型受容体の同定
○金森 星[1]，若林 万由香[1]，下村 沙也子[1]，服部 浩之[1]，赤川 貢[2]，井上 飛鳥[3]，内田 浩二[4]，柴田 貴広[1]（[1]名大院生命農，[2]大阪府大院生命環境，[3]東北大院薬，[4]東大院農生科）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化

3G08-01　梅由来ケイ皮酸類の皮膚老化抑制効果
○奥野 祥治[1]，上田 有里子[1]，宇都宮 洋才[2]，河野 良平[2]（[1]和歌山高専，[2]和歌山医大）

3G08-02　スイカ摘果幼果から単離した新規フェノール配糖体による抗光皮膚老化作用
○伊藤 智広[1]，藤田 信吾[2]，纐纈 守[3]，橋詰 利治[2]（[1]三重大院生資，[2]萩原農場，[3]岐阜大工）

3G08-03　じゃがいも皮抽出物は UVB 照射および酸化ストレスにより誘導される I 型コラーゲン産生量低下を改善する
○須藤 麻里[1]，増冨 裕文[1]，石原 克之[1]，正木 仁[2]（[1]カルビー(株)，[2]東京工科大）

3G08-04　食薬・油糧植物由来成分の皮膚老化改善効果
○鎌田 菜摘[1]，小櫃 実由[1]，ハフィダ ボウアママ[2]，ガディ ケムセドハ[2]，片倉 喜範[3]（[1]九大院・生資環，[2]カディ・アヤド大学，[3]九大農学院）

3G08-05　皮膚改善効果を有する食品成分の探索とその機能性解明
○安野 貴絵[1]，酒井 菜摘[1]，片倉 喜範[2]（[1]九大院・生資環，[2]九大農）

3G08-06　大豆フィトアレキシン Glyceollin-1 は Nrf2 のメチル化修飾を介して生体内恒常性を維持する
○井上 博文，森本 洋武，田中 未央里，高橋 信之，上原 万里子（東京農大）

3G08-07　Chaga（*Inonotus obliquus*）水熱処理抽出物の MEF への酸化ストレスに対する保護効果
○串崎 明日香[1]，松田 康平[1]，ハムサン ハズワニー[2]，野間 誠司[3]，出村 幹英[3]，松本 陽介[4]，辻田 忠志[3]，林 信行[3]（[1]佐大院・農，[2]鹿児島連大，[3]佐大・農，[4](株)フォーエス）

3G08-08　Chaga（*Inonotus obliquus*）水熱抽出物の RAW264.7 に対する抗炎症作用の評価
○松田 康平[1]，串崎 明日香[1]，Hamsan Hazwanee[2]，野間 誠司[3]，出村 幹英[3]，松本 陽介[4]，辻田 忠志[3]，林 信行[3]（[1]佐大院・農，[2]鹿児島連大，[3]佐大・農，[4](株)フォーエス）

3G08-09　津山産アピオス長期摂取の肝機能への影響
○森岡 優衣[1]，儀間 章託[1]，坂本 実由[1]，小原 瑞祈[1]，林 香里[1]，山本 汐里[1]，松永 祐介[2]，渡邉 理江[1]（[1]美作大，[2]津山工業原料）

3G08-10　津山産アピオス長期摂取の小腸機能への影響
○儀間 章託[1]，森岡 優衣[1]，小原 瑞祈[1]，坂本 実由[1]，山本 汐里[1]，林 香里[1]，松永 祐輔[2]，渡邉 理江[1]（[1]美作大学，[2]津山工業原料）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

食品―食品化学 - タンパク質・アミノ酸 / 食品化学 - その他

3H02-01　イチジク果実からのセリンプロテアーゼの精製
○床並 実津希[1]，上島 直生[1]，西村 耕作[2]，滝田 禎亮[1]，保川 清[1]（[1]京大院・農，[2](公財)東洋食品研究所）

3H02-02　広い特異性を有するL-アミノ酸オキシダーゼの探索と生産酵素の諸性質
○田中 佑弥[1]，宮田 良介[1]，川端 隆[1]，青木 秀之[2]，尾山 廣[1]（[1]摂大理工，[2]池田食研株式会社）

3H02-03　カルボキシペプチダーゼの特性とタンパク質加水分解物の苦味低減
○中村 梨乃，安齊 恵里，髙根澤 幸奈，種村 昂洋，渡邉 雅貴，山中 慎太，金澤 桜，林 清（東洋大学）

3H02-04　イミダゾールジペプチドの高速・高感度な定量分析法の開発
○慶徳 紗希，宮崎 多恵子，柴田 敏行（三重大院・生資）

3H02-05　京野菜のポリアミン含有量と耐熱性の確認及びポリアミン摂取における抹茶のメリット
○木下 郁心，藤原 有希，鈴木 秀之（京都工芸繊維大応用生物）

3H02-06　ポリフェノール修飾タンパク質に対する高親和性ペプチドの解析
○山本 広史，佐々木 栄太，板倉 正典，内田 浩二（東大農）

3H02-07　ポリフェノールによるヒストン凝集メカニズムと病態生理学的意義の解明
○塚本 萌南，山口 公輔，板倉 正典，内田 浩二（東大農）

3H02-08　システイン添加によるメロン果汁の瓜臭の低減
○網干 貴子[1]，成田 こなみ[1]，勝見 直行[2]，太田 智弥[1]，村山 哲也[1]（[1]山大農，[2]山形県農総研セ）

3H02-09　マルチコレクター型誘導結合プラズマ質量分析法を用いた食品・環境標準物質中ストロンチウム同位体比分析
○有賀 智子[1]，下田 玄[2]，三浦 勉[1]，後藤 孝介[2]，野々瀬 菜穂子[1]（[1]産総研・計量標準，[2]産総研・地調）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

食品―食品化学 - 色素，香料

3H04-01　緑藻類スジアオノリのβカロテン含有量への水温と光強度の影響
○谷山 友規[1]，黒須 泰行[1]，本間 悠里[1]，圍 昭紀[2]，垣田 浩孝[1]（[1]日大院・総合基，[2]徳島大・産業院）

3H04-02　外部標準法定量NMR（EC-qNMR）によるアントシアニン市販試薬の純度測定
○西崎 雄三[1]，建部 千絵[1]，吉田 久美[2]，杉本 直樹[1]，佐藤 恭子[1]（[1]国立衛研，[2]名古屋大学）

3H04-03　レモン精油からのトロピカルフルーツ様香気成分3-mercapto-3-methylpentyl acetateの同定
○中西 啓，川口 賢二，小林 宗隆（長谷川香料(株)）

3H04-05　加熱タマネギ由来の香気成分に関する研究
○安藤 菜々花，藤谷 麻由，森光 康次郎（お茶の水女子大学大学院）

3H04-06　揚げたて唐揚げの経時的香気変化に関する研究
○齊藤 博則，森永 遼太，細貝 知弘，宮沢 紀雄，石崎 享（長谷川香料(株)）

3H04-07　咀嚼模擬装置を用いた牛ハンバーグにおけるレトロネーザル香分析
○林 和寛[1]，中田 勇二[1]，セモン エティエンヌ[2]，サレ クリスチャン[2]（[1]味の素(株)，[2]INRA，CSGA）

3H04-08　全ヒト嗅覚受容体の気相応答を指標とする牛肉香のプロファイリング
○内村 美里，尾城 一恵，寺田 祐子，伊藤 圭祐（静岡県大院薬食）

3H04-09　香気成分を生かしたイチゴのランナーの焙煎茶としての開発可能性
○関口 光広[1]，篠田 清哉[1]，西脇 崚[1]，笹木 哲也[2]（[1]石川県立大，[2]石川県工業試験場）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲

3H07-01　3T3-L1細胞における苦味受容体タンパク質発現解析
○鶴間 あい，木村 駿介，加藤 英介（北大院農）

3H07-02　脂肪細胞における苦味受容体（T2R）の遺伝子発現解析とその機能推定
○木村 駿介，鶴間 あい，加藤 英介（北大院農）

3H07-03　ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）含有ナス粉末の摂取による睡眠改善作用
○小山 正浩[1]，後藤 和馬[2]，宮川 竜征[2]，王 文豪[3]，山口 翔平[3]，中村 浩蔵[2,3]（[1]（株）ウェルナス，[2]信州大農，[3]信州大院総合医理工）

3H07-04　テレメトリー法を用いた経口投与アセチルコリンが交感神経活動に与える影響調査
○山口 翔平[1]，後藤 和馬[2]，宮川 竜征[2]，王 文豪[1]，中村 浩蔵[1,2]（[1]信州大院総合医理工，[2]信州大農）

3H07-05　高血圧自然発症ラットとウィスター京都正常血圧ラットにおける経口投与アセチルコリンの降圧作用の差異
○中村 浩蔵[1,2]，後藤 和馬[2]，宮川 竜征[2]，王 文豪[1]，山口 翔平[1]（[1]信州大院総合医理工，[2]信州大農）

3H07-06　国産ナスの新規食品機能性成分アセチルコリンの含有量調査
○王 文豪[1]，和具 なおみ[2]，山口 翔平[1]，小山 正浩[3]，中村 浩蔵[2]（[1]信州大院総合医理工，[2]信州大農，[3]株式会社ウェルナス）

3H07-07　漢方薬人参養栄湯の抗不安作用とその作用機序
○竹野 日奈子[1]，久保 友理奈[2]，乾 明夫[3]，高橋 隆二[4]，塩崎 一弘[1,2]（[1]鹿大院農林水産，[2]鹿大水，[3]鹿大院医歯研，[4]クラシエ製薬漢方研）

3H07-08　そばタンパク質の抗うつ作用と腸脳相関の関与
○佐藤 史佳[1]，水重 貴文[2]，茗花 美幸[3]，金野 尚武[2]，前田 勇[2]，羽生 直人[2]，蕪山 由己人[2]（[1]宇都宮大院地域創生科学研究科，[2]宇都宮大学学術院，[3]松屋製粉株式会社）

3H07-09　うつ・不安症状に対する真珠層抽出成分の効果
○大町 知輝，長谷川 靖（室蘭工大院）

3H07-10　アコヤガイ貝殻真珠層に含まれる硫酸酸性多糖のβアミロイド沈着抑制作用
○若生 真由美，四ッ屋 大翔，下村 七海，長谷川 靖（室蘭工大院）

3H07-11　ホエイ由来ペプチドβラクトリンはマウスおよびヒトiPS細胞由来アルツハイマー病モデル神経細胞のミトコンドリア機能異常を改善する
○綾部 達宏，髙橋 千佳，大屋 怜奈，阿野 泰久（キリンHD・中央研）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

食品―食品機能・栄養 - その他

3H09-01　緑豆ペプチドによる骨格筋量の維持効果
○吉岡 泰淳[1]，伊美 友紀子[2]，川畑 球一[2]，柴田 克己[2]，芦田 均[3]，寺尾 純二[2]，三好 規之[1]（[1]静岡県大食品栄養，[2]甲南女子大医療栄養，[3]神戸大院農）

3H09-02　γ - アミノ酪酸はマウス筋芽細胞C2C12細胞の筋形成分化を促進する
○草野 由理[1,2]，烏山 将織[3]，宮村 かおり[3]，榊原 悠起[1]，寺島 亜子[2]，松本 裕子[3]，柴田 貴広[4]（[1]中部大院・応用生，[2]中部大・応用生，[3]ヤマモリ(株)，[4]名大院・生命農）

3H09-03　バレレン酸類縁体が脂肪細胞に及ぼす影響
○萩原 真理[1]，神戸 理恵[1]，岡田 茉夕[1]，小西 良子[1]，只石 幹[1]，清水 誠[2]，服部 一夫[1]（[1]東農大・応生，[2]東農大）

3H09-04　筆柿葉茶ポリフェノール類の定量とそれらに対する消化液の影響（in vitro）
○宮川 文[1]，青島 美穂[1]，清水 萌以[1]，菅井 碧乃[1]，中村 俊之[2]，中村 宜督[2]，矢田 友和[3]，保田 倫子[1,4]　([1]椙山大生活，[2]岡山大院環境生命科学，[3]JAあいち三河幸田，[4]椙山大院生活）

3H09-05　分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に及ぼす影響
○香西 歩[1]，岩槻 健[1]，清水 誠[2]，小西 良子[1]，只石 幹[1]，服部 一夫[1]　([1]東農大・応生，[2]東農大）

3H09-06　霊長類消化管オルガノイド単層培養系の構築とヒト菌体成分に対する応答の解析
○有永 理峰[1]，石原 理沙[1]，岩村 美緒[1]，佐藤 南帆[1]，稲葉 明彦[2]，田中 啓介[3]，今井 啓雄[2]，山根 拓実[1]，大石 祐一[1]，岩槻 健[1]　([1]農大　応生科，[2]京大　霊長類研，[3]農大　ゲノム解析センター）

3H09-07　カシス抽出物が腸内環境に与える影響
石黒 七海[1]，林 貴之[1]，山口 大貴[2]，河野 麻実子[2]，川上 宏智[2]，光永 徹[1]，中村 浩平[1]，○稲垣 瑞穂[1]　([1]岐阜大応用生物，[2]森下仁丹株式会社）

3H09-08　抗生物質の投与が腸内環境に与える影響
○高原 彩嘉，中村 浩平，稲垣 瑞穂　（岐阜大応用生物）

3H09-09　コーン油への飽和脂肪酸の添加がフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境におよぼす影響
○岡崎 由佳子，中谷 有希　（藤女子大人間生活）

3H09-10　乳酸菌 YRC3780 株の日常的な摂取が心理的ストレッサーに対する HPA 軸（視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系）のストレス反応に与える影響
○内田 健治[1]，元島 英雅[1]，松浦 倫子[2]，山仲 勇二郎[2,3]　([1]よつ葉乳業株式会社　中央研究所，[2]北大院教育学研究院生活健康学研究室，[3]北大脳科学教育研究センター）

3H09-11　in vitro 実験系を用いたフコイダンのヒト腸内細菌叢に対する効果の解析
○大野 波月[1]，中野 勇人[3]，柴崎 哲哉[3]，里山 俊哉[1]，宮﨑 義之[1,2]，中山 二郎[1]　([1]九大院農，[2]NPOフコイダン研究所，[3](株)ヴェントゥーノ）

3H09-12　脂肪酸組成の異なる高脂肪食の摂取が糞便中フェノール量に及ぼす影響
○小林 琢磨[1]，大石 水無瀬[2]，吉川 悠子[1,3]，吉岡 泰淳[1,2]，三好 規之[1,2]　([1]静県大院薬食，[2]静県大食品栄養，[3]日獣大獣）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 9:00～9:30

食品―食品工学 - 保蔵，安全性 / 食品工学 - その他

3I01-01　フロクマリン低減イチジク茶が薬物代謝酵素に与える影響
○小山 ゆかり，阿部 竜也，西村 耕作　（東洋食品研究所）

3I01-02　アミン酸化酵素とアルデヒド酸化酵素の共役反応による出汁中ヒスタミンの消去
○石原 瑞希[1]，河邉 真也[1]，足立 収生[2]，臼井 将勝[1]　([1]水大校・食品科学，[2]山口大・生物機能）

3I01-03　肉腐敗菌の分離と生成される腐敗臭の分析
○高島 健斗，村上 周一郎　（明大農）

3I01-04　食品中の *Listeria monocytogenes* の分離と汚染調査
○安藤 恵[1,2]，栗木 花苗[3]，岸本 満[2]，中村 浩平[3]　([1]岐大連農，[2]名学芸大管栄，[3]岐大応生）

3I01-05　微生物熱測定によるフロロタンニン類の微生物増殖抑制効果の評価
○千原 菜緒[1]，柴田 敏行[2,3]，田中 礼士[2,3]，三宅 英雄[2,3]　([1]三重大生資，[2]三重大院生資，[3]三重大海藻バイオリファイナリー）

3I01-06　大気圧低温プラズマ照射による果物表皮のポストハーベスト農薬の分解
○福田 志津[1]，櫻井 康博[1,2]，井澤 真吾[1]　([1]京都工繊大・工芸科学，[2]誠南工業）

3I01-07　市販長期熟成酒のカルバミン酸エチルおよび香気成分の分析
○孛儿只斤 蘇日娜，磯谷 敦子，向井 伸彦　（酒類研）

3I01-08　MALDI-TOF MS を用いた食品希釈液からの直接同定方法の開発
○福本 沙弥，下平 潤，庵原 啓司　（マルハニチロ株式会社）

3I01-09　渋柿の脱渋処理における可溶性成分の網羅的解析
○竹田 里咲子[1]，解良 康太[2]，牧野 照平[2]，増田 潤[2]，山口 和朗[2]，北條 雅也[3]，濵崎 貞弘[3]，飯嶋 益巳[1,2]，中山 勉[1,2]　([1]東農大院応，[2]東農大応，[3]奈良農研セ）

3I01-10　チョコレートの保存がフレバーリリース挙動と 油脂の結晶化に与える影響
○達 美月，勝野 那嘉子，西津 貴久，今泉 鉄平　（岐阜大院）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 10:00～10:30

動物―細胞機能 - シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム

3I03-01　尿細管障害におけるタンパク質架橋酵素の機能解析
○丹羽 優，辰川 英樹，人見 清隆　（名大院・創薬科学）

3I03-02　筋形成型オリゴ DNA の NF-κB 阻害を介した抗炎症作用機序
○山本 万智[1]，三好 愛[2]，森岡 一乃[2]，二橋 佑磨[3]，三谷 塁一[1,2,3]，高谷 智英[1,2,3,4]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大院総合医理工，[4]信州大バイオメディカル研）

3I03-03　フェロトーシス誘導細胞における酸化特異的エピトープ形成と免疫応答解析
○糸井 海星[1]，林 世映[1]，三浦 由香子[1]，板倉 正典[1]，今井 浩孝[2]，内田 浩二[1]　([1]東大農，[2]北里薬）

3I03-04　エンメイソウエキスによる表皮常在菌の一種である *Enterococcus* 属に起因した炎症抑制効果の検証
○横江 友貴[1]，太田 聖子[1]，渡邉 紘介[2]，伊藤 廉[2]，猪又 顕[1]　([1]株式会社コーセー 研究所，[2]株式会社ミルボン 開発本部）

3I03-05　ダイズシストセンチュウの誘引に関与する遺伝子の探索
○佐伯 靖将[1]，細井 昂人[1]，内山 博允[2]，佐々木 康幸[1]，矢嶋 俊介[1]，伊藤 晋作[1]　([1]東農大バイオ，[2]東農大ゲノムセンター）

3I03-06　小胞体ストレス時の過酸化を抑制する薬剤の作用機序
○石田 智也[1]，苅谷 昌洋[2]，奥 勇紀[2]，阪井 康能[2]，寶関 淳[1,2]　([1]京都先端大バイオ環境，[2]京大農）

3I03-07　TBC1D7 の新規結合因子の探索とその機能の解析
○逸見 明央，山本 祐司，鈴木 司，井上 順，田久保 希　（東農大院・農・農化）

3I03-08　CNBP による mTORC1 活性化機構の解析
○土澤 弘幸[1]，石井 真央[2]，鈴木 司[1,2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

3I03-09　5- アミノレブリン酸による哺乳動物細胞の増殖抑制
○渡邉 晴也[1]，竹本 圭汰[1]，飯田 友貴[2]，高橋 究[2]，石塚 昌宏[2]，中島 元夫[2]，千葉櫻 拓[1]　([1]東農大院生命，[2]SBIファーマ(株)）

3I03-10　筋分化における古典的・非古典的な甲状腺ホルモン受容体 *α* 作用の役割
○網干 舞音[1]，古川 潤[1]，北風 智也[1]，原田 直樹[1]，山地 亮一[1,2]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]大阪府大・生資センター）

3I03-11　線虫 C. elegans の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-1 の分子機構
○有年 梨沙子[1]，影山 なつみ[2]，小野 真弘[3]，松永 洋平[4]，岩崎 崇[1,2,3]，河野 強[1,2,3]　([1]鳥取大農，[2]鳥取大大学院持続性社会創生科学研究科，[3]鳥取大大学院連合農学研究科，[4]SRL）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

動物―遺伝子 - 発現制御，ノンコーディング RNA，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス，ゲノミクス / 細胞工学 - 物質生産，タンパク質工学，細胞培養技術，幹細胞技術，ゲノム編集技術

3I05-01　筋障害応答性繊維芽細胞増殖因子 FGF13 の骨格筋における機能解析
○野口 惇，清水 誠，山内 祥生，佐藤 隆一郎 （東大院・農生科・応生化）

3I05-02　骨格筋損傷におけるコレステロール代謝産物の変動と機能解析
○高瀬 飛天[1]，清水 誠[1]，小野 敦子[1]，近澤 未歩[1,2]，齋藤 穂高[1]，市 育代[3]，山内 祥生[1]，佐藤 隆一郎[1] （[1]東大院・農生科・応生化，[2]名城大学・農学部・応用生物化学科・栄養・食品学研究室，[3]お茶大・基幹研究院）

3I05-03　転写因子 CREBH が胆汁酸受容体 TGR5 のプロモーター活性に及ぼす影響の解析
○佐々木 崇，佐藤 隆一郎 （東大院・農生科・応生化）

3I05-04　樹状細胞におけるケモカイン CCL17/TARC 発現機構と転写因子 PU.1 siRNA の喘息改善効果
○伊藤 直人[1]，坂田 文弥[1]，八須 匡和[1]，長田 和樹[1]，伊藤 朋香[1]，中野 信浩[2]，八代 拓也[1]，西山 千春[1] （[1]東理大先進工，[2]順天堂大医）

3I05-05　長鎖ノンコーディング RNA，ANROC と OIP5-AS1 による細胞増殖制御機構
○神武 洋二郎，岡田 凌太朗 （近大産理工）

3I05-06　膵臓β細胞における酸化ストレスによる Redd2 の発現調節機構とその役割の解明
○浦川 夏帆[1]，田宮 央登[1]，原田 直樹[1]，松村 成暢[2]，真下 知士[3]，北風 智也[1]，乾 博[1,4]，山地 亮一[1] （[1]大阪府大院・生命環境，[2]大阪府大・総リハ・栄養，[3]東大・医科研，[4]大手前大・健康栄養）

3I05-07　遺伝子改変マウスを用いた骨格筋における Dnmt3a の役割の解析
○藤田 真理子[1]，畑澤 幸乃[1]，大藪 葵[1]，大平 悠人[1]，水谷 彩子[1]，石原 健吾[2]，吉岡 潔志[3]，小野 悠介[3]，亀井 康富[1] （[1]京府大・生命，[2]龍谷大農，[3]熊本大・発生）

3I05-08　肝機能の生理学的解明を目指したヒト肝臓オルガノイド培養技術の開発
○久保山 文音，高橋 裕，山内 祥生，佐藤 隆一郎 （東大院・農生科・応生化）

3I05-09　Development of Chinese hamster lung（CHL）cell line with suppressed sialylation to express effective biologics
○Amihan Leana Anajao[1]，Misaki Ryo[1]，Noriko Yamano-Adachi[2]，Hiroyuki Kajiura[1]，Kazuhito Fujiyama[1] （[1]Osaka University，International Center for Biotechnology，[2]Osaka University，Graduate School of Engineering）

3I05-10　*Ralstonia* sp. NT-80 由来ラクトン特異性エステラーゼの熱安定性，温度依存性，及び基質特異性
○大森 遥斗[1]，星崎 裕美[1]，横尾 直哉[1]，上村 渉 上村 渉[1]，久保田 和貴[1]，岩間 祐介[1]，月村 亘[1]，赤沼 元気[2]，石塚 盛雄[1] （[1]中央大理工応化，[2]学習院大・理・化学）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

動物―タンパク質 - 構造，機能，活性制御，分解，局在制御，プロテオーム

3I06-01　非昆虫ベースの食餌は，肉食性動物の酸性キチナーゼの構造と機能を変化させる
○田畑 絵理[1,2]，鯉沼 拓海[1]，田山 拓史[1]，樫村 明徳[1]，坂口 政吉[1]，小山 文隆[1] （[1]工学院大先進工，[2]日本学術振興会・特別研究員(PD)）

3I06-02　ネコ酸性キチナーゼ偽遺伝子の活性化
○小山 文隆[1]，鯉沼 拓海[1]，田山 拓史[1]，樫村 明徳[1]，坂口 政吉[1]，田畑 絵理[1,2] （[1]工学院大・先進工，[2]日本学術振興会・特別研究員(PD)）

3I06-03　分泌タンパク質生産効率における分子シャペロン共発現とレドックス調節の効果
○天方 迪也[1]，由里本 博也[1]，寶関 淳[1,2]，阪井 康能[1] （[1]京大院農，[2]京都先端大・バイオ環境）

3I06-04　セルピン病治療薬開発の標的分子模倣体 H338RS-S の構造解析
品田 紗智子，○恩田 真紀 （大阪府立大・理・生物）

3I06-05　α1- アンチトリプシンを標的とした薬剤開発に有用な熱安定型変異体の創出
○勘澤 良介，綿谷 凌，恩田 真紀 （大阪府立大・理・生物）

3I06-06　小胞体ストレスセンサーの会合状態分布を介した応答制御機構の研究
○松崎 元紀[1,2,3]，横山 武司[4]，次田 篤史[4]，金村 進吾[5]，田尻 道子[6]，明石 知子[6]，齋尾 智英[3]，稲葉 謙次[2]，奥村 正樹[1] （[1]東北大学際研，[2]東北大多元研，[3]徳島大先端酵素研，[4]東北大生命，[5]関学大理，[6]横浜市大生命医）

3I06-07　ALS 原因遺伝子産物 TDP-43 の定量的解析を目的としたモデル培養細胞の開発
○舟橋 里帆，高原 照直，牧 正敏，柴田 秀樹 （名大院・生命農）

3I06-08　「基質取り込みゲート」に着目した薬剤輸送体(ABCB1)と脂質輸送体(ABCB4)の機能分化メカニズムの解明
○上原 翔[1]，木岡 紀幸[1]，植田 和光[2]，木村 泰久[1] （[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3I06-09　ナノディスク再構成系を用いたヒト MDR1 機能解析手法の開発
○辻 雪奈[1]，植田 和光[2]，木岡 紀幸[1]，木村 泰久[1] （[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3I06-10　昆虫味覚受容体のリガンド結合およびチャネル開閉を説明する構造モデルの構築
○森永 敏史[1]，永田 宏次[1]，伊原 さよ子[1]，新村 芳人[1,2]，佐藤 幸治[1]，東原 和成[1] （[1]東大農，[2]宮崎大農）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生

3I08-01　新規 *N*- アシルドーパミン合成酵素の発見
○前田 萌羽[1]，前本 佑樹[1]，青木 元秀[1]，梅村 知也[1]，吉田 稔[2,3]，伊藤 昭博[1,2] （[1]東薬大・生命科学，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東大院・農生科・応生工）

3I08-02　ナトリウム利尿ペプチドが塩味の行動応答に及ぼす影響
○菅原 友佳[1,2]，高井 信吾[1]，川端 由子[1,3]，岩田 周介[1,4]，渡邊 雄[1,5]，尾池 麻未[1,6]，平山 彩夏[1,7]，實松 敬介[1,4,8]，田畑 正志[2]，重村 憲徳[1,4] （[1]九大・院歯・口腔機能解析学，[2]九大・院農・家畜生体機構学，[3]九大・院歯・口腔機能分子科学，[4]九大・五感応用デバイス研究開発センター，[5]九大・院歯・義歯補綴科，[6]九大・院歯・口腔総合診療科，[7]九大・院歯・矯正歯科，[8]九大・OBT研究センター）

3I08-03　食物新奇性恐怖による摂食行動制御機構の組織学的解析
○山本 航史，喜田 聡　（東大院）

3I08-04　新規食物摂食時の食記憶と摂食行動を制御する神経ネットワーク
○福山 雄大，喜田 聡　（東大農）

3I08-05　乳児に特徴的な体臭成分による母親のオキシトシン分泌促進効果
○平澤 佑啓[1]，白須 未香[1]，岡本 雅子[1]，東原 和成[1,2]　([1]東大農，[2]東大ニューロインテリジェンス国際研究機構)

3I08-06　ネコ尿特異的に分泌される分岐脂肪酸組成の家系解析
○市沢 翔太，上野山 怜子，宮崎 雅雄　（岩手大農）

3I08-07　ネコがマタタビやキャットニップの葉を舐め噛む行動は蚊への化学防御効果の促進に寄与する
○上野山 怜子[1]，宮崎 珠子[1]，Hurst Jane. L.[2]，安立 昌篤[3,4]，西川 俊夫[3]，宮崎 雅雄[3]　([1]岩手大総合科学，[2]リバプール大，[3]名古屋大生命農，[4]東北大薬)

3I08-08　遺伝子発現依存的な社会的敗北ストレス誘導性社会忌避記憶の形成
○松村 京香[1,2]，石川 理絵[1]，喜田 聡[1]　([1]東大院農，[2]東農大院農)

3I08-09　苦味物質に対する嗜好性が向上する条件付け味覚嗜好学習課題の確立
○劉 牧言，喜田 聡　（東大院）

3I08-10　ヒスチジンによる長期記憶形成と記憶想起の向上
○川嶋 珠生[1]，樺山 音々[2]，小田切 友紀[2]，谷水 俊之[1]，石川 理絵[1]，喜田 聡[1]　([1]東大農，[2]東農大)

3I08-11　FGF21 分泌を誘導する希少糖は，マウスの飲酒を抑制する
○松居 翔，岩間 大貴，高橋 侑真，森岡 修平，小栗 靖生，都築 巧，佐々木 努　（京大農）

3I08-12　IgA を介した腸管粘膜免疫における転写抑制因子 Bach1 の役割について
濱田 理久[1]，水島 かつら[2]，髙木 智久[2]，武藤 哲彦[3]，五十嵐 和彦[3]，内藤 裕二[2]，○東村 泰希[1]　([1]石川県大院・生資環，[2]京府医院・医，[3]東北大院・医)

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

植物―遺伝子 - 機能，発現制御 / 遺伝子 - 構造解析，ゲノム，遺伝，変異

3J02-01　ダイズイソフラボン合成関連遺伝子の時期特異的発現について
○濱崎 英史[1]，栗原 志夫[1]，栗山 朋子[1]，見城 貴志[2]，小島 克洋[2]，穴井 豊昭[3]，竹山 春子[4]，松井 南[1]　([1]理研 CSRS，[2](株) 朝日アグリア，[3]九州大学，[4]早稲田大学)

3J02-02　シロイヌナズナのフラビン代謝調節に関与する新規転写因子の生理機能解析
○原田 美帆[1]，難波 純也[1]，丸田 隆典[1]，石川 孝博[1]，吉村 和也[2]，重岡 成[3]，小川 貴央[1]　([1]島根大院・自然科学，[2]中部大・応生・食栄，[3]近畿大・附属農場)

3J02-03　ゼニゴケの精子誘引物質候補 apigenin 生合成酵素 chalcone isomerase（CHI）遺伝子機能欠損株の作出および活性評価
○武部 夏実，諏訪 宏紀，松川 哲也，大和 勝幸，梶山 慎一郎（近大生物理工）

3J02-04　酒造好適米への休眠遺伝子 *Sdr4-k* 導入とその機能の解析
○金澤 伸矢[1]，氏原 巧貴[1]，岩野 舞衣子[1]，花俣 繁[2]，Aycan Murat[2]，Baslam Marouane[2]，菅原 雅通[3]，鍋倉 義仁[3]，金桶 光起[3]，花城 勲[4]，杉本 和彦[5]，三ツ井 敏明[1,2]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟県醸造試験場，[4]鹿児島大農，[5]農研機構)

3J02-06　ゲノム編集酵素の直接導入による多収性オオムギ品種の開発
○手塚 大介[1]，チョ フイキョン[1]，小野寺 瞳[1]，リンフ キャンヤン[1]，千々松 武司[2]，今井 亮三[1]　([1]農研機構・生物研，[2]佐々木食品工業(株))

3J02-07　シロイヌナズナ種内雑種実生でみられるバイオマス増大に寄与する非相加的発現遺伝子の探索
○山口 真明[1]，杉 直也[1,2]，鈴木 穣[3]，草野 都[1,4]，柴 博史[1]　([1]筑波大院生命地球科学，[2]横浜市大生命ナノシステム，[3]東大院新領域，[4]理研CSRS)

3J02-08　シロイヌナズナの雑種強勢を制御する DNA メチル化の解析
○宮川 紗衣乃[1]，杉 直也[1,2]，鈴木 穣[3]，草野 都[1,4]，柴 博史[1]　([1]筑波大院生命地球科学，[2]横浜市大生命ナノシステム，[3]東大院新領域，[4]理研CSRS)

3J02-09　Modified SDS-LiCl 法を用いたバラ（(*Rosa* x *hybrida*）の花由来 RNA 調整法の検討
○内徳 聖[1]，高倉 梨央[1]，稲葉 丈人[1]，稲葉 靖子[1,2]　([1]宮崎大農，[2]東北大院・生命科学)

3J02-10　多倍体ゲノムに対応したアセンブリパイプラインの開発
○石橋 智仁，伊藤 武彦　（東工大生命理工）

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

植物―植物工学 - 育種，物質生産，形質転換

3J04-01　植物プロモーターの特異性を維持して目的遺伝子を高発現させる Boost Gateway システムの開発
○山田 裕也[1]，蜂谷 卓士[1]，石黒 澄衛[2]，塚越 啓央[3]，中川 強[1]　([1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]名大・生命農，[3]名城大・農)

3J04-02　植物への複数遺伝子導入システムの開発と形質転換植物における導入遺伝子発現解析
○大屋 卓博[1]，蜂谷 卓士[1]，佐藤 豊[2]，中川 強[1]　([1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]遺伝研・植物)

3J04-03　シロイヌナズナにおける葉緑体外 OPDA 生産系の構築
○金谷 貴広，井原 雄太，若松 孝幸，蛯谷 裕輝，太田 啓之，下嶋 美恵　（東工大・生命理工）

3J04-04　新規のシグナルペプチドを利用した植物におけるタンパク質の分泌生産
○山本 佳奈[1]，梶浦 裕之[2]，三崎 亮[2]，藤山 和仁[2]　([1]阪大院工，[2]阪大生国セ)

3J04-05　遺伝子組換え植物による活性型ビタミン D3 の合成
○山岸 萌子[1]，中川 真太郎[1]，畑田 珠希[1]，秋山 遼太[1]，三浦 謙治[2]，刑部 敬史[3]，刑部 祐里子[4]，鈴木 宗典[5]，杉本 幸裕[1]，水谷 正治[1]　([1]神戸大農，[2]筑波大生命環境，[3]徳島大生物資源産業，[4]東京工業大生命理工，[5]神戸天然物化学)

3J04-06　熱帯熱マラリアワクチン抗原高発現イネの作出と解析
○加藤 洋香[1]，藤本 茉緒[1]，野澤 彰[3]，高島 英造[3]，曾我 郁弥[3]，黒田 昌治[4]，森田 重人[1,2]，澤崎 達也[3]，増村 威宏[1,2]　([1]京都府立大学・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ，[3]愛媛大学・プロテオサイエンス，[4]農研機構)

3J04-07　The identification of CYP716A12 mutants which have a high potential for oleanolic acid production through heterologous expression in *Nicotiana benthamiana*
○JUTAPAT ROMSUK[1]，Yasumoto Shuhei[1,2]，Seki Hikaru[1,2]，Fukushima Ery Odette[1,3]，Miura Kenji[4]，Muranaka Toshiya[1,2]　([1]Department of Biotechnology，Graduate School of Engineering，Osaka University，Japan，[2]Industrial Biotechnology Initiative Division，Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives，Osaka University，Japan，[3]Universidad Regional Amazónica IKIAM，Ecuador，[4]Faculty of Life and Environmental Sciences，University of Tsukuba，Japan)

3J04-08　ラッカセイスプラウトによるレスベラトロールの生産
○田中 紘才，滝口 泰之　（千葉工大先進工）

3J04-09　High level transient production of thermostable basic fibroblast growth factor in Nicotiana benthamiana leaves
○EDJOHN AARON MACAUYAG，Kazuhito Fujiyama，Hiroyuki Kajiura，Ryo Misaki　(Osaka University)

3J04-10　アグロバクテリウムによる植物一過的形質転換のための Dual-Luciferase Assay Vector の構築
○武藤 佑季，蜂谷 卓士，中川 強　(島根大・総科セ・遺伝子)

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

植物―植物ホルモン，成長調節物質

3J07-01　シバとコムラサキシメジの共存培養によるフェアリーリング形成の分子機構解明の試み
○鈴木 海斗[1]，住田 真晟[1]，崔 宰熏[1,2,3]，道羅 英夫[3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研)

3J07-02　コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）における 2-azahypoxanthine の生合成研究
○鈴木 兵梧[1]，伊藤 彰将[2]，崔 宰熏[1,2,3]，鈴木 智大[4]，平井 浩文[1,2,3]，道羅 英夫[3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研，[4]宇都宮大・バイオ)

3J07-03　シロイヌナズナにおけるフェアリー化合物の影響と機能解析
○中原 諒大[1]，崔 宰熏[1,2]，ネルソン デビッド C.[3]，道羅 英夫[2]，谷口 有希[1]，深沢 知加子[1]，本橋 令子[1,2]，平井 浩文[1,2]，河岸 洋和[1,2]　([1]静大・農，[2]静大・グリーン研，[3]Bot. Plant Sci., UCR)

3J07-04　フェアリー化合物 2- アザヒポキサンチン非感受性シロイヌナズナ変異株の単離と解析
○田中 裕基[1]，鈴木 智大[1]，伊藤 綾乃[1]，崔 宰熏[2,3]，謝 肖男[1]，野村 崇人[1]，岡本 昌憲[1]，河岸 洋和[2,3]　([1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡大・農)

3J07-05　ゼニゴケにおけるストリゴラクトン生合成酵素の機能解析
○福田 遥，来馬 道生，瀬戸 義哉　(明大院農)

3J07-06　ワタ（*Gossypium hirsutum*）における strigol 合成酵素の探索
○若林 孝俊[1,2]，中山 芽与[1]，本間 大翔[1]，三浦 謙治[3]，滝川 浩郷[4]，水谷 正治[1]，杉本 幸裕[1,2]　([1]神戸大院農，[2]JST/JICA SATREPS，[3]筑波大生命環境，[4]東大院農)

3J07-07　根寄生植物 *Striga asiatica* における SL 受容体の機能解析
○内山 雄太[1]，遠矢 莉子[2]，瀬戸 義哉[1]　([1]明大院農，[2]明大農)

3J07-08　独創的化合物を用いた根寄生雑草 ShKAI2c 受容体の機能へのアプローチ
○須藤 瑠璃子，関 真太郎，今村 優作，喜久里 貢，高橋 郁夫，宮川 拓也，中村 英光，浅見 忠男　(東大農)

3J07-09　ストリゴラクトンシグナル伝達による病害誘導性機構の解析
○髙木 光佑[1]，伊藤 瑛子[1]，前田 哲[2]，草島 美幸[1]，藤田 萌香[3]，仲下 英雄[3]，森 昌樹[2]，浅見 忠男[1]，中村 英光[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]農研機構・生物機能利用研究部門，[3]福井県立大・生物資源)

3J07-10　ブラシノステロイド応答性の遺伝子抑制にはマスター転写因子の DNA 形状認識が必須である
○野崎 翔平[1,2,3]，光田 展隆[4]，坂本 真吾[4]，山上 あゆみ[5]，徐 玉群[3]，Bui Thi Bao Chau[3]，寺田 透[3]，三浦 謙治[1,2]，中野 雄司[5]，田之倉 優[3]，宮川 拓也[3]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・T-PIRC，[3]東京大・院・農生科，[4]産総研・生物プロセス研究部門，[5]京都大・院・生命科学)

3J07-11　好熱菌発酵産物由来の耐熱性機能性細菌 *Paenibacillus* sp. の植物生育促進性候補遺伝子群の同定と構造方程式モデリングにおけるオミクス統計評価
○宮本 浩邦[1,2,3,4]，須田 亙[4]，中熊 映乃[1,2,3]，富永 直樹[5]，宮本 久[6]，井藤 俊行[7]，佐藤 心郎[8]，守屋 繁春[8]，松浦 真紀子[1,2]，進藤 智恵[4]，児玉 浩明[1]，平井 優美[8]，茂田 勝美[5]　([1]千葉大院・園芸，[2](株)サーマス，[3]日環科学(株)，[4]理研・IMS，[5]タキイ種苗(株)，[6](株)三六九，[7]京葉ガスエナジーソリューション(株)，[8]理研・CSRS)

3J07-12　サフラナールのレタス主根伸長促進作用における内在性 ABA の関与の検討と構造活性相関
○岡 智将[1]，藤丸 佑紀[1]，山口 拓也[1,2]，松山 茂[1]，春原 由香里[1]　([1]筑波大生命環境科学研究科，[2]富山県立大工学部)

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

植物―植物ホルモン，成長調節物質

3J09-01　イネにおける AICA と AICA riboside の機能解析
○三好 大成[1]，崔 宰熏[1,2]，道羅 英夫[2]，平井 浩文[1,2]，河岸 洋和[1,2]　([1]静大・農，[2]静大・グリーン研)

3J09-02　イネにおけるフェアリー化合物 ICA の生合成研究
○阿部 孝宏[1]，崔 宰熏[1,2]，平井 浩文[1,2]，河岸 洋和[1,2]　([1]静大・グリーン研，[2]静大院・創造)

3J09-03　イネにおけるフェアリー化合物 ICA の代謝産物に対する特異的なメチルトランスフェラーゼの探索
○古田島 美颯[1]，崔 宰熏[1,2,3]，道羅 英夫[2]，謝 肖男[4]，大内 仁志[5]，鈴木 智大[4]，大西 利幸[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，浅川 倫宏[6]，稲井 誠[5]，菅 敏幸[5]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・創造，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・総合農，[4]宇大・バイオ，[5]静県大・薬，[6]東海大・海洋)

3J09-04　ジベレリンによるイネ葉鞘伸長の解析
○杉原 諒彦[1]，大井 崇生[2]，竹原 清日[1]，服部 将子[1]，松岡 信[1]，上口(田中) 美弥子[1]　([1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農)

3J09-05　イネジベレリン生合成・代謝酵素に対する選択的阻害剤創製への試み
○竹原 清日[1]，尾原 寛之[1]，服部 将子[1]，三上 文三[2]，松岡 信[1]，上口(田中) 美弥子[1]　([1]名大・生物機能セ，[2]京大・生存圏)

3J09-06　イネ属のジベレリン 3 酸化酵素 1 の遺伝子発現と酵素活性の進化的解析
○河合 恭甫[1]，竹原 清日[1]，樫尾 徹[1]，森井 南美[1]，杉原 諒彦[1]，吉村 久子[1]，伊藤 亜矢[1]，服部 将子[1]，戸田 陽介[2,3]，小嶋 美紀子[4]，竹林 裕美子[4]，古海 弘康[5]，野々村 賢一[6]，三上 文三[7]，赤木 剛士[8]，榊原 均[4,9]，北野 英己[1]，松岡 信[1]，上口(田中) 美弥子[1]　([1]名大院・生物機能セ，[2]JST・さきがけ，[3]名大・ITbM，[4]理研・CSRS，[5]遺伝研・技術課，[6]遺伝研・植物細胞遺伝，[7]京大院・生命農，[8]岡山大院・環境生命，[9]名大院・生命農)

3J09-07　シロイヌナズナ AtGH3.10 はジャスモン酸 - アミノ酸結合酵素として機能する
○清水 崇史[1]，デルフィン ジェイ カミソラ[1]，菅野 裕理[2]，瀬尾 光範[2]，北岡 直樹[3]，松浦 英幸[3]，峠 隆之[1]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]理研CSRS，[3]北大院・農)

3J09-08　シソ科植物における *cis*-jasmone 生合成経路の解明
○井上 史朗[1]，北岡 直樹[1]，松田 一彦[2]，松浦 英幸[1]　([1]北大農，[2]近大農)

3J09-09　空気伝搬のメチルジャスモネートの植物における代謝（その2）
○榎 亜加音[1]，大木 克成[1]，北岡 直樹[1]，清水 崇史[2]，峠 隆之[2]，松浦 英幸[1]　([1]北大農，[2]奈良先端大・バイオ)

3J09-10　オーキシンの不活性化経路の再構築に関する研究
○田中 佑佳[1]，新井 一司[1]，福井 康祐[1]，Guo Ruipan[4]，Hu Yun[4]，Ge Chennan[4]，青井 勇輝[2]，比良 隼[2]，Zhao Yunde[4]，笠原 博幸[2,3]，林 謙一郎[1]　([1]岡山理科大・理，[2]東京農工大院，[3]理研・CSRS，[4]カルフォルニア大サンディエゴ校)

3J09-11　コリンおよび N- アリルグリシンによる植物生長促進とその分子機構

○池田 直樹[1]，松浦 佑馬[2]，神村 麻友[2]，蔡 晃植[1,2,3]　([1]長浜バイオ大院バイオ，[2]長浜バイオ大バイオ，[3]長浜バイオ大ゲノム編集研究所)

3J09-12　銅イオンキレーターより見出された新規エチレン制御剤

○小山 倫之，浅見 忠男　(東大農)

講演番号　　演　題　　発表者氏名（所属）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

4A01-01　大腸菌が生成するセレンナノ粒子は細胞膜で包まれている
○芝本 佳永[1]，越智 杏奈[1]，豊竹 洋佑[1]，青野 陸[1]，井上 真男[1,3]，今井 友也[2]，三原 久明[1]（[1]立命大生命，[2]京大生存研，[3]立命大 R-GIRO）

4A01-02　*Bacillus subtilis* におけるプロファージ PBSX を介した round-body 形成の亜セレン酸耐性への関与
○越智 杏奈，井上 真男，青野 陸，三原 久明（立命大生命）

4A01-03　枯草菌における膜小胞生産機構
○安部 公博[1]，豊福 雅典[1,2]，野村 暢彦[1,2]，尾花 望[2,3]（[1]筑波大生命，[2]筑波大MiCS，[3]筑波大TMRC）

4A01-04　バイオサーファクタントが細菌のメンブレンベシクルに与える影響
○淡下 勇司[1]，野村 暢彦[2,3]，豊福 雅典[2,3,4]（[1]筑波大学大学院・生命地球科学研究群，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））

4A01-05　緑膿菌におけるメンブレンベシクル伝達の解析
○臼倉 雄紀[1]，諏佐 勇磨[1]，野村 暢彦[2,3]，豊福 雅典[2,3,4]（[1]筑波大院・生命地球科学研究群，[2]筑波大・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター，[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences）

4A01-06　緑膿菌細胞集団中の一部で出現する球状細胞の解析
○原田 潤[1]，兼松 周作[1]，野村 暢彦[1,2]，豊福 雅典[1,2,3]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大微生物サステナビリティ研究センター，[3]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））

4A01-07　緑膿菌の Quorum sensing 遺伝子に挿入される可動性因子の解析
○上原 礼佳[1]，須澤 由希[1]，遠矢 正城[1]，吉澤 晋[2]，木暮 一啓[2]，野村 暢彦[3,4]，豊福 雅典[3,4,5]（[1]筑波大院・生命環境，[2]東京大・AORI，[3]筑波大・生命環境系，[4]筑波大・MiCS，[5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in Life Sciences）

4A01-08　自家蛍光に基づいた QS シグナル応答株の網羅的解析
○佐野 千佳歩[1]，高部 響介[2]，八幡 穣[2,3]，豊福 雅典[2,3,4]，野村 暢彦[2,3]（[1]筑波大・院・生命地球科学研究群，[2]筑波大・生命環境系，[3]微生物サステナビリティー研究センター，[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences）

4A01-09　緑膿菌バイオフィルム内における自然突然変異株の解析
○矢野 真弓[1]，伊澤 徹[1]，尾花 望[2,3]，豊福 雅典[3,4,5]，野村 暢彦[3,4]（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・医療系トランスボーダー医学研究センター，[3]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大・生命環境系，[5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））

4A01-10　酸素の存在がプラスミドの接合伝達頻度を変化させるメカニズムの解明
○久野 航裕[1]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研）

4A01-11　*Pseudomonas chlororaphis* の Quorum Sensing によるフェナジン -1- カルボキサミド生産制御機構の解析
○諸星 知広[1]，矢部 奈緒香[1]，謝 肖男[2]，染谷 信孝[3]（[1]宇大院地域創生，[2]宇大バイオ，[3]農研機構）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

4A03-01　*Shewanella vesiculosa* HM13 由来細胞外膜小胞の主要積荷タンパク質の生理的役割
○釜阪 紘平，林 杏亮，川本 純，小川 拓哉，栗原 達夫（京大化研）

4A03-02　*Shewanella vesiculosa* HM13 の細胞外膜小胞の積荷タンパク質の機能発現に関与する表層糖鎖生合成系遺伝子群の機能解析
○都築 大空[1]，釜阪 紘平[1]，劉 愈穎[1]，今井 友也[2]，川本 純[1]，小川 拓哉[1]，栗原 達夫[1]（[1]京大化研，[2]京大生存研）

4A03-03　Identification and characterization of genes related to extracellular membrane vesicle production of *Shewallena vesiculosa* HM13
○Mengshan Zhu，Jun KAWAMOTO，Takuya OGAWA，Tatsuo KURIHARA（Kyoto Univ.，Inst. Chem. Res.）

4A03-04　曲率認識ペプチドを用いたハイスループットスクリーニングによる細菌細胞外膜小胞形成関連遺伝子の探索
○井上 宙夢[1]，河野 健一[2]，川本 純[1]，小川 拓哉[1]，栗原 達夫[1]（[1]京大化研，[2]京大薬）

4A03-05　有機塩素系殺虫剤分解細菌が産生する membrane vesicle に含まれる DNA
○石原 知行，加藤 広海，大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院・生命）

4A03-06　疎水性シグナルを包括した脂質二重膜小胞によるクォーラムセンシング誘導
○中嶋 勇人[1]，豊福 雅典[2,3]，野村 暢彦[2,3]，ウタダ アンドリュー　シンイチ[2,3]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター，[3]筑波大・生命環境系）

4A03-07　海洋細菌が形成する金属表面上のバイオフィルムにおけるマルチコピーなべん毛構成遺伝子の役割
○宮川 大[1]，尾花 望[2,3]，伊藤 菜々子[1]，相沢 慎一[4]，宮野 泰征[5]，野村 暢彦[3,6]（[1]筑波大院 ・ 生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]県立広島大院・生命環境，[5]秋田大院・理工，[6]筑波大・生命環境系）

4A03-08　酸素耐性嫌気性菌 *Amphibacillus xylanus* と通性好気性菌 *E.coli* における " 嫌気ストレス " に関する研究
鈴木 智典[1]，○加藤 紗弥[1]，木俣 真弥[1]，酒井 陽一[2]，高山 努[2]，中本 忠宏[3]，中島 聖也[1]，福島 多一[1]，武田 晃治[1]，吉村 悦郎[4]，野村 佳歩[1]，阿部 晃[1]，新村 洋一[1]，内野 昌孝[1]（[1]東京農大，[2]大同大，[3]東レリサーチセ，[4]放送大）

4A03-09　シアノバクテリアの分子シャペロンパラログの新規機能獲得
○仲本 準（埼玉大院理工）

4A03-10　過酷な環境からの新規微細藻類の探索とストレス応答機構に関する研究
○川口 遼太[1]，豊島 拓樹[1]，高市 真一[2]，川崎 信治[2]（[1]東農大 バイオ，[2]東農大　微生物）

4A03-11　細胞性粘菌を用いた表現型可塑性研究に向けた新規実験モデル系の構築
○小川 遥香，成田 隆明（千葉工大・先進工・生命）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

微生物―細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

4A05-01　低温醸造過程におけるワイン酵母のプロテオスタシス
○吉田 雅偲[1]，古谷 昇[1]，今井 芙月[1]，三木 健夫[2]，井澤 真吾[1]（[1]京都工繊大・工芸科学，[2]山梨大・生命環境）

4A05-02　ビール醸造過程の酵母のプロテオスタシス
○古谷 昇[1]，吉田 雅偲[1]，今井 竣也[1]，藤原 久志[2]，若井 芳則[2]，井澤 真吾[1]　([1]京都工繊大・工芸科学，[2]黄桜株式会社)

4A05-03　エタノールストレスによる酵母 *HSP78* の発現誘導とミトコンドリアタンパク質の変性
石川 優，西野 靖矢，福田 志津，○井澤 真吾　(京都工繊大・工芸科学)

4A05-04　高濃度エタノールストレス下での酵母の翻訳抑制に関する適応誘導
○安東 稜子，石川 優，井澤 真吾　(京都工繊大・工芸科学)

4A05-05　グルコース枯渇下における出芽酵母タンパク質 Tma10 と Stf2 の機能解析
○西野 靖矢，井澤 真吾　(京都工繊大・工芸科学)

4A05-06　出芽酵母におけるミトコンドリアレトログレードシグナル伝達経路を介したジヒドロスフィンゴシンの細胞死誘導
○高山 千廣，古賀 綾乃，有田 頌彬，坂本 理沙，谷 元洋　(九大理)

4A05-07　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における一酸化窒素依存的な翻訳後修飾を介した代謝制御
○示野 誠也，那須野 亮，高木 博史　(奈良先端大・バイオ)

4A05-08　リボフラビン合成酵素 GTP cyclohydrolase II が *Candida glabrata* の病原性に及ぼす影響
○鈴木 崇真[1]，那須野 亮[1]，老木 紗予子[2]，萩原 大祐[2]，高木 博史[1]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]筑波大生命環境)

4A05-09　酵母 Saccharomyces cerevisiae における新規な一酸化窒素耐性機構の解析
○吉川 雄樹，那須野 亮，高木 博史　(奈良先端大・バイオ)

4A05-10　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出したリボフラビン合成経路依存的なアセトアルデヒド耐性機構の解析
○那須野 亮，鈴木 崇真，高木 博史　(奈良先端大・バイオ)

4A05-11　分裂酵母における Rad24 優性不能変異の解析
○大島 智仁，川向 誠　(島大生資)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―細胞 - 細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞

4A06-01　オートファジックボディの膜分解メカニズムの解明
○籠橋 葉子[1,2,3]，川俣(堀江) 朋子[1]，大隅 良典[1]　([1]東京工業大学細胞制御工学センター，[2]東京工業大学生命理工学院，[3]ポーラ化成工業株式会社)

4A06-02　メタノール酵母 *Komagataella phaffii* Atg12-Atg5 複合体によるオートファジーの制御
○光部 雅俊[1]，中辻 拓実[1]，白石 晃將[1]，奥 公秀[2]，阪井 康能[1]　([1]京大農，[2]京都先端大バイオ環境)

4A06-03　TORC1-Gtr 経路の新規上流因子の同定を目指したスクリーニング
○谷川 美頼，外山 美奈，前田 達哉　(浜松医科大)

4A06-04　ウシグソヒトヨタケ子実体発生開始におけるオートファジーの関与
○吉田 裕史，坂本 裕一　(岩手生工研)

4A06-05　*Aspergillus* 糸状菌におけるアミラーゼ生産を誘導する代謝耐性イソマルトースアナログ
○沼本 穂[1]，森山 貴博[2]，田邉 理子[2]，寄立 麻琴[2]，平井 剛[2]，高橋 俊二[3]，加藤 直樹[1]　([1]摂大農，[2]九大院薬，[3]理研　CSRS)

4A06-06　麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養時における菌体への物理刺激がもたらすα-1,3- グルカン合成量への影響の解析
○織田 隆太郎[1]，宮澤 拳[2]，吉見 啓[3,4]，阿部 敬悦[1,4]　([1]東北大院農，[2]感染研真菌部，[3]京大院農，[4]東北大NICHe)

4A06-07　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるキチン合成酵素 ChsB のリン酸化修飾の解析
○金 京運[1]，岩間 亮[1,2]，堀内 裕之[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携)

4A06-08　糸状菌の生育において生体膜不飽和度が維持されることの意義
○岩間 亮[1,2]，堀内 裕之[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携)

4A06-09　麹菌の同株どうしの対峙培養における増殖抑制に関与する因子の探索
○浜中 祐弥[1]，齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，黒田 裕樹[3]，丸山 潤一[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]慶應大・環境情報)

4A06-10　Mitochondria fission dysfunction alleviates heterokaryon incompatibility-triggered cell death in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
○Chan LU[1]，Takuya KATAYAMA[1,2]，Ryota SAITO[3]，Kazuhiro IWASHITA[3]，Jun-ichi MARUYAMA[1,2]　([1]The Univ. of Tokyo，[2]CRIIM. UTokyo，[3]NRIB)

4A06-11　糸状菌 *Aspergillus fumigatus* のファルネソール応答における ABC トランスポータ ーの機能解析
○老木 紗予子[1]，浦山 俊一[1,2]，萩原 大祐[1,2]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

微生物―その他

4A08-01　ウイルス不活化剤としてのプロピレングリコールの効果とメカニズムについて
○平間 結衣，大西 慎太郎，森 卓也，石田 浩彦　(花王株式会社)

4A08-02　塵芥収集作業における感染リスク評価とミスト型ウイルス除去剤の検討
○石田 浩彦[1]，平間 結衣[1]，西尾 正也[1]，藤井 健吉[1]，塚田 慎也[2]　([1]花王株式会社，[2]株式会社モリタエコノス)

4A08-03　細菌のペプチドグリカンが光触媒殺菌効果に及ぼす影響の解析
○本村 陽香[1]，高尾 綾乃[1]，藤島 昭[2]，鈴木 智順[1,2]　([1]東理大・応生，[2]東理大・総研)

4A08-04　グラム陰性細菌の細胞壁が光触媒殺菌効果に与える影響の解析
○菅佐原 ことね[1]，藤嶋 昭[2]，鈴木 智順[1,2]　([1]東理大・応生，[2]東理大・総研)

4A08-05　菌体外にスペルミジンを排出する芽胞形成乳酸菌 *Bacillus coagulans* YF1 株の発見
○鈴木 秀之，藤原 有希，THONGBHUBATE Kullathida，前田 将宏　(京工繊大)

4A08-06　ヤケイロタケ Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産
○町田 龍晟，堀沢 栄　(高知工科大)

4A08-07　バニリンによる大腸菌の有機溶媒耐性化とバニリン耐性への薬剤排出ポンプの関与
○池畑 優希，道久 則之　(東洋大学)

4A08-08　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における insulysin ホモログの局在解析
○小川 翠，溝上 哲哉，鈴木 遥香，佐々木 信光，田中 瑞己，山形 洋平　(農工大院農応生化)

4A08-09　新規有機肥料の開発
○藤枝 由夏，タン コック ティン，荒木 希和子，久保 幹　(立命館大生命)

4A08-10　天然の有機触媒が示す抗菌活性のメカニズム
○西山 辰也，上田 賢志　(日大生資科)

4A08-11　日光文化財に発生する真菌の防除に向けた光触媒殺菌試験
○須崎 裕人[1]，小笠原 麻衣[1]，三浦 菜摘[1]，鈴木 孝宗[2]，寺島 千晶[2]，藤嶋 昭[2]，鈴木 智順[1,2]　([1]東理大・応生，[2]東理大・総研)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物一物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）

4B02-01　ウェルシュ菌のキシロース及びセルビオース資化性株の構築
○宮城 侑弥，川畑 博暉，森山 龍一，宮田 茂 （中部大院応用生物）

4B02-02　*Clostridium perfringens* のグリセロール・デヒドラターゼ遺伝子の欠失が生育と水素生産に及ぼす影響
○佐藤 悠一朗，加藤 実希，矢野 智奈美，宮田 茂 （中部大院応生）

4B02-03　Development of Gene Expression/Disruption Vectors for *Halomonas* sp. KM-1
○Ayaka TSUJI[1]，Yasuko TAKEI[2]，Minori MAEDA[2]，Yuka TSUJII[2]，Mei HIRATA[2]，Yoshinao AZUMA[1,2] （[1]Grad. Sch. of B.O.S.T，Kindai Univ.，[2]Kindai Univ.）

4B02-04　酵母のアルコール発酵を制御するシグナル伝達・代謝経路
○渡辺 大輔，川島 幹也，吉岡 直哉，杉本 幸子，高木 博史 （奈良先端大）

4B02-05　味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合性特異的遺伝子の発現制御機構
○堀 遼太郎[1]，福田 萌々花[1]，黒木 克明[1]，福地 佐斗志[2]，尾形 智夫[1] （[1]前橋工大・生物工，[2]前橋工大・生命情報）

4B02-06　味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合性発現に関与する転写因子 Ste12 の解析
○大塚 智史[1]，黒木 克明[1]，福地 佐斗志[2]，尾形 智夫[1] （[1]前橋工大生物工，[2]前橋工大生命情報）

4B02-07　味噌から分離された味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合遺伝子座の解析
○松浦 敦子[1]，福田 萌々花[1]，黒木 克明[1]，中村 建介[2]，藤原 朋子[3]，尾形 智夫[1] （[1]前橋工大・生物工，[2]前橋工大・生命情報，[3]広島総研食工技）

4B02-08　製麹工程におけるタンパク分解酵素遺伝子の発現とそれに関わる転写因子の挙動
○伊藤 一成[1]，谷野 有佳[1]，竹内 赳登[1]，五味 勝也[2]，狩山 昌弘[3]，三宅 剛史[1] （[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3](株)フジワラテクノアート）

4B02-09　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において酸性ペプチダーゼ PepO 及び OcpO の欠損が菌体外ペプチダーゼ生産に与える影響の解析
○佐藤 光希子，内平 瑛子，上野 綾子，田中 瑞己，山形 洋平（農工大院農応生化）

4B02-10　鰹節カビ *Aspergillus chevalieri* の生活環に関わる遺伝子の解析
○平松 健太郎[1]，門岡 千尋[2]，森 一樹[3,4]，奥津 果優[1]，吉﨑 由美子[1]，髙峯 和則[1]，玉置 尚徳[1]，二神 泰基[1] （[1]鹿児島大農，[2]崇城大生物生命，[3]セルイノベーター，[4]九大農）

4B02-11　ゲノムおよび代謝産物の分析に基づくクエン酸高生産菌 Aspergillus tubingensis WU-2223L のマイコトキシン非生産性の検証
○柴田 朗[1]，吉岡 育哲[2]，中川 博之[3]，桐村 光太郎[1,2] （[1]早稲田大学先進理工学部応用化学科，[2]早稲田大学理工学術院総合研究所，[3]農研機構・基盤技術研究本部高度分析研究センター）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物一物質生産 - 発酵（二次代謝産物）

4B04-01　麹菌による異種天然物生産における高生産因子の発見と機能解析
○原中 実穂[1]，齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，南 篤志[3]，及川 英秋[3]，丸山 潤一[1,2] （[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理）

4B04-02　高グルコアミラーゼ活性・低チロシナーゼ活性麹菌株の育種に関する研究
○陳 俊，殿内 暁夫 （岩手大連農）

4B04-03　輸送体選択技術を用いた新規有用化合物排出輸送体の網羅的探索
○竹中 優馬[1]，七谷 圭[1,2]，中山 真由美[1,3]，石井 智子[1]，伊藤 隼哉[1]，阿部 敬悦[1] （[1]東北大院・農，[2]東北大・INGEM，[3]東北大院・生命科学）

4B04-04　麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸分散変異株を用いた酵素生産性の評価
○石川 健二[1]，水戸 光司[1]，高橋 哲也[1]，山城 寛[1]，片瀬 徹[1]，小池田 聡[1]，片山 琢也[2]，丸山 潤一[2]，宮澤 拳[3]，吉見 啓[4]，阿部 敬悦[3,4]，山口 庄太郎[1] （[1]天野エンザイム，[2]東大院・農生科・応生工，[3]東北大院・農，[4]東北大・NICHe）

4B04-05　プトレッシンを産生する新規プロバイオティクス候補乳酸菌 *Latilactobacillus curvatus* KP 3-4 の分離と解析
○平野 里佳[1,2]，久米 愛子[3]，西山 知里[1]，本田 涼将[2]，白澤 秀斗[2]，凌 一葦[4]，杉山 友太[1]，奈良 未沙希[1]，下川 ひろみ[2]，河田 明輝[1]，小柳 喬[1]，芦田 久[2]，奥田 修二郎[4]，松本 光晴[3]，高木 宏樹[1]，栗原 新[2] （[1]石川県大生資環，[2]近畿大生物理工，[3]協同乳業・研究所，[4]新潟大医）

4B04-06　乳酸菌 *Lactobacillus amylovorus* と乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の相互作用が短鎖脂肪酸産生に与える影響
○栗原 瑞穂[1]，板谷 かえで[1]，宮本 浩邦[1,2,3,4]，児玉 浩明[1] （[1]千葉大院・園芸，[2]日環科学，[3]サーマス，[4]理研・生命医科学）

4B04-07　味噌漬け豆腐由来 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの生合成機構に関する研究
○松田 明香里[1]，河原 あい[2]，善藤 威史[3]，松崎 弘美[1,2] （[1]熊本県大・環境共生，[2]熊本県大院・環境共生，[3]九大院・農）

4B04-08　新たに分離した乳酸菌からの新奇バクテリオシンの探索と構造・特性の解析
○庄野 陸太，野見山 泰成，吉田 遥海，中山 二郎，善藤 威史（九大院農）

4B04-09　糸状菌 *Aspergillus terreus* が生産するイタコン酸による微生物の生育阻害効果
○川尻 康平[1]，浜田 勇和[1]，横前 滉太[2]，櫛田 冴希[2]，杉本 夏希[2]，鈴木 孝征[1,3]，金政 真[1,2] （[1]中部大院・応生，[2]中部大・環生科，[3]中部大・応生化）

4B04-10　*Mycobacterium tuberculosis* を選択的に殺す DNA ジャイレース阻害剤の発見
○今井 優[1]，HAUK Glenn[2]，QUIGLEY Jeffrey[1]，LIANG Libang[1]，SON Sangkeun[1]，GHIGLIERI Meghan[1]，GATES Michael[1]，MORRISSETTE Madeleine[1]，SHAHSAVARI Negar[1]，NILES Samantha[1]，HONRAO Chandrashekhar[3]，MA Xiaoyu[3]，GUO Jason[3]，BERGER James[2]，LEWIS Kim[1] （[1]ノースイースタン大学・抗生物質発見センター，[2]ジョンズ・ホプキンス大学，[3]ノースイースタン大学・創薬センター）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

微生物―物質生産 - 微生物変換，酵素反応，機能性高分子

4B07-01　麹菌における異種タンパク質高発現系の開発
○荒木 康子[1]，柚木 雅信[1]，鉞 陽介[1]，佐藤 敦史[2]，五味 恵子[1]，原 精一[1]，伊藤 考太郎[1]（[1]キッコーマン，[2]野田産研）

4B07-02　微生物生産能向上を目的とした微生物 ロドプシンの改変
○佐藤 良樹[1]，川崎 真由[1]，弘埜 陽子[2]，菊川 寛史[1,2]，中野 祥吾[2]，石井 純[3]，松田 史生[4]，戸谷 吉博[4]，伊藤 創平[2]，原 清敬[1,2]（[1]静県大院・薬食生命，[2]静県大・食栄，[3]神戸大院・科技イノベ，[4]阪大院・情報）

4B07-03　液胞改良による出芽酵母のエネルギー代謝の改善
○大長 薫，弘埜 陽子，菊川 寛史，田村 謙太郎，原 清敬（静県大・食栄）

4B07-04　*Methylorubrum extorquens* 内でのメタノール代替資化経路の構築とその影響
○鶴田 爽，平林 翼，折田 和泉，福居 俊昭（東工大生命理工）

4B07-05　野外から単離した微細藻類による生物変換
○藤井 洸気[1]，伊藤 賢一[1]，谷川 実[1]，東 翔子[1]，西村 克史[1,2]（[1]日大理工，[2]日大短大）

4B07-06　発酵食品中に含まれる麹菌のプレバイオティクス効果
○野村 亮[1]，都築 翔[1]，木村 公俊[1]，兒島 孝明[2]，志水 元亨[1]，加藤 雅士[1]（[1]名城大院・農，[2]名大院・生命農学）

4B07-07　ニコチンアミドモノヌクレオチドを生産する乳酸菌の検索
○吉野 都[1]，杉山 風音[1]，飯島 加奈[1]，道羅 英夫[1,2]，時本 悠司[3]，西川 孝治[3]，井戸垣 秀聡[3]，吉田 信行[1]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研，[3](株)大阪ソーダ）

4B07-08　鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌による鰹節（荒節）の燻煙香成分の代謝分解
藤原 卓巳[1]，米子 響[1]，木村 行宏[1]，横田 仁子[2]，土居 幹治[2]，○竹中 慎治[1]（[1]神戸大院農，[2]マルトモ(株)）

4B07-09　バクテロイデス属細菌の胆汁酸脱抱合活性の比較解析
○今西 陸，パタナポン ターダッタ，中山 二郎（九大院農）

4B07-10　無機―生体ハイブリッド系による可視光駆動型水素生産
○本田 裕樹[1]，篠原 優佳[1]，渡邊 源規[2]，石原 達己[2,3]，藤井 浩[1]（[1]奈良女大理，[2]九州大WPI-I2CNER，[3]九州大工）

4B07-11　ヒメマツタケ（*Agaricus blazei* Murrill）菌糸体由来抽出液が有する免疫チェックポイント阻害活性
○小堀 一[1]，多田 有人[1]，戸田 雅昭[2]，ダレッサンドロガバザ コリナ[2]，ガバザ エステバン[2]（[1]岩出菌学研究所，[2]三重大医）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

微生物―物質生産 - 微生物変換，酵素反応，機能性高分子

4B09-01　脳機能改善に資するチロシンあるいは Dopa を含むジペプチドの効率的生産
○本元 敦也[1]，佐怒賀 悠[1]，古渡 翔[1]，中森 俊宏[2]，木野 邦器[1]（[1]早大・先進理工・応化，[2]不二製油）

4B09-02　バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの工業的生産技術の開発
○倉本 歩[1,3]，木野 邦器[1,2]，佐藤 謙一郎[3]，岡田 行夫[3]（[1]早大・理工総研，[2]早大院・先進理工・応化，[3]東海物産株式会社）

4B09-03　非リボソーム型ペプチド合成酵素のモジュール構成に着目したアデニル化ドメインの探索とジペプチド類似体合成への展開
○永瀬 あゆみ[1]，鈴木 伸[2]，木野 邦器[1,2]（[1]早大・先進理工，[2]早大・理工総研）

4B09-04　Enantioselective synthesis of cyclic amines using a novel hydrolase
○Yuta FUKAWA，Yuta MIZUNO，Keisuke KAWADE，Koichi MITSUKURA，Toyokazu YOSHIDA（Gifu Univ.）

4B09-05　微生物酵素を利用した S- 置換システインスルフォキシドの立体選択的合成
○水谷 拓[1]，原 良太郎[2]，竹内 道樹[2]，日比 慎[3]，上田 誠[2,4]，小川 順[1]（[1]京大院農・応生，[2]京大院農・産業微生物，[3]富山県大工，[4]小山高専）

4B09-06　大腸菌の γ - グルタミルトランスペプチダーゼの菌体表面提示とその菌体を用いた γ - グルタミルバリルグリシンの酵素合成
○笹生 明日香，鈴木 秀之（京工繊大応生）

4B09-07　Putrescine production in Escherichia coli K-12 through the arginine decarboxylase pathway
○Kullathida Thongbhubate，Irie Kanako，Sakai Yumi，Itoh Akane，Suzuki Hideyuki（Division of Applied Biology，Kyoto Institute of Technology）

4B09-08　化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携によるジケトピペラジン合成における pH の影響と制御系導入による生産性向上
唐鎌 翔大[1]，○鈴木 伸[2]，木野 邦器[1,2]（[1]早大・先進理工，[2]早大・理工総研）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―遺伝子 - 構造，機能

4C01-01　ダイズ根圏でのイソフラボン分解に関与する遺伝子の同定
○青木 愛賢[1]，島﨑 智久[1,2]，矢崎 渉[1]，中安 大[1]，安藤 晃規[3]，岸野 重信[3]，小川 順[3]，増田 幸子[4]，柴田 ありさ[4]，須田 亙[5]，白須 賢[4]，矢﨑 一史[1]，杉山 暁史[1]（[1]京大・生存研，[2]理研・BRC，[3]京大・農，[4]理研・CSRS，[5]理研・IMS）

4C01-02　緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の新規キサントフィル合成遺伝子の探索
○小原 幹太，東根 徳広，森 勇輝，森本 大地，中川 聡，澤山 茂樹（京大農）

4C01-03　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子嚢胞子の成熟に関わる細胞壁分解酵素 AsmA の機能解析
○譚 鋳文[1]，手塚 武揚[1,2]，大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

4C01-04　Search for the acyltransferase genes required for the formation of triacylglycerol-containing sporangium membrane in *Actinoplanes missouriensis*
○SHIXUAN HU[1]，Satoshi Maeda[1]，Takeaki Tezuka[1,2]，Yasuo Ohnishi[1,2]（[1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci.，The Univ. of Tokyo，[2]CRIIM，The Univ. of Tokyo）

4C01-05　ビフィズス菌のカラメル化糖資化性に関わる酵素群の解析
○海江田 麿千加[1]，堀米 綾子[2]，小田巻 俊孝[2]，清水（肖）金忠[2]，北原 兼文[1]，藤田 清貴[1]（[1]鹿児島大農，[2]森永乳業・基礎研）

4C01-06　Insertion Sequencing 解析により同定されたアミノ酸代謝に関わるビフィズス菌遺伝子の通常飼育マウス腸内における定着と生存への寄与の評価
○井上 太貴，前田 智也，横田 篤，吹谷 智（北大院農）

4C01-07　Accumulation and assimilation process of maltose that inhibits the growth of the *malT* deletion mutant in *Aspergillus oryzae*
○Yahong Zou，Silai Zhang，Akira Watanabe，Shoki Fujita，Takahiro Shintani，Katsuya Gomi（Tohoku Univ.）

4C01-08　担子菌 Pleurotus ostreatus における自律複製配列 AMA1 の適用とゲノム編集への応用
○越 大志朗，河内 護之，中沢 威人，坂本 正弘，本田 与一（京大農）

4C01-09　糸状菌由来分泌型ホスホリパーゼ A2 の構造および機能解析
○川合 杏奈[1]，宮川 拓也[2]，田之倉 優[2]，吉田 稔[1,3,4]，有岡 学[1,3]
([1]東大院農・応生工，[2]東大院農・応生化，[3]東大・微生物連携機構，[4]理研環境資源セ)

4C01-10　*Saccharomyces eubayanus* のサブゲノムを持つ *Saccharomyces cerevisiae* に関する研究
○山下 敦士[1,2]，高橋 朋子[1,2,3]，加藤 拓[3]，只見 秀代[3]，永富 康司[3]，岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]，野田 陽一[1,2] ([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構，[3]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ(株))

4C01-11　冬虫夏草サナギタケの新規交配型遺伝子における機能解析
○鈴木 稔之[1]，小野 晶子[1]，鈴木 貴也[2]，張 吉麗[1]，道羅 英夫[2,3]，鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・理，[3]静岡大・グリーン研)

4C01-12　シイタケ子実体保存関連遺伝子 *exp1* の解析
○坂本 郁生，大畑 早弥香，橋本 侑香，吉田 一生，佐藤 利次 (北見工大・食品科学)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―遺伝子 - 構造，機能

4C03-01　Replication-Cycle Reaction 法による環境試料からのプラスミドの収集と性状解析
○一瀬 拓海[1]，池田 奈菜子[2]，森 光矢[1]，奈良 聖亜[3]，末次 正幸[3]，金原 和秀[1,2]，新谷 政己[1,2,4] ([1]静大院・総合科技，[2]静大・工，[3]立教大院・理，[4]静大・グリーン研)

4C03-02　細菌の進化・多様化を促す IncP-1 群プラスミドの宿主域や接合伝達頻度を左右する因子の探索
○梅木 穂乃花[1]，徳田 真穂[2]，雪 真弘[3]，大熊 盛也[3]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2,3,4] ([1]静大院・総合科技，[2]静大院・創造，[3]理研 BRC-JCM，[4]静大・グリーン研)

4C03-03　なぜ PromA 群プラスミドはアクセサリ遺伝子をもちにくいのか
○白木 友博[1]，山本 雪絵[2]，金原 和秀[1,2]，新谷 政己[1,2,3] ([1]静大・工，[2]静大院・総合科技，[3]静大・グリーン研)

4C03-04　IncP-1 群プラスミドの宿主域の違いを生む因子の探索
○徳田 真穂[1]，山田 亮[2]，金原 和秀[1,2]，新谷 政己[1,2,3] ([1]静大院・創造，[2]静大院・総合科技，[3]静大・グリーン研)

4C03-05　環境中の細菌から PromA 群プラスミドの「天然の宿主」を同定する
○川北 鈴香[1,2]，山本 雪絵[2,3]，陶山 哲志[2]，髙木 妙子[2]，大田 悠理[2]，野田 尚宏[2]，金原 和秀[1,3]，新谷 政己[1,3,4] ([1]静大工，[2]産総研バイオメディカル，[3]静大院総合科技，[4]静大グリーン研)

4C03-06　プラスミドの接合伝達現象に繊維状アミロイドタンパク質の有無が及ぼす影響
○白井 浩貴[1]，岩田 和樹[2]，田代 陽介[1,2]，金原 和秀[1,2]，新谷 政己[1,2,3] ([1]静大工，[2]静大院・総合科技，[3]静大・グリーン研)

4C03-07　FrmR は IncP1 型プラスミドによる細菌間及び生物界間接合の供与菌側染色体コード抑制因子である。
○守口 和基[1,2,3]，Zoolkefli Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad[2]，Cho Yunjae[3]，清川 一矢[1]，鈴木 克周[1,2,3] ([1]広島大院統合生命，[2]広島大院理，[3]広島大理)

4C03-08　線状プラスミド SAP1 における認識領域の特定
○土屋 建登[1]，深田 悠太[2]，片岡 正和[1] ([1]信州大院　総合理工　生命医工，[2]信州大院　総合医理工　生命医工)

4C03-09　植物病原性卵菌 *Aphanomyces cochlioides* の遊走子形態変化時変動遺伝子の解析
○竹原 由希子，佐藤 優樹，橋本 誠，崎浜 靖子 (北大院農)

4C03-10　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子べん毛形成に必須な 2 つの遺伝子(*trxA*，*AMIS1780*)に対するサプレッサー変異株の取得と解析
○鈴木 玲実[1]，前田 聡史[1]，手塚 武揚[1,2]，大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構)

4C03-11　*Methylobacterium* sp. OR01 株におけるメタノール走化性に関わる MCP タンパク質の同定
○加地 奏絵[1]，川端 和弥[1]，片山 志織[1]，谷 明生[2]，由里本 博也[1]，阪井 康能[1] ([1]京大農，[2]岡山大植物研)

4C03-12　*Methylobacterium aquaticum* 22A 株におけるメタノール走化性の分子機構の解明
○菊池 志保[1]，藤谷 良子[1]，加藤 純一[2]，谷 明生[1] ([1]岡大植物研，[2]広大院統合生命)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

酵素―酸化還元酵素

4C05-01　超好熱菌由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素の電極用素子への応用
○里村 武範[1,2]，三木 佑介[1]，大島 敏久[3]，高村 映一郎[1]，坂元 博昭[1]，櫻庭 春彦[4]，末 信一朗[1] ([1]福井大学工，[2]福井大ライフ，[3]大阪工大工，[4]香川大農)

4C05-02　アルドース C-6 位酸化菌によるトレハロース二酸化物の合成経路の解明
○桐生 高明，木曽 太郎，靜間 基博，村上 洋 (大阪産業技術研)

4C05-03　白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規 Flavin monooxygenase (FMO) の 機能解析
○早坂 実夏，森 玲香，鈴木 裕満，加藤 雅士，志水 元亨 (名城大農)

4C05-04　Engineering Cofactor Specificity of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase for a Highly Efficient and Robust NADPH Regeneration System
○Gamal Nasser Abdel-Hady[1,2]，Takeshi Ikeda[1]，Takenori Ishida[1]，Hisakage Funabashi[1]，Akio Kuroda[1]，Ryuichi Hirota[1] ([1]Hiroshima University，[2]Minia University)

4C05-05　*Geobacter sulfurreducens* におけるポリスルフィド取り込みへの *extHIJ* 遺伝子の関与
○藤田 大樹，Jahan Mst. Ishrat，伊豆 由記子，井上 真男，青野 陸，三原 久明 (立命大生命)

4C05-06　好熱菌由来色素依存性 L- グルタミン酸脱水素酵素の性質の解析
○岩田 峻弥[1]，伊藤 佑衣[1]，櫻庭 春彦[4]，大島 敏久[5]，里村 武範[2,3]，末 信一朗[2] ([1]福井大院・工，[2]福井大・工，[3]福井大・生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大)

4C05-07　異種生産したヒメツリガネゴケ由来のペルオキシダーゼ (Prx34) の特徴づけ
○伊藤 健司[1]，中 雄輝[2]，秋田 求[2] ([1]近畿大院　生物工学，[2]近畿大　生物工学)

4C05-08　乳酸センサ用フラビン依存性乳酸デヒドロゲナーゼの探索および特性評価
○鈴木 遼太，鉞 陽介，一柳 敦 (キッコーマン 研開本部)

4C05-09　リグニンモデル化合物で特異的に発現誘導される *Novosphingobium* sp. MBES04 株遺伝子の機能解析
○熊川 恵理[1]，吉川 昂宏[1]，勝亦 まどか[2]，粕谷 健一[1,2]，大田 ゆかり[2] ([1]群大院理工，[2]食健康センター)

4C05-10　膜結合型フルクトース脱水素酵素における直接電子移動型酵素電極反応の機構解明
○宋和 慶盛[1]，鈴木 洋平[1]，加納 健司[2]，北隅 優希[1]，白井 理[1] ([1]京大院農，[2]京大産官学連携)

4C05-11　有機溶媒耐性ブロモラクトン化酵素の開発
○知名 秀泰[1]，松浦 拓哉[2]，中村 卓[1] ([1]長浜バイオ大・バイオ，[2]長浜バイオ大院・バイオ)

4C05-12　ハブ毒腺組織由来プロテインジスルフィドイソメラーゼタンパク質のリコンビナント発現系の構築と機能解析
○竹林 聖純[1]，磯本 明子[2]，日高 將文[1]，二井 勇人[1]，柴田 弘紀[2]，小川 智久[1]（[1]東北大院農，[2]九州大生医研）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―遺伝子 - 構造，機能 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム

4C06-01　黄色と赤色を示すイソギンチャク Corynactis californica 由来の蛍光タンパク質 eCcRFP の構造形成に影響する要因の解析
○藤原 郁也，赤田 倫司，星田 尚司（山口大創）

4C06-02　緑膿菌においてシアン化物イオンにより発現が誘導される亜硫酸還元酵素ホモログ遺伝子の機能解明
○長田 瑞希[1]，亀谷 将史[1,2]，石井 正治[1,2]，新井 博之[1,2]（[1]東大 農生科 応生工，[2]東大微生物連携機構）

4C06-03　昆虫病原性真菌類由来レクチンの異種発現と諸性質決定
○小野 晶子[1,2]，竹島 愛乃[3]，崔 宰熏[3,4]，尾形 慎[5]，平井 浩文[4]，道羅 英夫[4]，河岸 洋和[3,4]，鈴木 智大[2]（[1]東京農工大院・連合農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研，[5]福島大・農）

4C06-04　Csr sRNA 安定性制御に関わる CsrD のアミノ酸残基の解析
○吉田 将来[1]，Gladyshchuk Olga[1]，藤樫 紅梅[2]，岡村 龍盛[1]，小谷 果穂[2]，杉本 華幸[1,2]，鈴木 一史[1,2,3]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農，[3]新潟大・日本酒学センター）

4C06-05　多重遺伝子破壊による黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン遺伝子群の機能解析
○田丸 詩織，近藤 永治，安藤 祐人，中島 春紫（明治大農・農化）

4C06-06　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン生産における，培地 pH が生産性・糖鎖修飾に及ぼす影響
○羽生 龍真，田近 麻友子，天貝 拓海，竹内 南優紀，中野 宏軌，中島 春紫（明治大農・農化）

4C06-07　qTn-Seq 法を用いた *Sphingobium japonicum* UT26 株の超低栄養環境での増殖に関わる遺伝子の同定
○野々山 翔太，柳 熙盟，加藤 広海，大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院・生命科学）

4C06-08　水田土壌において鉄還元窒素固定菌への炭素源供給を担う微生物群の解明
○笠原 拓己[1]，増田 曜子[1]，妹尾 啓史[1,2]（[1]東京大・院農，[2]東京大・微生物連携機構）

4C06-09　黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* とその近縁種における異なるアミラーゼ生産制御様式
○森瀬 太一[1]，橋本 渉[1]，塚原 正俊[2]，水谷 治[3]，山田 修[4]，渡部 昭[1]，藤田 翔貴[1]，新谷 尚弘[1]，五味 勝也[1]（[1]東北大院・農，[2]株式会社バイオジェット，[3]琉球大・農，[4]酒総研）

4C06-10　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析
○沼澤 里佳[1]，田中 優花子[2]，西岡 佐和子[2]，辻 遼太郎[2]，田中 瑞己[2]，山形 洋平[1,2]（[1]農工大院連農，[2]農工大院農応生化）

4C06-11　麹菌由来の転写因子 AoXlnR による発現制御と結合部位近傍における DNA 構造との関連性の解明
○岡 大椰[1]，兒島 孝明[1]，加藤 竜司[2]，井原 邦夫[3]，中野 秀雄[1]（[1]名大院・生命農，[2]名大院・創薬，[3]名大・遺伝子解析施設）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム

4C08-01　*Candida boidinii* におけるメタノール誘導性転写因子 Mpp1 の生理機能解析
○井上 紘一，岩瀬 公佑，由里本 博也，阪井 康能（京大農）

4C08-02　担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* における，C2H2 型転写因子 PaMig1 のグルコース抑制への寄与の解析
○田中 拓未[1]，三浦 敦宏[1]，田中 瑞己[2]，北本 宏子[1]（[1]農研機構・農環研，[2]農工大・農）

4C08-03　出芽酵母における部位特異的にクロマチン凝縮度を制御する新規手法の開発
○山本 凌大，天井 貴光，植田 充美，黒田 浩一（京大院農）

4C08-04　*Saccharomyces cerevisiae HKR1* 遺伝子の 3´ 末端側部分配列はエキソン内部から独立して転写される
○今藤 俊宏，細川 佑奈，小澤 良太郎，笠原 紳（宮城大・食産業）

4C08-05　*Saccharomyces cerevisiae HKR1* 遺伝子のエキソンに内在するプロモーター様配列とその転写活性
○小澤 良太郎，今藤 俊宏，細川 佑奈，笠原 紳（宮城大・食産業）

4C08-06　好熱性真正細菌 *Geobacillus* sp. Kps3 の *in vivo* 及び *in vitro* での選択的スプライシングについての調査研究
○中原 悠輔[1]，高橋 莉央[1]，石田 達矢[1]，早川 準平[1]，栗井 貴子[1]，赤沼 元気[2]，石塚 盛雄[1]（[1]中央大・理工・応化，[2]学習院大・理・化学）

4C08-07　麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB はユビキチンリガーゼアダプター CreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する
○田中 瑞己[1]，藤田 翔貴[2]，河原崎 泰昌[3]，山形 洋平[1]，新谷 尚弘[2]，五味 勝也[2]（[1]東農工大院農，[2]東北大院農，[3]静県大食栄）

4C08-08　*Aspergillus aculeatus* SrpkF の 1 アミノ酸置換による非誘導条件下におけるセルラーゼ遺伝子発現の亢進
○源 健太朗，炭谷 順一，川口 剛司，谷 修治（阪府大院・生環科）

4C08-09　麹菌における固体培養特異的な遺伝子発現に関与する転写因子 FlbC のシスエレメント解析
○大沼 司，荒井 啓，小嶋 慧，藤田 翔貴，日髙 將文，新谷 尚弘，五味 勝也（東北大農）

4C08-10　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における内在性 NO による形態分化制御メカニズムの解明
○本間 颯太，伊藤 晋作，矢嶋 俊介，佐々木 康幸（東農大院）

4C08-11　RNA-seq を用いた *Mycolicibacterium smegmatis* のイソニアジド分解酵素発現機序の解析
○栄山 新[1]，老沼 研一[1,2]，金子 幸弘[1,2]（[1]大阪市大院医・細菌，[2]大阪市大院医・感染症セ）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム

4D02-01　T7 RNA ポリメラーゼを利用した枯草菌宿主での高効率フラボノイド誘導型発現系の開発
○是枝 亜実，小林 衿花，亀田 那波，尾村 優太，広岡 和丈（福山大生命工・生物工）

4D02-02　枯草菌の接合伝達を介したバチルス属細菌のゲノム改変系の構築
○朝井 計[1]，須田 和奏[1]，千田 桃子[1]，板谷 光泰[2]（[1]東農大バイオ，[2]信大工）

4D02-03　ICE 接合伝達に関与する推定転写因子 TraR の標的遺伝子の探索
○松本 哲，永田 裕二，大坪 嘉行　（東北大生命）

4D02-04　プラスミド獲得後の細菌のプラスミド保持に対する適応過程の解析
○高島 綾[1]，河野 響[1]，チャン フイティン[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，野尻 秀昭[1,2]　([1]東大院・農生科・AgTECH，[2]東大・微生物連携機構)

4D02-05　ウシ胎児血清成分による Bacillus 属細菌の抗がん活性誘導と RNA-seq 解析
市川 俊輔[1]，○勝尾 徳斗[1]，岡﨑 文美[2]，中山 寛子[3]，西村 訓弘[4]，島田 康人[5]　([1]三重大学教育，[2]三重大院生資・先端セ，[3]三重大院地域イノベ・ゼブラセ，[4]三重大院地域イノベ，[5]三重大院医・先端セ・ゼブラセ)

4D02-06　ラビリンチュラ類の脂質代謝の制御機構に関与する遺伝子の探索
○石橋 洋平，伊東 周敏，沖野 望　（九大院農）

4D02-07　大腸菌の GcvB small RNA によるアミノ酸トランスポーターの転写後調節
○宮腰 昌利，神田 健　（筑波大医）

4D02-08　好熱バチルスに見いだされた 5 炭糖によるカタボライト抑制
○吉田 健一，福井 香帆，石川 周　（神戸大イノベ）

4D02-09　*Liquorilactobacillus satsumensis* の産生する菌体外多糖の生産に関わるグルカンスクラーゼ
手塚 武揚[2,3]，○今尾 遥[1]，石田 淳也[4]，山本 恵理[4]，大西 康夫[2,3]　([1]東大農・生命化学工学，[2]東大院・農生科・応生工，[3]東大・微生物イノベ連携機構，[4](株)明治・乳酸菌研)

4D02-10　*Serratia plymuthica* における小分子 RNA ChiX と Hfq によるキチナーゼ系の制御
○樋口 響[1]，石田 知輝[2]，小嶋 優常[2]，杉本 華幸[1,2]，鈴木 一史[1,2,3]　([1]新潟大農，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大日本酒学センター)

4D02-11　植物共生メチロトローフ細菌 *Methylorubrum extorquens* AM1 のランタノイドに応答したメタノールデヒドロゲナーゼ XoxF1 の発現調節機構の解析
○高橋 莉史[1]，矢野 嵩典[1]，中川 智行[2]，谷 明生[3]，三井 亮司[1]　([1]岡山理大理，[2]岐阜大応生科，[3]岡山大植物研)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物―遺伝子 - ゲノム，メタゲノム，プロテオーム / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム

4D04-01　ヒトマイクロバイオーム解析のための高精度な mock community（微生物カクテル）の開発
○大山 良文[1]，三浦 隆匡[1]，島村 麻美子[1]，古川 雅崇[1]，成田 興司[2]，Tourlousse Dieter[3]，坂本 光央[4,5]，大熊 盛也[4,5]，亀山 恵司[2]，久田 貴義[2]，笠原 堅[2]，寺内 淳[2]，関口 勇地[3]，川﨑 浩子[1]　([1]NITE/NBRC，[2]JMBC，[3]産総研，[4]理研BRC-JCM，[5]AMED)

4D04-02　ヒトマイクロバイオーム解析のための推奨分析手法開発および室間共同試験による検証
○成田 興司[1]，Dieter M Tourlousse[2]，三浦 隆匡[3]，大山 良文[3]，島村 麻美子[3]，古川 雅崇[3]，坂本 光央[4]，大熊 盛也[4]，清水 律子[5]，齋藤 さかえ[5]，後藤 まき[5]，中山 二郎[6]，三島 梨子[6]，國澤 純[7]，細見 晃司[7]，亀山 恵司[1]，久田 貴義[1]，笠原 堅[1]，川﨑 浩子[3]，関口 勇地[2]，寺内 淳[1]　([1]JMBC，[2]産総研，[3]NITE/NBRC，[4]理研，[5]ToMMo，[6]九大院農，[7]NIBIOHN)

4D04-03　実験室内および野外ダイズにおける根圏細菌叢の時空間変動解析
○木伏 真子[1,2]，西川 洋平[2,3]，細川 正人[1,2,3,4]，井手 圭吾[1,2]，小川 雅人[3]，穴井 豊昭[5]，竹山 春子[1,2,3,4]　([1]早大院・先進理工，[2]産総研・早大 CBBD-OIL，[3]早大・ナノライフ創新研，[4]早大・生命動態研，[5]九大院・農)

4D04-04　高完成度の 1 細胞ゲノム配列取得を可能とする，アガロースゲル・マイクロカプセルの開発と簡便な作製手法
○青木 弘良[1]，雪 真弘[2]，本郷 裕一[3]，大熊 盛也[2]，山形 豊[1]　([1]理研RAP，[2]理研BRC，[3]東工大・生命理工)

4D04-05　ゲノム情報を用いた日本海溝の海底微生物の多様性と機能の解明
○實野 佳奈[1,2]，西川 洋平[2,3]，小川 雅人[3]，星野 辰彦[4]，稲垣 史生[4]，竹山 春子[1,2,3,5]　([1]早大院・先進理工，[2]産総研・早大 CBBD-OIL，[3]早大・ナノライフ創新研，[4]国立研究開発法人海洋研究開発機構，[5]早大・生命動態研)

4D04-06　ゲノム配列中の連続三塩基出現頻度を利用した細菌種の高速予測
○鈴木 宏和，中川 翔太，杉原 辰典，大城 隆　（鳥取大工）

4D04-07　Stenotrophomonas maltophilia 基準株と biovar2 群の再分類のための比較ゲノム解析
○小川 泰地[1]，久富 敦[2]，志波 優[1]，藤田 信之[1]，田中 尚人[1]　([1]東農大・分子微生物，[2]東農大・環境共生)

4D04-08　*Arthrobacter* 属細菌におけるニコチン分解遺伝子群の比較ゲノム解析
○島崎 智久[1]，増田 幸子[2]，柴田 ありさ[2]，須田 亙[3]，白須 賢[2]，矢﨑 一史[4]，市橋 泰範[1]，杉山 暁史[4]，中野 亮平[5]　([1]理研・BRC，[2]理研・CSRS，[3]理研・IMS，[4]京都大・生存研，[5]MPIPZ (Germany))

4D04-09　放線菌のカルコフォア合成様遺伝子群の発現に関与するシグマ因子 SigC の解析
藤本 正浩[1]，Salvatore Cosentino[2]，按田 瑞恵[2]，佐藤 光彦[3]，中村 佳司[3]，小椋 義俊[3]，林 哲也[3]，岩崎 渉[2]，上田 賢志[1]，○高野 英晃[1]　([1]日大・生資科・生命研，[2]東大・院理・生物科学，[3]九大院・医学研究院)

4D04-10　ラッカーゼ発現に変異が生じたシイタケ組換え体のラッカーゼ遺伝子の解析
○鈴木 未由太，野地岡 侑輝，佐藤 利次　（北見工大院・食品科学）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

生物科学―タンパク質・ペプチド科学 - 構造，機能，その他

4D07-01　超好熱性ウイルス由来キャプシドタンパク質の大腸菌でのタンパク質発現系の構築と発現タンパク質の機能解析
○炭竈 優花[1]，里村 武範[2]，望月 智弘[3]，末 信一朗[2]　([1]福井大院・工，[2]福井大学・工，[3]東工大)

4D07-02　ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*）由来 PRI3 タンパク質の子実体特異的発現と機能
○蔵谷 大和[1]，椿松 知香[1]，椿 捺菜美[1]，宮原 浩二[1]，松本 顯[2]，岩田 眞人[3]，安藤 祥司[1]　([1]崇城大生物生命，[2]順天堂大医，[3]アイエムビー(株))

4D07-03　カイコガ前胸腺刺激ホルモン PTTH 組換体分子種の性状解析
○兒島 憲二，石垣 悠里，平田 康祐，岡田 歩実，岡屋 琳，下田 佳苗，齋藤 一樹　（姫路獨協大薬）

4D07-04　バクテリオファージφ X174 スパイク H タンパク質 C 末端ドメインの LPS 結合能の解析
○伊藤 恭平，秋田 総理，増田 裕一，稲垣 穣　（三重大生物資源）

4D07-05　サンゴ由来レクチンの C 末端領域がウサギ赤血球に対する反応に与える影響の解明
○郷田 秀一郎[1,2]，上村 亮介[1]，古賀 萌子[1]，外山 諒[1]，海野 英昭[1]，畠山 智充[1]　([1]長崎大院工，[2]創価大糖鎖研)

4D07-06　イネ細胞質翻訳系の部分再構成による eEF1A および eEF2 の GTP 再生機構の解析
○鈴木 翔，鈴木 丈瑠，戸澤 譲　（埼玉大学院理工）

4D07-07　Comprehensive analysis of transglutaminase substrate preference by cDNA display
○Jasmina DAMNJANOVIC[1]，Moeri Nezu[1]，Beixi Jia[1]，Nana Odake[1]，Kiyotaka Hitomi[1]，Takaaki Kojima[1]，Naoto Nemoto[2]，Hideo Nakano[1]（[1]Nagoya Univ.，[2]Saitama Univ.）

4D07-08　ウミウシの体を彩る新規な水溶性色素タンパク質の同定
○江口 知輝[1]，志波 優[2]，高市 真一[2]，川崎 信治[1,2]（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物）

4D07-09　PD-L1 親和性フィブロネクチンドメイン変異体の創出
○牧野 祥嗣，伊藤 伸哉，金井 保（富山県大工）

4D07-10　マガキ由来マンノース特異的レクチン CGL1 のマンノースオリゴ糖鎖認識機構
○工藤 瑞希，秋吉 雅弘，増田 一喜，海野 英昭，畠山 智充（長崎大工）

ミーティングルーム D 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

生物科学―生物工学 - 解析技術・方法論，その他 / その他

4D09-01　RNA 発現プロファイルデータと深層学習を用いた老化に関する研究
○長谷川 平[1]，金 相完[2]，濱田 浩幸[3]，田代 康介[1,2]（[1]九大院・システム生命，[2]九大院・生物資源環境，[3]九大院・農学研究院）

4D09-02　コムギ無細胞系を用いた網羅的プロテインアレイの確立
○中北 智哉[1,2]，竹田 浩之[2]（[1]明大農，[2]愛大PROS）

4D09-03　環境中の希少種の検出を可能とする 16S メタゲノム -DRIP 法
○中島 有登[1]，後藤 愛那[1]，加藤 紀彦[1]，尾島 望美[1]，阪中 幹祥[1]，吉田 圭佑[2]，小田巻 俊孝[2]，片山 高嶺[1]（[1]京都大学 大学院生命科学研究科，[2]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所）

4D09-04　mito-base editor システムの確立と酵母ミトコンドリア DNA の機能獲得型変異の同定
○黒田 浩一，天井 貴光，山本 凌大，滝本 廉，佐藤 源気，饗庭 亘，押村 のどか，植田 充美（京大院・農・応用生命）

4D09-05　出芽酵母における donor DNA/gRNA ハイブリッドを用いた効率的なゲノム編集戦略
○饗庭 亘，天井 貴光，植田 充美，黒田 浩一（京大院農）

4D09-06　自家蛍光シグネチャーに基づくマウス卵子の評価
○原 克樹[1]，岡野 千草[2]，高部 響介[2]，高島 友弥[3]，福島 彩乃[3]，藤丸 翼[3]，廣木 亜由美[2]，松浦 鈴子[2]，野村 暢彦[2,4]，尾畑 やよい[3]，八幡 穣[2,4]（[1]筑波大・生命環境学群，[2]筑波大・生命環境，[3]東農大・生命科学，[4]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター）

4D09-07　Aptamer-based Detection of DENV NS1 Protein by Competitive Aptamer Duplex Formation Utilizing 3D-nano-assembly Gold Nanoparticle as Nanocarrier
○Indra Memdi Khoris[1]，Nasrin Fahmida[2]，Enoch Y. Park[1,2]（[1]Department of Bioscience，Graduate School of Science and Technology，Shizuoka University，[2]Research Institute of Green Science and Technology，Shizuoka University）

4D09-08　麹菌によるアルカリホスファターゼの高分泌発現
○石川 隼也，一柳 敦，五味 恵子（キッコーマン株式会社）

4D09-09　効率的な In vitro 抗原提示機能を持つウイルス様粒子の開発
○関口 智史[1]，徐 剣[2]，加藤 竜也[3]，朴 龍洙[3]（[1]静大・総科技院，[2]中国華東師範大学・生命科学府・医学合成生物研究センター，[3]静大グリーン研）

4D09-10　デジタルファブリケーションによるマイクロ流体デバイスの設計，および，細胞接着制御
○太田 空良[1]，上野 裕太郎[1]，加藤 千寛[1]，鈴木 麻紘[1]，千田 洸弥[1]，二階堂 望[1]，本間 俊将[1]，高橋 泰輔[2]，小此木 孝仁[2]，山下 和彦[3]，戸谷 一英[1]（[1]一関高専，[2](株)アイカムス・ラボ，[3]ヤヱガキ醗酵技研(株)）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

有機化学，天然物化学―合成，反応機構

4E01-01　農薬原材料であるホスゲンの新規合成法開発
○森口 舞子[1]，高尾 希美[1]，淺原 時泰[1,2]，大久保 敬[2,3]，井上 豪[1,2]（[1]阪大院薬，[2]阪大先導学際研，[3]阪大高等共創研）

4E01-02　テトラヒドロフラン中リチウムとエチレンジアミンを用いたアンモニアフリー Birch 還元法の開発
○加茂 翔伍[1,2]，Burrows James[1]，小出 和則[1]（[1]ピッツバーグ大，[2]星薬大）

4E01-03　バラの重要香気成分である DAMASCENOLIDE の類縁体合成と香気特性（第 3 報）
○宮澤 和[1]，川口 賢二[1]，勝田 亮[2]，額田 恭郎[2]，石神 健[2]（[1]長谷川香料（株），[2]東農大・生命）

4E01-04　ブラリナトガリネズミ由来の神経毒ペプチド BPP 類の合成研究
○矢野 佑介，福岡 凌，Maturana Andres D.，北 将樹（名大院生命農）

4E01-05　アプリシアトキシン・オシラトキシン類縁体の網羅的合成法の開発
○波田 航平[1]，新木 悠介[1]，野倉 吉彦[1]，花木 祐輔[3]，中崎 敦夫[2]，西川 俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]岩手大理工，[3]香川大農）

4E01-06　蛍光色素 1,3a,6a- トリアザペンタレンの短段階合成
○大原 駿也，スー トゥアン，矢島 新，斉藤 竜男（東京農業大学生命科学部）

4E01-07　マトリグリカンオリゴ糖の合成と糖鎖－ラミニン間の相互作用
○田村 敬裕[1]，伊藤 良汰[2]，真鍋 法義[2]，大野 詩歩[2]，山口 芳樹[2]，田村 純一[1]（[1]鳥取大院・連大農，[2]東北医薬大・薬）

4E01-08　フェナントレイン骨格を母核とする新規アゾ－ヒドラゾン系ホウ素錯体の合成と光物性評価
○東 達也，園田 素啓，谷森 紳治（大阪府大）

4E01-09　南極産ホヤ由来メロテルペン rossionone B の生合成模倣合成
○齋藤 克哉，倉沢 一輝，滝野 ちあき，桑原 重文，榎本 賢（東北大院農）

4E01-10　生合成を模倣したノル -3,4- セコトリテルペノイドの A 環部分の構築
○多湖 光佑[1]，西川 俊夫[1]，中崎 敦夫[2]（[1]名大院生命農，[2]岩手大理工）

4E01-11　テトロドトキシン推定生合成中間体 4,9- アンヒドロ -10- ヘミケタール -5- デオキシテトロドトキシンの 8- デオキシアナログの合成
○宮坂 忠親[1]，安立 昌篤[2]，西川 俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]東北大院薬）

4E01-12　Quorumsensing 阻害物質 aculene 類の全合成研究
○横川 陽向[1]，石澤 誠也[2]，齋藤 克哉[1]，桑原 重文[1]，榎本 賢[1]（[1]東北大学院農，[2]東北大学農）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他

4E03-01　糸状菌のα - マンノシド β -(1 → 6)- ガラクトフラノース転移酵素の同定と機能解析
○岡 拓二[1]，門岡 千尋[1]，田中 大[2]（[1]崇城大・生物生命，[2]東北医薬大・薬）

4E03-02　*Aspergillus fumigatus* の AfAnp1 は 真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成に関わるα -(1-6)- マンノース転移酵素である
○門岡 千尋[1]，田中 大[2]，岡 拓二[1]（[1]崇城大・生物生命，[2]東北医薬大・薬）

4E03-03　酵母 O －結合型糖鎖由来マンノオリゴ糖の系統的合成
○松尾 一郎，佐藤 有花，石井 希実，佐野 加苗，佐藤 美咲 （群馬大院理工）

4E03-04　二環性シアル酸を用いたα(2,9)ポリシアル酸の合成
○加藤 雅大[1]，河村 奈緒子[2]，田中 秀則[2]，今村 彰浩[1,2]，石田 秀治[1,2,3]，安藤 弘宗[2] （[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・iGCORE，[3]岐阜大・G-CHAIN）

4E03-05　CMP- シアル酸合成酵素の構造と機能における C ドメインの役割解明
○戸田 さくら[1,2]，呉 迪[1,2]，羽根 正弥[1,2]，佐藤 ちひろ[1,2]，北島 健[1,2] （[1]名大院・生命農学，[2]名大・生物機能セ）

4E03-06　An impairment of the C-domain of CMP-sialic acid synthetase causes lethality of medaka due to protein insolubility
○Di Wu[1,2,3]，Chihiro Sato[2,3]，Ken Kitajima[1,2,3] （[1]Biosci. Biotech. Center，[2]Grad. Sch. Bioagr. Sci.，[3]Institute for Glyco-core Research（iGCORE），Nagoya Univ.）

4E03-07　*O*- マンノース型糖鎖を可視化する代謝ラベルプローブの開発研究
○梅村 悠太[1]，田中 秀則[2]，マドウカル　ビブーテ アモル[2]，河村 奈緒子[2]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2,3]，矢木 宏和[4]，安藤 弘宗[2] （[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・iGCORE，[3]岐阜大・G-CHAIN，[4]名市大・院薬）

4E03-08　ハイマンノース型および植物複合型 *N*- グリカンを結合させたアフィニティーカラムによるレクチン様レセプターキナーゼの探索
○田中 創平，木村 吉伸，前田 恵 （岡大院・環境生命）

4E03-09　新規合成法を用いたラクト系スフィンゴ糖脂質プローブの創製と挙動解析
○高橋 舞菜[1]，河村 奈緒子[2]，鈴木 健一[2]，田中 秀則[1,2]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2,3]，安藤 弘宗[1,2] （[1]岐阜大院・連合農学，[2]岐阜大・iGCORE，[3]岐阜大・G-CHAIN）

4E03-10　生薬半夏の有効多糖アラバンを認識するモノクローナル抗体のエピトープ探索
○佐藤 春菜[1]，栗木 淳寛[2]，田中 宏幸[3,4]，江口 壽彦[5]，松岡 健[1,2,5,6] （[1]九大農，[2]九大生資環，[3]山口東京理科大薬，[4]九大院薬，[5]九大実生環セ，[6]九大院農）

4E03-11　らっきょうフルクタンの正常ヒト皮膚線維芽細胞中の細胞外マトリックス生成に対する影響
○津久井 慶[1]，上沖 和己[2]，堂籠 究[3]，徳留 嘉寛[1,4,5] （[1]城西大薬，[2]上沖産業，[3]宮崎工技セ，[4]佐賀大，[5]ジャパン・コスメティックセンター）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他 / 生物工学 - 酵素工学・生物反応工学，生物材料工学，生体医用工学

4E05-01　異性化反応を利用するナイセリア LOS コア三糖の合成
○一柳 剛[1]，冨樫 佳祐[2]，後久保 春花[1]，大谷 直輝[2]，眞鍋 史乃[3,4] （[1]鳥取大農，[2]鳥取大院持続性社会創成科学，[3]星薬科大薬，[4]東北大薬）

4E05-02　チオエーテル基を導入した糖供与体を用いた立体選択的グリコシル化
○久保田 直也[1]，西田 芳弘[1,2]，土肥 博史[1,2] （[1]千葉大院園芸，[2]千葉大分子キラリティーセンター）

4E05-03　マンノシルエリスリトールリピッドの界面活性における構造依存性の解明
○渡邉 恵[1]，佐々木 リサ[1]，仁科 宏美[1]，西田 芳弘[1,2]，土肥 博史[1,2] （[1]千葉大院園芸，[2]千葉大分子キラリティーセンター）

4E05-04　生死をコントロールできる病原細菌を用いた高効率・高安全性生ワクチンの構築
○加藤 祐輔[1]，長澤 裕哉[2]，中山 ももこ[2]，小川 洋介[2]，アリバム スワミシャ・デビ[2]，杉山 碧[2]，江口 正浩[2]，林 智人[2] （[1]農研機構・生物研，[2]農研機構・動衛研）

4E05-05　機械学習による高度好熱菌由来タンパク質遺伝子の大腸菌発現情報から得た可溶性発現予測法の開発
○松井 大亮[1,2]，山村 義弥[1]，鈴木 皓大[1]，北條 佑斗[1]，篠田 優[1]，中村 正樹[1]，榊原 一紀[1]，浅野 泰久[1] （[1]富山県大工，[2]立命館大生命）

4E05-06　転写制御因子 XylS をバイオセンサーとして用いたトルエン分解酵素の基質特異性改変
○小川 友希[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2] （[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構CRIIM）

4E05-07　簡便なシトルリン定量を目指した酵素の開発
○鉞 陽介，山本 圭，荒木 康子，一柳 敦 （キッコーマン研開本部）

4E05-08　合理的変異導入法によるヤンバルトサカヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの凝集ホットスポットの解析
○篠田 優，浅野 泰久 （富山県大・生工研セ）

4E05-09　麹菌における C 源代謝に関連する転写因子の制御機構の網羅的解析
○小笠原 菜々子，水谷 友香，岡 大椰，兒島 孝明，中野 秀雄 （名古屋大学農）

4E05-10　細胞内糖化計測法の開発及び糖化の細胞影響解析への応用
○三上 あかね[1,2]，アリ ヤニファオザニ[2,3]，小島 祥也[1]，杉本 千実[1]，加柴 美里[2] （[1]東京工科大医療，[2]東京工科大院バイオ，[3]オイルガス技術開発研究センター）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

有機化学，天然物化学―合成，反応機構

4E06-01　プロアントシアニジン類蛍光プローブの合成研究
○小林 周平[1]，河村 篤[2]，真壁 秀文[2] （[1]信大総合理工農，[2]信大バイオメディカル研）

4E06-02　アミノ基の可逆的検出技術 ReD-A 法：Stylissamide H 固相合成への適用
○長内 肖廉，高松 啓吾，今野 博行 （山形大工）

4E06-03　ジブロモゼルンボン誘導体の反応性を利用した新規多環式化合物の構築
○西澤 拓未[1]，柏崎 玄伍[1]，吉川 知美[1]，河合 靖[2]，北山 隆[1] （[1]近畿大院農，[2]長浜バイオ）

4E06-04　抗菌活性環状デプシペプチド hypeptin に含まれるβ - ヒドロキシアミノ酸の合成
○橋詰 和記，稲垣 穣，増田 裕一 （三重大院生物資源）

4E06-05　9 員環エンジイン構造の新規合成法の開発
○浅野 耕太，二木 美咲，西川 俊夫 （名大院生命農）

4E06-06　ピクロトキシニンの合成研究
○松村 泰志[1]，西川 俊夫[1]，中崎 敦夫[2] （[1]名大院生命農，[2]岩手大理工）

4E06-07　テトロドトキシンの推定生合成中間体 Tb-210B，Tb-226，Tb-242C，Tb-258 の全合成
○西海 眞史[1]，安立 昌篤[2]，西川 俊夫[1] （[1]名大院生命農，[2]東北大院薬）

4E06-08　天然・生物活性物質合成を志向した，メトキシベンゼン類の合成研究
○須貝 威，斉 子煜，本田 桂子，橋本 理一，小林 俊文，花屋 賢悟，東林 修平 （慶應大薬）

4E06-09　タマネギに含まれる蛍光性フラボノイド配糖体の全合成
○西條 祐輝，堀 優希，二瓶 賢一 （宇都宮大農）

4E06-10　Ni(II) キラルシッフ塩基を用いたアミノ酸のキラル化に関する研究
○中野 有那[1]，長岡 敬太[1]，酒本 翼[2]，森脇 浩樹[2]，阿部 秀範[2]，井澤 邦輔[2]，今野 博行[1] （[1]山形大工，[2]浜理薬品株式会社）

4E06-11　ヤエヤマサソリの毒液に含まれる K^+ channel toxin 類似ペプチドの合成及びジスルフィド結合架橋様式の決定
○岸本 拓実，廣田 光希，宮下 正弘，宮川 恒 （京大農）

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

有機化学，天然物化学―合成，反応機構

4E08-01　Pseudosporamide の合成研究
○桂川 美咲[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]（[1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ）

4E08-02　抗菌環状ペプチド nicrophorusamide A と B の全合成と三次元構造解析
○片山 雄登，稲垣 穣，増田 裕一（三重大生物資源）

4E08-03　ホスファチジルセリンの収束型類縁体合成
○多田 大輝[1]，阿部 一啓[2]，馬場 直道[3]，三澤 嘉久[3]，安部 真人[1]（[1]愛媛大院農，[2]名大院創薬基盤創薬，[3]備前化成株式会社）

4E08-04　アンフィジノリド M の C16-C26 フラグメントの合成研究
○渡辺 颯太[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]（[1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ）

4E08-05　プロシアニジン B2 酸化生成物の構造決定と反応機構の解明
○諏訪 雄大[1]，柳瀬 笑子[1,2]（[1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生）

4E08-06　インスリンシグナルを制御する violaceoid A（SF231）の合成研究
○吉岡 晴香，砂田 直哉，松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）

4E08-07　除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの光学活性体合成
○中村 皓毅，松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）

4E08-08　ジベレリン様活性を有する化合物 helminthosporic acid の合成研究
○春原 大亮，松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）

4E08-09　フルオラスコバルトサレン錯体を用いる高立体選択的不斉 Henry 反応
○廣田 宗士，藤野 旭，石原 一輝，塩入 孝之，松儀 真人（名城大院農）

4E08-10　Palau'amine の合成研究
○藤野 雄大[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]（[1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ）

4E08-11　非天然型アミノ酸 DADH の全異性体の合成研究
○岡村 仁則[1]，保野 陽子[2]，中山 淳[2]，品田 哲郎[2]，滝川 浩郷[2]（[1]東大院農生科，[2]阪市大院理）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

有機化学，天然物化学―合成，反応機構

4F02-01　黒穂菌（Ustilago esculenta）由来新規脂質の全合成研究
○小澤 明穂[1]，江川 貴斗[1]，河岸 洋和[2]，安部 真人[1]（[1]愛媛大農，[2]静岡大農）

4F02-02　リベシン B の不斉全合成
○堀尾 嘉恵，二瓶 賢一（宇都宮大農）

4F02-03　トウモロコシが産生するファイトアレキシン zealexin 類の合成研究
○石井 航平，松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）

4F02-04　リゾカルジオリピンおよび過酸化カルジオリピンの全合成
○廣角 道信，安部 真人（愛大院農）

4F02-05　新規グリオキシル脂質の全合成研究
○安部 真人[1]，田中 遼太郎[1]，石橋 洋平[2]，伊東 信[2]（[1]愛媛大農，[2]九大農）

4F02-06　有機マグネシウム種の置換反応を介した生物活性ビベンジルの迅速供給
姜 法雄[1]，○山田 朱莉[2]，丈達 唯花[1]，森田 康明[1]，中尾 風貴[1]，大江 拓人[1]（[1]神戸大院農，[2]神戸大農）

4F02-07　ホスファチジルコリンの効率的アナログ合成の確立
○藤原 朋哉[1]，渡辺 麻友美[1]，三澤 嘉久[2]，馬場 直道[2]，阿部 一啓[3]，安部 真人[1]（[1]愛大農，[2]備前化成株式会社，[3]名古屋大院・創薬）

4F02-08　Decarestrictine K の合成
○鈴木 隆之介[1]，勝田 亮[2]，上羽 隼平[2]，若森 晋之介[2]，矢島 新[2]，額田 恭郎[2]，石神 健[2]（[1]東農大院・応生，[2]東農大・生命）

4F02-09　比較機能解析によるテルペン合成酵素の生成物特性制御機構の解明
○天野 博之[1]，栗栖 尚嗣[2]，山家 史大[2]，廣森 美樹[2]，和氣 駿之[2]，中山 亨[2]，高橋 征司[2]（[1]東北大工，[2]東北大院工）

4F02-10　Assamicain 類生成の推定
○林 辰尭，柳瀬 笑子（岐阜大院自然科技）

4F02-11　Claisen 転位環化連続反応を介したイソフラベン誘導体およびイソフラバン天然物の分岐合成
○姜 法雄[1]，大江 拓人[1]，清水 夕稀[1]，滝川 浩郷[2]（[1]神戸大院農，[2]東大院農）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

有機化学，天然物化学―作用機構，構造と活性 / その他

4F04-01　キイロショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体機能発現における RIC3 の関与
○伊原 誠，高山 浩一，小森 勇磨，神谷 昌輝，西浦 凜，松田 一彦（近畿大農）

4F04-02　ショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体の薬理学的特性
○高山 浩一，小森 勇磨，神谷 昌輝，小泉 航，伊原 誠，松田 一彦（近大農）

4F04-03　パラヘルクアミド A の線虫ニコチン性アセチルコリン受容体阻害活性の分子基盤
○大坪 柊也，小泉 航，前川 貴信，伊原 誠，松田 一彦（近大農）

4F04-04　抗菌活性を示すゼルンボン誘導体（2*E*,6*E*,10*E*）-11-bromo-4,4,7-trimethylundeca-2,6,10-troienoic acid の合成
○福本 章太，谷口 朱音，森 美穂，柏崎 玄伍，北山 隆（近畿大院農）

4F04-05　ターゲット活性化作用における昆虫活性物質コムネシンの構造活性相関
○矢野 雄大[1]，加藤 直樹[3]，甲斐 建次[2]，林 英雄[2]，伊原 誠[1]，松田 一彦[1]（[1]近畿大，[2]大阪府大，[3]摂南大）

4F04-06　様々な品種のアズキ種皮に含まれる色素の分析
○吉田 久美[1]，高山 陽子[1]，浅野 友世[1]，萩原 星児[1]，佐藤 綾人[2]（[1]名大情報，[2]名大ITbM）

4F04-07　γ - オリザノール高含有コメ胚芽油を配合した化粧料による塗布美容効果
○小黒 友輝，神足 悟史，中村 紀夫，築野 卓夫（築野ライスファインケミカルズ株式会社）

4F04-08　γ - オリザノール高含有米胚芽油の経口摂取による美容効果
○神足 悟史，小林 瑞佳，中村 紀夫，林 千恵子，築野 卓夫（築野ライスファインケミカルズ株式会社）

4F04-09　フロフラボノイド類の合成に関する研究
○佐藤 謙光[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲生[2]，吉澤 結子[2]（[1]東京電機大学，[2]秋田県立大学）

4F04-10　クマリン類のホルミル化の検討
○及川 夏澄[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲生[2]，吉澤 結子[2]（[1]東京電機大学，[2]秋田県立大学）

4F04-11　3- スチリルフラボン類の合成及び HL-60 に対する増殖抑制活性の研究
○堤 ありさ[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲生[2]，吉澤 結子[2]（[1]東京電機大学，[2]秋田県立大学）

4F04-12　6- スチリルフラボン類の合成及び生物活性相関に関する研究
○松下 剛大[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲夫[2]，吉澤 結子[2]　([1]東京電機大学，[2]秋田県立大学)

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

有機化学，天然物化学ー農薬，医薬 / その他

4F07-01　リパーゼによる 10,11- ジヒドロゼルンボールの立体選択的トランスエステル化
○寺田 百合香，柏﨑 玄伍，北山 隆　(近畿大院農)
4F07-02　計算化学的手法による NFAT-133 の配座解析と相対立体配置の予測
○茂田 巧，滝川 浩郷，小倉 由資　(東大院農生科)
4F07-03　レゾルシノールアルキル L- グルコシドの化学合成とチロシナーゼ阻害活性
○井川 奏乃，石岡 和佳奈，二瓶 賢一　(宇都宮大農)
4F07-04　ハスモンヨトウにおける FACs の生理的意義の解明
○丸岡 毅，白井 雄，大門 高明，森 直樹，吉永 直子　(京大農)
4F07-05　ツルマメの登熟過程における種皮成分の変化の分析
○仁瓶 栞里[1]，杉田 千恵子[1]，吉野 奈津子[2]，近藤 忠雄[1]，吉田 久美[1]　([1]名大院情，[2]名大全技セ)
4F07-06　Synthesis and evaluation of catechol derivatives as an amyloid-beta aggregation inhibitor
○Fusheng XU，Keima Osawa，Misato Tajiri，Ryusei Endo，Koki Makabe，Hiroyuki Konno　(Yamagata Univ.)
4F07-07　SARS-CoV2 増殖必須蛋白質 3CL protease の作製と基質認識能の探究
○遠藤 龍生，及川 慧人，大沼 拓巳，真壁 幸樹，矢野 成和，今野 博行　(山大工)
4F07-08　丹参由来天然化合物の tanshinones が示す抗結核菌活性
○森 茂太郎[1]，田村 敏生[2]，前田 百美[2]，阿戸 学[2]，見理 剛[1]　([1]感染研細菌第二部，[2]感染研ハンセン病研究センター)
4F07-09　活性酸素制御剤の深層学習による in silico スクリーニング系の構築
○小越 将行[1,2]，高橋 弘盟[1]，北畑 信隆[3]，朽津 和幸[4]，大和田 勇人[4]，水野 秀之[1]，来須 孝光[1]　([1]公立諏訪理大・工，[2]農研機構，[3]東大院・農生科，[4]東京理科大・理工)
4F07-10　希少糖デオキシ誘導体 1-deoxy-D-allulose の線虫成長阻害活性
○佐藤 正資[1]，吉原 明秀[2]，砂古口 博文[3]，新谷 知也[4]，George W.J. Fleet[5]，何森 健[2]　([1]香川大農，[2]香川大希少糖機構，[3]香川県環保研，[4]愛媛大院連合農，[5]オックスフォード大)
4F07-11　オキサ - デカリン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の設計と合成，阻害活性評価ならびに立体化学
○服部 恭尚，吉澤 慎一郎，小林 数也，赤路 健一　(京都薬大薬)
4F07-12　ニコチアナベンサミアナ発現系によるアクチビン A の製造法開発
○渡邉 理紗[1]，竹本 浩[1]，田中 裕之[1]，吉中 喬慈[2]，宮内 美穂[1]，三沢 悟[1]，川端 潤[1]　([1]三菱ケミカル株式会社，[2]株式会社UniBio)

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

食品ー食品工学 - 物性，分析 / 食品工学 - その他

4F09-01　コエンザイム Q10/R- α - リポ酸 / γ - シクロデキストリン三成分包接体の調製と評価
○上梶 友記子，石田 善行，中田 大介，寺尾 啓二　(シクロケムバイオ)
4F09-02　豆蜂(トーファン)：豆乳とハチミツから作られた新しいスイーツの開発
○有井 康博[1,2]，西脇 章[3]，獅子原 里実[1]，西澤 果穂[1,4]，佐野 由倫[1]　([1]武庫女大・食物栄養・食創造科学，[2]武庫女大・栄養科学研究所，[3]ハートスフードクリエーツ株式会社，[4](現)龍谷大・農・食品栄養)
4F09-03　リパーゼ添加がパンケーキの冷蔵保存中の物性変化に与える影響
○西垣 里桜[1]，松宮 健太郎[1]，田中 昭宏[2]，松村 康生[3]　([1]京大院・農，[2](株)日清製粉グループ本社・基礎研究所，[3]京大・生存研)
4F09-04　添加する油脂の種類と凝固条件が豆乳エマルションゲルの物性に与える効果
○金城 史奈[1]，松宮 健太郎[1]，石井 統也[2]，北湊 咲葵[3]，木下 満里代[1]，重本 絢音[1]，西村 公雄[3]，谷 史人[1]，松村 康生[4]　([1]京大院農，[2]香大農，[3]同女大，[4]京大生存研)
4F09-05　モデル舌を用いたやわらかいゲル，ペーストの力学特性評価
○神山 かおる，日下部 裕子　(農研機構食品研)
4F09-06　光造形式 SLA フード 3D プリンター開発
○古屋 佳叡，武政 誠　(東京電機大学理工学部生命科学系)
4F09-07　３Ｄプリント食品の食感造形可能領域を拡大するフードインク開発
○渡邊 健太，武政 誠　(東京電機大学)
4F09-08　オリーブ葉ポリフェノール oleacein が卵白ゲルの物性に及ぼす影響
○赤澤 隆志[1]，伊丹 ひかる[2]，小川 雅廣[2]，庄子 真樹[1]　([1]宮城大食産業，[2]香川大農)
4F09-09　Simultaneous Milling and Extraction (SME) - a new simple method for extraction of hard plant materials
○Thi Bao Chau BUI，Thu Tra TRAN，Mito KOKAWA，Yutaka KITAMURA　(Univ. Tsukuba)
4F09-10　食後血糖値上昇抑制作用を有するソバアルブミンの食品加工への利用に向けた機能特性の評価
○小川 里桜[1]，二宮 和美[2]，山口 勇将[1]，熊谷 仁[2]，熊谷 日登美[1]　([1]日大・生資科，[2]共立女子大学・家政)
4F09-11　ハッカ精油に含まれる微量重要香気成分の解析
○河野 蛍子[1]，妙田 貴夫[1]，金嶋 泰[1]，服部 和幸[2]，野島 聡[1]　([1]東京農業大学，[2]北見工業大学)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

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

4G01-01　GPR55 活性化物質としてのクルクミンの同定とインクレチン分泌における役割
○原田 直樹[1]，奥山 真衣[1]，寺岡 佳晃[1]，荒堀 有美[1]，新森 耀[1]，北風 智也[1]，乾 隆[1]，乾 博[1,2]，山地 亮一[1]　([1]大阪府大生命環境，[2]大手前大健康栄養)
4G01-02　イソリクイリチゲニンによる腸内細菌叢の変動を介したメタボリックシンドロームの改善
○石橋 璃子[1]，古澤 之裕[1]，本田 裕恵[2]，渡邉 康春[2]，藤坂 志帆[3]，戸邉 一之[3]，高津 聖志[2]，栗原 新[4]，田渕 圭章[5]，長井 良憲[1]　([1]富県大工，[2]富薬総研，[3]富大医一内，[4]近大理工，[5]富大生命)
4G01-03　骨髄性細胞の 67LR を介した緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用における腸内細菌叢の関与の解析
○西岡 成汰，小原井 春香，冨岡 玲乃，村田 京介，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文　(九大院農院・生機科)
4G01-04　食餌誘発性肥満モデルラットに対する乳酸菌 *Lactica-seibacillus paracasei* K71 の影響の解析
○清水 佳祐[1]，三原 敏敬[2]，内山 公子[2]，髙橋 肇[2]，松本 雄宇[1]，鈴木 司[1]，井上 順[1]，山本 祐司[1]　([1]東農大院・応生科・農化，[2]亀田製菓(株))

4G01-05　スルフォラファンが腸内細菌叢に及ぼす影響と肥満抑制効果の解析
○小高 愛未[1]，川上 優花[1]，吉良 早由里[1]，松本 雄宇[1]，鈴木 司[1,2]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]（[1]東農大・応生科・農化，[2]東農大院・応生科・農化）

4G01-06　Restorative effect of 1-deoxynojirimycin on neuronal insulin resistance and its beneficial implication on tau hyperphosphorylation: in-vitro study using insulin-resistant neuroblastoma
○Isabella Supardi PARIDA[1]，Soo TAKASU[2]，Junya ITO[1]，Takahiro EITSUKA[1]，Kiyotaka NAKAGAWA[1]（[1]Grad. Sch. of Agric. Sci.，Tohoku Univ.，[2]Fac. of Pharma. Sci.，Gifu Pharmaceutical Univ.）

4G01-07　尿中カテコールアミンを指標とした flavan 3-ols の交感神経活動亢進作用の検証
○牟田 織江[1]，尾髙 南結[2]，藤井 靖之[1]，伏見 太希[1]，越阪部 奈緒美[1,2]（[1]芝浦工大院理工学，[2]芝浦工大シス理工）

4G01-08　山椒に含まれるα-グルコシターゼ阻害活性物質の探索
○藤岡 美紅[1]，宇都宮 洋才[2]，河野 良平[2]，奥野 祥治[1]（[1]和歌山高専，[2]和歌山医大）

4G01-09　マウス培養細胞における ATP 合成経路の基質を供給する代謝経路の解析
○久保 裕亮[1]，佐藤 奈々[1]，北山 沙笑[1]，石野 孔祐[2]，片山 映[2]，大橋 隆治[2]，永田 宏次[1]，岡本 研[1]（[1]東大農，[2]日本医大）

4G01-10　ミリシトリンならびにヤマモモシクロデキストリン（CD）包接体の食後高血糖抑制効果
○山田 詩奈[1]，Odongo Kevin[1]，佐藤 良[2]，今田 隆文[2]，折越 英介[2]，芦田 均[1]，山下 陽子[1]（[1]神戸大院・農，[2]三栄源エフ・エフ・アイ(株)）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管

4G03-01　ラット腸および肝臓におけるケルセチンの ex-vivo 代謝解析
○谷川 七海，西川 美宇，生城 真一（富山県立・工）

4G03-02　腸内細菌叢は生理活性物質ポリアミンの主要な供給源
○生田 かよ，中村 篤央，松本 光晴（協同乳業）

4G03-03　Angiopep-2 を修飾したクルクミン・ピペリン含有ナノ粒子の作製：クルクミンの脳内移行量の増加を目指して
○板谷 麻由子[1]，宮澤 大樹[2]，仲川 清隆[1]（[1]東北大院農，[2]東北大未来科技共研セ）

4G03-04　*Piper longum* 含有成分による尿酸トランスポーター（ABCG2）発現亢進作用
桐生 莉沙[1]，茂木 一稀[1]，薩 秀夫[2]，○仁科 淳良[1]（[1]日大理工，[2]前工大工）

4G03-05　腸内細菌叢はマウスの循環血中エクソソームに内包される miRNA の変化を介して宿主生理に影響を及ぼす
○唐津 勇吾，逢坂 文那，園山 慶（北大院農）

4G03-06　ラット骨中のメナキノン -4 低下が骨形成マーカーに及ぼす影響の解析
○大崎 雄介[1]，駒野 悠太[1]，駒井 三千夫[1]，佐藤 俊郎[2]，白川 仁[1]（[1]東北大・院農・栄養学，[2]J-オイルミルズ）

4G03-07　チーズとの組合せ摂取によるトマトからのリコピン吸収向上効果の検証　―非盲検クロスオーバー比較試験―
○脇 尚子，鈴木 重徳，菅沼 大行（カゴメ・イノベーション本部）

4G03-08　油に分散させた茶カテキンの体内吸収挙動：LC-MS/MS による評価
○宮下 采夏[1]，伊藤 隼哉[1]，橋本 革[2]，市瀬 嵩志[3]，仲川 清隆[1]（[1]東北大院農，[2]不二製油株式会社　油脂開発部，[3]不二製油グループ本社株式会社　未来創造研究所）

4G03-09　ラットを用いた多様なアピゲニン配糖体の腸管吸収性比較
○川本 実佳[1]，室田 佳恵子[1,2]（[1]島根大院自然科学，[2]島根大生物資源）

4G03-10　乳汁中ケルセチンの摂取が新生仔マウスの薬物代謝機構に与える影響
○藤原 なお[1]，向井 理恵[2]，村上 明[1]，石坂 朱里[1]（[1]兵庫県大・環境人間，[2]徳島大院・社会産業理工）

4G03-11　ガーリック由来香気成分の抗動脈硬化作用に関する研究
○AN NI[1]，細野 崇[1,2]，関 泰一郎[1,2]（[1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症

4G05-01　β-グルカンが実験的食物アレルギーの発症に及ぼす影響について
○何 超琪，劉 云慧，鳥居 洸太，鄭 廷宇，戸田 雅子（東北大院農）

4G05-02　ユズ果皮の抗アレルギー作用に関する解析
○鳥居 洸太[1]，吉瀬 菜南[2]，何 超琪[1]，渡邉 賢[2]，戸田 雅子[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院工）

4G05-03　紅藻カイガラアマノリに含まれる sulfoquinovosyl diacylglycerol の抗アレルギー効果
○杉浦 義正[1]，柴田 敏行[2]，阿部 真比古[1]，村瀬 昇[1]（[1]水産機構水大校，[2]三重大院・三重大海藻バイオ研）

4G05-04　香料ライブラリーから得られた Salicylaldehyde の免疫調節機能
○芦刈 翼，松原 宏樹，長田 和樹，八須 匡和，西山 千春（東理大先進工）

4G05-05　中国産食用茸ツブイボダケ（*Thelphora vialis*）含有 vialinin A の RBL-2H3 細胞における TNF-α産生阻害活性メカニズムの解析
○横田 翔太[1]，小野瀬 淳一[1,2]，菅谷 紘一[1,2]，阿部 尚樹[1,2]（[1]東農大院・健康，[2]東農大・応生・健康）

4G05-06　STAT5 転写活性を抑制する抗炎症性食品成分の探索・解析
○石流 愛梨[1]，薩 秀夫[2]（[1]前橋工大院工，[2]前橋工大工）

4G05-07　食物アレルギー性腸炎併発骨量減少における IL-4 の役割の解析
○玉井 雅人[1]，宇野 智[1]，山田 悟生[1]，中村 翔太郎[1]，曽我 皓平[1]，中道 裕子[2]，小出 雅則[2]，高野 智弘[1]，宇多川 信之[2]，清野 宏[3,4,5]，八村 敏志[1]，足立(中嶋) はるよ[1]（[1]東大農，[2]松本歯科大，[3]東大医，[4]千葉大医，[5]カリフォルニア大医）

4G05-08　細胞外小胞を介したデルフィニジンの抗炎症作用
○竹内 陽奈子[1]，村田 希[1,2]，丸亀 裕貴[2]，藤村 由紀[2]，立花 宏文[2]（[1]愛媛大農，[2]九大院農院）

4G05-09　ブルーベリー葉を基軸とした機能性フードペアリングによる抗炎症作用評価
○工藤 七海[1]，野崎 雅彦[2]，廣澤 直也[2]，湯浅 友識[3]，金井 祐基[3]，平川 良子[3]，山﨑 正夫[4]，山﨑 有美[1]（[1]宮大地域，[2]SUNAO製薬，[3]宮食開セ，[4]宮大農）

4G05-10　Anti-inflammatory properties of indole compounds in fermented rice bran
○Afifah Zahra Agista[1]，Yusuke Ohsaki[1]，Takuya Koseki[2]，Michio Komai[1]，Hitoshi Shirakawa[1]（[1]Grad. Sch. Agri. Sci, Tohoku Univ.，[2]Fac. Agri.，Yamagata Univ.）

4G05-11　微細藻類 *Botryococcus terribilis* 抽出物を用いた抗炎症効果に関する研究
○山本 星里[1]，高橋 真哉[1]，フェルドウシ ファラハナ[1]，チャン ゴック リン[2]，有村 隆志[2]，打上 恵理子[2]，平野 篤[3]，額賀 佐知子[3]，野崎 広之[3]，富永 健一[2]，礒田 博子[1,2]（[1]筑波大・環境科学，[2]産総研・食薬資源OIL，[3]東京電力HD）

4G05-12　DHA 代謝産物レゾルビン D4 の抗炎症作用
○富田 沙織[1]，近澤 未歩[2]，湊 健一郎[2]　([1]名城大院・農，[2]名城大・農)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化

4G06-01　トウモロコシの味噌様発酵による抗酸化活性増強効果
○安彦 裕実，小田桐 望亜，津久井 隆行　(札保医大)
4G06-02　オニグルミとペルシャグルミの脂肪酸組成および酸化安定性の比較
○桐明 絢[1]，高田 大輔[2]，則藤 孝志[2]，牧 雅康[2]，望月 翔太[2]，吉永 和明[2]　([1]秋田大院・理工，[2]福島大農)
4G06-03　キノン構造を有する機能性化合物の抗酸化作用とプロオキシダント効果
○水野 美麗，福原 潔　(昭和大薬)
4G06-04　ホウキタケ(*Ramaria botrytis*)に含有される pistillarin の抗酸化活性評価及び塩蔵ホウキタケ中に含有される pistillarin B の発見
○酒見 裕香，中西 晴菜，荒木 悠梨香，新藤 一敏　(日女大・家政・食物)
4G06-05　Ergothioneine の抗酸化メカニズムに関する研究
○村木 美晴[1]，安藤 知佳[1]，大社 勇太[2]，三谷 茂樹[2]，森光 康次郎[1]　([1]お茶大，[2]香栄興業)
4G06-06　モリンガの乾燥葉に含まれる AGEs 生成阻害活性物質の探索
○松榮 美樹[1]，丸岡 克哉[2]，藤田 佳孝[3]，澤邊 昭義[1,2]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]王子食品(株))
4G06-07　ジャバラ果皮に含まれる抗糖化物質
○楠本 恵理，奥野 祥治　(和歌山高専)
4G06-08　ジペプチド(Leu-Lys)は酸化および糖化ストレスの低下を介して線虫(*C. elegans*)の寿命を延長させる
○横山 壱成[1]，瀬戸山 央[2]，藤田 菜々[1]，和気 明音[1]，莢 雅棋[1]，小宮 佑介[1]，長竿 淳[1]，有原 圭三[1]　([1]北里大獣，[2](地独)神奈川県立産業技術総合研究所)
4G06-09　鶏卵成分の骨格筋損傷回復及び筋萎縮抑制効果
○澤野 祥子，小林 佑哉，前澤 涼香，水野谷 航　(麻布大)
4G06-10　カルノシンの筋肉機能改善効果とその分子基盤
○藤木 結葉[1]，石橋 明寿香[1]，佐藤 三佳子[2]，片倉 喜範[3]　([1]九大院・生資環，[2]日ハム中研，[3]九大院・農院)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 14:00～14:30

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化

4G08-01　アルツハイマー病患者対象ロスマリン酸介入試験における microRNA 発現変動および機能解析
○山本 萌乃[1]，篠原 もえ子[2]，浜口 毅[2]，小野 賢二郎[2]，山田 正仁[2]，三坂 巧[1]，阿部 啓子[1]，小林 彰子[1]　([1]東大農，[2]金沢医)
4G08-02　黒米糠摂取による老齢マウス脳組織におけるアミロイド *β*産生抑制
○石神 和佳奈[1]，大畠 悠実[1]，松井 美涼[2]，原 崇[2]，池内 健[3]，中村 澄子[4]，城 斗志夫[2]，大坪 研一[4]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命)
4G08-03　アミタケ(*Suillus bovinus*)に含有される神経細胞保護物質の探索研究
○尾松 和夏子[1]，菅谷 紘一[1,2]，小野瀬 淳一[1,2]，阿部 尚樹[1,2]　([1]東農大院・健康，[2]東農大・応生・健康)
4G08-04　老化による認知機能低下に対するカルノシン酸の効果解明
○松田 幸，林 遼太郎，岡田 晋治，石島 智子，阿部 啓子，小林 彰子　(東大農)
4G08-05　米糠摂取による高脂肪食負荷マウスの認知機能低下および tau リン酸化の抑制
○大畠 悠実[1]，石神 和佳奈[1]，松井 美涼[2]，原 崇[2]，池内 健[3]，中村 澄子[4]，城 斗志夫[2]，大坪 研一[4]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命)
4G08-06　プラズマローゲンによるフェロトーシス抑制
○阿部 アキ[1]，中川 和也[2]，杉山 梢[2]，山田 秀俊[1,3]　([1]帝京科学大学大学院 理工学研究科 バイオサイエンス専攻(帝科大・院・バイオ)，[2]株式会社ADEKA((株)ADEKA)，[3]帝京科学大学 生命環境学部 生命科学科(帝科大・生命環境))
4G08-07　活性酸素種を発生する食等由来抗酸化物質の探索と，疾患原因蛋白質の酸化・変性促進効果の検討
○黒川 洋一，内田 智也，中村 有香　(福井県大生物資源)
4G08-08　Caco-2 細胞における大豆由来フェリチンによる抗酸化酵素遺伝子の発現応答
○上野 有紀[1]，川本 善之[2]，増田 太郎[3]　([1]愛知学院大心身科学，[2]中部大生命健康科学，[3]摂南大農)
4G08-09　オートファジー制御における細胞性粘菌由来の生物活性物質 DIF の機能解析
○山田 龍[1]，矢野 敏史[1]，山越 正汰[1]，菊地 晴久[2]，久保原 禅[3]，原 太一[1]　([1]早大人科院，[2]慶應大薬学，[3]順天堂大院スポ健)
4G08-10　*S*- アリルシステイン高含有ニンニクエキスの精神的疲労感へ及ぼす影響
○松永 尚之，西原 豊，若松 淳一郎，瓜生 圭介，丸 勇史　(備前化成)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

食品―食品化学 - その他

4H02-01　チョコレートの品質に関与するカカオ豆成分の産地による比較
○磯野 未来，堀江 秀樹　(都産技研・食技セ)
4H02-02　瀬戸内海沿岸で養殖されたマガキの季節変動と特徴
○桑田 七帆[1]，西島 功貴[2]，丸田 ひとみ[2]，花田 恭孝[3]，山下 広美[1,2]　([1]岡山県立大学大学院，[2]岡山県立大学，[3](株)　マルト水産)
4H02-03　擦過処理による積極的な真菌類の接種がドライ熟成肉の製造や品質に与える影響
○三上 奈々[1]，豊留 孝仁[2,3,4]，高谷 政宏[5]，田村 健一[6]　([1]帯畜大・畜産，[2]帯畜大・獣医，[3]帯畜大・動物・食品検診セ，[4]千葉大・真菌医研セ，[5]とかち財団，[6]北一ミート(株))
4H02-04　キュウリモザイクウイルスの感染がミニトマトの果実含有成分に与える影響
○毛利 哲[1]，中村 茂雄[1]，進藤 友恵[2]，板橋 建[2]　([1]宮城大食産業，[2]宮城県農園総研)
4H02-05　機械学習を利用した機器分析によるしょうゆの官能的な特徴の予測
○大野 直土，戸塚 直哉，大友 裕絵，今村 美穂　(キッコーマン株式会社)
4H02-06　渋味飲料による脂っこさのリセット作用
○古居 優季[1]，岩﨑 至令[2]，坂本 裕香[2]，赤川 貢[3]，柏 計雄[4]，石井 剛志[1,2]　([1]神院大院栄養，[2]神院大栄養，[3]阪府大院生命，[4]大塚食品(株)琵琶湖研)
4H02-07　ゲラニオール配合ローズフレーバーソフトキャンディの喫食影響の研究
○石田 幸子，秋山 朝子　(クラシエフーズ株式会社)
4H02-08　緑豆もやしの炒め加熱におけるアクリルアミド生成
○野田 響子[1]，安東 ひまわり[1]，多田 貴美子[1]，佐竹 海音[1]，中内 風花[1]，筒浦 さとみ[2]，島村 裕子[3]，増田 修一[3]，村田 容常[1,4]　([1]お茶大，[2]新潟大，[3]静岡県大，[4]農大)

4H02-09　亜臨界水処理による柿果実由来ポリフェノールの低分子化
○楠橋 里佳子[1]，星川 慶明[1]，竹森 久美子[1]，米谷 俊[1,2]　([1]近畿大農，[2](株)ファーマフーズ)

4H02-10　ウメ果実におけるプロアントシアニジンの分布
○堀西 朝子[1,2]，大崎 秀介[3]，尾崎 嘉彦[1]　([1]近大生物理工，[2]和歌山ノーキョー食品(株)，[3]和歌山県工業技術センター)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

食品―食品工学 - 製造工学，加工学

4H04-01　ジビエにおける節類加工の試み
○小木曽 加奈，浜 奈々子，武藤 ゆきな　(長野県立大健康発達)

4H04-02　加熱調理時にスジと脂肪を流出させる畜肉前処理方法の開発
○西村 耕作，阿部 竜也　((公財)東洋食品研究所)

4H04-03　*Mucor flavus* を用いて製造したドライエイジングビーフへの味と香りの効果
○花ケ崎 敬資[1]，安里 直和[2]　([1]沖縄県工業技術センター，[2]沖縄県畜産研究センター)

4H04-04　ドライエイジングビーフの熟成過程における可溶性成分の網羅的解析
○新川 麗[1]，解良 康太[2]，松井 伸祐[2]，平山 雄[2]，松沢 雄斗[2]，飯嶋 益巳[1,2]，中山 勉[1,2]　([1]東農大院応，[2]東農大応)

4H04-05　亜臨界水中での糖の反応挙動に及ぼす緩衝液の種類の影響
○尾西 佑一朗[1]，安達 修二[2]，谷 史人[1]，小林 敬[1]　([1]京大院農，[2]京都先端大)

4H04-06　中温中高圧処理においてポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼすカルシウムおよび pH の影響
○山崎 慎也　(長野工技セ)

4H04-07　乳化系を対象としたミクロゲルと低分子乳化剤の油滴表面における競合吸着の検討
○金本 悠里[1]，松宮 健太郎[1]，石井 統也[2]，松村 康生[3]　([1]京大院・農，[2]香川大・農，[3]京大・生存研)

4H04-08　卵白ミクロゲルの卵黄マヨネーズへの添加効果
○半田 明弘[1,2]，井上 陽菜[3]，小山 翔大[2]，辻井 良政[3]　([1]キユーピー，[2]東農大キユーピーエッグイノベーション，[3]東農大農化)

4H04-09　フレッシュなレモンの香りをオリーブオイルに移す方法
○柏木 彩子　(小豆島ヘルシーランド(株))

4H04-10　乳化 *d*- リモネン溶液の噴霧乾燥における *d*- リモネン残留率に及ぼす再構成油滴径の影響
○吉井 英文[1]，高重 至成[2]，アフロザ スルタナ[3]　([1]摂大農，[2]愛大連農，[3]チッタゴン獣医大)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲

4H07-01　線虫モデルにおけるフェルラ酸ルチノシドの神経保護効果および作用機序の解析
○守谷 望[1]，松本 果楠子[1]，バグドウ　アブデル ファワズ[1]，鄭 屹峰[2]，片山 茂[1,2]　([1]信州大院農，[2]信州大バイオ研)

4H07-02　脳腸相関を活性化する熟成ホップ由来苦味酸の単回摂取による自律神経活性化と注意機能改善
○金留 理奈[1]，髙良 毅[2]，梅田 聡[3]，阿野 泰久[1]　([1]キリンホールディングス株式会社，[2]タカラクリニック，[3]慶應大文学部)

4H07-03　黒ショウガ(*Kaempferia parviflora*)による脳認知機能改善効果の検証
○吉田 泉[1]，吉田 香[2]，高橋 有志[1]，藤田 和弘[1]，五十嵐 友二[1]　([1]日本食品分析セ，[2]同志社女大)

4H07-04　緑茶成分ストリクチニンの老齢マウス海馬における神経新生促進作用
○松井 優樹，李 寛雨，藤村 由紀，立花 宏文　(九大院農院・生機科)

4H07-05　消化管に作用する天然成分から見出された TRPA1 活性
○新田 貴大[1]，鴨井 享宏[1]，岩﨑 有作[2]　([1]ハウス食品グループ本社(株)，[2]京都府立大院 生命環境科学)

4H07-06　緑茶カテキン EGCG の肝細胞由来細胞外小胞を介した生体調節作用
○宮脇 早希[1]，村田 希[1,2]，丸亀 裕貴[2]，藤村 由紀[2]，立花 宏文[2]　([1]愛媛大農，[2]九大院農院)

4H07-07　ガランガル抽出物の注意機能改善作用および生理機能に及ぼす影響
○對馬 千沙都，田立 益巳，加藤 敬太，森戸 暁久，高岡 彰子　(大正製薬株式会社　セルフメディケーション研究開発所)

4H07-08　ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスに対するジオスゲニンの血中ステロイドホルモンに及ぼす影響
○小野田 圭汰[1]，吉川 悠子[1,2]，吉岡 泰淳[1]，三好 規之[1]　([1]静県大院薬食，[2]日獣大獣)

4H07-09　オレガノの匂いによるマウスの食塩摂取量調節に関する研究
○秋山 菜々子，細野 朗，大畑 素子，長田 和実　(日大生物資源)

4H07-10　食品の匂い成分が嗅覚認知機能に及ぼす影響について
○鯨井 麗晋，坂本 彩乃，河上 知華，石塚 里瑚，山田 萌夏，細野 朗，津田 真人，大畑 素子，長田 和実　(日大生物資源)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 14:30～15:00

食品―食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル　/ 食品機能・栄養 - その他

4H09-01　硬度の異なる海洋深層水由来にがり抽出物添加水が肥満マウスの認識機能へ与える影響について
○福井 浩二[1]，鈴木 優希[1]，加藤 優吾[1]，竹内 望[2]，竹中 浩貢[2]，河野 雅弘[1]　([1]芝工大生命，[2]ダイドー・タケナカ)

4H09-02　β - ヒドロキシ酪酸摂取による健常者の睡眠の質に対する改善作用の可能性
○草刈 剛[1]，加藤 真理子[1]，坪田 潤[2]　([1]大阪ガスケミカル株式会社　フロンティア マテリアル研究所，[2]大阪ガス株式会社　エネルギー技術研究所)

4H09-03　カルノシン酸の脳での抗炎症機序の検討
○海野 美月[1]，柴田 紗知[2]，海切 弘子[3]，萱島 知子[4]，松原 主典[1]　([1]広大院人間，[2]福山大薬，[3]広島文化学園短大，[4]佐賀大教育)

4H09-04　茶カテキンによるコロナウイルス・メインプロテアーゼの阻害
○加藤 陽二[1,2]，東山 明香里[1]，西川 美宇[3]，生城 真一[3]　([1]兵庫県大環境人間，[2]兵庫県大先端食セ，[3]富山県大工)

4H09-05　コリアンダー果実米麹発酵液の開発と肌に対する有効性評価
○青野 栞[1]，田中 千智[1]，小田 彩水[1]，土井 翔太[2]，西 拓哉[2]，前橋 万里子[1]，稲川 大地[1]　([1]株式会社シーボン，[2]株式会社永廣堂本店　R&D)

4H09-06　麹甘酒飲用は健常者の頬部皮膚水分量を維持する
○榎本 利彦，小島 彩奈，小平 一也，小黒 芳史，倉橋 敦　(八海醸造株式会社)

4H09-07　食用昆虫の摂取が実験動物の代謝に及ぼす影響
○増田 尚輝[1]，阪本 鷹行[2]，西海 信[3]，渡邉 崇人[4]，櫻谷 英治[2]，三戸 太郎[4]，向井 理恵[2]　([1]徳大院，創成，生物，[2]徳大院，社会産業理工，食料，[3]兵庫医大，疾患オミクス，[4]徳大，BIRC，昆虫)

4H09-08　核内受容体の活性化を指標とした国産のつる性薬用樹木カギカズラ生葉の機能性解析について
○森田 直樹[1]，奥澤 亜美[1]，伊藤 哲男[2]，谷口 亨[3]，坂下 真実[1]　([1]産総研 生物プロセス，[2](有)イトウグリーン，[3]森林総研 林育セ東北)

4H09-09　ホウレンソウとグリーンキウイのスムージー調製時に起こるクロロフィル分解酵素によるフィトール増加
○横坂 伸一[1]，浅田 ゆり[2]，妹尾 勇志[2]，三上 輝志[2]，松田 寛子[1,2]，奈良井 朝子[1,2]（[1]日獣医大院・応生科，[2]日獣医大・応生科）

4H09-10　デラウェアの小規模試験醸造による産地特性の解明（2020 年）
○下野 雄太[1]，三浦 季子[1]，三輪 由佳[1]，平松 和也[1]，後藤 奈美[2]，小山 和哉[2]（[1](地独)大阪府立環境農林水産総合研究所，[2](独)酒類総合研究所）

4H09-11　コーヒー豆の焙煎時間に伴う機能性成分含有量をモニタリングするための一斉分析法
○岩田 奈津紀，堀江 真之介（株式会社島津製作所）

4H09-12　プラセンタエキスの細胞増殖機能に及ぼす加熱処理の影響
○座間 悠次[1]，宮下 忠士[2]，関口 聡[2]，山浦 信明[2]，影山 将克[2]，丹羽 光一[1]（[1]東農大，[2](株)DHC）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 9:00～9:30

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生

4I01-01　オピオイドによる脳腸経路と免疫系の複合的な機能調節を介した食物アレルギー改善機構の解明
○長田 和樹[1]，長瀬 博[2]，八須 匡和[1]，西山 千春[1]（[1]東理大先進工，[2]筑波大）

4I01-02　粘膜型マスト細胞特異的プロテアーゼの遺伝子発現制御と *Cre* マウスの作出
○川添 響[1]，長田 和樹[1]，蔭山 あずさ[1]，笠倉 和巳[1]，八代 拓也[1]，八須 匡和[1]，岩倉 洋一郎[2]，後飯塚 僚[2]，西山 千春[1]（[1]東理大先進工，[2]東理大生命研）

4I01-03　抗体工学を利用した抗 DNA 自己抗体の解析
○阿南 優佑[1]，佐々木 栄太[1]，板倉 正典[1]，上田 宏[2]，内田 浩二[1]（[1]東大農，[2]東工大科学技術創成院）

4I01-04　酵母と線虫において S- アデノシルホモシステインはメチオニン制限を模倣し寿命を延長する
○古原 優希[1]，小川 貴史[1,2]，益村 晃司[1]，金井 宗良[3]，曽我 朋義[4]，水沼 正樹[1]（[1]広大院・統合生命，[2]ハーバード大，[3]酒類研，[4]慶應大・先端生命）

4I01-05　モデル生物としてのメダカを用いた組織特異的誘導変異個体の作製
○石川 雄太[1]，勝村 恵理[1]，マン チー[1]，辰川 英樹[1]，渡邉 優子[1]，橋本 寿史[2]，人見 清隆[1]（[1]名大院・創薬科学，[2]名大院理）

4I01-07　大腸ムチンの量的・質的変化における転写抑制因子 Bach1 の影響
○米澤 明莉[1]，水島 かつら[2]，平井 泰子[2]，舘野 浩章[3]，武藤 哲彦[4]，五十嵐 和彦[4]，髙木 智久[2]，内藤 裕二[2]，東村 泰希[1,2]（[1]石川県大院・生資環，[2]京府医院・医，[3]産総研・細胞分子工学，[4]東北大院・医）

4I01-08　炎症性腸疾患における核内受容体型転写因子 NR4A3 の関与
○南川 夏己，伊藤 直人，片桐 万由佳，八須 匡和，西山 千春（東理大先進工）

4I01-09　核内受容体型転写因子 NR4A3 の樹状細胞における機能解析と皮膚疾患への寄与
○片桐 万由佳，伊藤 直人，南川 夏己，八代 拓也，八須 匡和，西山 千春（東理大先進工）

4I01-10　ショウジョウバエ遺伝学で明らかになる栄養応答基盤
○小幡 史明[1,2,3]（[1]理化学研究所，[2]京大生命，[3]東大薬）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 10:00～10:30

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生

4I03-01　Aβ42 海馬注入アルツハイマー型認知症モデルマウスにおける時間帯依存的な海馬依存性記憶想起障害
○ボーグ ジェームス，喜田 聡（東大院）

4I03-02　2 型糖尿病が脳インスリンシグナルとアルツハイマー病態に与える影響
○辻 竜平[1]，田之頭 大輔[1]，王 蔚[1]，丸山 めぐみ[1]，黒岩 智恵美[1]，斉藤 貴志[2]，西道 隆臣[2]，田口 明子[1]（[1]国立長寿医療研究センター，[2]理化学研究所）

4I03-03　低タンパク質食摂取が ob/ob マウスの血中可溶性レプチン受容体とレプチン作用に与える影響
○内山 瑞稀[1]，武井 柚[2]，竹中 麻子[2]（[1]明治大院農，[2]明治大農）

4I03-04　骨格筋由来細胞外小胞の体内動態及び生理機能の解析
○渡辺 祥[1]，須藤 優里[1]，櫻井 英俊[2]，佐藤 隆一郎[1]，山内 祥生[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大・CiRA）

4I03-05　骨格筋における Tmem100 の機能解析
○東平 征哉，佐々木 崇，久保山 文音，清水 誠，山内 祥生，佐藤 隆一郎（東大農）

4I03-06　Lactate treatment suppressed insulin-induced glucose uptake in adipocytes and caused whole body insulin resistance
○Zheng Ni[1]，Takahiro Gunji[1]，Yu-Sheng Yeh[1]，Jungin Kwon[1]，Su-Ping Ng[1]，Haruya Takahashi[1]，Wataru Nomura[1,2]，Teruo Kawada[1,2]，Kazuo Inoue[1,2]，Tsuyoshi Goto[1,2]（[1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. C-PIER, Kyoto Univ.）

4I03-07　The Role of Mevalonate Biosynthetic Pathway in Brown Adipose Tissue and Whole Body Metabolism
○Jungin Kwon[1]，Yu-Sheng Yeh[1]，Satoko Kawarasaki[1]，Wataru Nomura[1,2]，Haruya Takahashi[1]，Kazuo Inoue[1,2]，Teruo Kawada[1,2]，Tsuyoshi Goto[1,2]（[1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., C-PIER., Kyoto Univ.）

4I03-08　褐色脂肪組織での熱産生に及ぼす男性ホルモンの作用とそのメカニズム
○久保 慶太朗[1]，原田 直樹[1]，北風 智也[1]，乾 博[1,2]，山地 亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]大手前大・健康栄養）

4I03-09　高脂肪食摂取時に IRS-1 欠損は耐糖能異常を惹起し肝脂質蓄積を抑える
○鈴木 晶子[1]，豊島 由香[2,3]，藤原 葉子[2,4]（[1]お茶大院・ライフ，[2]お茶大・HLI研，[3]宇大・農，[4]お茶大・基幹研究院）

4I03-10　抗ロコモ緑茶葉成分の骨密度に対する影響について
○山中 布武己[1]，松田 智子[2]，栗谷 健志[1]，梅川 逸人[1]，西尾 昌洋[1]（[1]三重大生物資源，[2]三重県農業研究所）

4I03-11　インテグリンシグナルによる運動誘導性マイオカインの発現制御機構
○木本 早耶，清水 誠，佐藤 隆一郎，山内 祥生（東大農）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

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

4I05-01 バイオメタン鉱床造成 / 生産法 : Subsurface Cultivation and Gasification（SCG）- 地下環境褐炭層では何が起こっているか？
○上野 晃生[1]，玉澤 聡[1]，玉村 修司[1]，村上 拓馬[1]，木山 保[1]，猪股 英紀[1]，山口 眞司[2]，長沼 毅[3]，五十嵐 敏文[1,4]（[1]幌延地圏環境研究所，[2]三菱マテリアル株式会社，[3]広島大院統合生命科学研究科，[4]北海道大学工学研究院）

4I05-02 二酸化炭素固定に貢献するバイオミネラル中の炭酸脱水酵素の活用
○浪川 勇人[1]，森安 賢司[2]，勝又 聡[3]，前山 薫[4]，渡部 終五[5]，安元 剛[5]，鈴木 道生[6]（[1]東大農，[2]日本海水，[3]出光興産，[4]御木本製薬，[5]北里大海洋生命，[6]東大院農）

4I05-03 固体腐植ヒューミンを用いた生物電気化学システムにおける酢酸生成菌よる二酸化炭素変換の促進
○笠井 拓哉[1,2]，伊藤 啓人[2]，Pham Minh Duyen[1]，菰田 峰生[3]，片山 新太[1,2]（[1]名古屋大IMaSS，[2]名古屋大工，[3]中部電力(株)）

4I05-04 嫌気呼吸を利用した好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株による H_2/CO_2 からのアセトン生産性の増強
○竹村 海生[1]，加藤 淳也[1]，加藤 節[1]，藤井 達也[2]，和田 圭介[2]，岩崎 祐樹[2]，青井 議輝[1]，松鹿 昭則[2]，森田 友岳[2]，村上 克治[2]，中島田 豊[1]（[1]広島大学院・統合生命，[2]産総研）

4I05-05 *Clostridium paraputrificum* のピルビン酸ギ酸リアーゼ遺伝子の解析と水素ガス生産への応用
西村 しおり，竹内 東沙，國武 絵美，○木村 哲哉（三重大院生資）

4I05-06 Search for new microbial catalysts for Biological Inorganic Hybrid System
○DAICHI KAZAMA，TAKUMI KONDO，TAIKI SATO，ERIKO MORIMOTO，KOZO SATO，HAJIME KOBAYASHI（Tokyo Univ.）

4I05-07 生物機能リソースとしての昆虫，複合微生物系のスクリーニング
○古賀 汐莉，石丸 陽子，劉 暁輝，長濱 一弘（崇城大）

4I05-08 遺伝子改変鉄酸化細菌によるアンモニアの電気合成
○山田 祥平，高妻 篤史，渡邉 一哉（東薬大生命）

4I05-09 脱脂米糠由来タンパク質の食品化学的特性の評価
○上田 恵子[1]，廣瀬 明日香[2]，遠藤 修二郎[3]，山田 千佳子[4]，渡辺 昌規[1]（[1]山大院農，[2]山大農，[3]三和油脂(株)，[4]名古屋学芸大院管栄）

4I05-10 土壌環境と地温の関係解析
○平井 佑治，Tran Quoc Thinh，荒木 希和子，久保 幹（立命館大生命）

4I05-11 機械学習を用いたオリーブの収量予測の試み
○岸本 憲人（小豆島ヘルシーランド(株)オリーヴ健康科学研究所）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

植物―生物間相互作用 / その他

4I06-01 トウモロコシごま葉枯病菌に感染したトウモロコシ葉に誘導されるカウラレキシンと MBOA の蓄積
○鶴嶋 鉄[1]，森 直樹[2]（[1]阪南大流通，[2]京大農）

4I06-02 植物発酵物は青枯病菌の植物体内での増殖を抑制する
○緋田 安希子[1]，田所 千佳[2]，鳥居 英人[3]，竹中 航平[3]，藤岡 耕太郎[3]，岸田 晋輔[3]，田島 誉久[1]，加藤 純一[1]（[1]広島大院・統合生命，[2]広島大・工，[3]万田発酵株式会社）

4I06-03 イネの受容体型キナーゼ FliRK2 および ERC1 の植物免疫誘導における役割
○綿谷 幸樹[1]，伊庭 弘貴[2]，桂木 雄也[1]，蔡 晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大，[2]長浜バイオ大院，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

4I06-04 ゴール非形成性動物へのオーキシン生産能の付与
○吉田 響[1]，鈴木 義人[1]，土田 努[2]（[1]茨城大農，[2]富山大理）

4I06-05 根分泌モデル実験系を用いたトマチンによるトマト根圏微生物叢形成の解析
○高松 恭子，豊福 美和子，奥谷 芙季，中安 大，矢崎 一史，杉山 暁史（京大生存研）

4I06-06 ユキツバキとヤブツバキの送粉者の違いにおける化学生態学
○森 信之介[1]，長谷川 陽一[2]，森口 喜成[3]（[1]慶大理工，[2]森林総研，[3]新大院自然研）

4I06-07 ソムレによる漆の増産
○染井 正徳[1]，田口 武[2]，染井 秀[1]，染井 和子[1]（[1]ソメイヤッコ研究所，[2]灯火栽培研究所）

4I06-08 3-Galloyl glucose の皮膚バリア機能改善効果に関する研究
○井上 卓思[1]，竹内 ちひろ[1]，新谷 恵[1]，石川 文博[1]，水出 夏央[2]，佐藤 芽衣[2]，加藤 敦[2,3]（[1]株式会社伏見製薬所，[2]富山大学学術研究部薬学・和漢系　臨床薬剤学研究室，[3]富山大学附属病院薬剤部）

4I06-09 クレオメ（*Tarenaya hassleriana*）から生じるメチルイソチオシアネートの定量
○晴山 陽平[1,2]，古川 智宏[2]，多羅尾 光徳[3]，藤井 義晴[3]，久城 真代[2]（[1]東京農工大院・BASE，[2]農研機構・食品研，[3]東京農工大・農）

4I06-10 有機土壌と化学土壌における根系分布と肥料成分の溶出特性の関係解析
○坪倉 美紗，Tran Quoc Thinh，荒木 希和子，久保 幹（立命館大生命）

4I06-11 イネ機動細胞に形成されるケイ酸体のナノ構造解析
伴 勇希[1]，中村 江里[2]，緒明 佑哉[2]，今井 宏明[2]，○尾崎 紀昭[1]（[1]秋田県大生資科，[2]慶大理工）

4I06-12 ゲノム再シークエンシング解析によるムラサキ国内栽培品種・海外品種の比較
○岡田 貴裕[1]，渡邉 啓一[2]（[1]佐大医，[2]九州栄養福祉大）

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化 / 植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送

4J02-01 トマト葉緑体シグマ因子相互作用タンパク質 SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 のゲノム編集技術による改変と機能解明
○宇津木 一陽[1]，安達 凛奈[1]，鳴坂 義弘[2]，鳴坂 真理[2]，山田 晃嗣[1]，刑部 敬史[1]，刑部 祐里子[3]（[1]徳島大・生物資源産業，[2]岡山生物研，[3]東工大・生命理工）

4J02-02 光呼吸由来の H_2O_2 誘導性細胞死における葉緑体 GS-GOGAT サイクルの役割
○石橋 可菜[1]，丸田 隆典[1,2]，MHAMDI Amna[2]，BREUSEGEM Frank Van[2]（[1]島根大院・自然科学，[2]Plant Systems Biol.，VIB-Ghent Univ.）

4J02-03 シロイヌナズナの葉緑体分裂位置異常変異体における孔辺細胞葉緑体の表現型解析
○篠原 万由子[1]，宮崎 梨菜[1]，サンジャヤ アルビン[1]，村松 亮輔[1]，安澤 愛[1]，名護 しほ[2]，伊藤 竜一[2]，藤原 誠[1]（[1]上智大理工，[2]琉球大理）

4J02-04　シロイヌナズナの気孔形成過程における葉緑体の増殖・分配解析
○宮﨑 梨菜[1]，名護 しほ[2]，窪園 雅人[1]，村松 亮輔[1]，伊藤 竜一[2]，藤原 誠[1]　([1]上智大理工，[2]琉球大理)

4J02-05　低光強度下トマト根の伸長における希土類元素の影響
○井口 翔[1]，徳永 達也[1]，竹中 悠人[1]，渡辺 正夫[2]，石水 毅[1]　([1]立命館大・生命，[2]東北大・院生命)

4J02-06　有機合成したムギネ酸類アナログ「PDMA」のキレート鉄肥料としての効果実証
○鈴木 基史[1]，小林 高範[2]，村田 佳子[3]，中西 啓仁[4]，上野 大勢[5]，難波 康祐[6]　([1]愛知製鋼，[2]石川県立大学，[3]サントリー生命科学財団，[4]東京大学，[5]高知大学，[6]徳島大学)

4J02-07　サトイモ科植物ザゼンソウの発熱期花序で発現する糖輸送体の局在および機能の解析
○小屋松 大輝[1]，大坪 雅[1]，増子(鈴木) 潤美[2]，渡辺 正夫[2]，稲葉 丈人[1]，稲葉 靖子[1,2]　([1]宮崎大・農，[2]東北大院・生命科学)

4J02-08　ソテツ球果の熱生産における脱共役タンパク質 UCP5 の役割に関する研究
○横田 圭馬，大畠 瑞希，稲葉 丈人，稲葉 靖子　(宮崎大学農学部)

4J02-09　ゼニゴケグルタミン合成酵素(GS)の細胞内局在性と光呼吸との関係の解明
○上田代 宙，和田 慎也，三宅 親弘　(神大農)

4J02-10　シアノバクテリア *Nostoc* sp. PCC7120 における RuBisCO activase-like protein の機能の解析
○林 悠介[1]，得平 茂樹[2]，蘆田 弘樹[1]　([1]神戸大院・人間発達環境，[2]都立大院・理)

ミーティングルーム J　質疑応答コアタイム 10:30～11:00

植物―一次代謝，二次代謝，メタボローム / タンパク質，酵素 - 機能，調節

4J04-01　植物のフェノール基質プレニル化酵素の部位特異性を担うアミノ酸残基の同定
○韓 俊文[1]，棟方 涼介[1]，高橋 宏暢[2]，肥塚 崇男[3]，Alain HEHN[4]，矢崎 一史[1]　([1]京大・生存研，[2]徳島文理大・薬，[3]山口大院・創成科学，[4]仏　ロレーヌ大/INRA)

4J04-02　植物細胞壁ペクチン RG-I: アラビノース転移酵素の活性検出
○大山 菜緒，森井 裕子，石水 毅　(立命館大・生命)

4J04-03　ホスホン酸エステル化合物類の GDSL リパーゼ TcGLIP および除虫菊でのピレスリン生合成阻害活性
○杉坂 如水[1]，青山 詩織[1]，伊原 誠[1]，松尾 憲忠[2]，田辺 陽[2]，松田 一彦[1]　([1]近大農，[2]関学大理工)

4J04-04　セロリ由来フラボノイド配糖体アピイン生合成アピオース転移酵素の同定と基質認識
○山下 真穂[1]，藤森 多恵[1]，An Song[1]，竹中 悠人[1]，小林 優[2]，石水 毅[1]　([1]立命館大・生命，[2]京大・院農)

4J04-05　シコニン／アルカニン生合成経路で働くデオキシシコニン水酸化酵素の機能解析
○大塚 峻[1]，市野 琢爾[2]，吉村 和貴[1]，李 豪[2]，山本 浩文[3]，矢崎 一史[2]，高梨 功次郎[1,4]　([1]信州大院・総合理工，[2]京都大・生存研，[3]東洋大・生命科学，[4]信州大・理)

4J04-06　ブロッコリー由来 S- セラニル化 NAD 依存グリセルアルデヒド -3- リン酸デヒドロゲナーゼの酵素学的性質
○小嵜 光夏[1]，中谷 美有[2]，大沼 貴之[1,2,3]，武田 徹[1,2]　([1]近大院農，[2]近大農，[3]近大アグリ研)

4J04-07　無細胞翻訳系を利用した完全長 Myb 様イネ転写因子の調製と機能解析
○黒田 隆司[1]，高荷 幸恵[1]，川岸 万紀子[2]，戸澤 譲[1]　([1]埼玉大院理工，[2]農研機構・生物機能部門)

4J04-08　天然ゴム生合成マシナリーのコアサブユニットの解析
○黒岩 風[1]，西野 輝[1]，本澤 正隆[1]，廣森 美樹[2]，モンドル 慶子[1]，山口 晴彦[3]，宮城 ゆき乃[3]，山下 哲[4]，高橋 征司[2]，戸澤 譲[1]　([1]埼玉大院理工，[2]東北大院工，[3]住友ゴム工業(株)，[4]金沢大理工)

4J04-09　紅藻類クビレオゴノリ由来ヘマグルチニンの分画法の改良
○緑川 英里香，黒須 泰行，本間 悠里，垣田 浩孝　(日大院・総合基)

4J04-10　トマト由来ネリル二リン酸合成酵素 NDPS1 の X 線結晶構造解析
○今泉 璃城[1]，三沢 柊人[1]，竹下 浩平[2]，坂井 直樹[2]，山口 晴彦[3]，宮城 ゆき乃[3]，片岡 邦重[1]，中山 享[4]，高橋 征司[4]，山下 哲[1]　([1]金沢大・院・自然科学，[2]理研・SPring-8センター，[3]住友ゴム工業(株)，[4]東北大・院・工)

講演番号：2A01-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

IAA 生産分離菌との共培養による微細藻類増殖促進効果の評価

Evaluation of the effect of promoting the growth of microalgae by co-culturing with IAA-producing isolates

○TAN Pei-Yu[1]、石田 奨[1]、加藤 勇太[1,2]、邱 泰瑛[1]、小西 正朗[1] ([1]北見工大院、[2]環境大善株式会社)
○Pei-Yu TAN[1], Masashi ISHIDA[1], Yuta KATO[1,2], Tai-Ying CHIOU[1], Masaaki KONISHI[1] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]Kankyo Daizen Co. Ltd.)

インドール-3-酢酸（Indole-3-acetic acid, IAA）生産菌は微細藻類増殖促進効果を持つと報告されている。本研究では、IAA 生産菌含有可能性の高い牛の尿を微生物で処理した発酵液（Fermented Cattle Urine, FCU）から分離し、共培養による微細藻類の増殖促進効果を検証した。FCU から 3 つの培地（JCM520 培地、Ormerod 培地、FCU（in situ）培地）を用いて、計 144 株を好気的に分離し、Salkowski 法により IAA 生産量を測定した。分離菌の IAA 生産量は 0.3 ± 0.2 μg/mL - 76.8 ± 11.4 μg/mL の範囲であった。次に、ラン藻のモデル生物である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と分離株を共培した。AF2108 株と GA1226 株は、*Syn. elongatus* PCC 7942 由来のクロロフィル量を大幅に増加させた。AF2108 株と GA1226 株の IAA 生産量は、それぞれ 8.8 ± 6.1 μg/mL と 3.7 ± 1.1 μg/mL であり、高い IAA 生産性を示した OR171 株（76.8 ± 11.4 μg/mL）の 1/10 と 1/20 程度であった。これらの結果から、共培養でのラン藻の成長促進は IAA 以外の因子で引き起こされたと思われた。

Indole-3-acetic acid (IAA)-producing bacteria have been reported to have a microalgae growth-promoting effect. In this study, the bacteria with high possibility of IAA-producing ability were isolated from fermented cattle urine (FCU), and the effect of growth promotion was verified by co-cultivation with microalgae. A total of 144 strains were aerobically isolated from the FCU using 3 mediums (JCM520 medium, Ormerod medium, FCU (in situ) medium), and the IAA production was estimated by the Salkowski method. The IAA production of the isolates was in the range of 0.3 ± 0.2 μg/mL - 76.8 ± 11.4 μg/mL. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 was used as the model organism of microalgae for the co-cultivation experiment with the isolates. As the result, AF2108 strain and GA1226 strain showed significantly increased amounts of chlorophyll derived from *Synechococcus elongatus* PCC 7942. In terms of IAA production, AF2108 strain and GA1226 strain were 8.8 ± 6.1 μg/mL and 3.7 ± 1.1 μg/mL, respectively, and the values were respectively approximately 1/10 and 1/20 to that of the OR171 strain which showed high IAA productivity (76.8 ± 11.4 μg/mL). According to the results, it was suggested that in addition to IAA there may be other cyanobacteria growth-promoting factors involved in the co-cultivation system.

IAA-producing bacteria, Cyanobacteria, Co-culture

発表責任者：小西正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2A01-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化装置から分離された易分解性有機物分解抑制細菌が他の分離株と汚水浄化装置内微生物叢に与える影響の解析

Analyses of the effects of bacteria that suppress the decomposition of easily decomposable organic matter on other isolates and the microbial flora in the lab-scale circulating wastewater treatment system

○石田 望、鈴木 智順 (東理大・応生)
○Nozomi ISHIDA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

汚水浄化における微生物叢の実態についてはほとんど明らかにされておらず、浄化槽内の微生物叢の制御には、経験に則った知識が用いられているのが現状である。以前の研究で、当研究室で運用している循環型汚水浄化槽から分離された細菌 41 株のうち、6 株それぞれを分離株で構成された複合細菌系に添加すると、易分解性有機物(EDO)の分解を有意に減少させることが明らかとなっている。そこで本研究では、EDO 分解に抑制的に働いているこれらの細菌株(EDODSB)が浄化槽分離株、さらには浄化槽由来のミクロ生態系に対し、どのようにして浄化能を落としているのかを明らかにすることで、微生物生態学の基礎的知見を収集し、より効率的に EDO が分解できる汚水処理能力の高い浄化槽の構築を目的とした。

EDODSB が他の微生物の生育を抑制する抗生物質を生産することの確認を行い、産生する抗生物質が浄化槽内のどの微生物に作用するかを全分離株に対して解析し、実際の浄化槽の運転を想定したミクロ微生物生態系内での挙動と比較解析した。また、抗生物質産生 EDODSB 株の系統解析を行った。その結果、*Paenalcaligenes hominis* や *Lysinibacillus fusiformis* と極めて近縁な EDODSB が抗生物質を産生することが示唆された。これら細菌種が抗生物質を産生することは新たな知見となり得る。また、*P. hominis* と極めて近縁な EDODSB はミクロ生態系内で、他の微生物の抗菌活性を相乗して高める働きをしていることが示唆された。

In our previous study, strains that significantly reduced the decomposition of easily decomposable organic matter (EDO) were isolated from the lab-scale wastewater treatment system. It has been clarified that these isolates significantly reduce EOD decomposition when added to the mixed culture system composed of isolates from our treatment system. In this study, we analyzed the mechanism by which EDO degradation suppressively acts.

Antibiotic tests against our treatment system-derived microbial suspension were performed. It was suggested that EDODSBs, which are closely related to *Paenalcaligenes hominis* and *Lysinibacillus fusiformis*, produced antibiotics and it could be new findings these species produce antibiotics. It was also suggested that EDODSB, which is closely related to *P. hominis* synergistically enhances the antibacterial activity of other microbes in the mixed culture system composed of isolates from our treatment system.

wastewater, antibiotic, easily decomposable organic matter

講演番号：2A01-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽から分離された難培養細菌が生育に必要とする物質の構造決定

Structure determination of the metabolites required for the growth of uncultivable bacteria isolated from circulating sewage septic tanks.

○鍵山 貴大、鈴木 智順（東理大・応生）
○Takahiro KAGIYAMA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

当研究室で運用しているラボスケール循環型汚水浄化槽内から、他の微生物（ヘルパー細菌）が生産する代謝産物を生育に必要とする難培養細菌（代謝産物要求細菌）が分離されている。本研究の目的は上記生育に必要とする代謝産物（生育物質）の特定である。本研究では、ヘルパー細菌株（*Lysinibacillus sphaericus* と 16S rDNA 相同値が 99.6%）と、代謝産物要求細菌株（*Alcanivorax pacificus* と 96.6%）を使用した。生育物質を特定するため、分離精製および化学的特性評価を行なった。

まず、ヘルパー細菌の培養液に対して分液操作を行なった。そして、生育物質が含まれる水層サンプルを順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、分取 TLC で分離精製した。純度を確認後、質量分析測定、NMR 測定を行なった。その結果、目的物質はケルセチンに糖鎖が結合している配糖体と推測された。これはヘルパー細菌株がアグリコンであるケルセチンを合成し、グリコシル化を行い、配糖体を形成していると考えられる。糖鎖の解析結果も含めて発表する予定である。

Uncultivable bacteria (metabolite-requiring bacteria) that require metabolites produced by other microorganisms (helper bacteria) for growth have been isolated from our lab-scale circulating wastewater treatment system. The purpose of this study is to identify the metabolites (growth substances). We used the helper bacterial strain (99.6% 16S rDNA similarity to *Lysinibacillus sphaericus*) and the metabolite-requiring bacterial strain (96.6% to *Alcanivorax pacificus*). The separation, purification, and chemical property were performed to identify the growing substance.

First, the bacterial culture of the helper bacterium was separated organic layer and aqueous layer. And then, The aqueous layer containing growth substances was separated and purified by normal phase chromatography, reverse phase chromatography, and preparative TLC. After confirming the purity, the structure of the growing substance was determined by MS and NMR. As a result, it was speculated that the target substance was a glycoside in which a sugar chain was bound to quercetin. It is considered that the helper bacteria synthesize quercetin as an aglycone and form a glycoside. We will also report the results of the sugar chain analysis.

Metabolite, uncultivable bacteria, Wastewater treatment

講演番号：2A01-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

汚水浄化に関与するマイクロバイオームに添加したアミノ酸が与える影響の解析

Analysis of the effects of amino acids added on microbiome-related to wastewater treatment

○野口 滉矢、鈴木 智順（東理大・応生）
○HIROYA NOGUCHI, TOMONORI SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

下水は種々の微生物による生物学的処理などにより浄化されている。汚水中には様々な成分が含まれているが、その中の一つにアミノ酸がある。一般的に、アミノ酸は微生物の主要な栄養源であり、代謝上重要な物質である。しかし、汚水浄化に関与する微生物にアミノ酸がどのような影響を与え、そして浄化能にどの様に反映されるかはあまり知られていない。そこで本研究では、小スケールで好気的な汚水浄化環境（ミクロ生態系）を再現し、ここへ任意のアミノ酸を様々な濃度で添加する事により、アミノ酸が微生物や浄化能に与える影響を検討し、基礎的な知見を収集する事を目的とした。

今回は代謝上特に重要なアミノ酸である Glu と Gln の影響を検討した。まず、窒素同化に関与する酵素の活性測定を行なった。その結果、control と比較してアミノ酸添加条件では GDH 活性が上昇した。つまり、窒素同化が促進されたと考えられる。さらに、経時的に細胞外プロテアーゼの活性測定を行なった。その結果、control と比較してアミノ酸添加条件では細胞外プロテアーゼ活性が有意的に増大した。つまり、タンパク質分解系が促進されたと考えられる。さらに、窒素同化とタンパク質分解系の相互作用の考察やこれに基づく検証実験の結果についても発表する予定である。

Wastewater is purified by biological treatment with microbes and contains various components, one of which is an amino acid. In general, amino acids are the main nutrients for microbes and play an important role in metabolism. However, it is known little how amino acids affect microbes related to wastewater treatment and how this effect reflects the ability of wastewater treatment. So, we replicated the environment of aerobic wastewater treatment at flask scale, added amino acid at several concentrations to the flask, and examined the impact of amino acid to microbes related to wastewater treatment and the change of the ability of wastewater treatment.

In this study, Glutamate (Glu) and glutamine (Gln), which are metabolically important amino acids, were added. First, we examined nitrogen assimilation. The addition of amino acids increased GDH activity. It is considered that nitrogen assimilation is promoted. Next, we examined extracellular protease activity. The addition of amino acids increased protease activity. It is considered that the degradation of protein is promoted. We will also report the results on the interaction between nitrogen assimilation and the degradation of the protein.

wastewater treatment, amino acid, metabolism

講演番号：2A01-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽由来セルロース分解微生物の機能解析

Functional analysis of cellulolytic microorganisms isolated from lab-scale circulating wastewater treatment system

○下村 和正、鈴木 智順（東理大・応生）
○Kazumasa Shimomura, Tomonori Suzuki (Tokyo Univ. of Science)

当研究室では、ラボスケールの循環型汚水浄化槽に生活排水を模した人工汚水を循環させ、そこで働く浄化に関わる微生物の生態学的な解析を行っている。生活排水にはセルロース成分が含まれているが、循環型汚水浄化槽のセルロース分解に関わる微生物については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、セルロース分解微生物に焦点をしぼり、セルロース分解微生物の生態学的な解析を行うことで、効率的な浄化槽の開発を目指した。

まず、浄化槽内の微生物に対してセルロース分解能の選抜を行った結果、特に高い活性を持っていたのは、真菌 MN4 株、細菌 JS20h 株であった。また、JS20h 株は *Bacillus subtilis* と 16S rRNA 遺伝子の相似値が 100％であった。上記2株を用い、それぞれのセルラーゼの至適条件、熱耐性、セルロース分解の促進効果、アロステリック抑制などの検討を行い、効率的な浄化槽の開発に有益な情報を得ることができた。

また、浄化槽内のセルロース分解微生物の動態解析を行い、セルロース成分の浄化槽内での分解過程の調査などを行った結果も併せて報告する予定である。

以上の実験結果より、本研究の目的である効率的な浄化槽の開発に繋げるための改善情報を得ることができたと考えられる。

In our laboratory, the lab-scale circulating wastewater treatment system is operated to analyze the ecological function of microorganisms involved in purification. The wastewater contains cellulose, but the microorganisms involved in cellulose degradation in the system have not been clarified. Therefore, we focused on cellulolytic microorganisms in the lab-scale circulating wastewater treatment system, analyzed them ecologically, and conducted this research to develop an efficient wastewater treatment system.

Bacterial strain JS20h and fungal strain MN4 with high cellulose-degrading ability were isolated from the wastewater treatment system. Strain JS20h has been revealed phylogenetically closely related to *Bacillus subtilis*. We researched optimal conditions, the heat resistance, the promotion effect, and allosteric suppression for each cellulase which two strains produced.

We will also report on the results of the dynamic analysis of cellulolytic microorganisms in the wastewater treatment system.

In conclusion, we achieved the improvement information to develop an efficient wastewater treatment system.

cellulose degradation, lab-scale circulating wastewater treatment system, Bacillus subtilis

発表責任者：下村和正（kazu.volleyball.amazarashi@gmail.com）

講演番号：2A01-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

高塩濃度水産発酵物由来希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. TUA-HKG02Y 株の微生物学的特徴と二次代謝生合成遺伝子の比較

Microbiological characteristics of the marine-derived rare actinomycetes, *Amycolatopsis* sp. strain TUA-HKG02Y, isolated from high-salt fermented fish gravy, and comparative analysis of the secondary metabolite gene clusters.

○鈴木 敏弘[1]、篠田 佳那[2]、松谷 峰之介[3]、長田 隆弘[4]、荒川 賢治[5]、石川 森夫[1]([1]東農大・醸造、[2]東農大院・醸造、[3]東農大・NGRC、[4]長田商店、[5]広大院・統合生命)
○Toshihiro Suzuki[1], Kana Shinoda[2], Minenosuke Matsutani[3], Takahiro Osada[4], Kenji Arakawa[5], Morio Ishikawa[1] ([1]Ferment. Sci. and Tech. Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]NGRC., Tokyo Univ. Agric., [4]Osada Shouten, [5]Integ. Sci. life., Hiroshima Univ.)

【研究目的】海洋由来放線菌は構造や作用がユニークな二次代謝産物を生産することから、近年新規創薬の観点において注目されている。我々は、海洋由来放線菌の特徴と生産する二次代謝産物について調べるために、高塩濃度水産発酵物を分離源として様々な海洋由来放線菌を分離し、希少放線菌を含むいくつかの放線菌の分離に成功している。本研究では、塩分濃度約 10%の八丈島産「くさや汁」から分離された希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. TUA-HKG02Y の微生物学的特徴を明らかにすると共に、全ゲノム配列決定による比較ゲノム解析により本菌株の二次代謝生合成遺伝子の多様性を比較した。
【方法・結果・考察】希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. TUA-HKG02Y 株の微生物学的特徴を明らかにするために、各濃度の NaCl 存在下での生育を調べたところ、他の *Amycolatopsis* 属と比較して高い塩濃度耐性を有しており 12%の NaCl 存在下でも良好に生育した。また、キノン組成や生育温度なども近縁種と比較して異なっていた。本菌の生産する二次代謝産物と抗菌活性を調べるために、培養抽出物を用いてバイオアッセイを行った結果、*Bacillus* 属などのグラム陽性細菌に対して特異的に活性を示す物質を生産していることが分かった。これら微生物学的特徴と二次代謝生合成について遺伝子レベルで調べるために全ゲノム塩基配列決定を行ったところ、9.74Mb の環状染色体上に塩耐性に関与する遺伝子が複数コードされていた事に加えて、28 個の二次代謝生合成遺伝子クラスターがコードされており Macrotermycin 生合成遺伝子クラスターに類似した配列が存在していた。本発表では、本菌株の微生物学的特徴に加えてゲノム配列を用いた近縁種との比較ゲノム解析についても報告する。

Marine-derived actinomycetes produce new secondary metabolites. To investigate the microbiological characteristics and secondary metabolites, we isolated the rare-actinomycetes *Amycolatopsis* sp. TUA-HKG02Y from Kusaya gravy used for manufacturing Kusaya, a Japanese traditional fermented fish product.

Strain TUA-HKG02Y shows a high salinity tolerance and was able to grow under the presence of 12% NaCl compared to other *Amycolatopsis* strains. In addition, the quinone composition and growth temperature were also different from those of related species. Strain TUA-HKG02Y produced antibiotics that shows anti-microbial activity against gram-positive bacteria. The complete genome sequence analysis revealed that strain TUA-HKG02Y possesses 28 secondary metabolite gene clusters containing Macrotermycin biosynthetic gene cluster and various salt tolerance genes on the chromosome. In this presentation, we will report the bacterial characteristics of TUA-HKG02Y and comparative genome to other related species of genus *Amycolatopsis*.

Amycolatopsis, marine Actinomycetes, Secondary metabolism

発表責任者：鈴木敏弘（ts206188@nodai.ac.jp）

講演番号：2A01-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

比較ゲノムによる *Cutaneotrichosporon cavernicola* の交配型遺伝子座の解析

Analysis of mating-type loci of *Cutaneotrichosporon cavernicola* strains by comparative genomics

○栢森 綺音[1]、青木 敬太[2]、志波 優[1]、藤田 信之[1]、杉田 隆[3]、高島 昌子[2]、田中 尚人[1]([1]東農大・微生物、[2]東農大・酵母、[3]明治薬科大・微生物)
○ Ayane KAYAMORI[1], Keita AOKI[2], Yuh SHIWA[1], Nobuyuki FUJITA[1], Takashi SUGITA[3], Masako TAKASHIMA[2], Naoto TANAKA[1] ([1]Tokyo Univ. Agr., Microbiol., [2]Tokyo Univ. Agr., Yeast, [3]Meiji Pharm. Univ., Microbiol.)

高等菌類に属する酵母ではアナモルフ（無性時代）とテレオモルフ（有性時代）があることが知られているが、一方、酵母の既知種の半数以上はテレオモルフが報告されていない。担子菌門ハラタケ亜門に属する Trichosporonales 目の酵母もその 1 つであるが、近年ゲノム解析された種のデータから交配型遺伝子座の存在が報告された。我々は本目の *Cutaneotrichosporon* 属に見られる多様な性質の要因の一つが交配現象の有無にあると推定し、本属の中で日本の洞窟から分離された *C. cavernicola* の性状の異なる 6 株についてゲノムおよび RNA-Seq 解析を行い、本種の交配現象について新たな知見を得ることを本研究の目的とした。

シークエンシング後、アセンブリとアノテーションを行い、株間の交配型遺伝子領域の比較解析を行った。その結果、5 株のゲノムは約 20Mb である一方、残りの 1 株のゲノムは約 40Mb と大きくヘテロザイガスゲノムと推定された。全株とも交配型遺伝子座の存在が確認され、本種の株は交配の可能性が考えられた。また交配型遺伝子領域から近縁種である *C. oleaginosum* のフェロモンペプチドやフェロモンレセプターと類似度の高い配列が 2 種類ずつ得られた。ヘテロザイガスゲノムと推定された株ではこの両方の配列を有していた。今後は交配型遺伝子領域を詳細に解析するとともに、交配型の異なる菌株同士による交配実験を行う予定である。

While *Cutaneotrichosporon* species (Trichosporonales, Basidiomycota) is asexual yeast species (anamorph), mating-type loci have been identified from genome analyzed strains. To study intra- and inter-species diversity within the genus, we performed the draft genome and RNA-seq analyses of six *C. cavernicola* strains, followed by comparative genome analyses of mating-type loci of these strains. The genomic sizes for five strains were ca. 20 Mb; and that of remaining one was ca. 40 Mb and estimated to be heterozygous genome. Mating-type loci were found in all *C. cavernicola* genomes. Two types of pheromone peptides and receptors that showed high similarity with those in *C. oleaginosum,* which is phylogenetically close to *C. cavernicola,* were also detected. In addition, both types of peptides and receptors were found in the heterozygous genome strain. Assuming that *C. cavernicola* strains could have ability to cross each other, we are planning to perform mating experiments among these *C. cavernicola* strains after detailed informatic analysis.

Mating-type locus, Cutaneotrichosporon, Comparative genomics

発表責任者：栢森 綺音（12221019@nodai.ac.jp）

講演番号：2A01-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

環境試料へのシデロフォア添加によるバイオフィルム形成および構成菌種の特性
Characterization of biofilm formation and constituent bacterial species by addition of siderophores to environmental samples

○久富 敦[1]、志波 優[2]、藤田 信之[2]、田中 尚人[1,2] ([1]東農大環境共生、[2]東農大微生物)
○Atsushi Hisatomi[1], Yuh Siwa[2], Nobuyuki Fujita[2], Naoto Tanaka[1,2] ([1]Tokyo Univ of Agriculture Ecological Symbiotic Science, [2]Tokyo Univ of Agriculture Molecular Microbiology)

シデロフォアは植物や微生物が鉄を必要とする際に産生する鉄キレート化合物である。その構造は多岐にわたり、鉄と錯体を形成してその構造特異的なレセプターを有する生物にのみ取り込まれる。特に、細菌ではシデロフォアの産生や取り込みがバイオフィルム形成と連動している。バイオフィルムは菌体や多糖などからなる高次構造体で高密度に特定の細菌が固定化される。よって、細菌の生育に十分な鉄が存在しない環境にシデロフォアを添加することで、そのシデロフォアを利用する特定の菌種の生育およびバイオフィルム形成を促進させる可能性がある。そこで、本研究では環境サンプルにシデロフォアを添加し、バイオフィルム形成やその構成菌種の特性を検討した。本研究ではシデロフォアである 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) を使用した。土壌と水試料に DHBS を添加したところ、両試料共にバイオフィルム形成が促進された。そのバイオフィルムからは無添加条件時とは異なる菌種が分離され、DHBS が選択圧となる可能性が考えられた。また、バイオフィルムの構成株は DHBS を利用するとともに強くバイオフィルム形成が促進される株であることが明らかとなった。

Siderophores are iron chelating compounds produced by plants and microorganisms that require iron. They have a wide variety of structures and are taken up only by organisms that form complexes with iron and have receptors specific to that structure. In particular in bacteria, the production and uptake of siderophores is linked to biofilm formation. Biofilm is composed of bacteria and polysaccharides, and bacteria are immobilized in high density. Therefore, the addition of siderophores to where there is not enough iron for bacterial growth may promote the growth and biofilm formation of specific bacterial species that utilize the siderophores. In this study, we added siderophores to environmental samples to investigate the characteristics of biofilm formation and its constituent fungal species. In this study, 2,3-dihydroxybenzoyl-L-serine (DHBS) was used as a siderophore. When DHBS was added to soil and water samples, biofilm formation was enhanced in both conditions. Bacterial species different from those in the culture supernatant were isolated from the biofilms, suggesting that DHBS may act as a selective pressure. The biofilm constituent strains were found to be those that utilize DHBS and promote biofilm formation.

Siderophore, Biofilm, Isolation

発表責任者：久富 敦（isuta444@gmail.com）

講演番号：2A01-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

新奇 *Aminobacter* 属細菌におけるトリメチルセレノニウム資化経路の同定
Identification of trimethylselenonium assimilation pathway in novel *Aminobacter* spp.
○寺部 千夏[1]、越智 杏奈[1]、井上 真男[1,2]、田中 麻衣[1]、青野 陸[1]、北山 香織[3]、栗原 達夫[3]、佐藤 総一[4]、小椋 康光[5]、三原 久明[1]([1]立命大生命、[2]立命大 R-GIRO、[3]京大化研、[4]東京都立大理、[5]千葉大薬)
○Chinatsu Terabe[1], Anna Ochi[1], Masao Inoue[1,2], Mai Tanaka[1], Riku Aono[1], Kaori Kitayama[3], Tatsuo Kurihara[3], Soichi Sato[4], Yasumitsu Ogra[5], Hisaaki Mihara[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Tokyo Metropolitan Univ., [5]Chiba Univ.)

セレンはヒトを含む哺乳類の必須微量元素であるが、過剰なセレンは毒性を示すため、毒性の低いトリメチルセレノニウムイオン (TMSe) やセレン糖の形で尿中に排出される。環境中に排出された TMSe は、土壌細菌の働きによりジメチルセレニド (DMSe) に分解され大気中に放出されると予想されていたが、関与する細菌種や酵素遺伝子は不明であった。我々は、立命館大学構内の土壌中より、TMSe を唯一の炭素源として生育する TMSe 資化性菌 2 株の単離に成功している。そこで本研究では、本 2 菌株の解析を通して、土壌細菌による TMSe 資化経路と遺伝子群の同定を試みた。

まず、本 2 菌株の完全長ゲノムを構築し、ゲノム相同性比較と系統解析を行ったところ、本 2 菌株はメチロトロフである *Aminobacter* 属の新種であることが分かった。次に、TMSe を単一炭素源とした培地で本菌を培養し、TMSe によって誘導されるタンパク質の N 末端配列を決定した結果、テトラヒドロ葉酸結合モチーフをもつ機能未知メチル基転移酵素が同定された。本酵素遺伝子は、C1 化合物資化経路に繋がるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素、2 つの転写因子、膜輸送体をコードする 4 つの遺伝子と遺伝子クラスターを形成しており、*Aminobacter* 属を含む複数のメチロトロフに散在していたが、TMSe 資化能を持たない *Aminobacter* 属細菌には見られなかった。そこで、TMSe 資化能を持たない *Aminobacter* 属細菌にこれらの遺伝子群を導入し、その性状を調べた結果、2 つの転写因子がメチル基転移酵素の発現誘導に、他の 3 つの遺伝子は TMSe の資化に必須であることが明らかになった。以上の結果から、土壌細菌の TMSe 資化能は C1 化合物資化経路と共役する本遺伝子クラスターの獲得によって付与されることが示唆された。

Trimethylselenonium ion (TMSe) released into the environment via animal urine may be degraded into dimethylselenide by soil microorganisms to be released into the atmosphere. However, microorganisms or genes responsible for this process are unknown. Here, for the first time, we identified a gene cassette for TMSe assimilation in two bacterial strains by genomic and cultivation studies. The strains were classified into novel species of the genus *Aminobacter*, a member of methylotrophs. TMSe drastically induced the expression of a novel tetrahydrofolate-dependent methyltransferase, whose gene forms a gene cluster with four C1 assimilation-related genes. Moreover, these genes were essential for the utilization of TMSe or for the induction of the methyltransferase expression, suggesting that the gene cassette confers TMSe assimilation on the strains.

selenium, methylotroph, tetrahydrofolate

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2A01-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

Saccharomyces pastorianus の偽菌糸生育能の解析
Analysis of pseudohyphal growth ability of *Saccharomyces pastorianus*
○宮澤 紘輔[1,2]、高橋 朋子[1,2,3]、加藤 拓[3]、只見 秀代[3]、永富 康司[3]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2]、野田 陽一[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ（株））
○Kousuke MIYAZAWA[1,2], Tomoko TAKAHASHI[1,2,3], Taku KATO[3], Hideyo TADAMI[3], Yasushi NAGATOMI[3], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Yoichi NODA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, Dept. of Biotech., UTokyo, [3]Asahi Quality & Innovations, Ltd.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には 2 倍体において窒素飢餓で偽菌糸生育する系統が存在し、その 1 倍体は寒天培地に侵食するような生育をすることが知られている。ラガー酵母 *Saccharomyces pastorianus* は *S. cerevisiae* と耐寒性酵母 *Saccharomyces eubayanus* のサブゲノムをもつ異質倍数体かつ異数体であり、染色体の構造が変化しやすいという性質を示す。*S. pastorianus* の表現型に異質倍数性と異数性がどう関与しているか知見を深めるため、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* のゲノムを合わせ持つ異数体のハイブリッド酵母を random spore 法により作製したところ、偽菌糸生育するものが一定数得られることを見出した。しかしながら、*S. pastorianus* や *S. eubayanus* の偽菌糸生育や寒天培地へ浸食するような生育とその条件については未解明な点が多い。そこで、これらの酵母の窒素飢餓培地での偽菌糸生育や YPD 寒天培地への侵食について調べたところ、*S. pastorianus* や *S. eubayanus* は *S. cerevisiae* とは異なり窒素飢餓培地では偽菌糸生育しなかった。一方で、どちらの酵母でも YPD 培地における低温・2 週間の培養により偽菌糸生育と寒天培地への侵食が見出された。さらに、*S. cerevisiae* の偽菌糸生育を促進するオートインデューサーであるトリプトフォールやフェネチルアルコールはこれらの酵母の偽菌糸生育を促進しないことも見出された。

Some strains of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* have the ability to form pseudohyphae in the diploid strains, while the haploid strains show invasive growth into the agar medium. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* is allopolyploid with subgenomes from *S. cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus*, which is a cold-tolerant yeast, and shows aneuploidy with a variable number of chromosomes. In order to learn more about how allopolyploidy and aneuploidy contribute to the phenotypes of *S. pastorianus*, we generated aneuploid hybrid yeasts with both *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* genomes by random spore analysis. We found that some of them showed pseudohyphal growth. To reveal more about pseudohyphal growth and invasive growth of *S. pastorianus* and *S. eubayanus*, we searched the conditions to induce pseudohyphal growth and invasive growth. We found that they did not show pseudohyphal growth upon nitrogen starvation, whereas YPD cultures under low temperature for two weeks induced pseudohyphal growth and invasive growth. We also found that the pseudohyphal growth of these yeasts were not stimulated by the autoinducers which stimulate that of *S. cerevisiae*.

Saccharomyces pastorianus, *Saccharomyces eubayanus*, pseudohyphal growth

発表責任者：宮澤紘輔（miyasanazabu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A01-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム A

オオムギ根内生微生物の同定と役割の解明

Identification and characterization of endophytic microorganisms in barley root

○木代 勝元[1]、最相 大輔[1]、山下 純[1]、山地 直樹[1]、山本 敏央[1]、門田 有希[2]、持田 恵一[3]、中川 智行[4]、谷 明生[1]([1]岡大植物研、[2]岡大環境生命、[3]理研 CSRS、[4]岐阜大応生)
○ Katsumoto KISHIRO[1], Daisuke SAISHO[1], Jun YAMASHITA[1], Naoki YAMAJI[1], Toshio YAMAMOTO[1], Yuki MONDEN[2], Keiichi MOCHIDA[3], Tomoyuki NAKAGAWA[4], Akio TANI[1] ([1]IPSR, Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [3]CSRS, RIKEN, [4]Fac. Appl. Biol. Sci. Gifu Univ.)

作物の生産性は多様な環境要因に影響され、その一つとして植物を取り巻く微生物叢はとりわけ重要である。本研究所では 2017 年からイネ・オオムギ二毛作での根圏微生物叢を解析しており、オオムギの根には *Janthinobacterium* 属細菌と *Methylibium* 属細菌が内生菌として優占していることが分かった。本研究では、オオムギから微生物を網羅的に分離しそれらのオオムギ生育における役割を解明することを目的とした。オオムギ根、稈、葉から約 100 株の分離菌を同定したところ、23 属 37 種の細菌を得た。同定結果から、*Methylibium* 属細菌は分離することができなかったが、根から *Rugamonas* 属細菌が分離された。デジタル DNA-DNA 交雑法、ANI 値、並びに *Rugamonas* 属細菌基準株との性質の比較の解析から、分離菌は新種であることが分かった。これら分離株の 16S rRNA 遺伝子配列は、アンプリコンシーケンス解析で *Janthinobacterium* 属細菌として検出されたものとほぼ一致したため、内生菌として優占化しているのは *Rugamonas* 属細菌であることが示唆された。そして、この *Rugamonas* 属細菌のうち、系統的に異なる 3 株（R1 株、R57 株、R64 株）を選び、それらの様々な性質を調べた。

Crop productivity is influenced by a variety of environmental factors, and the microbiota surrounding plants is particularly important. In our institute, the rhizosphere microbiota of rice and barley under double cropping has been analyzed throughout the year since 2017. We found that *Janthinobacterium* and *Methylibium* were predominant endophytic bacteria in barley roots. In this study, we aimed to understand the function of the microorganisms from barley. We isolated about 100 strains from different tissues of the barley. The isolates belonged to 23 genera and 37 species. We could not isolate *Methylibium* species. Instead, many isolates of *Rugamonas* species were obtained from the root. Analysis of the digital DNA-DNA hybridization, ANI values, and comparison of the properties with those of the reference strain of *Rugamonas* suggested that the isolates were novel species. The 16S rRNA gene sequences of the isolates were almost identical to the sequences detected as *Janthinobacterium* by amplicon sequencing analysis, indicating that *Rugamonas* species was predominant endophytic bacteria. Then, we selected three phylogenetically different strains (R1, R57, and R64) of *Rugamonas* and examined their various properties.

barley, endophytes, microbiome

講演番号：2A03-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

日光社寺文化財に発生する変色部位と周辺環境の網羅的真菌叢解析
Comprehensive fungal flora analysis of discolored parts occurring in cultural properties of the Nikko Toshogu shrine and their surrounding environments

○大島 祥[1]、須崎 裕人[1]、小笠原 麻衣[1]、三浦 菜摘[1]、鈴木 孝宗[2]、寺島 千晶[2]、藤島 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生、[2]東理大総研)
○Joe OSHIMA[1], Yuto SUZAKI[1], Mai OGASAWARA[1], Natsumi MIURA[1], Norihiro SUZUKI[2], Chiaki TERASHIMA[2], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

日光東照宮文化財の多くには、漆が塗装されており、その上に膠や桐油を用いた彩色装飾が施されている。この彩色装飾などが真菌の栄養源となり、文化財表面に真菌が発生することで、その部分が変色して文化財保全上の問題となっている。そこで本研究では、文化財表面の真菌発生に対する将来的な防除試験の前段階として、文化財の変色部位および周辺環境の網羅的な真菌叢解析を行うことを目的とした。

これまでに培養法によって、真菌 65 株の系統解析が完了し、PDA 培地や M40Y 培地で分離した菌株の多くが *Penicilium* sp.および *Cladosporium* sp.に近縁な真菌であることが分かった。非培養法による解析では、難培養性真菌である *Baudoinia* sp.が多く検出され、全体の 40%ほどを占めていた。*Baudoinia* sp.はエタノールを唯一の炭素源とする真菌属である。従来の殺菌剤にはエタノールが含まれており、*Baudoinia* sp.の殺菌は難しいと考えられる。現在、この真菌の集積培養による分離を試みており、その結果も併せて発表予定である。

Most of the cultural properties of the Nikko Toshogu shrine are lacquer painted. Moreover, on the lacquer paint, colored decorations used glue and tung oil are attached. These decorations mainly cause fungal growth. Fungal colonies change the color of cultural properties, which is a serious problem from a cultural preservation point of view.

To comprehensively reveal fungal flora that appears on the surface of the cultural properties, we conducted phylogenetic analysis against isolates and environmental samples, a previous step of photocatalytic sterilization experiment against fungi generated on the surface of the cultural properties.

Most of the strains isolated on the PDA medium and the M40Y medium were closely related to *Penicillium* sp. *Cladosporium* sp. In the analysis by the non-culture method, genus *Baudoinia* which is a hardly culturable fungus was detected in large numbers, accounting for about 40% of the total. The sole carbon source of *Baudoinia* is ethanol. Conventional fungicides contain ethanol, and it is considered difficult to kill *Baudoinia* fungi. We are trying to isolate these fungi by enrichment culture, and the results will be also reported.

fungal flora, cultural purorerties, Baudoinia

講演番号：2A03-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

放線菌コロニーの色性状の数値化によるグルーピング化に関する研究

Studies on the grouping of actinomycete colonies by digitizing their color properties

○廣瀬 侑生[1]、山村 英樹[1]、中川 洋史[1]、小久保 晋[1]、早川 正幸[2] ([1]山梨大、[2]山梨県立大)
○Yuuki Hirose[1], Hideki Yamamura[1], Youji Nakagawa[1], Susumu Kokubo[1], Masayuki Hayakawa[2] ([1]Univ. Yamanashi, [2]Yamanasi Pref. Univ.)

放線菌は創薬資源微生物として知られており、現在も自然界から放線菌の分離が行われている。放線菌を分離する際、人間はコロニー形態や色性状に基づく肉眼観察によって類似コロニーを除き、出来るだけユニークなコロニーの取得を目指している。過去の創薬スクリーニングの経験談からは分離者による分離株の分類学的あるいは生産物の偏りがあることが言い伝えられている。これを機械による客観的な評価方法が確立でいれば、効率的な分離が実現でき、さらに分類学上の色彩性状の客観的な差別化が実現する事が期待される。そこで、本研究では、まず放線菌コロニーの色彩性状をデジタル化しグルーピングすることを目指した。

土壌から放線菌の選択分離培地に希釈平板を行い、2 週間 30℃で培養した。平板上に生育した放線菌コロニー42 個を高演色光源下で写真撮影を行った。各コロニーを ImageJ にて RGB 色空間で色の測定を行い、コロニーの色に基づくデンドログラムを作製した。その結果、放線菌コロニーは 6 つのグループに分けることができた。これら各グループについてグループを形成する特徴を見出すことができれば放線菌の分離指標として提案が可能であると考えられる。

Actinomycetes are well known to produce pharmaceutical agents. In the case of isolation of actinomycetes from nature, we aim to isolate unique colonies from other similar colony groups through naked eye based on colony morphology and color features. Past experience with drug screening tells us that there is a taxonomic or product bias of isolates by isolator. If we could establish a method to evaluate the color of actinomycete colonies using numerical information, it would enable efficient separation and objective differentiation of taxonomic coloration. In this study, we aimed to digitize the color characteristics of actinomycete colonies and group them.

The actinomycetes were selectively isolated from soil and incubated on diluted plates at 30°C for two weeks. Forty-two actinomycete colonies grown on the plates were photographed under a high color-rendering light source. The color of each colony was measured by ImageJ software digitized in RGB color space, and a dendrogram based on the color of the colony was created. As a result, the actinomycete colonies could be divided into six groups. If we can find the grouping characteristics of these groups, it will be possible to propose an isolation index for actinomycetes.

actinomycetes, digitizing, colony

講演番号：2A03-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

土粒子 1 個からの放線菌の分離

Isolation of actinomycetes from a soil particle

○林 大稀[1]、濱渦 亮子[2]、海田 枝里[3]、保坂 毅[1,2,3] ([1]信州大院・総合理工、[2]信州大・バイオメディカル研、[3]信州大・農)
○Daiki HAYASHI[1], Ryoko HAMAUZU[2], Eri KAIDA[3], Takeshi HOSAKA[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shinshu Univ., [2]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [3]Fac. of Agric. Shinshu Univ.)

極微量の土壌を放線菌用選択分離培地に供して培養すると、様々な種類の放線菌コロニーが現れる。本研究では、このことを活かして希少放線菌や未知種放線菌を効率的に分離できるか否かを検証した。

目開き 250 μm のふるいを通過した土粒子 1 個を 1 mL の YE 緩衝液に懸濁し、放線菌用選択分離培地に移した。30℃で 2 週間培養後、出現したコロニーを釣菌し、それらを 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき簡易同定した。なお、約 10 μg の土壌を用いた希釈平板法による検討を対照群とした。

土粒子 12 個から分離した総数 155 個のコロニーの内、36 個(23.2%)が希少放線菌であった。それらには 11 属の希少放線菌が含まれていた。一方、対照群における希少放線菌の分離効率は 8.7%であり、2 属のみの分離にとどまった。土粒子から希少放線菌を効率良く分離できることは、採取地点に依存せず、普遍的に見られることも分かってきた。興味深いことに、今回考案した手法により、既知種との相同性が低い放線菌を分離できることも明らかにした。以上の結果から、土粒子を用いて放線菌を分離する手法が、希少放線菌や未知種放線菌の効率的取得に有効である見通しを得た。

A wide variety of actinomycete colonies appear when a small quantity of soil is cultured on a selective isolation agar medium for actinomycetes. This study tested whether the method could isolate rare actinomycetes and unknown actinomycetes.

One soil particle that passed through a sieve with a 250 μm mesh opening was suspended in 1 mL of YE buffer and transferred to a selective isolation agar medium for actinomycetes. After two weeks of incubation at 30°C, the emerged colonies were picked and identified based on the 16S rRNA gene sequence. As a control group, the same experiment was conducted using equivalent to10 μg soil by dilution plate method.

Of the 155 colonies isolated from 12 soil particles, 36 (23.2%) were rare actinomycetes, including 11 genera of rare actinomycetes. On the other hand, the isolation efficiency of rare actinomycetes in the control group was 8.7%, and only two genera were isolated. It has been found that the efficient isolation of rare actinomycetes from soil particles is not dependent on the collection site and is universally observed. Interestingly, we also found that our method can isolate an unknown actinomycete species. These results suggest that isolation of actinomycetes using soil particles is effective for acquiring rare actinomycetes and unknown actinomycetes.

Actinomycetes, Rare Actinomycetes, Soil particle

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A03-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

奥塩原温泉における新規鉄代謝アーキアの探索

Exploration of iron reducing, thermoacidophilic archaea in Oku-Shiobara hot spring

○逆井 青空[1]、加藤 真悟[2]、伊藤 隆[2]、大熊 盛也[2]、高品 知典[1] ([1]東洋大院生命科学、[2]理研 BRC)
○Sora SAKASAI[1], Shingo KATO[2], Takashi ITOH[2], Moriya OHKUMA[2], Tomonori TAKASHINA[1]
([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]RIKEN BRC)

火山性酸性温泉には、*Thermoplasma* 属や *Sulfolobus* 属等の多種多様なアーキアが生息しており、これらの多くは硫黄を基質として好気的、嫌気的に生育することができることが知られている。一方、こうした好熱好酸性アーキアの一部には鉄(Fe)を酸化または還元して生育することが報告されているが、これら鉄代謝がどれ程のアーキアに分布しているかは明らかになっていない。しかし、我々のこれまでの研究において、*Thermoplasmatales* 目および *Sulfolobales* 目の代表株がいずれも三価鉄(Fe(Ⅲ))存在下で嫌気的に生育したことから、こうした好熱好酸性アーキアにも幅広く鉄代謝能が分布しているものと考えられる。一方、栃木県奥塩原新湯温泉から採取した温泉水資料について菌層解析を行なったところ未培養の *Thermoplasmatales* 目および *Sulfolobales* 目のアーキアの存在が確認できた。そこで Fe(Ⅲ)存在下で嫌気的集積培養を行なったところ、*Thermoplasmatales* 目に属する新規性の高いアーキアを培養することができた。

A wide variety of thermoacidophilic archaea such as *Thermoplasma* and *Sulfolobus* are living in volcanic acidic hot springs. Many of them are known to grow aerobically or anaerobically using sulfur or sulfur compounds. On the other hand, some thermoacidophilic archaea have been reported to grow by oxidizing or reducing iron compounds. However, it is not clear to what extent the iron metabolisms are distributed in Archaea. In our previous studies, representative strains of *Thermoplasmatales* and *Sulfolobales* grew anaerobically in the presence of Fe(III). This finding would imply that many of thermoacidophilic archaea are capable of metabolizing iron compounds. On the other hand, our metagenomic analysis revealed that uncultivated archaea of *Thermoplasmatales* and *Sulfolobales* were predominant in the microbial communities of hot spring sites at Oku-Shiobara Arayu-Onsen, Tochigi, Japan. Therefore, we conducted anaerobic enrichment cultures in the presence of Fe(III) for these samples, and successfully cultivated novel archaea belonging to *Thermoplasmatales*.

Archaea, Iron reduction, Isolation

発表責任者：逆井青空（s39102100118@toyo.jp）

講演番号：2A03-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

海洋環境から分離された紫外線耐性菌 *Deinococcus* sp. AKn-1 株の諸性質と分子系統解析

Phylogenetic analysis and characterization of UV-resistant bacterium strain AKn-1 isolated from marine environment

○松原 光希[1]、大道 悠周[1]、岡村 好子[2]、前田 誠[3]、大橋 弘範[4]、杉森 大助[4]、阪口 利文[1]([1]県立広島大・生命環境、[2]広島大院・統合生命科学、[3]広島大・N-BARD、[4]福島大学・共生システム理工学類)

○Kouki MATSUBARA[1], Yukichika DAIDO[1], Yoshiko OKAMURA[2], Makoto MAEDA[3], Hironori OHASHI[4], Daisuke SUGIMORI[4], Toshifumi SAKAGUCHI[1] ([1]Dep. of Life Sci., Prefectural Univ. of Hiroshima, [2]Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima Univ., [3]N-BARD, Hiroshima Univ., [4]Faculty of Symbiotic System Sci., Fukushima Univ.)

Deinococcus 属の微生物は強い放射線耐性を有し、砂漠、上空など多くの環境から見出されてきた。演者らはこれまで、アヤメカサゴの体表面から赤色色素生産菌（*Deinococcus* sp. AKG-1 株）を分離し、その紫外線耐性などを調査することで海洋環境における放射線耐性菌の幅広い分布の可能性について明らかにしてきた。本研究では、紫外線が強い環境下にある奄美大島の砂浜海岸の採取試料から紫外線耐性菌の分離について検討し、分離株に対する紫外線、放射線耐性などの諸性質、16SrDNA 配列に基づく分子系統解析を実施した。

鹿児島県奄美大島の海洋環境において強い紫外線照射、乾燥など過酷な生育条件が予想される砂浜海岸の砂礫、波打ち際の採取試料から、紫外線耐性を有する AKn-1 株と名付けられた分離株の獲得に成功した。本菌 は 10mM 以上のセレン酸添加においても生育し、生育菌体の近傍にはセレンナノ微粒子の形成が確認された。次に、紫外線、過酸化水素、放射線耐性評価を行ったところ、分離株は高い紫外線耐性（600 J/m²で生存率 10 %）、過酸化水素耐性（4.0 v/v%まで生存率が残余）、放射線耐性（照射量 15 kGy でも生育）を有していた。さらに、AKn-1 株に対して 16SrDNA 配列に基づく分子系統解析を行ったところ、*Deinococcus* 属の各標準株と間で 2 %以上の差異が確認され、分離株 AKn-1 株は *Deinococcus* 属の新種微生物であることが示唆された。

The genus *Deinococcus* has been known as bacteria have strong radiation tolerance, and they have been found from various environments such as deserts, soil and atmospheres. So far, we have been investigating the isolation and characterization of red pigment-producing bacteria which have UV resistant from marine scorpionfish. We have demonstrated about the possibility of the wide distribution of radiation resistant bacteria in marine environments. In this study, the resistances against UV, H_2O_2 and radiation, and phylogenic analysis based on the 16SrDNA of newly isolated marine bacterium from Amami island were investigated.

A marine bacterium designated stains AKn-1 was isolated from Amami island. This bacterim had high resistances against UV (percent survival: 10 % at 600 J/m^2), H_2O_2 (remains active cells at 4.0 v/v%) and gamma ray radiation (the cells grew at the 15 kGy radiation). Phylogenic analysis based on the 16SrDNA of strain AKn-1 indicated that the isolate has about 2% differences among the DNA homologies of the type strains in genus *Deinococcus*. This result showed that strain AKn-1 is a new species of bacterium in genus *Deinococcus*.

Deinococcus, Amami Island, UV resistance

発表責任者：松原光希（q805018zi@ed.pu-hiroshima.ac.jp）

講演番号：2A03-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

「ゲノムを包む膜」を持つ新規 *Atribacterota* 門地下細菌の培養化と機能解明
Isolation and characterization of the novel subsurface *Atribacterota* member possessing membrane-bounded nucleoid

○川本 大輝[1,2]、渡邊 美穂[2,3]、持丸 華子[4]、中原 望[2]、孟 憲英[2]、吉岡 秀佳[4]、野村 暢彦[5,6]、玉木 秀幸[2,5,6]（[1]筑波大院・理工情報生命、[2]産総研・生物プロセス、[3]秋田県大・生物資源科学、[4]産総研・地圏資源環境、[5]筑波大・生命環境系、[6]筑波大・MiCS）
○Hiroki KAWAMOTO[1,2], Miho WATANABE[2,3], Hanako MOCHIMARU[4], Nozomi NAKAHARA[2], Xiang-Ying Meng[2], Hideyoshi YOSHIOKA[4], Nobuhiko NOMURA[5,6], Hideyuki TAMAKI[2,5,6]
([1]Tsukuba Univ., [2]Bioproduction Res. Inst., AIST, [3]Akita Pref. Univ., [4]Rearch inst. Geo. Env., AIST, [5]Life Env., Tsukuba Univ., [6]MiCS, Tsukuba Univ.)

細菌の系統群の一つである *Atribacterota* 門は、遺伝子解析により海底堆積物、油ガス田、地熱環境など、様々な嫌気的環境に広く棲息していることが明らかとなっている。特に、本系統群は炭素の物質循環プロセスに寄与する可能性が示唆されており、その生理生態機能が注目されている。しかしながら、これまでに報告された *Atribacterota* 門細菌はわずか 1 種のみであり、その実態は未だ不明である。本研究では、深部地下環境から新たに *Atribacterota* 門に属する細菌を単離し、その生理・形態の特徴を明らかにすることを目的とした。

新潟県中条ガス田の地層水試料 (深さ>1,000m) を用い、嫌気的条件下で集積培養・コロニー単離・限界希釈培養を繰り返し行うことにより、嫌気性・独立栄養性・好熱性細菌 M15 株の純粋分離に成功した。既存株の 16S rRNA 遺伝子との相同性が非常に低い (90.2%) ことなどから、M15 株は *Atribacterota* 門の *Atribacraceae* 科に属する新属の細菌であることが示唆された。蛍光顕微鏡・透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて M15 株の細胞構造を観察した結果、細胞内においてゲノム DNA が局在し、ゲノム DNA を包むような膜を持つことが明らかとなり、本特徴が *Atribacerota* 門において広く保存されている可能性が示唆された。本講演では、M15 株の分子系統学的解析結果ならびに形態学的特徴と生理性状について報告する。

Members of the phylum *Atribacterota* inhabit and frequently dominate a wide variety of anaerobic environments (e.g., marine sediments, oil fields, and geothermal environments) and have therefore been suggested to play a crucial role in carbon cycling. However, their physiological and ecological functions remain unclear, especially given that only one species has been validly described so far. In this study, we succeeded in isolating a new member (strain M15) of the phylum *Atribacterota* from a deep subsurface oil reservoir in Japan, and characterized its morphological and physiological features and phylogenetic position. In this talk, we will present the unique traits found in the new isolate and discuss on the ecophysiology of the *Atribacterota*.

Atribacterota, novel subsurface bacteria, cell structure

発表責任者：玉木秀幸（tamaki-hideyuki@aist.go.jp）

講演番号：2A03-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

ゲル微粒子の凝集培養を用いた難培養性細菌の単離方法の構築

Construction of a method to isolate uncultivable bacteria from environment using Gel-micro-droplet (GMD) agglutination culture

○下村 有美、鈴木 陸太、マルチネス ジョバル、中島田 豊、加藤 節、青井 議輝 (広大統合生命)
○Yumi SHIMOMURA, Rikuta SUZUKI, Joval MARTINEZ, Yutaka NAKASHIMADA, Setsu KATO, Yoshiteru AOI (Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

環境中の多くの微生物は未培養・難培養であるため、それらを可培養化する新しい培養手法の開発が求められている。本研究では独自に開発した Gel-micro-droplet (GMD) 凝集培養法を適用し、Cell sorter と組み合わせて環境中から分離株を獲得する方法論の確立を行った。森林土壌より抽出した微生物細胞を含む GMD を作成し、ミネラルオイル中で GMD を凝集させた状態で攪拌培養した（凝集培養)。GMD は経時的にサンプリングし、細菌のコロニー形成率の測定と NGS による菌叢解析を行った。また、培養 14 日目にはコロニーが形成された GMD を Cell Sorter で分取し、その後分離培養を試みた。対象試験として、標準寒天平板法 (SDP) で培養を行ったところ、SDP のコロニー形成率は 5%であるのに対し GMD 培養では 30%～45%であった。GMD の菌叢は、すべての期間において易培養性の Proteobacteria が約 50～70%の相対存在率を保っていたが、培養日数が進むにつれて難培養性細菌の *Verrucomicrobia* や *Planctomycetes*、*Oligoflexia* の相対存在率の増加が見られた。SDP と GMD の分離株はどちらも殆どが *Proteobacteria* であったが、GMD 培養では難培養性の *Verrucomicrobia*、*Oligoflexia*、*Gemmatimonadetes* に属する細菌が単離された。本研究で用いた GMD の凝集培養は難培養性細菌の増殖に適していることが示唆された。本研究の成果は、NEDO 助成事業の結果得られた。

Majority of environmental bacteria remain uncultivated. We applied gel-micro-droplet (GMD) technique to isolate those uncultured bacteria. GMD entrapping single cells with medium softly aggregated in oil (GMD-oil cultivation) is the key structure of this method. The GMDs were collected over time to analyze the microcolony forming efficiency and the microbiome. The 14th day GMDs were inoculated to medium using Cell Sorter to obtain isolates. The colony forming efficiency of the standard plate count method (SDP) was 5%, while that of the GMD method was 30% to 45%. *Proteobacteria* were the predominant bacteria in GMD cultures, but as the number of culture days increased, the relative abundances of uncultivable bacteria, such as *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, and *Oligoflexia*, were increased. These bacteria except *Planctomycetes* were isolated from GMD, whereas they were not obtained from SDP. These results indicate that the GMD-oil cultivation is suitable for uncultivable bacteria incubation. This study is based on results obtained from a project subsidized by NEDO.

Gel-micro-droplet (GMD), uncultivable bacteria, GMD-oil cultivation

講演番号：2A03-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

なぜ培養困難なのか？*Nitrospira* の生存戦略と難培養性の関係性を解き明かす
Why does *Nitrospira* resist cultivation? Linking the uncultivability of *Nitrospira* to their survival strategies

○定廣 晋吾[1]、田村 淳[1]、村上 千穂[2]、加藤 節[1]、中島田 豊[1]、金田一 智規[1]、大橋 晶良[1]、青井 議輝[1] ([1]広島大院、[2]安田女大)
○Shingo Sadahiro[1], Atsushi Tamura[1], Chiho Murakami[2], Setsu Katou[1], Yutaka Nakashimada[1], Tomonori Kindaichi[1], Akiyoshi Oohashi[1], Yoshiteru Aoi[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Yasuda Univ.)

現在、環境中の多くの微生物は分離培養できていないが、その普遍的な理由は解明されていない。本研究では、様々な環境に存在する亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* を難培養性微生物のモデルとして未知増殖制御機構の解明を目指した。*Nitrospira* はストレス環境下で増殖停止（休眠）し、容易に増殖再開せず、シグナル因子を受け取ることで増殖再開（覚醒）するという仮説を立て、飢餓状態で休眠誘導後 *Nitrospira* の代謝産物を含む培養上清の有無による増殖再開（休眠からの覚醒）への影響を比較した。その結果、上清を含む培地でのみ低植菌密度でも増殖再開が確認された。このことから、*Nitrospira* が飢餓により休眠することと、*Nitrospira* が覚醒因子を生産することが示唆された。その後、因子に応答しない菌株（非応答株）の出現が確認されたため、因子に応答する株（応答株）と生理学的性質を比較したところ、応答株の方が比較的長い誘導期と緩やかな死滅期を示した。また、応答株は高密度の凝集体を形成し、非応答株は低密度の枝分かれ構造をとることも確認された。これらの結果から、応答株は低栄養環境で生存のために死菌を栄養源にでき、非応答株は増殖のために効率的に栄養を獲得できると示唆された。休眠や環境適応する変異株の出現が統合して、広く存在しながら難培養性の理由になっていると考えられた。今後は覚醒因子や遺伝子変異の同定を行う。

Many environmental microorganisms resist cultivation, but the reasons are not understood. In this study, we aim to elucidate the unknown growth control mechanism using *Nitrospira* as a model for uncultivable microorganisms. After starvation, *Nitrospira* restarted to grow only in the medium containing the supernatant of *Nitrospira*. This suggests *Nitrospira* goes dormant under starvation and *Nitrospira* produces the signal factor. Later, the strains that did not respond to the factors (non-responsive strains) generated and were compared to the strains respond to the factors (responsive strains). The responsive strains showed a relatively long lag phase and a slow death phase. In addition, it was confirmed that the non-responsive strain had a low-density, branched aggregates, while the responsive strain formed dense aggregates. These results suggest responsive strains use dead cells as a nutrient source, while non-responsive strains efficiently acquire nutrient sources. These results suggest dormancy and the generation of mutants may be the reasons for the widespread but difficult cultivation. We will identify the signal factor and genetic mutations.

Uncultivated bacteria, dormant, resuscitation

発表責任者：青井　議輝（yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A03-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

Burkholderia 株由来の細胞外多糖類画分による難培養性 *Verrucomicrobia* 門細菌の集積培養

Aggregation culture of *Verrucomicrobia* phylum by extracellular polysaccharide fractions from *Burkholderia* strains

○笹川 航、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Wataru Sasagawa, Hiromi Kato, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

【目的】微生物間相互作用を用いた土壌環境の未培養菌の分離を目的として、これまでに *Burkholderia* 属の細胞外多糖類(EPS 画分)が難培養性として知られる *Verrucomicrobia* 門細菌株の増殖を促進することを明らかにした。本研究では *Burkholderia* 属の EPS 画分によって、土壌細菌叢の中でどのようなグループが集積できるのか検討した。
【方法】畑地土壌から抽出した微生物集団を、*Burkholderia* 属細菌株の EPS 画分、または植物由来の水溶性デンプンを炭素源とする無機塩液体培地で振盪培養した。濁度によって菌体の増殖をモニタリングしながら、適宜培養液を採取し、メタゲノム DNA を抽出して、16S rRNA のアンプリコンシーケンスを Illumina MiSeq で解析した。
【結果と考察】その結果、水溶性デンプン添加区では *Bacillus* 属等の *Firmicutes* 門や *Flavobacterium* 属等の *Bacteroidetes* 門および *Proteobacteria* 門が優占していた一方で、EPS 画分添加区では *Verrucomicrobia* 門が 50%を超える割合にまで優占化した。この結果、特定細菌由来の生体成分を用いることで、難培養性細菌を含む特定の細菌を集積培養できる可能性が示された。今後、様々な細菌由来の EPS を用いて未培養細菌群を含む新たな微生物資源の獲得が可能になると期待できる。

One of the reasons why most microorganisms in nature are difficult to culture is that relationships among these microorganisms are not fully understood. Our previous research demonstrated that extracellular polysaccharide (EPS) fraction prepared from *Burkholderia* spp. culture promoted the growth of some *Verrucomicrobia* strains, which are known as microbial dark matter in environments. In this study, we investigated which groups of soil microorganisms could be enriched by the EPS fraction of *Burkholderia*. Microorganisms extracted from a farm soil were incubated in a minimum liquid medium with the EPS fraction or starch from plants. 16S rRNA amplicon sequencing of these enrichment samples with Illumina MiSeq revealed that (i) *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* were dominated in the starch-supplemented samples, and (ii) *Verrucomicrobia* were dominated more than 50% in the EPS-supplemented samples, clearly showing that EPS fractions of *Burkholderia* can enrich *Verrucomicrobia.*

Verrucomicrobia, extracellular polysaccharide, soil microorganisms

講演番号：2A03-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

地衣類フォトビオントの分離と培養

Isolation and cultivation of a lichen photobiont

○廣瀬 琴美、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大学 工学研究科 化学応用学専攻）
○ Kotomi Hirose, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii (Applied Chemistry and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Kogakuin University, Tokyo.)

地衣類は糸状菌と微細藻類（フォトビオント）の共生体であるが、一般に栄養や水分に乏しい過酷な環境に生育することから、環境ストレスの軽減や共生を維持するための生理活性物質を生産している。しかし、地衣類組織は比較的強固であることから、そこからフォトビオントを分離することは容易ではなく、組織を破砕しても糸状菌の菌糸が多く混入することから、自由生活型の微細藻類にくらべて研究が進んでいない。そこで本研究では、地衣類からフォトビオントを分離する方法を検討した。採集した地衣類を滅菌水に懸濁し、ビーズ粉砕機で 30 秒間破砕後、マイクロチューブに入れた 10%、25%、35% (w/v) の Ficoll 層の上に積層し、50x*g* で遠心分離した。フォトビオントが集積した 25% (w/v) Ficoll 層を、新たな Ficoll 層 (10%、25%、35% (w/v)) に積層し、10,000x*g* で遠心分離した。再び 25% (w/v) Ficoll 層に集積されたフォトビオントを回収後、滅菌水と混合し遠心分離することで、フォトビオントを含む細胞沈殿画分を得た。顕微鏡観察では、フォトビオント画分に菌糸の混入はほとんど見られなかった。無機塩類培地で培養することで生育も確認でき、生細胞として回収できることがわかった。

Lichens are a symbiotic community of fungi and photobionts. Photobionts are expected to produce bioactive substances which maintain the symbiosis. However, their isolation is difficult, because of hardness of lichen tissue and contamination of fungal hyphae after homogenization of the tissue. We examined conditions for a separation of photobiont from fungal hyphae using a density gradient centrifugation. The lichen samples were suspended in sterile water and ground for 30 seconds by a bead crusher. Lichen homogenate was then overlaid on layers of 10%, 25%, and 35% (w/v) Ficoll and centrifuged at 50x*g*. The 25% (w/v) Ficoll layer containing photobiont cells was collected and overlaid on fresh Ficoll layer prepared in another microtube, and centrifuged again at 10,000x*g*. The 25% (w/v) Ficoll layer containing photobionts was harvested, mixed with sterile water to reduce Ficoll concentration, and centrifuged to precipitate cells. Microscopic observation after the centrifugation showed no significant contamination of fungal hyphae in photobiont fraction. The photobionts grow well in mineral salts medium, indicating that they did not suffer mechanical damage during the separation process.

photobiont, lichen, density gradient centrifugation

講演番号：2A03-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム A

シングルセル解析技術を用いた二次代謝産物生合成能を有する未培養海綿共在細菌の同定

Detecting uncultured sponge symbiont producing secondary metabolites with Raman microspectroscopy and single-cell genomics

○小川 雅人[1]、Hemmerling Franziska[2]、安藤 正浩[1]、西川 洋平[1,3]、細川 正人[4]、松永 茂樹[5]、Piel Jörn[2]、竹山 春子[1,3,4,6] ([1]早大ナノライフ創新研、[2]Institute of Microbiology, ETH Zurich、[3]産総研-早稲田 CBBD-OIL、[4]早大理工学術院、[5]東大院農学生命科学、[6]早大先進生命動態研)
○ Masato KOGAWA[1], Franziska HEMMERLING[2], Masahiro ANDO[1], Yohei NISHIKAWA[1,3], Masahito HOSOKAWA[4], Shigeki MATSUNAGA[5], Jörn PIEL[2], Haruko TAKEYAMA[1,3,4,6] ([1]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [2]Institute of Microbiology, ETH Zurich, [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [5]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Tokyo Univ., [6]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Univ.)

海綿動物の共在細菌叢は多様な天然生理活性物質に関する生物資源として古くから注目されており、近年でも二次代謝産物産生能を有する海綿共在細菌の分離に複数の研究が展開されている。一方で、*Theonella* 属海綿に共在する‘Entotheonella’属細菌など二次代謝産物合成能を有する未培養細菌の報告例[1)]も存在しており、培養に頼らず海綿共在細菌を解析する手法が求められる。本研究では、顕微ラマン分光法を用いた細胞内代謝産物の検出、および、微小液滴を用いたシングルセルゲノム解析、の研究室で保有する 2 つのシングルセル解析技術を組み合わせたプラットフォーム「MERMAID」を開発し、海綿 *Theonella swinhoei* に共在する二次代謝産物生合成細菌の特定および性状解析を行った[2)]。まず 1 細胞ラマン解析によって、同海綿から抽出される生理活性物質 aurantoside A を含有する糸状細菌を特定した。ゲノム解析によって、同一菌体が auranotoside 生合成遺伝子群を有することが確認されたため、得られた新規 Chloroflexi 門細菌が aurantoside A の生産者であることが明らかとなった。また、同細菌は aurantoside 生合成遺伝子群以外にも複数の生合成遺伝子群配列を有することが明らかとなり、潜在資源としての海綿共在細菌の更なる可能性が示唆される結果となった。

It is important to have comprehensive analysis technologies that can target uncultured bacteria to understand complex sponge symbionts, which are natural resources of diverse bioactive substances. In this study, we developed an analysis platform named MERMAID combining two single-cell analysis technologies: detection of intracellular metabolites using Raman microspectroscopy and single-cell genome analysis using microdroplets. By applying the MERMAID to detection of sponge symbionts which can biosynthesize secondary metabolites, we identified the aurantoside-producing uncultured Chloroflexi. Numerous biosynthetic gene clusters in addition to the aurantoside locus were also identified in the bacterial genome, suggesting an even higher potential for metabolic richness of sponge microbiome than previously appreciated.

1) Wilson, M. C., Takeyama, H., Piel, J. et al, *Nature,* **506**, 58-62 (2014).

2) Kogawa, M., Miyaoka, R., Hemmerling, F., Piel, J., and Takeyama, H. et al, *bioRxiv*, 10.1101/2021.09.11.459929 (2021).

single cell, secondary metabolite, uncultured bacteria

講演番号：2A05-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

創出土壌を対象とした X 線 CT による土壌物理性解析の試み

Attempt to Analyze Physical Properties in Created Soil Using X-ray CT

○西田 亮也[1]、鈴木 飛鳥[2]、宮本 憲二[3]、加藤 康夫[4]、安藤 晃規[5,6]、小川 順[5,6]、篠原 信[7]、高野 雅夫[1]([1]名大院環、[2]名大院工、[3]慶大理工、[4]富山県大・生医工研セ、[5]京大院農、[6]京大・生理化学研究ユニット、[7]農研機構)

○Ryoya NISHIDA[1], Asuka Suzuki[2], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Akinori Ando[5,6], Jun Ogawa[5,6], Makoto Shinohara[7], Masao Takano[1] ([1]Grad. Sch. of Env. Stud., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Nagoya Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [5]Div.Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [6]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [7]NARO)

土壌創出技術は、並行複式無機化法(篠原, 2006)を応用したものであり、非土壌媒体中(鉱物や人工樹脂等の多孔体)に微生物を固定化し、有機質肥料から無機養分を生成する技術である。本技術により、無機養分生成能を指標として、土壌としての物理性・化学性・生物性を総合的に評価することが可能となった。しかし、非土壌媒体の種類によって無機養分生成能が大きく変化することは明らかになっているものの、物理性の指標である 3 相分布がどのように影響しているのかを明らかにできていない。そこで本研究では、土壌の物理性を X 線 CT による 3 次元的な構造分析により評価し、無機養分生成能との関係性を明らかにすることを目的とした。微生物担体となる多孔質非土壌媒体としては植物炭、セラミックス、人工樹脂等を用いた。それらに対して、X 線 CT を用いて粒子径や間隙等の 3 次元的な構造を観察・分析し定量化することを試みた。また、各多孔体に微生物を固定化することで無機養分生成能を付加した。微生物の固定化は、多孔体の洗浄と有機質肥料の添加を連日行う手法で硝酸イオン生成が安定するまで繰り返した。本講演では、創出土壌における無機養分生成能と物理性の関係を評価するための手法として、X 線 CT の有用性ならびに課題等に関して紹介したい。

The soil creation technology (soilization) is an application of the parallel multiple mineralization method (Shinohara, 2006), in which microorganisms are immobilized in non-soil media to produce inorganic nutrients from organic fertilizers. This technology has made it possible to comprehensively evaluate the physical, chemical, and biological properties of soils using inorganic nutrient production capacity as an indicator. However, although it has been shown that the inorganic nutrient production capacity varies greatly depending on the type of non-soil media, it has not been possible to clarify how the three-phase distribution, which is an indicator of physical properties, affect. In this study, the physical properties of the soil were evaluated by three-dimensional structural analysis using X-ray CT, and the relationship between the physical properties and inorganic nutrient production capacity was clarified. Porous non-soil materials such as plant charcoal, ceramics, and artificial resins were used as microbial carriers. We attempted to observe, analyze, and quantify the three-dimensional structure of these materials, such as particle size and pore space, using X-ray CT. In addition, microorganisms were immobilized in each porous material to add inorganic nutrient production capacity. In this presentation, I would like to introduce the usefulness and challenges of X-ray CT in evaluating the physical properties related to the inorganic nutrient production capacity of the created soil.

X-ray computed tomography, soil physical property, nitrification

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：2A05-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

ゲル充填マイクロウェルアレイと顕微ラマン分光測定の融合：土壌微生物への応用
Integrating a Gel-Filled Micro Well Array Device into Raman Microspectroscopic Measurements: An Application to Soil Microbes

○前田 大樹[1]、菅野 菜々子[1]、佐々 文洋[2]、重藤 真介[1]([1]関西学院大院理工、[2]九州大院システム情報科学)
○Taiki MAEDA[1], Nanako KANNO[1], Fumihiro SASSA[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Kwansei Gakuin Univ., [2]ISEE, Kyushu Univ.)

【背景・目的】自然界の大多数の微生物は未培養で、その機能は未知なままである。これを解明するためには、膨大な数の微生物を網羅的かつあるがままの姿で観察する手法が必須となる。そこで本研究では、一度に 100 回/cm^2 以上の培養を可能とするゲル充填マイクロウェルからなる独自の培養デバイスを、微生物 1 細胞中の生体分子を細胞を壊すことなく観測可能なラマン分光法と融合させ、実環境中の微生物の種と機能の 1 細胞レベル解析に向けた基盤技術を構築することを目的とした。
【結果】初めに、モデル微生物である *Escherichia coli* を本培養デバイスで培養し、共焦点ラマン顕微鏡（励起波長 638 nm）下での分光測定の実行可能性を確認した。次に、大学構内で採取した土壌中の微生物を同じように培養してラマン分光観察を行ったところ、多様な微生物のラマンスペクトルを異なる培養区画（ゲルウェル）から取得することに成功した。また、特定の微生物が見出された培養区画をピックアップし、シャーレで分離培養した後に改めてラマン分光測定を行うことも可能であることを確認した。得られたラマンスペクトルには、脂質やタンパク質/核酸のピークに加えて、微生物が細胞内に蓄積することが知られているポリヒドロキシアルカン酸（PHA）のピークが観測された。発表では、長期間にわたって管理・維持されたモデル圃場から採取した土壌を対象とした実験結果も合わせて報告する。

Elucidation of uncultured, unknown microorganisms in nature requires both tremendously laborious cell culturing and techniques for observing microorganisms *in vivo*. In this research, we combined a unique gel-filled micro well array device with Raman microspectroscopy toward nondestructive analysis of diverse microorganisms in environments. First, we cultured the model microorganism *E. coli* using this device and observed *E. coli* cells with a confocal Raman microscope (excitation wavelength = 638 nm) to check the feasibility of the method. Next, we applied the system to analysis of microorganisms in a soil sampled on our university campus and successfully observed their Raman spectra without destroying cells. We also picked up a gel well containing specific microorganisms and transferred it from the device to a petri dish for the conventional cell culture. The Raman spectra we measured showed peaks arising not only from lipids and proteins but also from polyhydroxy alkanoates (PHA).

Raman spectroscopy, Single-cell analysis, Gel-filled micro well array device

発表責任者：重藤真介（shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：2A05-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

マイクロドロップレットを用いた土壌微生物複合培養とその菌叢解析

Microbiome analysis of soil bacterial consortia prepared using microdroplet technology

○市川 俊輔[1]、本間 宣行[2]、勝尾 徳斗[1]、石毛 真行[2]([1]三重大、[2]オンチップ・バイオテクノロジーズ)
○Shunsuke Ichikawa[1], Nobuyuki Honma[2], Norito Katsuo[1], Masayuki Ishige[2] ([1]Mie Univ., [2]On-chip Biotechnologies)

土壌中の大部分の微生物は未探索な状況 (Microbial dark matter) であり、これら微生物の培養方法を確立することが求められている。本研究では、マイクロドロップレット内に土壌微生物を封入して培養することで、多様な微生物を含む複合培養系を確立することを目的とした。

土壌微生物を液体培地に懸濁し、Water in oil (W/O)ドロップレットに包埋した。ドロップレットを混在させたまま 59 日間室温で複合培養した場合、複合培養液中では Proteobacteria が優占することがわかった。次に、増殖の遅い微生物を保持した複合培養を達成するために、13 日培養時点で微生物増殖のあるドロップレットをソーティングにより除去した。1,201,540 ドロップレットのうち、微生物増殖が検出された 28,704 ドロップレット（全体の 2.4%）を除去した。その後、回収した画分を 46 日間室温で培養した結果、Proteobacteria に加え、Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria を含む菌叢が形成されていた。属レベルでみると、この複合微生物培養液は *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* などの細菌を含む菌叢を構築していることがわかった。

以上の通り本研究では、土壌細菌の W/O ドロップレットへの包埋とドロップレットソーティングを活用することで、特定の細菌の優占を防いで多様性を保持した菌叢をもつ複合培養液を調製できることを明らかにした。

A diverse range of bacteria exist in the soil; however, many have not been characterized yet, because of their unculturability. In this study, using microdroplet technology, we prepared a soil bacterial consortium that maintained diversity. Soil microorganisms were suspended in a liquid medium and encapsulated in water in oil (W/O) droplets. The soil bacteria in W/O droplets were cultured for 59 days at room temperature to prepare a bacterial consortium. Microbiome analysis revealed that Proteobacteria were dominant in the bacterial consortium. To prepare a consortium containing slow-growing bacteria, droplets containing fast-growing bacteria were removed by a cell sorter at 13 days of culture. Subsequent culture of the recovered fractions at room temperature for 46 days resulted in a consortium containing Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria, in addition to Proteobacteria. At the genus level, the consortium included *Pseudomonas*, *Bacteroides*, and *Lactobacillus*. In this study, we demonstrated that the preparation of a bacterial consortium using W/O droplets and droplet sorting can maintain the diversity of soil bacteria.

Soil microbiome, Water in oil droplet

発表責任者：市川俊輔（ichikawa@edu.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A05-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

マイクロウェルアレイを用いた新たな微生物の分離培養法の構築

Construction of a new microbial isolation and culture method using micro-well array device

○沼館 美法[1]、佐々 文洋[2]、土肥 裕希[1]、桝尾 俊介[1]、竹下 典男[1]、高谷 直樹[1] ([1]筑波大・生命環境系/ MiCS、[2]九州大・システム情報科学)
○Minori NUMADATE[1], Fumihiro SASSA[2], Yuki DOI[1], Syunsuke MASUO[1], Norio TAKESHITA[1], Naoki TAKAYA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kyusyu Univ.)

現在一般的に使われる微生物培養法は、1800 年代後半にロベルトコッホが考案した平板培養法である。これは、微生物ダークマターに迫るため微生物を単離する上で、多大なスペースとコストを使うことが知られている。そこで本研究では、省スペースでハイスループットに微生物を分離培養するための新たな手法を開発することを目的とした。まず、直径 200 μm、深さ 300 μm の微小孔を 3600 個設置した 3 cm 角のガラス製マイクロデバイスを開発した。これを使い蛍光タンパク質を生産させた大腸菌を微小孔内に一細胞隔離し培養することに成功した。この培養液はデバイス内で凍結保存可能であり、微小孔と同規格の微小剣山を用いたレプリカの作製も可能であった。環境試料中の微生物を隔離培養し純粋分離することもできた。その細菌叢解析の結果から、本技術は最低限の空間でハイスループットな微生物の隔離培養を可能とし、難培養微生物を可培養化することで生態系の微生物情報を飛躍的に増加させることが期待される。

Microbial culture method using agar plates are most popular today, and invented by Robert Koch in the late 1800s. To overcome use of a great deal of space and cost in isolating environmental microorganisms this study aimed to develop a space-and money-saving high-throughput methods for their isolation and culture. First, we developed a 3-cm square glass microdevice with 3600 micro-wells of 200 μm in diameter and 300 μm in depth. Using this device, we succeeded in isolating and culturing a single cell of fluorescent protein-producing E. coli in the micro-wells. The culture solution could be frozen and stored in the device, and microkendrons for each micro-well were able to replicate the culture to another microdevice. The microorganisms in the environmental samples could be isolated and separated to pure cultures. Microbiome analysis indicated that this technology enables high-throughput isolation and culture of microorganisms in a minimum space, and is expected to dramatically increase the microbial information of ecosystems by culturing difficult-to-culture microorganisms.

microdevice, bacteria, screening

講演番号：2A05-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

ヒッチハイク現象の環境汚染物質分解細菌への応用

The application of hitchhiking to the environmental pollutant degrading bacteria

○岩本 和音、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大・院生命）
○Kazune IWAMOTO, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

汚染物質の分解細菌を利用した環境浄化が期待されている一方で、接種した分解細菌が当該環境に定着できずに死滅してしまうことがしばしば問題になっている。*Sphingobium japonicum* UT26 株は、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) の分解資化能を有するが、滅菌土壌に単独で接種した際の生残性は良好でない。土壌での生残性が低い原因と推定される低栄養環境への不適合性や土壌の低い拡散性などの諸問題を改善することで接種菌の生残性が向上すると考えられる。本報告では、固体表面上で運動性を有する細菌が運動性のない細菌を運ぶ「ヒッチハイク現象」に着目し、本現象を引き起こす細菌の特徴を検討すると共に、本現象を利用して UT26 株の拡散性や土壌での生残性を向上させることが可能か検討した。

γ-HCH 汚染土壌懸濁液を含む複数の土壌懸濁液を栄養寒天培地に接種し、ヒッチハイク現象を示したコロニーを対象に運動性細菌の純粋分離を行なった。その結果、取得した運動性細菌 9 株は全て *Paenibacillus* 属であった。これら運動性細菌株と様々な分類群の細菌株を栄養寒天培地に混合接種した結果、UT26 株を含めた *Sphingobium* 属以外にも *Burkholderia* 属や *Escherichia* 属、*Rhodococcus* 属など、幅広い分類群の運動性の低い細菌に対してもヒッチハイク現象を示した。更に、滅菌土壌に UT26 株と、運動性の *Paenibacillus* sp. NK-L2 株を混合接種した結果、UT26 株の生残性を飛躍的に向上させることに成功した。ただし、NK-L2 株が有するヒッチハイク現象を示す能力が土壌における UT26 株の生残性向上に寄与したのかは、検討の必要がある。

Bioaugmentation of polluted environments usually does not work, because the inoculated bacteria often cannot survive in the field. *Sphingobium japonicum* UT26 utilizes γ-HCH, a insecticidal environmental pollutant, but poorly survived in a sterilized soil in our previous study. We hypothesized that one of the reasons for the poor survivability is owing to nonmotile characteristics of this strain on a solid surface, and thus, improvement of its dispersion in the soil may promote the survivability. In this study, we focused on “bacterial hitchhiking”, which is a phenomenon that motile bacteria transport nonmotile bacteria on a solid surface. We newly isolated 9 *Paenibacillus* strains showing hitchhiking activity from soil samples including γ-HCH-contaminated one. They transported phylogenetically diverse bacteria (alpha-, beta-, and gamma-proteobacteria, and Actinobacteria) as well as UT26. Furthermore, co-inoculation of UT26 and motile *Paenibacillus* strain NK-L2 in the sterilized soil resulted in a significant increase of the UT26 survivability, although more experiments are necessary to conclude that the hitchhiking ability of NK-L2 caused the increase of the UT26 survivability in soil.

bioremediation, co-culture, soil environment

発表責任者：岩本　和音（kazune.kisarazu@gmail.com）

講演番号：2A05-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

γ-HCH 分解細菌コミュニティ形成における *Cupriavidus* 株の重要性

The importance of *Cupriavidus*The importance of Cupriavidus strains in the formation of γ-HCH degrading bacterial community strains in the formation of γ-HCH degrading bacterial community

○佐子川 さやか、羽賀 千晃、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院生命）
○Sayaka SAKOGAWA, Chiaki HAGA, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【目的】残留性の高い有機塩素系殺虫剤であるγ-hexachlorocyclohexane（HCH）を分解する細菌株が世界各地で単離され、酵素・遺伝子・ゲノムレベルで解析が進んでいる。しかし単離菌株が環境中でどのように他の微生物と関わりながら HCH を分解しているのかは未解明である。本研究室では、HCH 分解菌 *Sphingobium* sp. TKS 株を HCH を唯一の炭素源とする寒天培地（HCH 寒天培地）に単独で接種すると活性が弱く小さなコロニーしか形成されないのに対して、TKS 株の分離源である HCH 集積培養系 EB2 を接種すると、低頻度ながら活性を長期維持する巨大コロニーが形成されることを見出した。巨大コロニーの形成機構やコロニー内での構成細菌の役割は不明である。本研究では、EB2 が HCH 寒天培地上で形成する多様なコロニーの菌叢解析を実施し、HCH 分解活性を長期維持する巨大コロニー形成に関する知見を得ることを目的とした。
【方法・結果】EB2 を HCH 寒天培地に画線接種して 20 日間培養した。クリアゾーンを示したコロニーのうち、小さいコロニーとその 2 倍以上のサイズを示す巨大コロニーに対して、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを実施した。その結果、小さいコロニーは TKS 株と 16S rRNA 配列が一致する *Sphingobium* が 7 割以上を占めていたのに対して、巨大コロニーでは、*Sphingobium* の割合は高くても 50%程度であり、残りの 50%以上は *Cupriavidus* と *Pseudomonas* が占めていた。さらに、EB2 から純粋分離した *Cupriavidus* sp. TKC 株と TKS 株を混合し、HCH 寒天培地に塗布したところ、稀に巨大コロニーが形成された。一方、TKC 株と様々な分類群の細菌コロニーとの相互作用を調べた結果、TKC 株は TKS 株を含む sphingomonads 細菌群に向かってコロニー伸長することがわかった。これらの結果は、TKC 株が TKS 株と積極的にコミュニティを形成している可能性を示している。

The bacterial community EB2, which degrades organochloride insecticide γ-HCH, occasionally forms large colonies on an HCH-containing minimum agar plate, and the large colony maintained HCH-degrading activity for a long time. 16S rRNA amplicon sequencing of the large colonies revealed that the ratio of *Sphingobium* was at most 50%, and *Cupriavidus* and *Pseudomonas* dominated at the remaining 50% or more. Furthermore, co-inoculation of HCH-degrading *Sphingobium* sp. TKS and non-degrading *Cupriavidus* sp, TKC, both isolated from EB2, on the HCH plate resulted in occasional formation of the large colony. These results suggested that *Cupriavidus* may play an important role for the formation of the large colony in EB2 community.

HCH degradation, community, colony

講演番号：2A05-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

C1 化合物利用能・ヨウ素抗菌性・捕食をめぐる微生物種間相互作用とそのコミュニティ形成への影響を水処理微生物集団からみる
Interspecific interactions on C1 compounds utilization, iodine antimicrobial susceptibility, and predation affect microbial community assembly in the activated sludge ecosystem
○松下 真由美[1,3]、山本 京祐[2]、青柳 智[1]、稲葉 知大[1]、堀 知行[1]、青木 寛[1]、羽部 浩[1]、佐藤 由也[1] ([1]産総研・環境創生、[2]産総研・生物プロセス、[3]学振 RPD)
○ Mayumi MATSUSHITA[1,3], Kyosuke YAMAMOTO[2], Tomo AOYAGI[1], Tomohiro INABA[1], Tomoyuki HORI[1], Hiroshi AOKI[1], Hiroshi HABE[1], Yuya SATO[1] ([1]AIST EMRI, [2]AIST BPRI, [3]JSPS RPD)

【背景・目的】自然界では、多種の微生物が混在してコミュニティを形成している。その微生物コミュニティ内では周囲の環境に応じて微生物同士の相互作用（競合、捕食−被食、共生等）がおき、構成微生物の組成変化や、それに伴う系全体の機能変化がみられる。本研究ではヨウ素を合成利用する工場廃水を処理する水処理微生物集団（活性汚泥）に着目し、水質等の環境変化が微生物コミュニティ形成に及ぼす影響の解明に取り組んだ。
【結果・考察】本サンプルを採取した環境の特徴は、有機物濃度が低く、比較的高濃度のメタノールやヨウ化物イオン（I^-）等を含むことであり、活性汚泥の菌叢は、C1化合物資化性細菌（メチロトローフ）とヨウ素酸化細菌、捕食性細菌が多くを占めていた。そこで、系内の主要微生物3種または5種の近縁種を様々な条件で共培養し（メチロトローフ細菌1種[または2種]、ヨウ素酸化細菌[従属栄養性]1種、一般的な従属栄養性細菌1種[または2種]）、環境変化がコミュニティ形成に及ぼす影響を調べた。その結果、一定量以上のI^-が存在すると、ヨウ素酸化細菌が生成するヨウ素の影響で他の微生物の生育が強く抑制されること、また、ヨウ素非存在下では炭素源の種類（有機化合物かC1化合物か）によって優占が決まることがわかった。元の活性汚泥環境では、I^-が存在するためヨウ素生成による多種への生育抑制があり、捕食性細菌や原生動物による捕食圧もあったと考えられる。しかし、主な炭素源はC1化合物であるためメチロトローフのC1化合物資化能は重要で、それらが系内食物連鎖の中で一次生産者として機能したと推察される。生育阻害物質の生成や捕食といったネガティブな選択圧がある一方で、C1化合物資化能は系内食物連鎖の起点となり重要なため、それらのバランスによって、ヨウ素酸化細菌、捕食性細菌、メチロトローフ細菌が優占化するというコミュニティ形成メカニズムが、人工の微生物コミュニティ実験から示唆された。
We investigated microbiome of the activated sludge from a treatment facility for iodide ion (I^-)-containing industrial wastewater, in which low concentrations of organic substances and relatively high concentrations of C1 compound (methanol) are available as carbon sources. In the activated sludge, several methylotrophs capable of assimilating C1 compounds, predatory bacteria and an iodide-oxidizing bacterium were dominant. While bacterial predation as well as toxicity of iodine produced by iodide-oxidizer could be major two negative pressures, methylotrophs are the most dominant, possibly because they can be a start point of the food chain in the activated sludge. Results of coculture experiments of the relatives of the major dominant species in the activated sludge also supported the above hypothesis.

interspecific interaction, microbial community assembly, iodine antimicrobial susceptibility

発表責任者：佐藤 由也（yuya-satou@aist.go.jp）

講演番号：2A05-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

アンチセンスペプチド核酸を用いた微生物菌叢改変手法の開発

Manipulation of bacterial community by using antisense peptide nucleic acid

○岡野 憲司[1,2]、日詰 達哉[3]、佐藤 悠[1]、本田 孝祐[1,2]([1]阪大・生物工学国際交流センター、[2]阪大・先導的学際研究機構、[3]阪大院・工)
○Kenji Okano[1,2], Tatsuya Hizume[3], Yu Sato[1], Kohsuke Honda[1,2] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]OTRI, Osaka Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

近年、ヒト体内や環境中の微生物菌叢の働きがヒトの健康改善や地球上の元素循環に重要であることが明らかになりつつある。微生物菌叢の働きを自在に改変・制御できれば、健康維持や持続的耕地利用といった社会課題の解決に貢献できるが、そのような技術は不在である。そこで、我々は細胞透過作用のあるペプチド(CPP)を用いて標的微生物の必須遺伝子 mRNA にのみ結合するアンチセンスペプチド核酸（PNA）を微生物菌叢に導入し、菌種特異的に増殖を抑制する手法の開発に着手した。

Escherichia coli、 *Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Lactoplantibacillus plantarum* からなる 4 菌共培養系に対して、*E. coli* もしくは *P. putida* に対するアンチセンス PNA と KFFKFFKFFK のアミノ酸配列からなる CPP の融合体を導入した結果、両菌の増殖を選択的に抑制することに成功した。興味深いことに *E. coli* の増殖抑制に伴い *L. plantarum* の増殖が低下する、*P. putida* の増殖抑制に伴い *P. fluorescens* の増殖が向上するといった現象が見られた。従って、アンチセンス PNA を用いた微生物菌叢改変技術は、微生物間の増殖連関解析技術としても有用であることが示され、菌叢機能の理解と応用に向けた強力なツールになると期待できる。

In nature, microbes exist as a part of giant ecosystem formed by microbial interactions. Such a bacterial community plays important roles such as elemental cycle in soil and promotion of human health. Therefore, understanding microbial interactions is of importance to control the function of microbiota. However, no experimental method is available for altering microbial community. To this end, we have developed a technique to selectively inactivate microorganism from microbiota by introducing antisense peptide nucleic acid (PNA) using cell penetrating peptide (CPP).

First, we constructed four bacterial co-culture system, which is consisting of *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Lactoplantibacillus plantarum*. By introducing the antisense PNAs targeting the mRNA of the essential gene of *E. coli* and *P. putida* using CPP having the sequence of KFFKFFKFFK, we succeeded to selectively inhibit the growth of these species. Interestingly, inactivation of *E. coli* and *P. putida* caused growth inhibition of *L. plantarum* and growth activation of *P. fluoresence*, respectively. Therefore, CPP-PNA can be used for not only manipulating bacterial community but also analyzing growth linkage between microorganisms.

antisense peptide nucleic acid, cell penetrating peptide, microbiota

発表責任者：岡野 憲司（okano@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2A05-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

RP4 接合伝達システムを用いた大腸菌-*Alkalihalobacillus* 属菌間への遺伝子導入

Establishment of a gene transfer method from *E. coli* to *Alkalihalobacillus sp.* using the RP4 conjugal transfer system

○網島 健太[1]、深田 悠太[2]、片岡 正和[1]([1]信大院　総合理工　生命医工、[2]信大院　総合医理工　生命医工)
○Kenta AMIJIMA[1], YUTA FUKADA[2], MASAKAZU KATAOKA[1] ([1]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., [2]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Med. Sci. tech., Shinshu Univ.)

Alkalihalobacillus 属の多くは好アルカリ性 pH9～10 付近で最適な生育をする。この一部には、アルカリ性酵素を生産する種やプロバイオティクスとして用いられる種が存在し、産業上の関心が高い。しかし、この属の細菌の多くは形質転換効率が低く、研究や育種における課題となっている。
そこで本研究では接合伝達を用いた *Alkalihalobacillus* 属への遺伝子導入法の確立を目的とした。
接合伝達とは、細菌同士の接触により膜貫通蛋白質を介して DNA の伝達が行われる現象である。
本研究では、Ⅳ型接合伝達システムを利用した。本システムは、接合伝達の中でも応用的知見が集積しているシステムであり、T4SS(Type Ⅳ secretion system)を介した物理的な貫通により、様々な菌に対して適用可能であると報告されている。RP4 の接合伝達関連遺伝子を持つ pUB307 をヘルパープラスミド、大腸菌-枯草菌間シャトルベクターpHY300PLK に RP4 の伝達起点配列である *oriT* を組み込んだ pSEB104 をモバイルプラスミドとして用いた。今回、大腸菌から *A. clausii* へ pSEB104 の伝達を確認し、接合伝達効率の評価を行った結果を報告する。

Many of *Alkalihalobacillus* are alkaliphilic and grow optimally around pH 9-10.
Some of them produce industrial applicable enzymes. Furthermore, some produce antimicrobial compounds for the manufacturing of probiotics. Therefore, this genus is getting industrial attention. This genus shows a low transformation efficiency and has difficulty on breeding. The aim of this study is to establish a gene transfer method for *Alkalihalobacillus sp.* using conjugation. Conjugation is a phenomenon of DNA transmission through transmembrane proteins and caused by physical contact between bacteria. In this study, we used a kind of conjugation system which is called Type Ⅳ secretion system(T4SS). T4SS is applicable on a wide range of bacteria. We use a helper plasmid pUB307 derived from RP4, a typical plasmid causing T4SS conjugation. We designed a plasmid(pSEB104) as a mobile/target plasmid by inserting the RP4 origin of transfer sequence(*oriT*) into the *E. coli-B. subtilis* shuttle vector pHY300PLK.
We confirmed that the transmission of pSEB104 from *E. coli* to *A. clausii* has occur. Furthermore, we report the results of conjugation efficiency.

conjugation, alkaliphilic, *Alkalihalobacillus*

発表責任者：網島健太（21bs102d@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A05-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

性線毛先端タンパク質は接合伝達における受容菌選択に関与する

The tip protein of conjugative pili is involved in the recipient selectivity in plasmid conjugation

○杉山 京佳[1]、作田 郁子[1]、高島 綾[1]、河野 響[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]([1]東大院・農生科・AgTECH、[2]東大・微生物連携機構)
○ Kyoka SUGIYAMA[1], Ayako Sakuda[1], Aya Takashima[1], Hibiki Kawano[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1,2], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】当研究室の以前の研究で、細菌集団中での接合伝達では供与菌の周囲に複数の受容菌群が存在していることを想定し、その最小単位として一種類の供与菌に対して二種類の受容菌の混合菌群を用いた実験系 (1:2 接合実験系) が構築された。1:2 接合実験の結果、供与菌と同種の受容菌の存在により異種の受容菌への接合伝達頻度が下がる現象が見いだされていた [*mSphere* **3:** e00490-18 (2018)]。ナフタレン分解プラスミド NAH7 ではこの傾向が強く、受容菌を「選択」していると考えられた。過去の報告から、NAH7 の接合伝達を担う性線毛先端タンパク質 MpfD が受容菌との接触を促進することが示唆されたことから[*Microbiology* **153:** 3766-3775 (2007)]、本研究では MpfD が NAH7 の受容菌選択性に寄与する可能性を評価した。

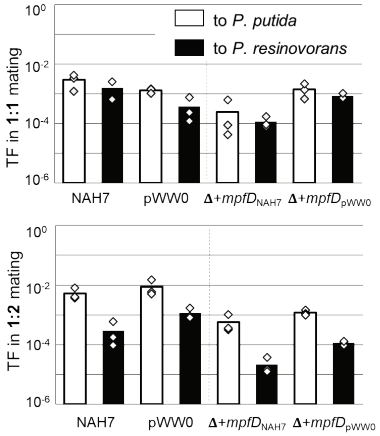


図. *P. putida* を供与菌として用いた 1:1 および 1:2 接合実験 グラフ下部に供与菌の保持するプラスミドを示す。

【方法】供与菌の保持する NAH7 上の *mpfD* 遺伝子を破壊し、接合実験に供したところ、接合伝達頻度は検出限界以下となった。そこで NAH7Δ*mpfD* を保持した供与菌に NAH7 由来の *mpfD* を相補し、1:1 および 1:2 接合実験を行った。加えて、NAH7 と同じ不和合性群に属する、受容菌選択性の低いプラスミド pWW0 由来の *mpfD* を相補した場合の接合実験も行い、MpfD の違いが受容菌選択性に与える影響を評価した。

【結果・考察】1:1 接合実験の結果、両プラスミドの *mpfD* のいずれを相補した場合でも NAH7Δ*mpfD* の接合伝達頻度 (図中 TF) は回復した (図上)。1:2 接合実験では、NAH7 に比べて pWW0 由来の MpfD を相補した場合に受容菌選択性が低下する現象（接合伝達する相手の偏りが少なくなる現象）が見られた (図下)。この結果から、MpfD の違いが受容菌選択性を決定づけていることが示された。

When two different species recipients coexist, some plasmids dominantly transferred to the same species than different one. Such tendency was especially high in NAH7, suggesting that NAH7 selects preferable recipient [*mSphere* **3:** e00490-18 (2018)]. We hypothesized that the tip protein of conjugative pili, MpfD, is involved in the recipient selectivity. As a result of the mating assay using *mpfD*-deficient NAH7, the plasmid transfer became negligible. By complementation of *mpfD*, the transfer of NAH7Δ*mpfD* was restored. Interestingly, when *mpfD* of plasmid pWW0, which shows low recipient selectivity, was complemented, the recipient selectivity decreased. This result indicated that difference in MpfD contributes to the recipient selectivity.

horizontal gene transfer, plasmid, conjugative pili

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム A

代謝ネットワーク形成プロセスと微生物共存

The assembly order of metabolic network is key to enable multispecies coexistence

○鈴木 研志[1,5]、上原 悠太郎[2]、栗栖 太[3,5]、野尻 秀昭[4,5]（[1]東大院・農生科、[2]東大院・工・都市工、[3]東大院・工・水環セ、[4]東大院・農生科・アグテック、[5]東大・CRIIM）
○Kenshi SUZUKI[1,5], Yutaro UEHARA[2], Futoshi KURISU[3,5], Hideaki NOJIRI[4,5] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]Grad. Sch. Eng. Dept. Urban Eng., UTokyo, [3]Grad. Sch. Eng. Res. Ctr. WET., UTokyo, [4]Grad. Sch. Agric. Life Sci., AgTECH., UTokyo, [5]CRIIM, UTokyo)

微生物は限られた資源を競合することから、環境中で共存できる微生物は資源の種数に依存すると考えられてきた。しかし、実環境には資源の数を遥かに上回る微生物が生息しており、理論的理解とは大きく乖離している。これまでに研究で、フェノールを唯一の炭素源として増殖できる異属菌株を組み合わせた連続集積培養系において、フェノールを競合しつつ代謝産物を種間で分配することで共存することが示唆されてきた。一方で、どの様な菌株の組み合わせでも共存が成立するわけではないことも明らかとなってきた。即ち、多種共存には適切な菌株の組み合わせで、種間代謝ネットワークが形成されることが必要不可欠であることが考えられた。そこで本研究では、5 種の異属フェノール分解細菌である、*Acinetobacter* C26 株、*Comamonas testosteroni* R2 株、*Cupriavidus* sp. P-10 株、*Pseudomonas* sp. LAB-08 株および *Vaeiovorax* sp. HAB-30 株を様々な順序で植菌し、群集構造変遷および細胞外代謝産物を解析することで、微生物共存機構を代謝ネットワーク形成の観点から解明することを目的とした。

上記 5 菌株の理論的な競争力を比較すると R2 株が最も高く、P-10 株、C26 株、LAB-08 株および HAB-30 株の順に低下する。そこで R2 株を第一種目とし他菌株を 6 パターンで植菌することで、フェノール競合下で代謝ネットワークが形成される様を捉えることを目指した。先ず、群集構造変遷を解析したところ、R2 株に代わって C26 株が優占化することで LAB-08 株を除く 4 種の共存が確認されたことから、C26 株が代謝ネットワーク形成の要となっていることが示唆された。しかも、植菌順序によって最終的案群集構造が異なることが明らかとなった。次に、代謝ネットワークとその形成過程を検討するため、培養上清を用いたメタボローム解析を実施した。その結果、少なくとも 22 種の代謝産物がネットワーク形成に関与していることが示唆された。また、有機酸、アミノ酸、脂肪酸等が検出されており、中央代謝に関連する代謝産物や溶菌した細胞由来の物質も菌株間で分配されていることが示唆された。以上の結果から、植菌順序、即ち、適切な代謝ネットワーク形成過程を経ることが微生物の多種共存の鍵であることが示唆された。

A synthetic microbial community using five different phenol-degrading bacterial strains (*Acinetobacter* sp. C26, *Comamonas testosteroni R2*, *Cupriavidus* sp. P-10, *Pseudomonas* sp.LAB-08 and *Variovorax* sp. HAB-30) supplemented with phenol as the sole carbon source was constructed to elucidate the fundamental principles of microbial coexistence. Although strain R2 exhibited the highest competitiveness, strain C26 became dominant and coexisted with strains R2, P-10 and HAB-30. Interestingly, the order of inoculation altered bacterial community structure at the end of incubation. Metabolome analysis using the culture supernatants indicated that these strains shared at least 22 metabolites under coexisting condition. As coexistence was not always observed, these results suggested that the assembly order of metabolic network is key to enable multispecies coexistence.

competition, coexistence, metabolic network

発表責任者：鈴木 研志（kensuzuki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A06-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

腸内細菌叢中に存在するビフィズス菌の選択的回収系の確立

Establishment of a selective recovery system for bifidobacteria in the gut microbiota

○吉田 佳鼓、嶋田 みな、宮下 聖也、前田 智也、横田 篤、吹谷 智（北大農）
○Kako YOSHIDA, Mina SHIMADA, Seiya MIYASHITA, Tomoya MAEDA, Atsushi YOKOTA, Satoru FUKIYA (Hokkaido Univ.)

ビフィズス菌はヒト腸内に生息し，宿主であるヒトに対して様々な健康有用効果を示すことが知られている．実際の腸内では，ビフィズス菌は腸内細菌叢の中で他の腸内細菌との生存競争にさらされており，腸内細菌叢存在下でのビフィズス菌の生存や定着のメカニズムについては，未だ不明な点が多い．これらのメカニズムを分子レベルで明らかにするためには，ビフィズス菌の腸内における詳細な遺伝子発現プロファイルを知ることが有効である．複雑な腸内細菌叢の中から，特定の菌種の十分な遺伝子発現プロファイルを得ることは困難であるが，遺伝子発現プロファイルを保ったまま，特定のビフィズス菌を選択的に回収することができれば，この課題を解決できる可能性がある．

そこで本研究では，通常飼育マウス腸内に定着させた *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A（105-A 株）を常在腸内細菌叢から選択的に回収する方法を確立することを目的とした．実際には，105-A 株を特異的に識別できるようにペプチドタグを細胞表層に提示することを着想し，そのタグを認識する分子を結合させた磁気ビーズを用いて，目的の細胞を回収することを目指している．これまでに最適な RNA 固定化の条件を検討し，ペプチドタグである Strep-TagIIを細胞表層に発現する 105-A 株を構築した．さらに Western blotting によりタグの発現，免疫蛍光染色により細胞表層におけるタグの提示を確認した．現在，Strep-TagII特異的結合タンパク質である Strep-Tactin で標識された磁気ビーズを用いて，実際に細胞を回収し，FISH 解析により細胞回収率の評価を進めている．

Bifidobacteria are well-known for exerting health-promoting effects on humans. However, the molecular mechanisms of their survival and colonization in the gut and host-bifidobacteria interaction have much room for clarification. A comprehensive gene expression profile of bifidobacteria in the gut is informative to clarify these issues, but acquiring it is difficult since the presence ratio of a particular bacterial species in the gut microbiota is generally low. Therefore, in this study, we try to establish a selective recovery system for *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A) from the gut microbiota of conventional mice in which 105-A colonized, along with maintaining their gene expression profile. We have examined the optimal conditions for RNA stabilization and constructed 105-A expressing Strep-TagII on the cell surface. The expression of the tag was confirmed by Western blotting and the presentation of the tag on the cell surface was confirmed by immunofluorescence staining. Currently, we are collecting cells using magnetic beads labeled with Strep-Tactin, and evaluating the cell recovery rate by FISH analysis.

Bifidobacterium, cell recovery, gut microbiota

発表責任者：吹谷 智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A06-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

好熱菌発酵産物を給与したノトバイオートマウスから単離された嫌気性細菌に関する研究

Anaerobic bacteria isolated from the gnotobiotic mice administrated with a thermophile-fermented compost

○松﨑 雄大朗[1]、宮本 浩邦[1]、児玉 浩明[1,2,3,4] ([1]千葉大園芸、[2]理研、[3]サーマス(株)、[4]日環科学(株))
○Yutaro MATSUZAKI[1], Hirokuni MIYAMOTO[1], Hiroaki KODAMA[1,2,3,4] ([1]Chiba Univ., [2]RIKEN, [3]Sermas Co.,Ltd, [4]Japan Eco science Co.,Ltd.)

好熱菌発酵産物とは、未利用海産資源を高温・好気的条件で発酵させた発酵飼料であり、家畜に給与すると家畜の生産性が向上する。そこで、発酵産物プロバイオティクスバクテリア候補を探索するために、無菌マウスに発酵産物を給与したノトバイオートマウスの盲腸糞から、好気条件下で生育する *Bacillus coagulans*、*Bacillus hisashii* が単離されている(J.Appl. Microbiol.,2013)。今回、当該盲腸糞から新たに嫌気条件下で生育するバクテリアについて単離同定を行ったので報告する。単離されたバクテリアは、藍染に用いられる藍の発酵過程から単離されたインジゴ還元能を持つ好熱菌 *Clostridium isatidis* 近縁菌であり、グラム陽性の芽胞菌であった。また、好熱菌発酵産物抽出液からも同様の培養条件下において、*C. isatidis* が単離同定され、好熱菌発酵産物には当該菌種が含まれることが明らかになった。*in vitro* 培養試験により、*C.isatidis* は、酪酸産生菌である *C. butyricum* に近縁であるが、酪酸は産生せず、主に酢酸を産生することが明らかになった。

A thermophile-fermented compost is made from marine animal resources under aerobic conditions. This compost improves the fecundity of pigs and chickens. Several probiotic bacteria, such as Bacillus hisashii and Bacillus coagulans, have been isolated from the cecal samples of the gnotobiotic mice that had been administrated with this compost. These two Bacillus species were identified under the aerobic culture condition (J.Appl. Microbiol.,2013). Here, we report the isolation of anaerobic bacteria from the cecal samples of the gnotobiotic mice. The resultant isolated bacteria are identified as Clostridium isatidis, which had been isolated from the fermentation process of blue dye plants. The isolated C. isatidis, which is a gram-positive, spore-producing bacterium, contributes to indigo metabolism and mainly produces acetate under the in vitro culture condition.

thermophile-fermented compost, Clostridium, anaerobic bacteria

発表責任者：松崎雄大朗（ahga3672@chiba-u.jp）

講演番号：2A06-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

高脂肪食摂取ラットにおける盲腸内脂肪酸プロファイルの変化が腸内細菌叢構成に与える影響の解明：脂肪酸仮説の検証

Elucidation of the effects of the fatty acid profile changes on the gut microbiota composition in the cecum of rats fed a high-fat diet: validation of a fatty-acid hypothesis

○川上 憲太郎[1]、B. Gowda Siddabasave Gowda[2]、Chen Zhen[2]、吹谷 智[1]、Liang Chongsheng[2]、Hai Han[2]、石塚 敏[1]、小椋 義俊[3]、後藤 恭宏[4]、前田 智也[1]、林 哲也[4]、千葉 仁志[5]、惠 淑萍[2]、横田 篤[1]（[1]北大院農、[2]北大院保、[3]久留米大医、[4]九大院医、[5]札幌保医大栄）

○ Kentaro KAWAKAMI[1], Siddabasave Gowda B. Gowda[2], Zhen Chen[2], Satoru FUKIYA[1], Chongsheng Liang[2], Han Hai[2], Satoshi ISHIDSUKA[1], Yoshitoshi OGURA[3], Yasuhiro GOTOH[4], Tomoya MAEDA[1], Tetsuya HAYASHI[4], Hitoshi CHIBA[5], Syukuhei KEI[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ., [2]Dept. Health Sci., Sch. Med., Hokkaido Univ., [3]Kurume Univ., [4]Kyusyu Univ., [5]Sapporo Univ. Health Sci.)

脂質を過剰に含む高脂肪食の摂取は，肥満や代謝関連疾患の発症のみならず，腸内細菌叢の特異的な変化を引き起こす．我々はこれまでに，高脂肪食の摂取に伴う盲腸内総胆汁酸濃度の増加が菌叢変化に与える影響を明らかにしてきたが，存在量が変化した全ての腸内細菌種が胆汁酸の影響を受けたわけではない．このことから我々は，胆汁酸以外の腸内細菌叢に影響を与える因子として，高脂肪食に多量に存在し，胆汁酸と同様に抗菌活性を示すとされる遊離脂肪酸に着目した．遊離脂肪酸が腸内細菌叢に与える影響についてはこれまで十分に解明されていない．そこで本研究では，高脂肪食摂取時に盲腸内容物に含まれる遊離脂肪酸が腸内細菌叢に与える影響を解明することを目的とした．
5 週齢の WKAH/Hkm Slc 雄性ラットを基準食群，23%ラード含有高脂肪食群（HL 群）の 2 群に分類し，8 週間飼育した．解剖時に盲腸内容物を採取し，遊離脂肪酸分析を行った結果，HL 群において脂肪酸濃度の有意な増加が確認された．また，脂肪酸濃度とメタ 16S 菌叢解析により得られた各菌種の相対存在量との相関解析を行った結果, 菌叢中の 26.6%の菌が脂肪酸濃度とのみ有意な相関を示した．現在，遊離脂肪酸が高脂肪食摂取時の菌叢変化に関与していることを検証すべく，HL 群において有意に増加した 5 種類の遊離脂肪酸をラットに与えた飼育試験を行い, 盲腸内容物の分析を進めている．

Ingestion of a high-fat diet (HFD) causes not only metabolic disorders but also specific changes in the gut microbiota. We have focused on bile acids (BAs) as one of the regulators of the gut microbiota during HFD intake. However, not all bacterial species have been affected by cecal BAs during HFD intake. Therefore, we focused on fatty acids (FAs) that show antibacterial activity. In this study, we aimed to clarify the influence of FAs on the change of gut microbiota by HFD. Twelve of 5-week-old WKAH/Hkm Slc male rats were classified into two groups (n = 6 each): a control group fed the AIN-93G control diet and an HL group fed HFD containing 23% lard, then feeding tests were conducted for 8 weeks. As a result, free FA concentration was significantly increased in the cecal contents of the HL group. Also, correlation analysis between the free FA concentration and the relative abundance of each bacterial species identified in the meta-16S microbiota analysis revealed that 26.6% of the bacteria in the gut microbiota showed a significant correlation only with the free FA concentration. We are conducting a second feeding test to verify whether free FAs are involved in the cecal microbiota modulation by feeding 5 types of free FAs that were significantly increased in the HL group.

gut microbiota, fatty acids, bile acids

発表責任者：吹谷　智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A06-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

ヒト腸内常在酪酸産生菌 *Roseburia intestinalis* の増殖はタマリンドシードガム酵素分解物により選択的に促進される

Growth of human intestinal indigenous butyrate-producing *Roseburia intestinalis* is selectively promoted by enzymatic degradation product of tamarind seed gum

○尾藤 あやか[1]、網 優太[1]、山西 健太[2]、中井 梨歩[1]、平野 里佳[1,3]、宇野 陽一郎[2]、栗原 新[1]([1]近畿大・生物理工、[2]DSP 五協フード＆ケミカル(株)、[3]石川県大・生資環)
○Ayaka BITO[1], Yuta AMI[1], Kenta YAMANISHI[2], Riho NAKAI[1], Rika HIRANO[1,3], Yoichiro UNO[2], Shin KURIHARA[1] ([1]Kindai Univ., [2]DSP GOKYO FOOD & CHEMICAL Co., Ltd., [3]Ishikawa Prefect. Univ.)

腸内常在菌叢は様々な疾患と深く関連することが報告されており、制御法が開発されれば人類の健康寿命は大きく伸長すると考えられる。タマリンドシードガムは、熱帯～亜熱帯に生育するタマリンドの種子から分離・精製された多糖類で、増粘剤として多くの食品で使用されており、ヒトの消化酵素では分解されない構造を有しているため一部は大腸まで到達すると考えられる。本研究では、タマリンドシードガムおよびその酵素（セルラーゼ・ガラクトシダーゼ）分解物がヒト腸内常在菌の増殖に与える影響について解析した。

タマリンドシードガムおよびその酵素分解物（TSGD）を糖除去 GAM 培地に添加し、ヒト腸内常在菌叢再優勢 32 種の生育に与える影響を試験したところ、TSGD がヒト常在酪酸産生菌である *R. intestinalis* の増殖を特異的に促進した。次に、様々な腸内細菌の共存下における TSGD の *R. intestinalis* に対する増殖促進効果を解析する目的で、ヒト糞便培養を行った (n = 10)。培養後の *R. intestinalis* の菌数を定量 PCR にて解析したところ、TSGD は糞便由来細菌共存下においても統計学的に有意に *R. intestinalis* の増殖を促進した。

It has been reported that intestinal indigenous microbiota is deeply related to various diseases, and if control methods are developed, the healthy life span of human would be greatly extended. Tamarind seed gum is a polysaccharide isolated and refined from the seeds of the tamarind plant, which grows in tropical and subtropical regions, and is used in many foods as a thickening agent. In this study, we analyzed the effects of tamarind seed gum and its enzymatic (cellulase and galactosidase) degradation products on the growth of human intestinal indigenous bacteria.

The effect of tamarind seed gum and its enzymatic degradation products (TSGD) on the growth of 32 dominant species of human intestinal microbiota was tested by adding tamarind seed gum and TSGD to sugar-free GAM medium. Next, human fecal culture was performed to analyze the growth-promoting effect of TSGD on *R. intestinalis* in the presence of various intestinal bacteria (n = 10). Quantitative PCR analysis for the number of *R. intestinalis* after incubation showed that TSGD promoted statistically significantly the growth of *R. intestinalis* even in the presence of fecal-derived bacteria.

probiotic, *Roseburia intestinalis*, prebiotic

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2A06-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

ヒト腸管細胞と腸内優占 *Bacteroides* 属細菌との宿主粘液物質を介した接着と相利共生
Adhesion and mutually beneficial symbiosis *via* host mucosubstances between human gut cells and dominant *Bacteroides* species

○幸田 有希渚[1]、梶川 幹太[1]、佐藤 賢宏[1]、髙瀬 隆一[1]、渡辺 大輔[2]、橋本 渉[1]([1]京大院・農、[2]奈良先端大・バイオ)
○ Yukina KOUDA[1], Kanta KAJIKAWA[1], Masahiro SATO[1], Ryuichi TAKASE[1], Daisuke WATANABE[2], Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Div. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Technol.)

【背景と目的】ヒト腸管では、上皮細胞から種々の粘液物質［ムチンやグリコサミノグリカン（GAG）］が分泌されている。ムチンを主成分とする粘液層には多種多様な細菌が常在し、腸内細菌叢を形成している。当研究室では、ヒト腸内に優占する *Bacteroides* 属細菌が粘液物質資化性を示すこと、及びその代謝産物としてヒトに有益な短鎖脂肪酸や必須アミノ酸を分泌することを見出し、ヒトと *Bacteroides* 属細菌との相利共生モデルを提案している。本研究では、相利共生に関わる分子機構を解明するため、*Bacteroides* 属細菌による腸管上皮モデル細胞の増殖促進と両者の相互作用を評価した。
【方法と結果】*Bacteroides* 属細菌（*B. ovatus* と *B. thetaiotaomicron*）をムチンまたはヒアルロン酸（HA：GAG の一種）を含むヒト培養細胞用培地で生育させ、その培養濾液をヒト腸管由来 Caco-2 細胞に供した。その結果、ムチンと HA のそれぞれの培養濾液は、Caco-2 細胞の増殖を促進した。なお、ムチンと HA を資化できない *B. vulgatus* の培養濾液では、その増殖促進は観察されなかった。また、*B. ovatus* は HA を介して、*B. thetaiotaomicron* はムチンを介して、Caco-2 細胞単層膜に接着することが示唆された。以上より、*Bacteroides* 属細菌はヒト粘液物質を定着・資化の標的として腸内優占性を示し、ヒト腸管上皮細胞と密接な相利共生関係にある可能性を明らかにした。

[Background and objectives] In human gut, different mucosubstances such as mucin and glycosaminoglycan (GAG) are secreted from epithelial cells. A large number of bacteria constitute a gut microbiota in mucus layer containing major component mucin. In our laboratory, *Bacteroides* species dominant in human gut have been found to assimilate these mucosubstances and subsequently secrete short-chain fatty acids and essential amino acids, postulating mutually beneficial symbiosis between human and *Bacteroides* species. In this study, we evaluated proliferation of human gut epithelial model cells by *Bacteroides* species and host-bacteria interaction.
[Methods and results] *Bacteroides* species (*B. ovatus* and *B. thetaiotaomicron*) were grown in human cell culture medium containing mucin or hyaluronan (HA, a kind of GAGs) and the resultant culture supernatant was subjected to Caco-2 cells derived from human gut. Each supernatant was found to promote the human gut cell growth, while no promotion of Caco-2 cell growth was observed in the case of *B. vulgatus* assimilating neither mucin or HA. *B. ovatus* and *B. thetaiotaomicron* cells attached to monolayer of Caco-2 cells *via* HA and mucin, respectively. These results demonstrated the possibility that *Bacteroides* species targeting mucosubstrances for assimilation and adhesion showed dominancy in gut and mutually beneficial symbiosis with human gut cells.

Bacteroides, gut, mucosubstance

発表責任者：橋本　渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A06-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

モンゴル国における 2 型糖尿病肥満者と非 2 型糖尿病肥満者の腸内細菌叢の比較

Comparison of gut microbiota between diabetic and non-diabetic obese Mongolian

○篠田 あかり[1]、ラハクバジャウ ツォクトバートル[2]、三島 梨子[1]、ジャムヤン ドゴースレン[2]、デンベレル シルチン[2]、中山 二郎[1] ([1]九大院農、[2]モンゴル生命科学大学)
○ Akari SHINODA[1], Tsogtbaatar LKHAGVAJAV[2], Riko MISHIMA[1], Dugersuren JAMYAN[2], Shirchin DEMBEREL[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., [2]Mongolian University of life Sciences)

【背景】肥満は 2 型糖尿病の発症リスク因子の一つである。さらに腸内細菌叢がそれら生活習慣病に関連することが知られている。モンゴル国は畜産品を中心とする高脂質・高動物性タンパク質の食生活を中心とし、肥満者が多いにも関わらず、2 型糖尿病患者が少ない（糖尿病患者=10.4%, 肥満者=17.2%, NCD Risk Factor Collaboration,2010)。そこで我々は、モンゴル人の腸内細菌叢に 2 型糖尿病の発症リスク低減機能が存在すると作業仮説を立て、モンゴル国の非 2 型糖尿病肥満者と 2 型糖尿病肥満者の腸内細菌叢の比較を行うことにした。
【方法】モンゴル国の非 2 型糖尿病肥満者(n=43)と 2 型糖尿病肥満者(n=21)より糞便を採取した。そして、それらのサンプルの 16S rRNA アンプリコン解析により細菌組成データを得た。また、NMR 解析により便中の各種短鎖脂肪酸量、LC-MSMS にて各種胆汁酸量を測定し、ノンパラメトリック群間比較解析を行った。
【結果・考察】腸内細菌組成比較より、非 2 型糖尿病肥満者においては短鎖脂肪酸生産菌として知られる、*Faecalibacterium* と *Bifidobacterium* の存在量が高い傾向が見出された。さらに、非 2 型糖尿病肥満者の糞便中には、抗糖尿病作用が知られる短鎖脂肪酸（特に酢酸）量およびタウロウルソデオキシコール酸（TUDCA）が多い傾向が見られた。以上より、これら短鎖脂肪酸や胆汁酸がモンゴル国の肥満者において抗糖尿病効果を示すことが示唆された。

【Background】Although obesity is one of risk factors for type 2 diabetes mellitus (T2DM), the ratio of obese population to T2DM population is relatively low in Mongolia. We suspected that gut microbiota may play a role for this Mongolian paradox. To answer the paradox, we did cross-sectional study to compare gut microbiome and metabolome between obese subjects with and without T2DM.
【Method】Fecal samples were collected from non-T2DM obese subjects(n=43) and T2DM obese subjects(n=21). The fecal bacterial composition was analyzed by 16S rRNA gene amplicon sequencing and compared between these groups using non-parametric comparative analysis. Also, short chain fatty acids (SCFAs) and bile acids which are main metabolites of the intestinal microbiota were measured by NMR and LC-MSMS, respectively.
【Result and Discussion】As a result of fecal microbiome analysis, SCFA-producing bacteria such as *Faecalibacterium* and *Bifidobacterium* were more abundant in non-T2DM obese subjects. As a result of metabolome analysis, SCFAs, especially acetate, and tauro-ursodeoxycholic acid were more abundant in the samples of non-T2DM obese people. These results suggest that these metabolites play anti-diabetic roles in Mongolian obese people.

Gut microbiota, Obese, Type 2 diabetes

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A06-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

ダニ由来乳酸菌の単離ならびに共生微生物叢の解析

Isolation of lactic acid bacteria from mites and bacterial community analysis

○櫻間 晴子[1]、清水 伸泰[1]、坂本 文夫[1,2]、萩下 大郎[1] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]京都ニホンミツバチ研究所)
○Haruko Sakurama[1], Nobuhiro Shimizu[1], Fumio Sakamoto[1,2], Tairo Hagishita[1] ([1]Kyoto Univ. of Adv. Sci., [2]Kyoto apis cerana japonica Lab.)

【目的】共生微生物が産生する酵素や代謝産物は，「未知有用物質の宝庫」として注目されてきている．近年，様々な動物が微生物との共生関係を進化させることで，多種多様な環境で生育するのに必要な適応能力を高めている事例が報告されるようになってきた．そこで，本研究では，節足動物である 3 種のダニに着目し，これらの共生微生物とその諸性質を明らかにすることを目的とした．
【方法】累代飼育している *Carpoglyphus lactis*（サトウダニ）ならびに，*Sancassania* sp. sasagawa（ササガワダニ），*Cosmoglyphus hughesi*（ヘラゲアシナガダニ）を使用した．乳酸菌の単離は，炭酸カルシウム含有 MRS 培地を用いた．単離された菌株からゲノムを調製し，16S rDNA 配列解析により菌種を推定した．また，これらダニから，直接，ゲノムを採取し，V3-V4 領域を標的とした 16S メタゲノム解析を実施することで菌叢解析を行った．単離した乳酸菌の資化性や各種酵素の活性は，アピ 50CH やアピザイム（ビオメリュー社製）を使用した．
【結果と考察】ササガワダニとヘラゲアシナガダニから *Lactobacillus plantarum* の類縁菌が単離された．一方で，サトウダニから乳酸菌は単離されなかった．さらに，菌叢解析を行ったところ，ササガワダニとヘラゲアシナガダニは，*Lactobacillus* 属がそれぞれ 99.3%と 88.3%存在する極端に単純化した菌叢であった．一方で，サトウダニは，*Sphingomonas* 属（30.2%）や *Methylobacterium* 属（14.4%），*Cutibacterium* 属（10.5%）などを主とする様々な菌種から形成されていた．現在，取得した乳酸菌の諸性質を解析中である．

【Introduction】There is currently great interest in enzymes and metabolites produced by symbiotic bacteria as a bioresource. In this study, we showed the bacterial communities of *Carpoglyphus* lactis, *Sancassania* sp. Sasagawa, and *Cosmoglyphus hughesi*, and the characterization of their symbiotic bacteria.
【Results and Discussion】*Lactobacillus plantarum* relatives were isolated from *S.* sasagawa and *C. hughesi*, but not *Carpoglyphus lactis*. Next generation sequencing showed the bacterial community of *C. lactis* was mainly dominated by members of *Sphingomonas* (30.2%), *Methylobacterium* (14.4%) and *Cutibacterium* (10.5%). Interestingly, the bacterial communities of *S.* sasagawa and *C. hughesi* were dominated by lactic acid bacteria, primarily *Lactobacillus*, which represented 88.3% and 99.3% of the bacterial population in *S.* sasagawa and *C. hunghesi*, respectively. The characterization of isolated lactic acid bacteria is now under investigation.

symbiotic bacteria, lactic acid bacteria, bacterial community

発表責任者：櫻間晴子（sakurama.haruko@kuas.ac.jp）

講演番号：2A06-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

害虫と共生細菌にみる相互協力的な農薬解毒メカニズム

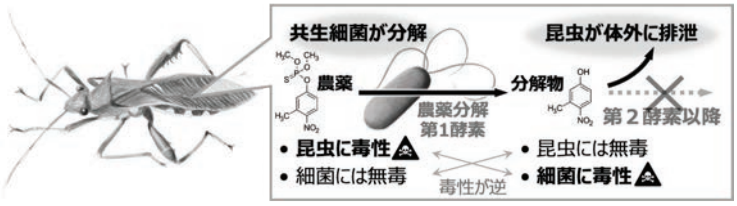
Reciprocal insecticide detoxification via host-symbiont cooperation

○佐藤 由也[1]、ジャン ソンハン[2,3]、竹下 和貴[4]、伊藤 英臣[2]、小池 英明[2]、多胡 香奈子[5]、早津 雅仁[5]、堀 知行[1]、菊池 義智[2,3]（[1]産総研・環境創生、[2]産総研・生物プロセス、[3]北大・農、[4]秋田県立大・生物資源、[5]農研機構・農業環境）

○Yuya SATO[1], Seonghan JANG[2,3], Kazutaka TAKESHITA[4], Hideomi ITOH[2], Hideaki KOIKE[2], Kanako TAGO[5], Masahito HAYATSU[5], Tomoyuki HORI[1], Yoshitomo KIKUCHI[2,3] ([1]AIST EMRI, [2]AIST BPRI, [3]Hokkaido Univ, [4]Akita Pref Univ, [5]NARO)

異なる 2 種が共生することで、ときに生物は全く新しい機能を獲得する。これまでに我々は、農業害虫のカメムシ類が農薬分解菌 *Burkholderia* sp.を体内に共生させることで、昆虫自身までもが農薬抵抗性になるという現象を見出していた[1]。しかし、農薬の分解経路や、腸内共生細菌が宿主カメムシに農薬抵抗性を賦与する具体的なメカニズムはわかっていなかったため、その解明に挑んだ。

はじめに共生細菌 *Burkholderia* sp. SFA1 株の *in vitro* 条件における農薬（フェニトロチオン）分解経路を、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、および遺伝子破壊実験によって解明した。次に *in vitro* 毒性試験において、本菌は農薬を資化できるにもかかわらず、農薬の第一分解産物である 3-methyl-4-nitrophenol（3M4N）が本菌にとって有毒であることを明らかにした。一方で、分解産物の 3M4N はカメムシには無毒であり、共生細菌とカメムシでは毒性物質が逆になっていることがわかった。このことから、共生時（*in vivo* 条件）には、カメムシに有毒な農薬を共生細菌が分解し、共生細菌に有毒な分解産物（3M4N）をカメムシが代謝するという、「相互協力的な農薬解毒機構」が成立する可能性を着想した。この仮説を検証するため、SFA1 株共生状態のカメムシに農薬を投与し、*in vivo* 条件の共生細菌についてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、カメムシ体内では農薬分解経路の第一酵素のみが発現し、3M4N を代謝する第二酵素以降は発現しないことが明らかとなり、上述の仮説が支持された。さらに、各種遺伝子破壊株を共生させたカメムシの農薬抵抗性を評価することで、農薬分解経路のうち最初の反応を触媒する酵素遺伝子だけあれば、カメムシに農薬抵抗生が付与されることが分かった。農薬解毒を巡る利害の一致により、カメムシと共生細菌がユニークな「相互協力的な農薬解毒機構」を作り上げ、これらが共生関係の維持と効率的な農薬解毒に大きく寄与している可能性が考えられる[2]。



Insecticide resistance of pest insects represents a serious problem for agriculture. Using transcriptomics and reverse genetics, we here demonstrated that gut symbiotic bacteria degrade an insecticide (fenitrothion) using a horizontally acquired insecticide-degrading enzyme into the non-insecticidal but bactericidal compound 3-methyl-4-nitrophenol (3M4N), which is subsequently excreted by the host insect. This sophisticated “host-symbiont reciprocal detoxification relay” would enable the simultaneous maintenance of symbiotic relationship as well as efficient insecticide degradation.

【参考文献】[1] Kikuchi et al., “Symbiont-mediated insecticide resistance”, ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 2012; [2] Sato et al., “Insecticide resistance by a host-symbiont reciprocal detoxification”, ***Nat Commun***, 2021

symbiosis, insecticide resistance, host-symbiont cooperation

発表責任者：佐藤由也（yuya-satou@aist.go.jp）

講演番号：2A06-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

草本堆肥の堆肥化過程における微生物群集変化

Changes in microbial communities during the composting process of weed

○松永 理佳[1]、Akter Chowdhury Sharmin[2]、Ibne Baki MD. Zakaria[2]、Asiloglu Rasit[1]、鈴木 一輝[3]、原田 直樹[4]（[1]新潟大農、[2]新潟大院自、[3]新潟大超域、[4]新潟大自）
○RIKA MATSUNAGA[1], Sharmin Akter Chowdhury[2], MD. Zakaria Ibne Baki[2], Rasit Asiloglu[1], Kazuki Suzuki[3], Naoki Harada[4] ([1]Niigata Univ., [2]Gra. Sch. of Sci. and Technol. Niigata Univ., [3]Institute for Research Promotion Niigata Univ., [4]Institute of Sci. and Technol. Niigata Univ.)

堆肥化は、家畜排せつ物や作物残渣、樹木剪定枝や樹皮、雑草等の有機廃棄物の有効な利用方法のひとつである。堆肥化は発酵過程であり、微生物（主に細菌と菌類）が易分解性画分の分解に重要な役割を果たす。本研究では、市民回収で収集された雑草を原料とした草本堆肥の堆肥化過程における微生物群集の経時変化を調べた。堆肥化は屋外堆積発酵とし、発酵期間は 2019 年 4 月 30 日～2021 年 4 月 26 日（733 日間）とした。発酵中はブルーシートで覆い、1 度積み替えを実施した。試料採取は 11 回行い、採取試料から DNA を抽出してアンプリコンシーケンス解析により細菌と菌類群集を調べた他、化学性分析を行った。その結果、発酵期間中の細菌と菌類の群集組成は大きく変化することが示された。細菌では、堆肥化初期にはフィルミクテス門が優占したが、その後その割合は減少した。糸状菌では、子嚢菌門のユーロチウム菌綱が堆肥化前期に、フンマタカビ綱は後期に増加する傾向が見られた。また、堆肥化期間中の微生物数・種類が堆肥温度と関連している可能性が示唆された。これは、堆肥の理化学性と微生物群集組成に深い関連があることを示唆している。

Composting is one of the most effective methods to utilize organic wastes such as livestock manure, tree trimmings, and removed/mowed weeds. The composting process is a fermentation process in which microorganisms (mainly bacteria and fungi) play an important role in the decomposition of easily degradable fractions. Fermentation of weeds was carried out for 733 days from April 30, 2019, to April 26, 2021, and compost samples at each fermentation stage were collected (11 times). DNA was extracted from the collected samples and the bacterial and fungal communities were determined by amplicon sequencing targeting the rRNA genes. In addition, chemical analyses were performed. The results showed that the relative abundance of bacteria and fungi varied greatly in each fermentation stage. In the early stage, Firmicutes accounted for most of the relative abundance, but it decreased with fermentation. Among fungi, Eurotiomycetes were abundant in the early composting stage, while Sordariomycetes showed an increasing trend towards the late composting stage. The number and types of the dominant microorganisms may be related to the composting temperature. This suggests that the microbial community structures during the composting process are closely related to changes in the physicochemical properties of the compost.

Composting, Microbial community, Bacterial diversity

発表責任者：松永 理佳（a18n045k@mail.cc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A06-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

根圏合成コミュニティにおけるマイクロバイオータ形成機構

Mechanism of microbiota organization in rhizosphere synthetic community

○頼永 萌々佳[1,2]、工藤 凱門[1,2]、西岡 智樹[3]、壽崎 拓哉[1]、玉木 秀幸[3]、竹下 典男[1,2] ([1]筑波大学生命環境、[2]微生物サステナビリティ研究センター、[3]産総研)
○ MOMOKA YORINAGA[1,2], Gamon Kudo[1,2], Tomoki Nishioka[3], Takuya Suzaki[1], Hideyuki Tamaki[3], Norio Takeshita[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]MiCS, [3]AIST)

植物根圏には、根から放出されるさまざまな成分を養分とする細菌や糸状菌が集まる。本研究では、根圏から単離した細菌・糸状菌を使用して根圏合成コミュニティーを人工的に作製し、微生物間相互作用の分子機構の解明を目指す。筑波大学圃場由来の土壌に生育させたミヤコグサの根圏から DNA を抽出して 16S rRNA、ITS のアンプリコン解析をした。並行して、根圏を粉砕し希釈平板法により糸状菌 7 株と細菌 178 株を単離した。糸状菌は ITS のアンプリコン解析で最優占種(26%)の *Fusarium oxysporum* を取得した。全細菌の 16S rRNA の配列を決定し、それらが 46 属であることが判明した。16S rRNA アンプリコン解析で 1%以上の細菌は 21 の科で、その合計は 68%であった。単離した細菌 46 属は、21 の科のうち 11 の科をカバーし、全体の 47%を占めた。ミヤコグサに糸状菌 *F. oxysporum*、細菌 46 属 152 株を接種し、栽培後に植物地上部の重量を測定する。また、根圏から DNA を抽出してアンプリコン解析を行う。合成コミュニティーにおける糸状菌・各細菌の役割を検証するため、糸状菌無し、あるいはある属の細菌を除いた新たな合成コミュニティーを用意し、アンプリコン解析・相関解析を行う。

Plant roots release a variety of components, which attract bacteria and filamentous fungi that feed on them. In this study, we aim to elucidate the molecular mechanism of microbial interactions by artificially creating a rhizosphere synthetic community using bacteria and filamentous fungi isolated from the rhizosphere. *Lotus japonicus was* grown on soil derived from university field. DNA was extracted from the rhizosphere and amplicon analyses of 16S rRNA and ITS were performed. In parallel, 7 filamentous fungi and 178 bacterial strains were isolated from the rhizosphere by the dilution plate method. *Fusarium oxysporum*, the most dominant species (26%) by ITS amplicon analysis, was obtained. All bacterial 16S rRNAs were sequenced and found to be of 46 genera. In 16S rRNA amplicon analysis, 1% or more of the bacteria were in 21 families, and the total was 68%. The 46 genera of isolated bacteria covered 11 of the 21 families, accounting for 47% of the total. *Lotus japonicus* seedlings are grown in the SynCom containing 152 strains of 46 genera bacteria with/without *F. oxysporum* and the weights of the above-ground part of the plant are measured after cultivation. In addition, DNA is extracted from the rhizosphere and 16S rRNA amplicon analysis is performed.

microbiota, synthetic community, rhizosphere

講演番号：2A06-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム A

Lactiplantibacillus plantarum LP-2 株の凝集能欠損が山廃酒母および山廃仕込清酒に及ぼす影響
Effect of deficiency in co-aggregation ability of *Lactiplantibacillus plantarum* strain LP-2 on *Yamahai-shubo* and *Yamahai-shikomi* sake

○藤原 久志、若井 芳則（黄桜株式会社）
○Hisashi FUJIWARA, Yoshinori WAKAI (Kizakura Co., Ltd.)

【目的】我々は自社の山廃酒母から桿状乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* LP-2 株を分離し、この株が酵母と凝集体を形成することを確認している。そこで本研究では、LP-2 株の凝集能欠損株を取得し、凝集能の有無が山廃酒母および山廃仕込清酒への影響について報告する。
【方法】乳酸菌は自社で分離した桿状乳酸菌 LP-2 株と Type strain の *Lp.plantarum* NBRC15891、清酒酵母は、泡なし協会 701 号(K-701)を用いた。LP-2 凝集能欠損株（LP-2Δg 株）は、液体培養した乳酸菌 LP-2 株と酵母 K-701 と混合後上清部分を回収する操作を繰返し、凝集を生じない株を取得した。
【結果と考察】LP-2Δg 株は LP-2 株と比較して、*in vitro* での清酒酵母との共凝集能と混合種バイオフィルム形成能が有意に減少した。また、LP-2Δg 株の共凝集反応時の pH や熱処理などの影響についても述べる。山廃酒母使用時には、LP-2 株と LP-2Δg 株間で香気成分に差が確認された。製成酒でも、両株間でアルコール生成量ときき酒評価に有意差が認められた。これらの差は、共凝集能の有無と関係することが示唆された。

[Purpose] We have isolated *Lactiplantibacillus plantarum* strain LP-2 from *Yamahai-shubo* employed in our brewery and this strain forms aggregates with yeast. In this study, we obtained an aggregation-deficient strain of LP-2 and reported on the effect of co-aggrigation on *Yamahai-shubo* and *Yamahai-shikomi* sake.
[Materials and Methods] Strain LP-2 isolated from our brewery and the type strain, *Lp. plantarum* NBRC15891, and non-foaming *kyokai* No. 701 (K-701) were used in this study. Strain LP-2Δg was isolated from the supernatant collected after mixing the liquid-culture of strains LP-2 and K-701 due to no significant aggregate.
[Results and Discussion] Strain LP-2Δg showed the decrease in ability to co-aggregate with sake yeast and to form mixed species biofilms *in vitro* compared to strain LP-2. The results of the *Yamahai-shubo* preparation showed that differences in aroma components were also observed between strains LP-2 and LP-2Δg. There were significant differences in the alcohol content and sake evaluation between *Yamahai-shikomi* sake samples prepared by use of the strains LP-2 and LP-2Δg. These differences were suggested to be related to the presence or absence of co-aggregation ability.

co-aggregation, Lactiplantibacillus plantarum, Yamahai-shikomi sake

発表責任者：藤原　久志（fujiwara_hisashi@kzkappa.co.jp）

講演番号：2A08-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

フッ素系不活性液体添加による細菌増殖促進メカニズムの解析

Effects of perfluorocarbons on the growth of bacteria and yeast

○細木 亮輔[1]、川田 晃士[1]、山重 貴久[2]、菊池 正二郎[3]、小川 雄一[2]、原田 昌彦[1] ([1]東北大・院・農、[2]京大・院・農、[3]兵庫医科大・先端研)

○ryosuke HOSOKI[1], Kouji Kawada[1], Yoshihisa Yamashige[2], Syojiro Kikuchi[3], Yuichi Ogawa[2], Masahiko Harata[1] ([1]Tohoku univ. grad. sch. agri, [2]Kyoto univ. grad. sch. agri, [3]Hyogo medical univ.)

大腸菌や出芽酵母は組み換え DNA やタンパク質を生産・回収する目的で広く用いられており、菌体の培養効率は目的の産物の回収量に大きく影響する。フッ素系不活性液体である Perfluorocarbons(以下 PFCs)は炭化水素の水素がフッ素に置換された化合物で、水よりも酸素溶解度が高い性質を利用して、液体呼吸や代替血液の候補として研究が盛んに行われてきた。また、細胞や大腸菌の培養に添加することで、これらの増殖が亢進されることが報告されている。しかし、PFCs に溶解した酸素がこの増殖亢進効果の原因であるかどうかは十分に検討されてこなかった。そこで本研究では、PFCs が細菌・細胞増殖亢進に作用するメカニズムを明らかにすることを目指し、まず溶存酸素量の少ない PFCs が大腸菌(DH5α株)の増殖を亢進するかについて解析を行った。その結果、低酸素化した PFCs を大腸菌培養に添加した場合においても大腸菌の増殖の亢進が観察された。この結果は、PFCs による大腸菌増殖促進効果は、溶存酸素が原因ではないことを示している。

また、出芽酵母(BY4741 株)の培養に PFCs を添加した場合においても増殖を顕著に亢進することが示され、特に酵母の好気呼吸過程中での増殖を亢進していることが示唆された。現在、PFCs の添加による細菌の増殖亢進メカニズムについてより詳細な解析を進めている。

E. coli and budding yeast are widely used to produce recombinant DNA and proteins, and the culture efficiency of the cells affects the yield of the products. Chemical inert perfluorocarbon solvents, called PFCs, were researched in liquid breathing and blood substitute because of their oxygen solubility. Also, it has been reported that PFCs improves the growth of bacteria and cultured animal cells. However, it has not been examined whether oxygen dissolved in PFCs is responsible for the improvement of cell growth. Here, we demonstrated the hypoxic PFCs improved the growth of *E. coli* (Dh5α). We additionally revealed PFCs improved the growth of budding yeast (BY4741).

PFCs, proliferation

講演番号：2A08-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

Perfluorocarbon の増殖促進効果メカニズム：アセテートの増殖抑制効果に対する影響の解析

Mechanism analysis of the grow-promoting effect of perfluorocarbon: Effects on the growth inhibition by acetate.

○川田 晃士[1]、細木 亮輔[1]、山重 貴久[2]、菊池 正二郎[3]、小川 雄一[2]、原田 昌彦[1]([1]東北大・農、[2]京都大・院・農、[3]兵庫医科大・先端研)
○ Koji KAWADA[1], Ryosuke HOSOKI[1], Yoshihisa YAMASHIGE[2], Shojiro KIKUCHI[3], Yuichi OGAWA[2], Masahiko HARATA[1] ([1]Tohoku University, [2]Kyoto University, [3]Hyogo College of Medicine)

細菌の培養において培地に添加したフッ素系不活性液体である perfluorocarbons(以下 PFCs)が増殖を促進することが知られており、その促進効果は PFCs に溶解した酸素によるものとこれまで考えられてきた。しかし、当研究室ではこれまでに溶存酸素を窒素の吹込みにより低酸素化した PFCs を培地に添加した場合でも細菌の増殖を促進することを見出しており、この結果は PFCs の増殖促進効果が培地中の溶存酸素量に起因しないことを示唆している。

本研究では、大腸菌が代謝副産物として排出するアセテートが大腸菌の増殖を阻害することに着目し、アセテートの増殖抑制効果の緩和によって、PFCs が増殖促進に寄与している可能性を考えた。アセテートと PFCs の両方を培地に添加して大腸菌(DH5α)の増殖速度を測定することで仮説の検証を行った。その結果、PFCs の有無に関わらず、アセテートの増殖抑制効果の緩和は観察されなかったため、PFCs の増殖促進は、アセテートによる増殖抑制効果の緩和ではないことが示された。現在は、PFCs の添加による細菌増殖促進メカニズムについて、より詳細な解析を進めている。

Perfluorocarbons (PFCs) improve the growth of bacteria as additives to culture media. It has been considered that the growth-promoting effect of PFCs is attributed to enhanced oxygen transfer by PFCs. However, our study showed that, even though the dissolved oxygen in PFCs was removed by nitrogen injection, PFCs still improved bacterial growth. Considering this result, we conclude that the growth-promoting effect of PFCs is not caused by facilitating oxygen transfer.

Escherichia coli produces acetate during its growth, and the secreted acetate negatively affects cell growth. We hypothesized that PFCs improve the growth of bacteria by reducing the inhibitory effect of the secreted acetate. We analyzed the growth rate of *E. coli* (strain DH5α) in a culture medium including both acetate and PFCs. It was found that PFCs did not reduce the growth inhibitory effect of acetate, and this finding supports the hypothesis.

perfluorocarbon, acetate, growth

発表責任者：川田　晃士（koji.kawada.r2@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A08-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

希少糖、芽胞の新規な発芽誘起物質、その活性制御機構

Rare sugars, novel germination-inducing substances for spores, and their active regulatory mechanisms

○坂元 仁[1,2]、朝田 良子[1,3]、古田 雅一[1,3]、土戸 哲明[1] ([1]府大微制研、[2]関大化生工、[3]府大院工)
○ Jin Sakamoto[1,2], Ryoko Asada[1,3], Masakazu Furuta[1,3], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]Res.Ctr. Microoganism Ctrl., Osaka Pref. Univ., [2]Fac. Chem.,Matl. & Bioeng. Kansai Univ., [3]Quantum & Radiat. Eng. Grad. Sch. Osaka Pref. Univ.)

枯草菌は飢餓状態で芽胞と呼ばれる休眠細胞を形成する。芽胞は一般的な栄養細胞よりも著しく高い耐久性を示すことから、殺菌指標の分野で広く活用されている。発芽不能芽胞は致死芽胞とは同一ではないが生存性評価に重大な影響を及ぼす。この枯草菌芽胞の発芽には L-Ala を認識する GerA 発芽レセプター系と AGFK（L-Asn、D-Glucose、D-fructose、K^+）の 4 成分を必要とする GerB GerK 発芽レセプター系が知られている。我々はコルテックス分解酵素由来の光学密度の低下の影響を受けない特定の発芽レセプターの機能のみを評価可能な遺伝子破壊株の芽胞を用い、いくつかの新規発芽誘起物質を特定した。その中の D-グルコース代替物質として希少糖である D-Allose と D-フルクトース代替物質として D-Mannose があり、この 2 つは GerB GerK 発芽レセプター系に対して 4 成分だけでなく、3 成分(L-Asn、K^+、D-Allose または D-Mannose)でも著しく発芽時の光学密度の低下を促進する点で特異な性質を示した。この疑似 AGFK 発芽応答の活性制御機構について新規な知見が得られたので報告する。

Bacillus subtilis forms dormant cells called spores under starvation conditions. Spores have been widely used in the field of bactericidal indicators because they exhibit significantly higher durability than common vegetative cells. Non-germinable spores are not identical to lethal spores but have a significant impact on viability assessment. It is known that the germination of *B. subtilis* spores requires the GerA germination receptor system, which recognizes L-Ala, or the GerB GerK germination receptor system, which requires the four components AGFK (L-Asn, D-glucose, D-fructose, and K^+). We have identified several novel germination-inducing substances (D-Allose, a rare sugar, as a D-glucose substitute, and D-Mannose as a D-fructose substitute.) using spores from gene-disrupted strains in which only the function of specific germination receptors can be assessed without the effect of cortex lytic enzymes-derived optical density. These showed unique properties for the GerB GerK germination receptor system in that not only the four components but also the three components (L-Asn, K^+, and D-Allose or D-Mannose) markedly promoted a decrease in optical density during germination. We report here a novel insight into the active regulatory mechanism of this pseudo-AGFK germination response.

Rare sugars, Spore, Germinaion

発表責任者：坂元仁（jin.saka@kansai-u.ac.jp）

講演番号：2A08-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

ラマン分光法による珪藻の減衰期予測

Prediction of death phase of diatom by Raman spectroscopy

○久保 昂也[1,2]、安藤 正浩[3]、堀井 俊平[1,2]、外丸 裕司[5]、羽野 健志[5]、竹山 春子[1,2,3,4] ([1]早大院先進理工、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大ナノライフ創新研、[4]早大先進生命動態研、[5]水産機構水技研)

○ Kouya Kubo[1,2], Masahiro Ando[3], Shumpei Horii[1,2], Yuji Tomaru[5], Takeshi Hano[5], Haruko Takeyama[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ, [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [5]FRA, Fish. Tech. Inst.)

赤潮はプランクトンの異常増殖によって引き起こされる現象であり水産業に多大な被害を与える。赤潮の発生・終息は原因となるプランクトンの増殖曲線と対応しているため，プランクトンの減衰期を予測することで赤潮の終息時期を予測することが可能である。増殖曲線は集団における各細胞の増殖速度や死滅速度の分布の代表値を表現するものであり，同一の培養時間においても個々の細胞の成長段階は多様である。そのためバルク分析だけではなく細胞集団中の個々の細胞の動態を明らかにできるシングルセルレベルでの分析が望まれる。

ラマン分光法は低侵襲に物質の分子構造を明らかにできるため，シングルセルレベルでの表現型の解析に適している。本研究ではラマン分光法を用いて珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* の減衰期特異的な分子やその局在の決定を試みた。その結果，減衰期に特異的な分子として多価不飽和脂肪酸の増加が確認された。また対数増殖期に特徴的な局在を示す分子として，多糖類などが確認された。さらに，複数の生体内物質の分子プロファイルに基づき個々の細胞の成長段階を決定することで，珪藻の減衰時期の予測が可能であることが示唆された。

Red tide, resulting from large concentrations of plankton, causes severe disruptions to the fisheries industry. The onset and end of red tides correspond to distinct growth stages of the plankton causing the red tide. Therefore, it should be possible to predict the end of a red tide by knowing the death phase of the plankton. Growth curve is the representative values of heterogenous growth phases of plankton cells. That is, not only bulk analysis but also single-cell level analysis can clarify the dynamics of individual cells in a cell population.

Raman spectroscopy can be applied for the phenotypic analysis at single cells. In this study, we determined the molecular characteristics and spatial distribution profiles of the diatom *Chaetoceros tenuissimus* during its death phase using Raman spectroscopy. Poly-unsaturated fatty acids were found in elevated levels during the death phase. Polysaccharides showed characteristic distributions in single cells depending on the growth phase. Our study suggests the possibility of predicting the death phase of diatoms by determining the growth phase of individual cells based on the biomolecular profiles.

Raman spectroscopy, diatom, single cell

講演番号：2A08-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

アンモニアガス耐性細菌 *Paenibacillus lentus* NH33 の生育特性

Growth property of gaseous ammonia-tolerant bacterium, *Paenibacillus lentus* NH33

○安東 剛、Chaophaya Panjuy、清 啓自、吉田 ナオト（宮大農）
○Takeshi ANDO, Panjuy Chaophaya, Keiji KIYOSHI, Naoto YOSHIDA (Univ. Miyazaki)

1300ppm アンモニアガス存在下、最少培地にて *Paenibacillus lentus* NH33 を分離した。この細菌はアンモニアガス耐性細菌であり、アンモニアガス（非解離性アンモニア）が存在しないと生育できないので絶対アンモニアガス要求性細菌であるといえる。NH33 はアンモニアガスをどのように利用しているか調査した。NH33 株は SCD（有機栄養培地）で弱く生育することができたので従属栄養が可能であった。アンモニアガス存在下(1350ppm)では、グルコース 28mM を含む YNB 培地(生育因子のみを含む無機培地)にて良好に生育した。グルコースを含まない YMB 培地でも生育が確認されたので、NH33 株は混合栄養も可能な化学合成独立栄養細菌であることが分かった。混合栄養条件において、窒素源としてはアンモニアガスのみ利用可能で、解離性アンモニア、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素は利用できなかった。NH33 は窒素源として、アンモニアガスのみを利用すると思われる。独立栄養条件でのエネルギー源としては、アンモニアガスのみエネルギー源として利用するが、解離性アンモニア(NH_4^+)の利用はできなかった。独立栄養条件下、170ppm アンモニアガス中で生育した細胞からは亜硝酸が検出された。本細菌はアンモニアガスのみを窒素源、エネルギー源として使用する、新しいタイプのアンモニア酸化細菌であると思われる。

Ammonia gas tolerant bacterium *Paenibacillus lentus* NH33 was isolated using minimum medium containing glucose under the presence of 1300ppm of ammonia gas. *P. lentus* NH33 was obligately gaseous ammonia required organism due to completely growthless without gaseous ammonia (undissociated ammonia). How *P. lentus* NH33 use gaseous ammonia was investigated. *P. lentus* NH33 was able to grow on nutrient agar medium, indicating the capable of heterotrophic growth, and grow on minimum agar medium supplemented with glucose or without glucose under the presence of 1350 ppm of ammonia gas, indicating the capable of both mixotrophic and chemolithoautotrophic growth. In mixotrophic condition, NH33 used gaseous ammonia as nitrogen source, but did not use dissociated ammonia, nitrite, nitrate. NH33 used only gaseous ammonia as sole nitrogen source. In autotrophic condition, NH33 was capable of using gaseous ammonia as a sole energy source, but not dissociated ammonia. These growth attitudes were indicating that NH33 was novel nitrifying bacterium which use undissociated ammonia as sole energy and nitrogen source.

Paenibacillus, ammonia oxidizing bacteria, chemolithoautotroph

発表責任者：吉田ナオト（a04109u@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A08-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

放線菌 *Streptomyces* 属を対象とした菌種間での細胞内 pH の比較

Comparison of intracellular pH among *Streptomyces* species in actinomycetes

○蓮池 祐紀[1]、臼田 隆亮[2]、須藤 雅己[1]、山本 純子[3]、猪又 俊輔[1]、片岡 正和[1] ([1]信州大院　総合理工　生命医工、[2]信州大工、[3]信州大工　物質化学)

○ Yuki HASUIKE[1], Ryusuke USUDA[2], MASAKI SUTO[1], Zyunko YAMAMOTO[3], Syunsuke INOMATA[1], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., [2]Fac. Eng., Shinshu Univ., [3]Dep. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ.)

細胞内 pH は代謝や小胞輸送などの生化学反応に重大な役割を果たしている。そして、細菌は細胞内 pH を一定に保つ機構が存在する。この機構により細胞は適切なレベルの代謝を維持することが出来る。過去 10 年間、細菌の細胞内 pH は、一般に蛍光試薬を用いて測定されてきた。しかし、この方法では、生存している細菌の細胞内 pH を長期間にわたって測定することは困難である。

当研究室では、生きた大腸菌の細胞内 pH をリアルタイムでモニターするシステムを確立した。この系は pH 感受性のある緑色蛍光タンパク質（GFP）変異体のレシオメトリック蛍光強度測定によって細胞内 pH を測定する。GFP 変異体は、遺伝子導入により対象となる細菌に発現させるため、侵襲性がなく、連続的かつ長期的な測定が可能である。本研究の目的は、大腸菌以外の細菌に対するこの細胞内 pH 測定システムの有効性を調べることである。

今回の発表では、工業的に有用な細菌である放線菌 *Streptomyces* の様々な種の細胞内 pH を比較しました。その結果，細胞内 pH の範囲は多様であり，種に依存することが示された。

Intracellular pH plays an important role in various biochemical reactions such as metabolism and vesicular trafficking. Bacteria have a mechanism to maintain intracellular pH at a constant. This mechanism allows the cell to keep metabolism at adequate level. In the last decade, the intracellular pH of bacteria has generally been measured using fluorescent reagents. However, this method has difficulty to measure the intracellular pH of viable bacteria for a long time. In our laboratory, we have established a real time monitoring system on the intracellular pH of live E. coli. This system measures intracellular pH by ratiometric fluorescence intensity measurements on a pH sensitive green fluorescent protein (GFP) mutant. Since the GFP mutant is expressed in the target bacteria by gene transfer, it is not invasive and enables continuous and long-term monitoring. The aim of this study is to investigate the effectiveness of this intracellular pH measuring system on bacteria other than E. coli.

In this presentation, we compared the intracellular pH of various species of actinomycetes Streptomyces, which is an industrially useful bacterium. As a result, it was shown that the intracellular pH ranges have variety and depend on the species.

pH dynamics, *Streptomyces* sp, intracellular pH

発表責任者：蓮池 祐紀（21bs119j@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A08-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

放線菌 *Streptomyces* 属の異種間における染色体移行頻度の向上

Improved the frequency of chromosomal mobilization between different *Streptomyces* species

○依田 健人[1]、溝脇 朱音[2]、深田 悠太[3]、片岡 正和[2] ([1]信州大工　物質化学、[2]信州大院 総合理工 生命医工、[3]信州大院 総合医理工 生命医工)
○Kento Yoda[1], Akane Mizowaki[2], Yuta Fukada[3], Masakazu Kataoka[2] ([1]Dep. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ., [2]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., [3]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Med. Sci. tech., Shinshu Univ.)

放線菌 *Streptomyces* 属は多くの生合成遺伝子群を有している一方で、その大半は休眠状態にある。これらの休眠遺伝子は別の菌種に導入すると発現する場合があることが明らかになってきている。そのことから、*Streptomyces* 属菌の新たな産業的利用のために、抗生物質生合成遺伝子クラスターなどの長大な遺伝子群を安定して導入する手法が求められている。

我々は *Streptomyces* 属菌間で発生する「染色体移行現象」に着目した。本現象は供与菌の染色体が受容菌内に移行し、受容菌の染色体と相同組換えを起こす現象である。本現象を利用し、染色体をベクターとして用いることで、*Streptomyces* 属菌への長大な遺伝子群の導入が期待できる。しかし、異種菌間で本現象が生じる頻度は、同種間と比較して低い傾向にあり、実用化が困難である。

我々は本課題を解決するために、供与菌と受容菌の生育速度の差に着目した。両者の生育速度を測定したデータを利用し、植菌時間を調節した。その結果、対数増殖期初期を揃えることによって、複数の *Streptomyces* 属菌において染色体移行効率の向上が確認できた。

Streptomyces is a genus of Actinomycetes and has a large number of dormant gene clusters. The gene clusters are considered to include biosynthetic pathways of antibiotics. Activation of these gene clusters may give huge impacts on bio-industries. Furthermore, expression of dormant genes were observed when they inserted into other *Streptomyces* species.

In this study, we focused on the "Chromosomal mobilization" that occurs among the genus *Streptomyces*. "Chromosomal mobilization" is a phenomenon in which the chromosomes of one bacterium are transferred into other bacterium and homologous recombination occurs accordingly. This phenomenon makes it possible to transfer gene clusters between *Streptomyces* spp. However, the frequency of occurrence between different *Streptomyces* species is lower than that between the same species.

To solve this problem, we focused on the growth phase between the donor and the recipient. Using the data from the growth measurements, we adjusted the inoculation time for both bacteria. As a result, it was confirmed that aligning the growth phase of the donor and the recipient on early exponential improved the efficiency of chromosomal mobilization in several Streptomyces spp.

Streptomyces, Chromosomal mobilization, conjugal transfer

講演番号：2A08-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

ジェランガム培地を用いた製パン用サワー種からの微生物の分離と解析

Analysis of microorganisms in a sourdough starter using gellan gum media

○三枝 静江、佐藤 万里、細井 知弘（都産技研・食技セ）
○Shizue Saegusa, Mari Sato, Tomohiro Hosoi (TIRI)

多糖類ジェランガムを利用した培地は，透明度が高く，植物の培養や環境中の微生物の分離などに用いられている。しかしながら，ジェランガムを食品の微生物検査に用いた報告は少ない。そこで本研究では，ライ麦粉，小麦粉および滅菌水で作製したパン発酵用サワー種について，発酵中（5 日間）の真菌数，乳酸菌数，生菌数の変化を，ジェランガムまたは寒天を含む培地により測定し，比較した。

サワー種発酵中の真菌数は，YPD broth に 0.1 g/L クロラムフェニコールおよび 12 g/L ジェランガム（Gelrite）を添加した培地，または同抗生物質添加 YPD 寒天培地により測定した。その結果，ジェランガム・寒天両培地において同等の菌数が得られた。発酵開始から 2 日後までは，種々の出芽酵母や偽菌糸形成酵母，カビなどが共存して検出されたが，3 日後以降は，特定の酵母が優勢となった。5 日後には，YPD ジェランガム培地および YPD 寒天培地上で，それぞれ 2 種類の酵母が出現し，D1/D2 領域の DNA シーケンス解析結果から，両培地から分離された各酵母は同じで，*Candida glabrata* および *Issatchenkia orientalis* と推定された。乳酸菌数については，$CaCO_3$ 添加 MRS broth に 10 g/Lジェランガムを加えた培地または $CaCO_3$ 添加 MRS 寒天培地を用いて測定し，両培地において同等の菌数が得られた。生菌数は，トリプチケースソイブロスに 10 g/L ジェランガムを加えた培地またはトリプチケースソイ寒天培地を用いて測定した。生菌数は，乳酸菌数とほぼ同数であり，発酵 3 日後以降は微小コロニーが大部分で，透明なジェランガム培地で微小コロニーをより多く観察できた。以上の結果から，本研究の条件では，ジェランガム培地が寒天培地と同様に遜色なく使用可能と判断する。

Gellan gum is a gel-forming polysaccharide that is added to solidify liquid culture media. However, gellan gum medium is not widely employed for microbiological testing of foods. In the present study, we evaluated the changes in fungal, lactic acid bacterial, and total aerobic microbial counts during the 5-day fermentation of sourdough starter made from rye flour, wheat flour, and water using media containing either gellan gum or agar. Fungal counts obtained during sourdough starter fermentation were similar for both YPD-based gellan gum and agar media. On day 5, two types of yeasts appeared on each medium; these were presumed to be *Candida glabrata* and *Issatchenkia orientalis*. We determined lactic acid bacterial counts using MRS-based gellan gum or agar medium and obtained comparable counts on both media. Total aerobic microbial counts were determined using Trypticase soy broth-based gellan gum or agar medium. On fermentation days 3-5, most of the colonies were small, with higher counts on the clear gellan gum medium than on agar medium.

gellan gum medium, microbial analysis, sourdough starter

発表責任者：三枝静江（saegusa.shizue@iri-tokyo.jp）

講演番号：2A08-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

点滅 LED 照射光による微細藻類 *Nannochloropsis oceanica Suda& Miyashita* の増殖能および脂質生産能への影響

Effects of flashing LED light on the growth and lipid production of microalgae *Nannochloropsis oceanica Suda& Miyashita*

○篠本 亮太、滝口 泰之（千葉工大先進工）
○Ryota SHINOMOTO, Yasuyuki TAKIGUCHI (CIT)

微細藻類は高いバイオマス生産能や増殖能から、植物や石油に替わる新たな資源として期待されている。特に *Nannochloropsis oceanica* はトリアシルグリセロールの形で高濃度の油脂を蓄積するため、トランスエステル化することで容易にバイオディーゼル燃料に加工できる。また、油脂だけでなく必須ビタミン、アミノ酸も生産することから、栄養補助食品や水産養殖の飼料としても利用できる。しかし藻類自体未だ研究例が少なく、効率的な培養法などについて研究が進められている。

今回注目したのが点滅光効果(FLE: Flashing Light Effects)を用いた培養である。点滅光効果とは、1 ms 以下の短い点滅光を照射して培養すると，その生物の光合成効率が向上する効果のことである．このメカニズムとして光化学系 II における P680 の還元時間との関連が指摘されているが、詳細については明らかではない。さらに、点滅光が産生物質に及ぼす影響を対象とした研究例は限られる。そのため本研究では、バイオ燃料の原料とされる脂肪酸に着目し、その量と脂肪酸組成の変化について研究している。

Microalgae are expected to become a new resource to replace plants and oil due to their high biomass production and growth capacity. In particular, *Nannochloropsis oceanica* accumulates a high concentration of fats and oils in the form of triacylglycerols, which can be easily processed into biodiesel fuel by transesterification. In addition to fats, *N.oceanica* also produces essential vitamins and amino acids, which means that it can be used as a nutritional supplement and feed for aquaculture. However, there are still few examples of research on algae itself, and research is still being conducted on efficient cultivation methods.

What we have focused on this time is cultivation using “Flashing Light Effects (FLE)”. FLE is an effect that improves the photosynthetic efficiency of an organism when it is cultured under a short flashing light of 1 ms or less. It has been pointed out that this mechanism is related to the reduction time of P680 in photosystem II, but the details are not clear. In addition, there are limited examples of studies on the effects of blinking light on product quality. Therefore, in this study, we focus on fatty acids, which are used as raw materials for biofuels, and study the changes in the amount and composition of fatty acids.

Microalgae, Flashing Light Effects, Bio fuel

発表責任者：滝口泰之（takiguchi.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

講演番号：2A08-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

気生微細藻類が蓄積する抗菌活性物質の培養法の検討

Investigation of extraction method for antimicrobial substances accumulated in aerial microalgae

○関沢 寿裕、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大学）
○TOSHIHIRO SEKIZAWA, NOBUHIRO ABURAI, KATSUHIKO FUJII (kogakuin Univ.)

発表者は、これまでの研究において、気生微細藻類を主体とする微生物マットの脂質抽出物に抗菌活性物質が含まれていることを見出している。しかし、活性物質は不安定で、微量しか得られないため、構造解析が困難であった。本研究では、培養した気生微細藻類が蓄積する抗菌活性物質の抽出法を検討することを目的とした。まず、乾燥細胞を粉砕する方法として、「乳棒による粉砕」と「ガラスビーズを添加したビーズ破砕機による粉砕」を検討した。粉砕後に、定法に従って全脂質を抽出した。得られた脂質をシリカゲルクロマトグラフィーにかけ、3つの画分に分け、ペーパーディスク法により抗菌活性試験を行なった。試験には*Kocuria rhizophila* (BRC 12708株)を被検菌株として用いた。抽出法を検討した結果、「ガラスビーズを添加したビーズ破砕機による粉砕」が最も効果的に気生藻類の脂質を抽出することができた。他方、抗菌活性は「乳棒による粉砕」で調製した脂質画分に検出された。ガラスビーズを用いた粉砕は、脂質抽出効率は高いが、ビーズ破砕機で粉砕することで発生する摩擦熱により、脂質中の抗菌物質を失活させている可能性がある。藻類細胞に含まれる抗菌活性物質の精製と同定を進めているところである。

In our previous study, lipid extract of microbial mats, mainly composed of aerial microalgae, contains antimicrobial substances. However, the substances are unstable and can be obtained only in small amounts, making structural analysis difficult. The purpose of this study was to develop the extraction method of antimicrobial substances accumulated in cultured aerial microalgae.

We examined the following methods to grind algal cells: grinding by a pestle, and grinding by a bead homogenizer with addition of glass beads. The mixture of chloroform and methanol in the ratio of 2:1(v/v) was employed to extract total lipid. The lipid extracts were then applied to a silica gel chromatograph to prepare three fractions and tested their antimicrobial activity using the paper disc method against *Kocuria rhizophila* (BRC 12708). Results showed that the combination of bead crusher and glass beads was more effective than simple grinding by a pestle in extracting lipid from aerial microalgal cells. Antimicrobial activity was detected in a fraction of lipid extract prepared by grinding algal cells with a pestle. In contrast, grinding of cells with glass beads and a bead homogenizer seems useful for efficient lipid extraction, but a frictional heat generated by bead crushing might partly reduce antimicrobial substances. Purification and identification of the antimicrobial active substances in algal cells are in progress.

Antibacterial activity, Aerial microalgae

発表責任者：関沢寿裕（bm21028@g.kogakuin.jp）

講演番号：2A08-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム A

カロテノイドを蓄積する気生微細藻類のスクリーニング

Screening of carotenoid-rich aerial microalgae

○比企 優太、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大学化学応用学専攻）
○Yuta Hiki, Nobuhiro Aburai, Katsuhiko Fujii (Applied Chemistry and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Kogakuin University)

一般に、水圏で生活する微細藻類はカロテノイドを蓄積しており、その抗酸化活性から、カロテノイドは医薬品、化粧品、食品などの産業分野で利用されている。他方、陸上で生活する微細藻類には気生微細藻類と呼ばれるものが知られ、栄養飢餓、強光、温度変化などの過酷な環境で生育する。

本研究では、室外機下から得られた 42 株の気生微細藻類を様々な光強度、温度、窒素源、pH 条件で 96 穴マイクロプレートを用いて培養し、カロテノイドを豊富に含む気生微細藻類を全細胞ベーススクリーニング法を用いて探索した。このとき、40 μmol photons m^{-2} s^{-1}、pH8.0、25℃、窒素源 NO_3^- を基準条件とした。カロテノイド蓄積は、先行研究に基づいた 3 つの式を用い、480 nm の吸光度を算出して評価した。その結果、基準条件における各藻株の平均吸光度は 0.43 だった。pH3 および 10 で吸光度が 0.8 を超えた藻株はそれぞれ 2 株（No.37, 42）と 4 株（No.37, 38, 41, 42）であった。強光（170 μmol photons m^2 s^{-1}）では吸光度 0.9 を超えた藻株は 2 株（No.2, 42）であった。室外機下から得られた 42 株のうち、5 株がカロテノイドを豊富に含んでいる可能性がある。

$$A_{650\ Chl\ b} = A_{680} / 2.38 \quad (1)$$

$$A_{480\ Chl\ b} = 1.14 \times A_{650\ Chl\ b} \quad (2)$$

$$A_{480\ Car} = A_{480} - A_{480\ Chl\ b} \quad (3)$$

Microalgae generally accumulate carotenoids with antioxidant properties that are used in industrial field such as pharmaceuticals, cosmetics, and foods. On the other hand, some microalgae living on land are called aerial microalgae, which grow under severe environmental conditions such as nutrition starvation, strong sunlight, and temperature change. In this study, 42 strains of aerial microalgae, which were obtained from a surface of concrete beneath an outdoor unit of air conditioner, were cultured in 96-wells microplates under various light intensity, temperature, nitrogen source and pH conditions, and carotenoid-rich strains were screened using a whole-cell-based method. At this time, the culture conditions at 40 μmol photons m^{-2} s^{-1}, 25 °C, nitrogen source (NO_3^-), and pH 8.0 were set as a standard condition. Carotenoid accumulation was evaluated by calculating the absorbance at 480 nm using three formulae shown above. As a result, the average absorbance of each algal strain under standard conditions was 0.43. At pH 3 and 10, two strains (No. 37 and 42) and four strains (No. 37, 38, 41 and 42) having an absorbance above 0.8 were obtained, respectively. Two strains (No. 2 and 42) with an absorbance above 0.9 were obtained in strong light (170 μmol photons m^2 s^{-1}). Of the 42 strains, five were determined as potential carotenoid-rich strains.

aerial microalgae, carotenoid, screening

講演番号：2B02-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

近大構内から分離した酵母の多様性解析

Genetic diversity of isolated yeasts from Kindai University campus.

○塩谷 瑞紀[1]、松尾 啓史[1]、大谷 里菜[1]、長谷川 哲哉[1]、大西 徹[1]、井田 悠斗[1]、副田 尚位[1]、定塚 勝樹[2]、倉田 淳志[1]、上垣 浩一[1] ([1]近大農、[2]アストロバイオロジーセンター)
○Mizuki SHIOTANI[1], Yoshifumi MATSUO[1], Rina OTANI[1], Tetsuya HASEGAWA[1], Toru ONISHI[1], Yuto IDA[1], Syoui FUKUDA[1], Katsuki JOHZUKA[2], Atsushi KURARTA[1], Koichi UEGAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]A.B.C)

【概要】
我々は、既存の醸造用酵母とは異なった特色を持つ酵母を得ることを目標に、大学構内の花々から酵母のスクリーニングを行い遺伝的多様性や発酵特性を調べている。昨年度、60 株以上の単離を行い、12 領域のマイクロサテライト解析から 4 つのグループに分類することができることを報告した。さらに、きょうかい酵母 K7 グループにみられる *PPT1* 遺伝子座の欠失変異 *Δppt1::Ty2* を PCR で確認したところ、23 株で *Δppt1::Ty2* が見られた。また K7 グループに特徴的な突然変異 $RIM15^{5055insA}$、MSN^{C1540T} の有無を DNA シークエンスで確認し、単離酵母が K7 グループに属するか否かを調べた。
【結果・考察】
単離した酵母の *RIM15*、*MSN4* 遺伝子を PCR で増幅し、塩基配列の確認を行った。その結果、単離酵母は *RIM15*、*MSN4* 遺伝子は実験室酵母型(*RIM15* と *MSN4*)と K7 型 ($RIM15^{5055insA}$ と $MSN4^{C1540T}$) に大別され、*PPT1* 遺伝子の PCR による分類と相関を示した。一部の株では ($RIM15^{5055insA}$ と *MSN4*) のような実験室酵母型と K7 型の混合型も確認され、K7 グループの酵母と野生酵母の環境中での交雑が示唆された。

【overview】
We have been screening yeasts from flowers on the Kindai University campus to investigate their genetic diversity and fermentation characteristics. We have reported that isolated more than 60 strains can be classified into four groups based on microsatellite analysis. In this presentation, we found *Δppt1::Ty2* in 23 of our isolates, which is characteristic of K7 yeast type, by PCR. We further examined the DNA sequence of *RIM15* and *MSN4* to confirm the presence or absence of $RIM15^{5055insA}$ and $MSN4^{C1540T}$ mutations.
【results and discussion】
We amplified *RIM15* and *MSN4* genes of isolates by PCR and confirmed their DNA sequence. The *RIM15* and *MSN4* sequencing showed most isolates were classified into two types: laboratory yeast type (*RIM15* and *MSN4*), and K7 type ($RIM15^{5055insA}$ and $MSN4^{C1540T}$), consisted with the results of *PPT1* PCR. Some isolates were mixed type of laboratory yeast type and K7 type, suggested that hybrids originate from K7 and wild yeasts inhabited the Kindai campus.

yeast, genetic diversity, microsatellite

発表責任者：上垣　浩一（k-uegaki@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B02-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

白神山地からの *S. cerevisiae* の分離と製パンへの応用

Isolation of *S. cerevisiae* from the Shirakami-Sanchi and its application to bread making

○上村 詩奈、殿内 暁夫（弘大農生）
○Shiina UEMURA, Akio TONOUCHI (Hirosaki Univ.)

我々は白神山地から分離した酵母を「弘前大学白神酵母（弘大白神酵母)」として商標登録し、清酒・りんごシードル・リンゴ酢・りんごブランデーの醸造に活用している。今回、弘大白神酵母をパン酵母として利用するための研究を試みたので報告する。

ミズナラの樹皮からマルトースを基質として No. 932 株を分離した。No. 932 株は弱いマルトース資化能・発酵能を有し、冷凍生地用の酵母としての利用が可能である。しかし、そのマルトース発酵性は低糖パン製造用としては市販の酵母と比較して非常に低いため、マルトース発酵性を向上株させた No. 932-m93 株を育種した。発酵力試験と製パン試験で比較した結果、No. 932-m93 株はオリジナルの No. 932 株と比較してマルトース資化能・発酵能が向上しており、低糖生地を膨らませる能力も向上した。本発表では、No. 932-m93 株のマルトース利用性の向上とマルトース利用に関連する遺伝子との関係についても考察する。

We have registered the yeast strains obtained from the Shirakami Sanchi as a "Hirosaki University Shirakami Yeast" trademark and use them to brew sake, apple cider, apple vinegar, and apple brandy. In this report, we attempted to study one of them as a baker's yeast.

A yeast strain designated No. 932 was isolated from the bark of Quercus crispula using maltose as a substrate, and it has weak maltose-utilizing and fermenting ability, which can be used as yeast for the frozen dough. However, maltose fermentability of strain No. 932 is much lower than commercial yeast for low-sugar bread production, so we bred strain No. 932-m93 from strain No. 932 with improved maltose fermentability. As a result of comparing fermentability and bread-making tests, strain No. 932-m93 showed improved maltose utilization and fermentation ability compared with the original strain No. 932. Also, it improved the ability to expand the low-sugar dough. This presentation will also discuss the relationship between the improved maltose utilization of strain No. 932-m93 and genes related to maltose utilization.

S. cerevisiae, Maltose, bread fermentation

発表責任者：上村詩奈（h21ga213@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2B02-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

椿の枝から単離した野生酵母のワイン醸造適性の分析

Analysis of wine brewing suitability of wild yeasts isolated from camellia branches

○舩渡 遼平、中村 日向子、関 淑楓、工藤 泰良、山本 歩（八戸工業高等専門学校）
○Ryohei FUNAWATARI, Hinako NAKAMURA, Yoshika SEKI, Taira KUDO, Ayumi YAMAMOTO
(National Institute of Technology Hachinohe College)

近年、発酵食品業界では自然界から新規に分離した酵母を利用した新商品の開発が注目されている。所属研究室では、青森県東津軽郡平内町に位置するツバキ北限自生地帯として天然記念物に指定されている「椿山」のツバキの枝から新規に清酒酵母やワイン酵母と同種の *Saccharomyces cerevisiae* の分離に成功し、「椿山酵母」として清酒やパンの開発を行ってきた。このような背景のもと、本研究では、椿山酵母の新たな活用方法を見出すために、ワイン醸造への利用の可能性に着目した。国内での果実酒の生産量は年々増加傾向にあり、県や醸造所が自然界から独自に分離した野生酵母を使用したワインの開発が試みられており、地域産業の活性化つながる取り組みの一つとして期待されている。本研究では、椿山酵母のワイン醸造への適性を明らかにするため、赤ブドウ果汁と白ブドウ果汁を用いたアルコール発酵試験や亜硫酸耐性試験を実施した。ブドウ果汁に対するアルコール発酵試験の結果、椿山酵母のほぼすべての株がワイン酵母と同程度の発酵力を示した。また、椿山酵母の亜硫酸耐性を分析したところ、亜硫酸塩含有培地においてワイン酵母と同等の増殖が確認された。以上の結果より、椿山酵母をワイン醸造に利用できる可能性が示唆された。

In recent years, the development of new products using wild type yeast isolated from nature is attracting interest in the fermented food industry. We isolated *Saccharomyces cerevisiae* from the camellia branch growing at Tsubakiyama in Hiranai city, which area has been designated a national monument in Japan. Isolated yeast strains were named as Tsubakiyama yeast. In Japan, the production of wine is increasing year by year, also the novel types of wild type yeasts isolated from various natural environments were used to develop wines with originality. In this study, we evaluated alcohol fermentation activity and sulfite resistance test to reveal the wine brewing aptitude of Tsubakiyama yeast strains. The results of alcohol fermentation tests in grape juice showed that Tsubakiyama yeast has similar ability of fermentation compared to wine yeast. Tsubakiyama yeast exhibited sulfite resistance as the same level as wine yeast.

wild type Saccharomyces Cerevisiae, wine brewing, grape juice fermentation

発表責任者：舩渡遼平（r03ac04@hachinohe.kosen-ac.jp）

講演番号：2B02-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

ワインパミスの麹菌固体培養における熱水処理の影響
Effect of hot water pretreatment on *Aspergillus* solid state fermentation of wine pomace
○奥川 日菜乃[1]、橋本 敦子[1]、三宅 剛史[2]、伊藤 一成[2]、谷野 有佳[2]、山下 秀行[3]、中川 拓郎[3]、平野 幸司[4]、仁戸田 照彦[1]、神崎 浩[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山県工技セ、[3]樋口松之助商店、[4]果実工房)
○ Hinano OKUKAWA[1], Atsuko HASHIMOTO[1], Tsuyoshi MIYAKE[2], Kazunari ITO[2], Yuka TANINO[2], Hideyuki YAMASHITA[3], Takuro NAKAGAWA[3], Koji HIRANO[4], Teruhiko NITODA[1], Hiroshi KANZAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci.,Okayama Univ., [2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [3]Higuchi Matsunosuke Shoten, [4]Kajitsu Kobo)

【目的】我々はこれまで，発酵食品製造に利用されてきた麹菌固体培養技術によって麹菌がワイン醸造副産物であるワインパミス (絞り粕) 基材上に生育し，ワインパミス成分や抗酸化活性の変化が観察されることを報告してきた[1,2]。これまで用いてきたワインパミス素材は，食品として使うにあたって熱水 (煮沸) 処理により殺菌をしたものであった。そこで本研究では，素材の熱水処理がワインパミスを用いた麹菌固体培養においてどのような影響を与えるかについて，特に，麹菌の生育度に与える影響，さらにはワインパミスの二次代謝産物の変換に与える影響を中心に検討した。【方法・結果】熱水処理を行ったワインパミスと熱水処理を行っていないワインパミスそれぞれを用いて麹菌の固体培養を行ったところ，いずれのワインパミス基材でも麹菌の生育が認められた。得られたワインパミス麹の MeOH 抽出物について，UPLC 分析，総ポリフェノール量測定，DPPH 法による抗酸化活性測定を行ったところ，熱水処理の有無で，麹菌固体培養に伴う成分変化の傾向に差異が認められた。基材の処理方法を変えることで，特徴が異なる素材を創生できる可能性が示唆された。
1) 2021 年 3 月農化大会 (仙台) : 3C06-06
2) 2021 年 9 月農化西日本･中四国･関西支部合同大会 (鹿児島) : C-p06

We have previously reported that *koji* molds grew on wine pomace using *koji* mold solid-state cultivation technology that has been used in fermented foods, which resulted in changes in wine pomace constituents and antioxidant activity. The wine pomace that we have used so far were sterilized by hot water treatment before being used as food. In this study, we investigated the effects of hot water treatment on *Aspergillus* solid state fermentation of wine pomace, especially the effects on the growth rate of *koji* mold and also on the bioconversion of secondary metabolites of wine pomace. Solid state cultivation of *koji* mold was conducted using wine pomace with and without hot water treatment, and growth of *koji* mold was observed on both materials. The obtained MeOH extracts of wine pomace *koji* were subjected to UPLC analysis, total polyphenol content measurement, and antioxidant activity measurement by the DPPH method. The possibility of creating materials with different characteristics by changing the treatment method of the base material was suggested.

Aspergillus, High functionalization, Wine

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2B02-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

オリーブ葉の麹菌固体培養における蒸煮処理の影響

Effect of steaming on *Aspergillus* solid state fermentation of olive leaves

○橋本 敦子[1]、奥川 日菜乃[1]、三宅 剛史[2]、伊藤 一成[2]、谷野 有佳[2]、山下 秀行[3]、内田 真美[3]、三木 翔平[3]、吉田 靖弘[4]、徐 恵美[4]、菊地 敬一[4]、仁戸田 照彦[1]、神崎 浩[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山県工技セ、[3]樋口松之助商店、[4]日本オリーブ)

○ Atsuko HASHIMOTO[1], Hinano OKUKAWA[1], Tsuyoshi MIYAKE[2], Kazunari ITO[2], Yuka TANINO[2], Hideyuki YAMASHITA[3], Mami UCHIDA[3], Shouhei MIKI[3], Yasuhiro YOSHIDA[4], Megumi JYO[4], Keiichi KIKUCHI[4], Teruhiko NITODA[1], Hiroshi KANZAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [3]Higuchi Matsunosuke Shoten, [4]Nippon Olive)

【目的】我々は，発酵食品製造に利用されてきた麹菌固体培養技術を用いて，麹菌がオリーブ葉素材に生育し，二次代謝産物の構造変化が観察されることを報告した[1)]。これまで，培養基材としてオリーブ葉乾燥葉を用いてきたが，伝統的な麹菌の固体培養基材は蒸煮処理が行われたものが一般的に使われる。そこで本研究では，素材の蒸煮処理がオリーブ葉麹においてどのような影響を与えるかについて，特に，麹菌の生育度に与える影響，さらにオリーブ葉の二次代謝産物の変換に与える影響を中心に検討した。【方法・結果】蒸煮処理を行ったオリーブ葉乾燥葉を用いて麹菌固体培養を行ったところ，蒸煮処理を行ったオリーブ葉麹は未処理のオリーブ葉麹と比較して麹菌の良好な生育が確認された。この培養により得られたオリーブ葉麹 MeOH 抽出物について，UPLC による成分分析，総ポリフェノール含有量の測定，DPPH 法による抗酸化活性測定を行ったところ，蒸煮処理オリーブ葉麹では未処理オリーブ葉麹と異なり，培養による総ポリフェノール量の変化がほとんど見られず，かつ二次代謝産物の構造変換がもたらされることが分かった。これにより，オリーブ葉の麹菌の固体培養の素材の前処理として蒸煮処理を行った基材を用いると，新たな物性や機能性が付与された素材を創生できる可能性が示唆された。

1) 2021 年 3 月農化大会 (仙台) : 3C06-07

We have reported that *koji* molds grew on olive leaves using *koji* mold solid-state cultivation technology that has been used in fermented foods, which resulted in changes in olive leaves constituents. Dried olive leaves were used as culture medium materials in our previous study, but steamed materials are commonly used for solid culture materials of *koji* mold. In this study, we investigated the effect of steaming on olive leaf *kojis*, especially the effect on the growth of *koji* mold and the conversion of secondary metabolites of olive leaves. We inoculated several *koji* molds on steamed or untreated olive leaves, which resulted in better growth on steamed olive leaves of *koji* molds than untreated ones. The MeOH extracts of olive *kojis* were characterized by HPLC analysis, the determination of total polyphenol contents (TPC) and the evaluation of antioxidant activity. The result showed that, in contrast to TPC of untreated olive leaf *kojis,* those of steamed olive leaf *kojis* were almost unchanged, while conversion of olive secondary metabolites was occurred. These results suggest that using steamed olive leaves as a plant derived solid culture medium may lead to create materials with new physical properties and functionalities.

Aspergillus solid state fermentation, High functionalization, Olive

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2B02-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

壺造り純米黒酢醸造に関わる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の特徴に関する研究

The characteristics of *Acetobacter pasteurianus*, the acetic acid bacteria contribute to black vinegar brewing

○福井 里佳子[1]、亀谷 将史[1,3]、藤井 暁[2]、長野 正信[2]、新井 博之[1,3]、石井 正治[1,3] ([1]東大農、[2]坂元醸造、[3]東大微生物連携機構)
○Rikako FUKUI[1], Masafumi KAMEYA[1,3], Akira FUJII[2], Masanobu NAGANO[2], Hiroyuki ARAI[1,3], Masaharu ISHII[1,3] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Sakamoto Kurozu, Inc, [3]CRIIM, Univ. Tokyo)

鹿児島県霧島市福山町では伝統的手法を用いた壺造り純米黒酢醸造が行われており、麹以外には人為的な種菌添加を行うことなく、壺や麹に内在する微生物によって自然と醸造が進行することが特徴である。酢酸菌は黒酢醸造における酢酸発酵を担っている。我々の過去の研究により、醸造前の壺内壁には *Acetobacter pasteurianus* や *Acetobacter aceti* など多様な酢酸菌が存在しているが、酢酸発酵期には *A. pasteurianus* のみが優占化することが分かっている。そこで、*A. pasteurianus* 黒酢単離株特有の性質を明らかにするため、基準株 *A. pasteurianus* NBRC3283 との比較実験を行った。その結果、基準株とは異なり、黒酢単離株はグリセロールを炭素源として生育できないことが示された。また、壺内には酢酸菌の他に乳酸菌も存在することがわかっているが、基準株は乳酸菌との共培養時に生育が抑制される一方、黒酢単離株は生育が保たれることも示された。

In Fukuyama-cho, Kirishima City, Kagoshima Prefecture, pure rice black vinegar is brewed in ceramic jars using traditional methods. The feature of this method is that the brewing process progresses naturally by the microorganisms inherent in the jar and koji without artificial addition of other specific microbes. Acetic acid bacteria (AAB) are responsible for acetic acid fermentation in black vinegar brewing. Our previous studies have shown that a variety of AAB such as *Acetobacter pasteurianus* and *Acetobacter aceti* exist on the inner wall of the jar before brewing, but only *A. pasteurianus* becomes dominant during the acetic acid fermentation period. In order to clarify the unique characteristics of black-vinegar-derived *A. pasteurianus* strain, we conducted a comparison experiment with the type strain, *A. pasteurianus* NBRC3283. The results showed that, unlike the type strain, black-vinegar-derived *A. pasteurianus* strains could not grow on glycerol as a carbon source. In addition to acetic acid bacteria, lactic acid bacteria are known to be present in the jar. The growth of the *A. pasteurianus* type strain was inhibited when co-cultured with lactic acid bacteria, while the growth of the black-vinegar-derived strain was not affected by the lactic acid bacteria.

Microbiology, metabolism, fermentation

講演番号：2B02-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

模擬的熟成による非スターター菌種のチーズフレーバー生成能の検証

Verification of flavor formation capability of non-starter bacterial strains by lab-scale ripening

○大崎 友美加、海野 良輔、鈴木 敏弘、石川 森夫（東農大院・醸造）
○Yumika OSAKI, Ryosuke UNNO, Toshihiro SUZUKI, Morio ISHIKAWA (Dept. Ferment. Sci. Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】熟成チーズを特徴付けるフレーバーの多くは、その生成に自然発生的に増殖する非スターター菌が関与すると知られている。しかし、フレーバーを構成する成分と微生物叢は共に複雑であるが故、非スターター菌のフレーバー形成機序については不明な点が多い。そこで本研究では、マルチオミクスアプローチにより白カビチーズの細菌群と香気成分の相関を明らかにした。また、得られた相関関係の実証を目的とし、分離株を用いた模擬的熟成を行い、各細菌のフレーバー形成能の解明を試みた。

【方法及び結果】国産・仏産の白カビ熟成チーズを対象に成分分析と次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析を行い、統計的手法により細菌叢と成分の相関を明らかにした。その結果、乳酸菌に限らず、*Proteobacteria* 門（海洋細菌）や *Actinobacteria* 門（放線菌）を含む非スターター菌がチーズのフレーバーを特徴付けるケトン類や硫黄化合物などの香気成分と正の相関を示した。これらの相関関係を実証するため、国産熟成チーズから種々の非スターター菌の分離を試み、獲得した株を用いたチーズの模擬的熟成を行った。熟成中の成分変化を多変量解析により可視化したところ、海洋細菌や放線菌を接種したチーズでケトン類や硫黄化合物が特徴的に検出され、市販の白カビ熟成チーズの細菌叢と成分の相関関係と一致した。中でも海洋細菌 *Pseudoalteromonas prydzensis* は熟成初期に特徴的な香気成分を生成し、それに付随した顕著な含硫アミノ酸の増加やカゼイン加水分解能がみられた。以上より、海洋細菌や放線菌の非スターター菌がチーズの特徴となるフレーバー生成に重要であることが示唆された。

Owing to the complexity of the microbiota involved, the relationship between microorganisms and components during ripening remains unclear. In this study, this relationship in soft-type mold-ripened cheeses were revealed using multi-omics approaches. Furthermore, to verify the obtained correlation, lab-scale ripening was performed using non-starter bacterial isolates. Speaman correlation analysis revealed that marine bacteria and Actinobacteria were related to the formation of ketones and sulfur components. Moreover, the formation of these components was reproduced by the lab-scale ripening with these bacterial isolates. Therefore, marine bacteria and Actinobacteria play an important role to produce key components of cheese flavors.

cheese, non-starter bacteria, flavor formation

発表責任者：石川森夫（m1shika@nodai.ac.jp）

講演番号：2B02-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

異なるスターター乳酸菌が野沢菜漬の水溶性・揮発性成分プロファイルに与える影響
Metabolomic evaluation of different starter culture effects on water-soluble and volatile compound profiles in nozawana pickle fermentation

○冨田 理[1]、渡辺 純[2]、栗林 剛[3]、田中 沙智[4]、河原 岳志[4] ([1]農研機構食品研、[2]帯畜大生命、[3]長野県工技セ、[4]信州大農)
○Satoru TOMITA[1], Jun Watanabe[2], Takeshi Kuribayashi[3], Sachi Tanaka[4], Takeshi Kawahara[4] ([1]Food Res. Inst., NARO, [2]Obihiro Univ. Agri. Vet. Med., [3]Nagano Pref. Ind. Tech. Ctr., [4]Shinshu Univ.)

長野県の特産物である野沢菜漬けから分離された 4 菌株の乳酸菌について、発酵スターター乳酸菌として使用した場合に成分プロファイルに与える影響を明らかにすることを目的とし研究を行った。発酵で生じた漬け汁を核磁気共鳴法(NMR)および固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー質量分析法(SPME-GC/MS)によるノンターゲット分析に供し、水溶性成分および揮発性成分を包括的に比較した。ピーク組成に基づく主成分分析の結果、各菌株の試料には明確な特徴差が示された。水溶性成分では、菌種間の乳酸発酵形式の違いに関連する主要代謝産物（乳酸、酢酸、エタノール）以外にも、残存した糖類や、マンニトール、分岐鎖アミノ酸、アラニン、オルニチン、コハク酸、アセトイン、ジヒドロキシアセトンなどが特徴差への寄与を示した。さらに、揮発性成分としてイソチオシアネート類、ニトリル類、ジアセチル、ジメチルトリスルフィド、酢酸エチルなどが寄与を示した。これらの成分には呈味・香気成分が多く含まれているため、野沢菜漬けの風味に影響を与えていると考えられる。特に、*Latilactobacillus curvatus* を特徴づけたイソチオシアネート類や、*Levilactobacillus brevis* に寄与したジメチルトリスルフィドおよびチオ酢酸 *S*-メチルなどのように、一般的に嗅覚閾値の低い含硫化合物への影響が複数確認された。スターター乳酸菌の選択により成分プロファイルの形成を制御することで、好ましい漬物の風味を作ることができると期待される。

Metabolomic characterization of a lactic-fermented pickle of *nozawana* (*Brassica rapa* L. var. *hakabura*) was conducted to evaluate the effects of different starter culture strains on the chemical profiles. The water-soluble and volatile compound profiles were compared by non-targeted NMR and SPME-GC/MS analyses. The fermented samples differed significantly in terms of the levels of various compounds, such as sugars, organic acids, mannitol, ethanol, dihydroxyacetone, ornithine, γ-aminobutyric acid, choline, volatile isothiocyanates, 3,4-epithiobutyl cyanide, 2,3-butanedione, acetoin, ethyl acetate, dimethyl trisulfide, and *S*-methyl thioacetate. Fermentation with a *Latilactobacillus curvatus* culture was associated with a unique metabolite profile characterized by higher levels of isothiocyanates and hexanoic acid and lower levels of lactic acid, acetic acid, acetoin, and 2,3-butanedione. These variations in the chemical profile might be associated with different qualities in fermented pickle products.

【参考文献】Tomita et al. (2021). *Food Chem Mol Sci*, 2, 100019.

Lactic acid bacteria, Fermented food, Metabolomics

発表責任者：冨田 理（s.tomita@affrc.go.jp）

講演番号：2B02-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

長良川鵜匠家鮎なれずしの菌叢解析とその発酵における乳酸菌の機能

Analysis of microflora in the *Ayu-narezushi* from Gifu prefecture and function of lactic acid bacteria in its fermentation step

○河合 雄介[1]、堀 光代[2,3]、中村 浩平[1,2,4]、島田 昌也[1,2,4]、鈴木 徹[1,2,4]、中川 智行[1,2,4]（[1]岐阜大院自然科学、[2]岐阜大院連農、[3]岐阜市女子短大、[4]岐阜大応生）
○Yusuke KAWAI[1], Mitsuyo Hori[2,3], Kohei Nakamura[1,2,4], Masaya Shimada[1,2,4], Tohru Suzuki[1,2,4], Tomoyuki Nakagawa[1,2,4] ([1]Gifu Univ. Nat. Sci., [2]Gifu Univ. Unit. Agric., [3]Gifu City Women's col., [4]Gifu Univ. Appl. Biol. Sci.)

【目的】岐阜長良川の鵜飼は 1300 年以上の歴史があり、その鵜匠は世襲制で代々受け継がれてきた。また、鵜匠家の行事食「鮎なれずし」は伝統的な製法で作られているため、その発酵食品としての科学的解析はこれまでほとんどない。本研究では岐阜長良川の鵜匠家の鮎なれずしの発酵菌叢を解析し、そこに生息する乳酸菌株の機能性についても評価した。
【結果】鵜匠家 A、旅館 B、鵜匠家 C の鮎なれずしの発酵菌叢を解析した。A の発酵前サンプルでは仕込み環境に伴った常在菌と思われる多様な菌叢が見られたものの、発酵後には *Latilactobacillus* 属と *Leuconostoc* 属が優占属となり、A と B は *Enterobacter* 属、C は *Enterococcus* 属も主要菌叢であった。一方、C から単離した乳酸菌 *Leu. mesenteroides* は高い抗菌活性を示し、*Leu. mesenteroides* および *Lb. sakei* は *E. lactis* よりも pH 耐性が高かった。また、*Lb. sakei* LB64 株は GABA 生成能力が高かった。
【考察】鮎なれずしの発酵過程は、嫌気環境のもと乳酸菌が生産する乳酸による pH 低下と *Leuconostoc* 属のもつ抗菌物質などにより乳酸菌が主要菌叢になるものと考えられる。また発酵が進むにつれ、比較的 pH 耐性が低い *Enterococcus* 属が減少し、耐性が高い *Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属が主要菌叢となることが示唆された。一方、今回単離された乳酸菌の中で、*Lb. sakei* LB64 株は低 pH 環境下でも GABA を安定的に生成でき、低 pH 食品に付加価値を付与できる乳酸菌株であると考えられる。

【Introduction】 "*Ayu Narezushi*" is a traditional fermented food in Gifu. In this study, we analyzed the fermented microflora in *Ayu Narezushi* produced by *Usho* families in Gifu, and evaluated the function of the lactic acid bacteria strains isolated from *Ayu Narezushi*.

【Results and Discussion】 The microflora in *Ayu Narezushi* sample A, B and C was analyzed. In the non-fermented sample A, various microflora that seemed to be indigenous bacteria on the preparation environment were observed. In the fermented samples, the genera *Latilactobacillus* and *Leuconostoc* became the dominant genera. Additionally, in samples A and B, the genus *Enterobacter* was one of the major genera, and in sample C, the genus *Enterococcus* was major one. Moreover, the lactic acid bacterium *Leu. mesenteroides* isolated from sample C showed high antibacterial activity, and *Leu. mesenteroides* and *Lb. sakei* strains showed high resistance to low pH than *Ec. lactis*.

On the other hand, *Lb. sakei* strain LB64 had a high GABA-producing ability in low pH condition, thus strain LB64 has high advantage of being able to produce GABA during fermentation of foods.

ayu-narezushi, lactic acid bacteria, microflora

発表責任者：中川智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2B02-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム B

過酸化脂肪酸を還元する *Lactobacillus plantarum* P1-2 株によるプロバイオティクス資材の開発

Development of probiotics using lactic acid bacteria capable reducing fatty acid peroxide

鈴木 智典[1]、○糸田 侑花[1]、野口 龍生[1]、植松 悠[1]、石塚 雄一[1]、村崎 友彦[1]、渡邊 昭夫[1]、野村 佳歩[1]、阿部 晃[2]、新村 洋一[1]、内野 昌孝[1] ([1]東京農大、[2]ミシガン大)
Tomonori SUZUKI[1], ○Yuka ITOTA[1], Tatsuo NOGUCHI[1], Yu UEMATSU[1], Yuichi ISHIZUKA[1], Tomohiko MURASAKI[1], Akio WATANABE[1], Kaho NOMURA[1], Akira ABE[2], Youichi NIIMURA[1], Masataka UCHINO[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]University of Michigan)

我々は菌体外過酸化脂肪酸の強力な還元力を持つ乳酸菌のプロバイオティクスへの応用を目的として、パン種から過酸化脂質還元菌である *Lactobacillus plantarum* P1-2 株（*L. plan.* P1-2 株）を単離した。線虫とラットに対して本菌の酸化ストレス防御効果が観察されたため (1)、豚に投与したところ、血液生化学的指標や肉質評価において良好な結果を得た (2)。本研究では、未利用資源であるオカラの有効利用を視野に、オカラを培地基材とした *L. plan.* P1-2 株の培養を試みた。豚への投与では母豚と子豚で異なる飼料が必要であり（Fig. 1）、母豚への固体飼料としてオカラ、子豚への液体飼料として YG 培地を用いることとし (2)、それぞれの培地における乳酸菌の増殖を観察した。

Previously, we isolated the Lactobacillus plantarum P1-2 strain (L. plan. P1-2) that reduces environmental fatty acid hydroperoxides. We examined the inhibitory effects against internal oxidative stress in Caenorhabditis elegans and rat (1). The L. plan. P1-2 was orally administered to the pregnant pigs and newborn pigs. The test showed positive results for blood biochemical values and pig meat quality (2). Soy okara, which is hugely disposed as byproducts of tofu production, is a good nutrient resource and cheep material. In this study, cultivation of L. plan. P1-2 with soy okara-based medium was attemped from the viewpoint of effective utilization of soy okara. In the oral administration of L. plan. P1-2, the feed form of pregnant pigs is different from that of newborn pigs. Therefore, the liquid medium (YG medium) and the solid medium (commercial okara powder) were prepared to use for newborn pigs as liquid feed and pregnant pigs as solid feed, respectively, (Fig. 1) (2). In addition, effect of each soy okara-based medium on the growth of L. plan. P1-2 was investigated.

(1) Watanabe A. *et al.*, *PLOS ONE*, 2020.
(2) Noguchi T. *et al.*, *The Japanese Society of Swine Science 95th Annual meeting*, 2011.

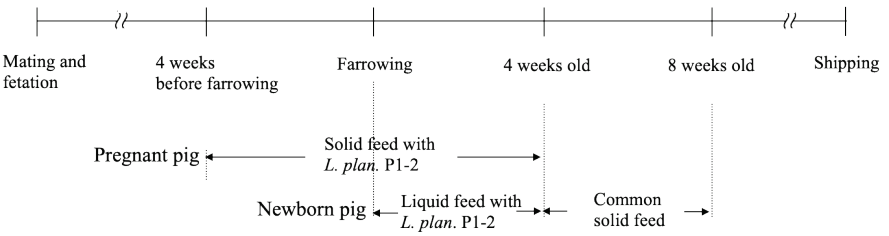


Fig. 1 *L. plan.* P1-2 administration test

Lactobacillus plantarum, Probiotics, Hydroperoxide reducing activity

講演番号：2B04-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

胎内ブランド・NAFU ブランド清酒を目指した自然界からの酵母の分離と育種

Isolation of a local strain of *Sacchromyces cerevisiae* in the *Shishinokura-no-Mori* forest in Tainai city of the Niigata prefecture.

○森 崇智[1]、米内 裕都[1]、古田 悟[2]、栗林 喬[1]、小熊 哲哉[1]、渡邉 剛志[1]（[1]新潟食料農業大学、[2]今代司酒造）
○Takato Mori[1], Hiroto Yonai[1], Satoru Furuta[2], Takashi Kuribayashi[1], Tetsuya Oguma[1], Takeshi Watanabe[1] ([1]Niigata Agro-Food Univ., [2]Imayo Tsukasa Sake Brewery)

清酒（日本酒）製造における酵母の発酵特性は，原料である米と麹とともに清酒の品質を左右する重要な要因である。現在，清酒製造に用いられる酵母は各地の酒造場より単離された，きょうかい酵母の使用が主流となっている。きょうかい酵母が有する良好な醸造特性は，清酒の安全醸造や高品質化に大きく貢献しており，（公財）日本醸造協会から清酒製造場へ広く頒布されている。一方で近年，自然界由来の酵母を用いた清酒製品が注目されている。

酒類の多様化に伴い，より独自性の高い地域色ある清酒製品が重要になるなか，このような酵母を利用することによって，産地のイメージ向上と他地域との差別化を図る動きがある。特に，その産地の名所や特産品などから分離した酵母の使用は，清酒の付加価値向上を可能とし，消費拡大に寄与するものと期待できる。



ししのくらの森の異形ブナ巨木

そこで本研究では，新潟食料農業大学が立地する新潟県胎内市に所縁のある清酒酵母の開発を目的として，“異形ブナ巨木”の存在が世界的に有名な胎内市内の「ししのくらの森」より，酵母のスクリーニングを行ったところ *Saccharomyces cerevisiae* の単離に成功した。さらに、この分離株と既存酵母の 1 倍体を交配させることによって，清酒製造における醸造特性を向上させた育種株を造成し，試験醸造を行ったので報告する。

Sake is a Japanese alcoholic beverage that is produced by the fermentation of steamed rice and *koji* (a culture of *Aspergillus oryzae* on steamed rice grains) using sake yeast. Sake yeasts are classified as *Saccharomyces cerevisiae* and are very important for product quality. Therefore, studies have screened for novel *S. cerevisiae* in various sources, such as flowers and fruits in nature.

In this study, we isolated a local strain of *S. cerevisiae* in the *Shishinokura-no-Mori* forest in Tainai city of the Niigata prefecture. The isolated strain was bred with a haploid sake yeast strain, and the bred strain was found to be closely related to the sake yeast strain and showed excellent brewing properties in small-scale sake brewing. Although more detailed studies are required for this strain to be useful in the sake brewing industry, our findings may contribute to high-quality sake brewing in Tainai city.

sake, yeast, brewing

発表責任者：栗林喬（takashi-kuribayashi@nafu.ac.jp）

講演番号：2B04-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

清酒酵母における新規エタノール適応機構の解明

Elucidation of a new ethanol adaptation mechanism in sake yeast

○島田 翔心[1]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオレジリエンス研究プロジェクト)
○Shogo SHIMADA[1], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]Bio-resilience Research Project. Toyo Univ.)

【背景】*Saccharomyces cerevisiae* の高いエタノール耐性には、ストレス応答転写因子が関与している。しかし清酒酵母においては、ストレス応答転写因子の上流活性化因子が機能欠失変異しているにもかかわらず醸造環境において完全に死滅することはない。このことから、他の要因によるエタノール応答を行っていると考えられる。本研究において、至適温度である 28℃における生菌数を測定したところ、生菌数の増減が繰り返された。その生菌数の増減要因を特定することにより、清酒酵母のエタノール応答機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】標準菌株および清酒酵母について、生菌数および生成エタノール濃度の測定を 15、20、28、30℃で 2 時間毎に行った。その結果、28 と 30℃においては、標準菌株で生菌数が規則的に増加し、エタノール濃度についても規則的に上昇していた。一方、清酒酵母では生菌数は増減が繰り返され、エタノール濃度が減少している箇所や上昇傾向が緩やかになっている箇所が確認できた。そこで、生菌数の増減箇所とエタノール濃度の上昇に変化があった箇所で、エタノール応答が顕著にあらわれると考えた。本研究では、エタノール濃度の変化に関係する要因として、エステル類に関わる *EEB1*、*EHT1* に着目した。現在は、RT-qPCR による遺伝子発現量の解析を行っている。本発表では、これらのデータの詳細ついて報告する。

Stress responsive transcription factors are involved in the high ethanol resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. However, in sake yeast, the upstream activator of the stress response transcription factor is not completely killed in the brewing environment despite the functional deletion mutation. Therefore, other factors may have been involved in the ethanol response. In this study, the viable cell count was repeatedly increased and decreased at the optimum temperature of 28℃. The aim was to elucidate the ethanol response mechanism of sake yeast by identifying the factors that increase or decrease the viable cell.

At 28 and 30℃, the viable cell count of the NBRC strain increased regularly, and the ethanol concentration also increased regularly. In sake yeast, the viable cell repeatedly increased and decreased, and the ethanol concentration decreased and the upward trend became gradual.

In this study, we focused on *EEB1* and *EHT1* related to esters as factors related to changes in ethanol concentration. The analyzing the gene expression level using RT-qPCR will be described in the presentation.

Saccharomyces cerevisiae, sake yeast, ethanol stress

発表責任者：島田翔心（s39102100141@toyo.jp）

講演番号：2B04-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

酒米品種・産地が玄米形状と白米形状の制御に及ぼす影響

The effect of cultivation area and cultivar of sake rice on brown rice shape and white rice shape control

○平吉 明日香[1]、柚山 泰成[1,2]、小松 夕子[1]、小林 拓嗣[1]、岩下 和裕[1,2]([1]酒総研、[2]広島大院・統合生命)
○Asuka HIRAYOSHI[1], Taisei YUYAMA[1,2], Yuko KOMATSU[1], Takuji KOBAYASHI[1], Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】
酒米の玄米形状は多種多様であり、品種や栽培条件の影響を受けると考えられるものの、これらの研究は限られている。一方で、cBN ロールの開発により、比較的容易に白米形状を制御できるようになって来た。玄米の形状は、白米の形状に影響を与えるものと考えられるが、このような背景から玄米の形状を考慮した、最適な白米形状については十分に検討がされていない。そこで我々は品種・産地の異なる酒米を収集し、玄米形状を比較分析するとともに、異なる cBN ロールを用いて、50%白米を作成して形状を分析した。
【方法・結果】
R2BY 酒米 12 品種 18 産地計 22 サンプルの玄米形状と心白形状の比較を行ったところ、異品種間だけでなく同品種間でも産地によって、米粒のサイズや長さ、幅、厚さ、さらに、心白形状に大きな差異が見られた。そこでまず、玄米形状、心白形状等が適宜バラつくように選抜した 7 品種 9 産地計 10 サンプルを用いて、#40(球形)・#60(原形)・#80(扁平)cBN ロールにより 50%白米を作成した。その結果、#80 などの同一条件において白米の形状が大きく異なった。また、同じ品種の玄米でも砕米率は産地によって大きく異なった。今後も玄米形状と白米形状の関係についてさらに検討を進める。

The shape of brown rice has variation and it depends on the cultivar and cultivation conditions. Recently, the shape of polished rice can be controlled by the particle size of newly developed cBN rolls. The shape of brown rice affects the shape of white rice, but none of the studies has been reported. In this context, we examine the shape of both brown and white rice, using 22 R2BY rice samples, including 12 cultivars and 18 different cultivation area. The size and length, width, thickness, and shape of white core were different in each cultivar and cultivation area. At first, we selected 10 rice samples to cover all these differences and produced 50% white rice using #40 (spherical), #60 (analogues), and #80 (flat) cBN rolls. As the result, the differences was observed in the shape of white rice even in same polishing condition, especially #80 cBN roll. Large difference of cracking white rice ratio was observed even in same rice cultivar. We further study on the relationship between the shape of brown and white rice to find the theory for polishing rice.

rice cultivar, rice cultivation area, shape control of white rice

発表責任者：平吉　明日香（a-oofuchi@nrib.go.jp）

講演番号：2B04-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

酒米産地の違いによる高精白（50%精米）の清酒醸造および清酒メタボロームへの影響

The effect of the differences in cultivation areas of sake rice on 50% rice-polished sake brewing and sake metabolome

○柚山 泰成[1,2]、小松 夕子[1]、小林 拓嗣[1]、岩下 和裕[1,2]（[1]酒類総合研究所、[2]広島大院・統合生命）
○Taisei YUYAMA[1,2], Yuko KOMATSU[1], Takuji KOBAYASHI[1], Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】清酒の原料である酒米は、その産地によって、造られる清酒品質が異なると経験的に知られている。酒米の産地の違いは、気象、土壌、栽培方法の違いに基づくと考えられ、これまでにも酒米の品質との関係も解析されている。しかし、ラボスケールでの高精白が難しかったことや、分析項目が限られているなど、解析には限界があった。そこで本研究では、高精白の白米を用い（50%精米）、メタボローム解析により清酒に対する原料米産地の影響を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】2018BY の 5 産地、2019BY の 8 産地で栽培された酒米（山田錦）を用いて、ラボスケールで高精度に制御した製麹・小仕込み試験を行った。分析は、一般成分、香気成分、米麹酵素力価、清酒メタボロームを測定した。その結果、産地の違いでアミノ酸度、日本酒度、カプロン酸エチルの変動係数が大きく、これらの成分は、先行研究の 70%精米の掛米品種間での変動が大きな成分と類似していた。さらに、米麹のα-アミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、酸性プロテアーゼの活性も産地間で変動が大きいことが明らかになった。また、メタボロームによる主成分分析の結果、同じ栽培年度では、産地によってプロットが分かれた。さらに興味深いことに、産地だけでなく、栽培年度によっても主成分プロットが分離することが分かった。したがって現在、産地の違いは気象要素の違いが大きいと仮説を立て、気象要素と清酒成分の関係について解析している。

The cultivation area of sake rice has been recognized as an important factor in sake quality. Differences in cultivation areas include variations in climate, soil, and cultivation methods. Their effects on sake have been analyzed but limited due to classical sake composition analysis method and the difficulty of rice polishing method in lab-scale. Here, using noble sake metabolome analysis method and new rice polishing equipment, we investigate the effect of the rice cultivation area on sake making process and its metabolite. In this study, we collected 13 sake rice (*Yamadanishiki*) cultivated in various areas (5 areas in 2018, 8 areas in 2019) and brewed in lab-scale using 50% polished sake rice. The general sake analysis and ordinal volatile compositions, rice-*koji* enzyme activities, and sake metabolome were determined. Results showed large variation of amino acid content, *Nihonsyu-do*, rice-*koji* enzyme activities (α-amylase, acid carboxypeptidase, and acid protease), and ethyl caproate content among the cultivation areas. Also, metabolome analysis suggested that not only the difference in cultivation area but also the difference in cultivation year had a large effect on sake metabolome. The relationship between the climate and the compositions of sake will also be presented in this study.

Premium sake, Sake metabolome, Cultivation area of sake rice

発表責任者：岩下和裕（iwashitat@nrib.go.jp）

講演番号：2B04-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

Aspergillus oryzae RIB40 株で製麹した米麹のグルコアミラーゼ活性に及ぼす音波照射の影響
Effects of irradiation of sound waves on glucoamylase activities of rice-*koji* prepared from*Aspergillus oryzae* RIB40
○松本 拓、池田 葵、河口 由季、小島 幸治、三枝 敬明、寺本 祐司（崇城大院）
○Taku MATSUMOTO, Aoi IKEDA, Yuki KAWAGUCHI, Kouji KOJIMA, Noriaki SAIGUSA, Yuji TERAMOTO (Sojo Univ.)

【背景・目的】当研究室では、酒造用黄麹 *Aspergillus oryzae* に 6.3 kHz の音波照射下で製麹することにより米麹のグルコアミラーゼ活性が減少することを報告している （Saigusa *et al.*, *African J. Biochem.* 2015）。グルコアミラーゼに関して米麹の分生子に直接音波照射した場合、6.3 kHz で変化は見られず、16.0 kHz で減少することを確認しており、音波照射時期によりグルコアミラーゼ活性が異なることを報告している。（Matsumoto *et al.*, *Int. J. Biomass Renew.* 2021 ）。本研究では、*A. oryzae* RIB40 株で製麹した米麹の糖化力およびグルコアミラーゼ遺伝子発現に及ぼす音波照射（16.0 kHz）の影響について酒造用黄麹の特徴と比較した。
【方法・結果】*A. oryzae* RIB40 株を PDA 培地で 7 日間培養し、分生子を 0.1 g 回収した。一方、酒造用黄麹の種麹を篩にかけて分生子を分離し、同様に 0.1 g 回収した。これら分生子に 16.0 kHz の周波数の音波を 5.0 dB の音圧にて 25℃で 24 時間照射し、蒸米に加えて 30℃で 36 時間製麹した。音波を照射していないコントロールと比較した結果、糖化により生成された還元糖量は RIB40 株では減少が見られ、酒造用黄麹では変化は見られなかった。一方、グルコアミラーゼ活性は RIB40 株および酒造用黄麹ともに減少が確認された。さらにグルコアミラーゼ遺伝子の発現応答を RT-PCR 法により確認した結果、グルコアミラーゼをコードする *glaB* の転写産物量は、RIB40 株および酒造用黄麹ともに減少が確認された。このことから 16.0 kHz の音波照射は *glaB* の遺伝子発現およびグルコアミラーゼ活性に対して抑制の効果を与える可能性が示唆された。

It has been reported that glucoamylase activities of rice-*koji* prepared from *tane-koji* of *Aspergillus oryzae* for sake brewing was decreased, when irradiation of sound waves at 16.0 kHz on conidiospores. In this study, effects of sound on glucoamylase activities of rice-*koji* prepared from *A. oryzae* RIB40 was examined. *A. oryzae* RIB40 was cultivated on PDA plates and conidiospores were collected. Resulting conidiospores were incubated with irradiation of sound waves at 16.0 kHz. As a result, suppression of glucoamylase activities were observed because of irradiation of sound waves. The amount of reducing sugar that was produced from rice-*koji* was also decreased. Furthermore, gene expression of *glaB* was suppressed as well. Thus, we suggested that irradiation of sound waves at 16.0 kHz negatively regulates glucoamylase in rice-*koji*.

Aspergillus oryzae, glucoamylase, *glaB*

講演番号：2B04-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

日本酒醸造ビッグデータを用いた迅速な清酒醸造法の開発

Development of rapid brewing method using large sake brewing data

○小畑 龍太郎[1,2]、小松 夕子[2]、平吉 明日香[2]、小林 拓嗣[2]、岩下 和裕[1,2]([1]広島大学、[2]酒類総合研究所)
○Ryutaro OBATA[1,2], Yuko KOMATSU[2], Asuka HIRAYOSHI[2], Takuji KOBAYASHI[2], Kazuhiro IWASHITA[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB)

【目的】清酒の品質は杜氏の勘や経験によるところが大きい。そこで我々は、醸造酒メタボライト解析法を開発し、原料米や米麹、酵母等の醸造プロセス、微生物と清酒メタボライトとの関係について長年解析を行った。言い換えると、勘や経験が多く介在している清酒醸造プロセスと清酒成分との関係のビックデータ化（日本酒醸造ビッグデータ）を試みた。このビッグデータを使用することで、効率的に醸造プロセスの改善や新商品の開発を行うことが可能と考えられる。そこで、様々な機能性が報告されている 5－アミノレブリン酸（5-ALA）に着目し、短期間で 5-ALA を高生産する醸造法の開発を試みた。
【方法・結果】新たに 5-ALA 標準物質データを得て、これまでに構築したビックデータを検索したところ、酵母菌株と精米歩合が影響したが、さらに白米形状の影響が大きかった。70%扁平精米で最大となり、胚芽の影響によることが推察された。そこで、70％扁平精米をポジティブコントロールとして、粗タンパク量がほぼ同程度となる 60%球形白米、最低レベルとなる 40%原形白米に、段階的に胚芽を添加した小仕込みを実施した。新たに確立した 5－ALA 定量法により小仕込み清酒を測定した結果、胚芽添加区分で、扁平 70%白米と同等の 5-ALA 生産性がみられた。以上のことから、清酒醸造ビックデータを用い短期間で 5-ALA 高含有清酒の醸造法を開発した。

The quality of sake still depends largely on the sake master’s intuition and experience. We have analyzed the relationship among the sake making parameters and sake metabolites, then estimate sake brewing bigdata. Using this bigdata, it will be possible to minimize the time cost to develop the new brewing method. As the example, we attempt to develop the high 5-aminolevulinic acid (5-ALA) sake brewing method, because of various physiological functions of 5-ALA. From the sake bigdata, we explore brewing parameters, which affect the 5-ALA level. Yeast strain and polishing ratio were detected but the shape of white rice was found as most significant factor for the 5-ALA concentration in sake. The 70% flat polishing rice sake contained the highest 5-ALA level. Thus, we suspected germ of rice would affect the 5-ALA level and we examined a small-scale fermentation by adding the germ of rice to 60% spherical polishing and 40% analogues shape of white rice. With the germ, 5-ALA level of sake was equivalent to that of 70% flat polishing. Taken together, we have developed a new brewing method to produce high 5-ALA sake in a short period using sake brewing bigdata.

sake, metabolome, data driven

発表責任者：岩下和裕（iwashitact@nrib.go.jp）

講演番号：2B04-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

ワイン用酵母発酵助成剤が清酒醸造に及ぼす影響（第 2 報）

Effects of fermentation nutrients for wine on sake brewing （Part2）

○飯塚（古川） 幸子、神田 涼子、寺本 聡子、藤田 晃子、山田 修 (酒総研)
○Sachiko IIZUKA(FURUKAWA), Ryoko KANDA, Satoko TERAMOTO, Akiko FUJITA, Osamu YAMADA (NRIB)

酵母発酵助成剤は、製造の健全を期するため海外のワイン醸造では広く用いられており、日本でも酒税法及び酒類行政関係法令等解釈通達で酒類の原料として取り扱わない物品としてその使用が認可されている。これまでに我々は、ワイン用酵母発酵助成剤（LALLEMAND 社製 Stimula Sauvignon Blanc と Optimum White を添加した一段仕込み及び三段仕込み（留添で添加）の清酒醸造試験を行い、酵母発酵助成剤の添加による原料利用率の向上と製成酒の香気増強効果を確認した [1)]。今回、我々はこれらの酵母発酵助成剤を水麹または初添で添加した三段仕込みの清酒醸造試験をワイン酵母と清酒酵母を用いて行い、添加時期による差異を調べた。その結果、ワイン酵母では、一段仕込みほど顕著ではないものの前回と同様の効果が確認され、ワイン酵母で清酒醸造を行う際の発酵代謝是正に効果を示すことが示唆された。清酒酵母では、酵母発酵助成剤の添加効果はワイン酵母より小さかったが、製成酒の官能評価では果実様の良好なコメントを得た。以上のことから、ワイン用酵母発酵助成剤の添加は、清酒に新しい特徴香を付与し、特徴ある製品開発の手段となる可能性があると考えられた。

1）飯塚ら：醸協，**116**，641-653，2021.

Fermentation nutrients are widely used in winemaking for the manufacturing soundness, and their use is permitted as an article which is not treated as raw materials of alcoholic beverages by the Liquor Tax Law and Liquor Administrative Law or regulation interpretation notifications in Japan. Previously, we have examined the one-step and the three-step (addition at third step) preparation for fermentation mash with the use of fermentation nutrients for wine（Stimula Sauvignon Blanc and Optimum White, LALLEMAND）. The addition of them improved the utility efficiency of raw materials and enhanced aroma of the brewed sake[1)]. In this study, we have investigated the difference due to addition time by the three-step (addition at koji and water mixture or first step) preparation for fermentation mash using wine and sake yeasts. Although it was not remarkable as the previous results of the one-step preparation for fermentation mash, the same effect as previous reports was found in that of the use of wine yeast. It was suggested that the addition of them improved the fermentative metabolism in sake brewing using wine yeast. The effects of the addition of them in the case of using sake yeasts were smaller than that of using wine yeast, the favorable comments as fruit aroma in those samples show a possibility in which the use of the fermentation nutrients on sake brewing provides a potent tool for the development of products with new characteristics aroma.

1） S. Iizuka et al.: Journal of the Brewing Society of Japan, **116**, 641-653, 2021.

sake brewing, fermentation nutrients, fermentation property

講演番号：2B04-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

大吟醸酒の上槽工程による脂肪酸及び脂肪酸エチルエステルの変化

Change of fatty acids and fatty acid ethyl esters after filtration of finished main mash in *daiginjo*

○谷野 有佳、伊藤 一成、竹内 赴登、花房 裕子、三宅 剛史（岡山県工技セ）
○Yuka TANINO, Kazunari ITO, Hayato TAKEUCHI, Hiroko HANAFUSA, Tsuyoshi MIYAKE (Industrial technology Center of Okayama Prefecture)

【目的】清酒の香気は酒質を決定づける重要な因子であり、清酒製造過程で香気のバランスが崩れるとオフフレーバーが目立つ要因になるといわれている。我々は、2020 年度大会において、上槽工程で使用される濾布のうち、化学繊維には綿よりも多くの香気成分が残留していること、化学繊維を使用する自動圧搾工程を経ると、酒中の脂肪酸エチルエステル (FAEE) が脂肪酸 (FA) と比較して減少することを報告した。今回は、多くの香気成分を含む大吟醸酒を用いて、綿または化学繊維を使用した上槽工程における FA と FAEE の変化を報告する。
【方法・結果】岡山県内の清酒製造会社において醸造された大吟醸酒を試料とした。醪を遠心分離したものを上槽前試料とし、綿製の酒袋を使用した袋吊り後のものと、化学繊維の濾布を使用した自動圧搾工程後のものの 2 種を上槽後試料とした。香気成分の分析は、2020 年度大会同様、Full Evaporation DHS (FEDHS) 法と特性の異なる捕集管 2 本を組み合わせた方法を用い、広範な成分を捕集濃縮後、GC/MS により分離検出した。内部標準物質であるカプロン酸メチルに対する相対強度で半定量化し、比較した結果、化学繊維を使用した上槽工程において、大吟醸酒は 2020 年度大会に報告した結果と同様の傾向を示し、上槽によって FAEE の方が FA よりも大きく減少していた。一方で、綿を使用した上槽工程では、化学繊維を使用した自動圧搾に比べて、FAEE の減少が抑えられる傾向がみられた。

[Objective] In the 2020 annual meeting, we reported that synthetic textile trapped more volatile compounds than cotton and that FAEEs were more decreased after automatic pressing with synthetic textile than FAs in sake. In this study, we analyzed the changes of FAs and FAEEs after filtration using hanged cotton bag or automatic pressing with synthetic textile in *daiginjo* which contains many volatile compounds.
[Methods and Results] *Daiginjo* samples before and after filtration were kindly provided from sake breweries in Okayama Prefecture. The analysis of GC/MS was conducted after sampling from *daiginjo* sample by the 2 step multi-volatile method combined with DHS and FEDHS. As a result of semi-quantification of FAs and FAEEs against internal standard, FAEEs were more decreased than FAs after automatic pressing with synthetic textile in *daiginjo*, which was similar tendency to our previous report. On the other hand, in the filtration process using hanged cotton bag, many FAEEs tended to be remained even after filtration.

FEDHS-GC/MS, fatty acid, fatty acid ethyl ester

発表責任者：谷野　有佳（yuka_tanino@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：2B04-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム B

清酒から新たに見出されたオリゴ糖の構造解析

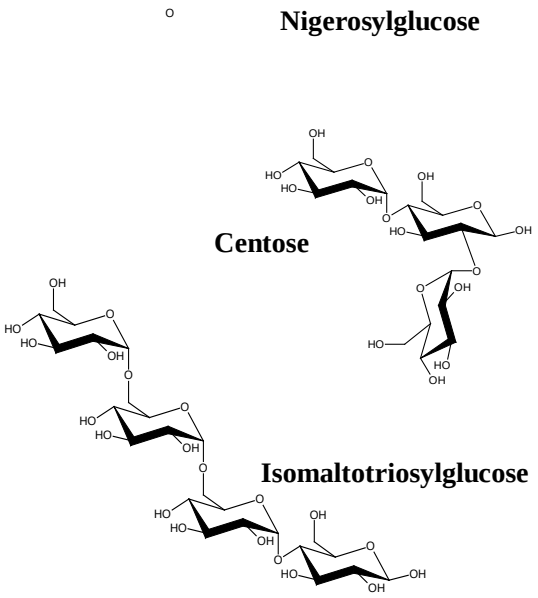
Structural Analysis of Oligosaccharides Newly Detected in Sake

○竹久 まや[1]、山田 明日香[1]、勝田 亮[2]、小林 泉美[3]、本田 千尋[1]、金本 湧太[3]、進藤 斉[1]、穂坂 賢[1]、徳岡 昌文[1] ([1]東農大院応生、[2]東農大院生命、[3]東農大院農)
○Maya TAKEHISA[1], Asuka YAMADA[1], Ryo KATSUTA[2], Izumi KOBAYASHI[3], Chihiro HONDA[1], Yuta KANEMOTO[3], Hitoshi SHINDO[1], Masaru HOSAKA[1], Masafumi TOKUOKA[1] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Life. Sci., Tokyo Univ. of Agric., [3]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric.)

清酒中においてオリゴ糖は全糖の 22~65%と多く含まれ，甘味や粘稠性をもたらすほか，アルコールや酸の刺激を和らげるなど，調和のとれた味わいをもたらす重要な呈味成分である。当研究室では，清酒中のオリゴ糖生成メカニズムの解明を目的とし，麹菌 *Aspergillus oryzae* の主要なα-グルコシダーゼである AgdA 及び AgdB のオリゴ糖生成との関連を調べている。

遺伝子破壊株で製造した清酒(*Δagda* 清酒，*ΔagdB* 清酒)に含まれるオリゴ糖を分析したところ，AgdA もしくは AgdB が生成に関与すると推定された重合度 3，4 のオリゴ糖は少なくとも 6 分子種検出され，このうち 3 分子種は構造が不明であった。精製物を NMR 解析した結果，これらは清酒からの検出報告がない Nigerosylglucose，Centose 及び Isomaltotriosylglucose であった（図)。コントロールの清酒と比較して，*ΔagdA* 清酒では Nigerosylglucose が増加し Isomaltotriosylglucose が減少し，*ΔagdB* 清酒では Nigerosylglucose 及び Centose が減少，Isomaltotriosylglucose が増加した。以上より，清酒醸造において、Nigerosylglucose と Centose は AgdB により，Isomaltotriosylglucose は AgdA が生成に関わっていることが示唆された。

In sake, oligosaccharides reach 65% of the whole saccharides and are important components that provide a harmonious taste. We have been investigating the relationship between the oligosaccharide generation and the major α-glucosidases of *Aspergillus oryzae*: AgdA and AgdB. Oligosaccharide analysis in sakes produced with fungal strains, Δ*agdA* and Δ*agdB*, showed that the amount of six oligosaccharides with degree of polymerization three and four were influenced by gene disruption of *agdA* or *agdB*. NMR analysis showed that these oligosaccharides included Nigerosylglucose, Centose and Isomaltotriosylglucose, all of which have not been detected in sake. Also, our data suggested that Nigerosylglucose and Centose were generated by AgdB, and Isomaltotriosylglucose was generated by AgdA during sake brewing.



oligosaccharide, *Aspergillus oryzae*, α-glucosidase

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：2B07-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

食用担子菌発酵ダイズの栄養特性と抗酸化活性

Nutritional properties and antioxidant activity of edible mushroom fermented soybeans

○澤田 雄太、福士 涼介、新井 博文、佐藤 利次（北見工業大学）
○Yuta SAWADA, Ryosuke HUKUSHI, Hirohumi ARAI, Toshitsugu SATO (Kitami Inst. Tech)

【研究背景】食用担子菌は、食品や医薬品の原料など多様な用途に利用されている糸状菌である。一方ダイズは、機能性成分としてポリフェノールの一種であるイソフラボンを含む農作物である。イソフラボン、特にアグリコンは、女性ホルモン様作用、抗酸化作用を有することから、更年期障害緩和や骨粗しょう症予防、乳癌の予防などの効果が期待されている。本研究では、食用担子菌であるタモギタケ（*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*）とヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）でダイズを発酵させ、イソフラボン、ポリフェノール量、抗酸化活性、および遊離アミノ酸の変動を解析した。
【結果】イソフラボンは、どちらのキノコで発酵させても培養 10 日目で配糖体である Daidzin と Genistin が急激に減少し、代わりにアグリコンである Daidzein と Genistein が増加した。ポリフェノール量と抗酸化活性は発酵に伴って増加し、タモギタケ発酵ダイズではそれぞれ 40 日目で 4.3 倍、30 日目で 6.8 倍と最大となった。ヒラタケ発酵ダイズはどちらも 30 日目で最大となり、それぞれ 3.9 倍、2.0 倍となった。遊離アミノ酸も発酵に伴って増加し、タモギタケ発酵ダイズは 40 日目で 24.4 倍、ヒラタケ発酵ダイズは 50 日目に 21.0 倍で最大となった。以上の結果は、ダイズを食用担子菌で発酵させることにより、イソフラボンアグリコンが増加し、遊離アミノ酸量が増加したことから、機能性と栄養価を高めることが期待できる。

[Background] Edible mushrooms used for various purposes such as raw materials for foods and pharmaceuticals are filamentous fungi belonging basidiomycetes. On the other hand, soybean is one of agricultural products containing isoflavones as a functional component expected to be effective in alleviating menopausal disorders, preventing osteoporosis, and preventing breast cancer. In this study, soybeans fermented with Tamogitake (*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*) and Hirateke (*Pleurotus ostreatus*) were analyzed for changes in isoflavones, polyphenols, antioxidant activity, and free amino acids.
[Results] In isoflavones, Daidzin and Genistin decreased quickly and Daidzein and Genistein increased on the 10th day of culture regardless of which mushroom was fermented. The amounts of polyphenols and free amino acids, and antioxidant activity increased during fermentation. These results can be expected to enhance the functional value and nutritional of soybean by fermentation of edible mushroom.

mushroom, soybean, fermentation

発表責任者：佐藤　利次（tosisato@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2B07-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

複合微生物系による機能性代謝物の生産に関する研究(1) - 水素生産菌を利用したエクオール発酵生産 -

Synthesis of functional metabolites by co-culture (1) - EQL fermentation using H2-generating bacteria -

○千葉 夏乃[1]、濱川 匡史[1]、山本 侑平[2]、中島 賢則[1]、山本 浩明[1]([1]ダイセル・事業創出 C、[2]ダイセル・工業化 G)
○ Natsuno CHIBA[1], Masafumi HAMAKAWA[1], Yuhei YAMAMOTO[2], Takanori NAKAJIMA[1], Hiroaki YAMAMOTO[1] ([1]Daicel Business Develop. C, [2]Daicel Industrialization Dept.)

【目的】機能性食品素材は腸内で代謝され、より高機能な腸内代謝物に変換されることで効能を発揮するという報告が近年増加している。腸内代謝能は個人差が大きいため、代謝前駆体（例えば大豆イソフラボン）ではなくその機能性代謝物（例えばエクオール（EQL））を摂取する方がより効果的である。腸内代謝においては、高い嫌気度や水素が重要な役割を有し、工業的な機能性代謝物の生産では系外からの水素供給が課題となっている。一方、我々はエラグ酸からその機能性ポリフェノールであるウロリチン A（UA）への代謝に少なくとも 2 種類の腸内細菌が関与することを見出し、複合微生物系による UA の工業的生産方法の確立について報告してきた（2019 年度日本農芸化学会 3D1p06-08)。この UA 生産では、反応に水素を必要とする微生物に対してもう一方の微生物が水素を生産・供給することにより、外部からの水素供給なしに UA の生産が可能となった。本研究では、水素を必要とする EQL 生産菌と UA 製法開発で見出された水素生産菌とを共培養することにより、外部からの水素供給を必要としない EQL 生産システムを構築した。
【結果】EQL 生産菌は、窒素雰囲気下における単独嫌気培養では EQL 生産が全く認められなかったが、水素生産菌との共培養によって水素供給条件と遜色ない EQL の生産が確認できた。

In gut metabolism, a highly anaerobic atmosphere and a supply of hydrogen play an important role to produce functional metabolites. Hydrogen-supply has become an issue in the industrial production. Recently, we have constructed a co-culture system of urolithin A(UA) production with two types of intestinal bacteria. In this system, one microorganism transforms ellagic acid to Urolithin C (UC) using hydrogen supplied by the other which transforms UC to UA, so that a hydrogen-requiring reaction could achieve without an external supply of hydrogen.
In this study, we applied the co-culture system of UA to the synthesis of equol from daidzein, which is known as a bioconversion that required hydrogen. We combine an equol-producing bacterium and a hydrogen-generating bacterium, then aim to conduct an equol production without an external supply of hydrogen. At our presentation, we report a novel EQL synthesis by a co-culture system.

equol, co-culture, hydrogen

発表責任者：千葉夏乃（nt_chiba@jp.daicel.com）

講演番号：2B07-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

食品廃棄物の循環利用に向けたセルフクローニング麹菌によるオメガ３脂肪酸生産

Omega-3 fatty acid　production by self-cloning koji mold toward food waste utilization

○真野 潤一[1]、小竹 英一[1]、都築 和香子[2]、鈴木 聡[1]、楠本 憲一[3]、服部 領太[1]([1]農研機構食品研、[2]農研機構食品研（現　東京家政大学)、[3]農研機構食品研（現　大阪大学））
○Junichi MANO[1], Kotake Eiichi[1], Wakako Tsuzuki[2], Satoshi Suzuki[1], Kenichi Kusumoto[3], Ryota Hattori[1] ([1]Institute of Food Research, NARO, [2]Institute of Food Research, NARO (Tokyo Kasei Univ.), [3]Institute of Food Research, NARO (Osaka Univ.))

地球温暖化の影響が顕在化しつつある現在、環境保全に対する人々の関心はこれまで以上に高まっている。環境負荷低減のため、資源を効率的に利用し、廃棄物を削減する循環型社会の実現が期待されている。日本国内では、年間 1800 万トンの食品廃棄物等が発生しており、その有効活用が求められている。一方、オメガ３脂肪酸が高い健康機能性で注目を集めており、オメガ３脂肪酸の一つであるα-リノレン酸を多く含む食用油や飼料が求められている。そこで、本研究では、様々な食品廃棄物から培養することができる麹菌を用いてα-リノレン酸を生産することを目指し、研究を実施した。

α-リノレン酸の生産にはオメガ３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が必須であるが、麹菌に関する報告が見当たらなかったことから、データベース上の検索で AO09001000714 を候補遺伝子とした。TEF1 プロモーター（引用 1）と AO09001000714 遺伝子を接続し、*A. oryzae* RIB40 株に導入して、形質転換体を得た。この株を、デンプンを炭素源として培養し、菌体内の脂質をガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、α-リノレン酸の比率は野生株で 1.2%であったが、形質転換株では 13.2%に上昇した。このことから、AO09001000714 が RIB40 株のオメガ３脂肪酸不飽和化酵素遺伝子であることが示唆された。今後、マルチコピー導入株の作出等によって更なる生産性の向上を目指す予定である。

（引用 1、N. Kitamoto et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 85-92 (1998)）

From the viewpoint of enhancing environmental sustainability, it is requested to realize circular economy. In Japan, 18 million tons of food wastes are annually generated. The utilization of these food wastes is strongly demanded. α-linolenic acid, a kind of omega-3 fatty acids, is valuable as food oil and animal feed. In this study, we aimed α-linolenic acid production using *Aspergillus oryzae* being able to grow on various food wastes.

By homology search in the public database, AO09001000714 was estimated as omega-3 fatty acid desaturase gene in *A. oryzae* RIB40. This gene was connected to TEF1 promoter and introduced into *A. oryzae* cells. The obtained transformant was subjected to fatty acid analysis using gas chromatography. The percentage of α-linolenic acid was 1.2% and 13.2% for the wild type and the transformant, respectively. These results suggested that AO09001000714 is the omega-3 fatty acid desaturase gene. More efficient production by the multicopy introduction is our future subject.

koji mold, self-cloning, omega-3 fatty acid

発表責任者：真野潤一（jmano@affrc.go.jp）

講演番号：2B07-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

大腸菌によるルテイン高生産システムの開発
Pathway engineering for high-yield production of lutein in *Escherichia coli*
○竹村 美保[1]、久保 亜希子[2]、渡邉 あすか[1]、作野 華誉[1]、美濃部 侑香[1]、佐原 健彦[3]、村田 昌浩[4]、荒木 通啓[4]、原田 尚志[5]、寺田 喜信[2]、矢追 克郎[3]、大段 光司[2]、三沢 典彦[1]（[1]石川県大、[2]グリコ（株）、[3]産総研、[4]京大医、[5]鳥取大工）
○Miho TAKEMURA[1], Akiko KUBO[2], Asuka WATANABE[1], Hanayo SAKUNO[1], Yuka MINOBE[1], Takehiko SAHARA[3], Masahiro MURATA[4], Michihiro ARAKI[4], Hisashi HARADA[5], Yoshinobu TERADA[2], Katsuro YAOI[3], Kohji OHDAN[2], Norihiko MISAWA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Glico Co., [3]AIST, [4]Kyoto Univ., [5]Tottori Univ.)

ルテインはカロテノイドの一種で、人の目の健康にとって重要な働きをしている。代謝工学によってカロテノイドを微生物（大腸菌）で生産する研究は盛んに行われているが、ルテインに関してはほとんど行われていない。我々はこれまでに、大腸菌によるルテインの生産に成功しているが、その生産性は非常に低いものであった。そこで本研究では、ルテイン生産のキーとなる遺伝子の最適化と上流経路の強化により、ルテインの生産性の向上を試みた。まず、生合成酵素遺伝子を検討した結果、リコペンβ環化酵素遺伝子としてゼニゴケ由来 *MpLCYbΔTP*、リコペンε環化酵素遺伝子としてゼニゴケ由来 *MpLCYe*（大腸菌コドンに最適化）、ε環水酸化酵素遺伝子としてゼニゴケ由来 *MpCYP97C*（大腸菌コドンに最適化）を組み合わせた際に、ルテインの生産量が最も高くなることがわかった。次に、上流経路を強化し、基質となるファルネシル二リン酸を増やすことを試みた。方法としては、メバロン酸経路遺伝子群およびエチルアセト酢酸資化遺伝子をプラスミドあるいはゲノム挿入により、大腸菌に導入した。その結果、エチルアセト酢酸を添加して培養した際に、ルテインの生産量が増加した。さらに、最も生産性が高かった大腸菌株を用いて、ミニジャーによる培養条件の最適化を行った結果、当初 0.26 mg/L であったルテイン生産性が 11.0 mg/L にまで向上した。（本研究は、NEDO Smart Cell Project によるものである）。

Lutein is an industrially important carotenoid pigment, which is essential for photoprotection and photosynthesis in plants. It is crucial for maintaining human health due to its protective ability from ocular diseases. However, its pathway engineering research has scarcely been performed for microbial production using heterologous hosts, such as *Escherichia coli*, since the engineering of multiple genes are required there. In this study, upstream genes effective for the increase in carotenoid amounts, such as isopentenyl diphosphate (IPP) isomerase (*IDI*) gene, were integrated into the *E. coli* JM101 (DE3) genome. The most efficient set of the key genes (*MpLCYe*, *MpLCYb*, and *MpCYP97C*) was selected from among corresponding genes derived from various plant (or bacterial) species using *E. coli* that had accumulated carotenoid substrates. Furthermore, to optimize the production of lutein in *E. coli*, we introduced several sorts of plasmids that contained some of the multiple genes into the genome-inserted strain and compared lutein productivity. Finally, we achieved 11 mg/L as lutein yield at a mini jar level. Here, high-yield production of lutein was successfully performed using *E. coli* through approaches of pathway engineering. (Funding: ‘Smart Cell Oroject’ organized by NEDO)

lutein, *Escherichia coli*, pathway engineering

発表責任者：竹村美保（mtake@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2B07-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

ポリグルタミン酸を生産する野生バチルス科細菌の探索

The exploration of wild Bacillaceae that produce polyglutamic acid

○佐藤 涼香、杉山 健二郎、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大学工学研究科化学応用学専攻）
○Suzuka SATO, Kenjiro SUGIYAMA, Nobuhiro ABURAI, Katsuhiko FUJII (Applied Chemistry and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Kogakuin University)

ポリグルタミン酸（PGA）は、納豆の糸で知られる納豆菌の粘性マトリクスの主成分であり、化学処理により吸水性のあるハイドロゲルを形成することから、医薬、化粧品、環境保全の分野で利用が期待されている。本研究では、納豆菌以外で PGA を生産する野生 *Bacillus* 属細菌の探索を試みた。

大学キャンパス周辺で土壌、落葉、枯草等を採取し、微生物源とした。10 分間煮沸した後、PGA 生産菌の培養で実績のある寒天培地数種類に接種し、25℃で 3 日間培養した。寒天培地上に出現したコロニーを分離し、それらのマトリクスの水溶液を調製し、オストワルド粘度計で還元粘度を測定した。 検討の結果、ほとんどの菌株のマトリクスの粘度は納豆菌 PGA よりも低かったが、納豆菌 PGA よりも高い還元粘度マトリクスを生産する株も見つかった。化学分析の結果、当該株のマトリクスには分子量約 9,000 kDa のタンパク質が含まれており、主要な構成アミノ酸はグルタミン酸であったことから、PGA であることが示唆された。しかし、疎水性アミノ酸の含量が納豆菌 PGA よりも多い特徴があった。さらに、マトリックス中の主要な多糖類は、レバンを持つ納豆菌と異なり、グルカンであった。

The mucilage of *Bacillus subtilis* var. *natto* are a viscous matrix containing polyglutamic acid (PGA), which is known to form water-absorbing hydrogel by chemical treatment, and has a potential to applications in medical and cosmetic industries, as well as environmental protection.

Soil and litter samples were collected in and around University campus. After boiling for 10 min., the samples were inoculated to several types of agar media, and cultivated at 25℃ for 3 days. Mucilage of the isolates was collected from the grown colonies on agar media, and the viscosity of the mucilage solution was measured using the Ostward’s viscometer. Reduced viscosity the matrix was calculated and the strains which produce viscous mucilage were screened.

While viscosity for mucilage of most isolates was lower than that for *B. subtilis* var. *natto*, but mucilage for the strain 8H was found to show a viscosity higher than *B. subtilis* var. *natto*. Chemical analysis showed that the mucilage of the strain 8H contains protein which has molecular mass of approximately 9,000 kDa and is rich in glutamic acid, suggesting that it is PGA. Unlike a mucilage of *B. subtilis* var. *natto*, major polysaccharide in the mucilage of the strain 8H was glucan.

polyglutamic acid, Peribacillus simplex, mucilage

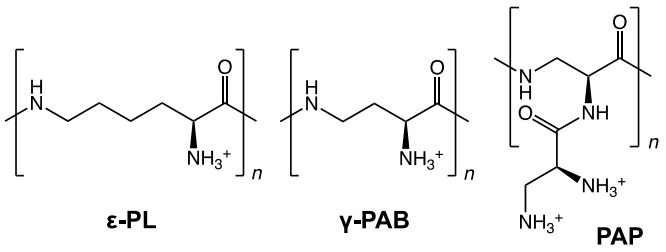
講演番号：2B07-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

放線菌由来のポリ(γ-L-ジアミノ酪酸)の構造解析と抗菌活性

Structural Characterization of Poly(γ-L-diaminobutyric acid) Produced by a Strain of *Streptomyces* sp. and Its Antimicrobial Activity

○佐々木 摩帆[1]、吉田 修[1]、星山 貴文[1]、松井 旺大[1]、山中 一也[2]、竹原 宗範[1]([1]滋賀県大工、[2]関西大化学生命工)
○Maho SASAKI[1], Osamu YOSHIDA[1], Takafumi HOSHIYAMA[1], Akihiro MATSUI[1], Kazuya YAMANAKA[2], Munenori TAKEHARA[1] ([1]Univ. Shiga Pref., [2]Kansai Univ.)

Poly(ε-L-lysine)（ε-PL）を分泌生産する *Streptomyces* 属放線菌のいくつかの株が，類縁のカチオン性ポリペプチドである poly(γ-L-diaminobutyric acid)（γ-PAB）[1] や poly[β-(L-diaminopropionyl-L-diaminopropionic acid)]（PAP）[2] を併産していることを見出した（右図）。これらポリペプチドは幅広い抗菌スペクトルを有し，とくに γ-PAB は ε-PL よりも出芽酵母に対し優れた抗菌性を示した。



本研究では，*Streptomyces* sp. USE-31 株の ε-PL 生合成遺伝子欠損株（Δ*pls*）を作製し，効率的に γ-PAB を生産・取得した。精製した γ-PAB について，^{1}H NMR 解析より，平均重合度は 20，また α 位のアンモニウム基の pK_a は 6.8 と見積もられ，野生型由来と同等の値を有していた。円偏光二色性スペクトル測定において，γ-PAB は ε-PL と同様に酸性から中性域では，タンパク質の典型的な二次構造に由来するピークは観察されなかったが，塩基性域では β シート様構造が誘起されることが分かった。さらに，γ-PAB および ε-PL を水溶性縮合剤（EDC）存在下で Dansyl hydrazine と反応させることで，ペプチドのカルボキシ末端をラベル化した。これらを *Saccharomyces cerevisiae* 細胞に添加して蛍光顕微鏡観察することで，ペプチドの細胞内局在を調査した。

Some strains of *Streptomyces* spp. were found to secrete polycationic polypeptides such as poly(γ-L-diaminobutyric acid) (γ-PAB) and poly[β-(L-diaminopropionyl-L-diaminopropionic acid)] (PAP) into their culture broth along with poly(ε-L-lysine) (ε-PL). These polypeptides have broad antimicrobial spectra, and γ-PAB showed remarkably higher antifungal activity against budding yeasts.

The γ-PAB was efficiently prepared from a mutant of *Streptomyces* sp. USE-31 whose ε-PL biosynthetic gene cluster was disrupted. Purified γ-PAB has almost identical chemical properties to those of the wild type. Cellular distribution of γ-PAB and ε-PL in *Saccharomyces cerevisiae* were microscopically investigated with fluorescently-labelled polypeptides at their carboxyl termini.

1) M. Takehara, M. Saimura, H. Inaba, H. Hirohara, *FEMS Microbiol. Lett.* **2008,** *286,* 110. 2) M. Takehara, M. Saimura, H. Inaba, Y. Kato, S. Muro, T. Matsunaga, K. Yamanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021,** *105,* 3145.

cationic polypeptide, poly(γ-L-diaminobutyric acid), poly(ε-L-lysine)

発表責任者：竹原宗範（takehara@mat.usp.ac.jp）

講演番号：2B07-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

発酵食品に由来するポリアミン高産生菌 *Staphylococcus epidermidis* FB146 のポリアミン関連遺伝子の同定

Identification of polyamine-related genes in the high polyamine-producing bacterium *Staphylococcus epidermidis* FB146 from fermented foods

○白澤 秀斗[1]、西山 知里[2]、平野 里佳[1,2]、小柳 喬[2]、奥田 修二郎[3]、高木 宏樹[2]、栗原 新[1]（[1]近畿大生物理工、[2]石川県大生資環、[3]新潟大医）
○Hideto SHIRASAWA[1], Chisato NISHIYAMA[2], Rika HIRANO[1,2], Takashi KOYANAGI[2], Syujiro OKUDA[3], Hiroki TAKAGI[2], Shin KURIHARA[1] ([1]Kindai Univ, [2]Ishikawa Prefectural Univ., [3]Niigata Univ.)

ポリアミンの摂取が動物の健康寿命延伸に大きく寄与していることが報告されている。発酵食品にはポリアミンを高濃度で含むものが存在し、このポリアミンは発酵微生物由来であることが考えられた。食経験のある発酵微生物からポリアミンを高生産する細菌をスクリーニングできれば、その培養上清からポリアミン高含有サプリメントを作出できるほか、プロバイオティクスとして摂取した場合に消化管内でのポリアミン産生が期待される。本研究では、その培養上清中に高濃度の（478 μM）プトレッシンを蓄積する能力を持つ *Staphylococcus epidermidis* FB146 を味噌から分離した。次に、代表的な *Staphylococcus* 属細菌 21 菌種の基準株および、本研究で新たにスクリーニングした *S. epidermidis* FB 146 について、その培養上清および菌体内のポリアミン産生能を解析し、全ゲノムシーケンスで、ポリアミン関連遺伝子の保存性を検証した。この結果、試験した菌株のうち *S. epidermidis* FB 146 のみが高いプトレッシン産生能を有しており、本菌のプラスミド DNA 上にはプトレッシン合成に関わるオルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子（*odc*）と培養上清へのプトレッシンの放出に寄与すると考えられるプトレッシン-オルニチンアンチポーター遺伝子（*potE*）が存在した。

It has been reported that the intake of polyamines greatly contributes to the extension of healthy life span in animals. Fermented foods exist that contain high concentrations of polyamines, and these polyamines were thought to be derived from fermented microorganisms. If we can screen bacteria that produce high levels of polyamines from food-experienced fermenting microorganisms, we can produce supplements containing high levels of polyamines from their culture supernatants, and polyamine production in the gastrointestinal tract is expected when they are ingested as probiotics. In this study, *Staphylococcus epidermidis* FB146, which has the ability to accumulate high concentrations of (478 μM) putrescine in its culture supernatant, was isolated from miso. Next, we analyzed the polyamine-producing capacity of the culture supernatants and bodies of the reference strains of 21 representative *Staphylococcus* species and *S. epidermidis* FB 146, which was newly screened in this study, and verified the conservation of polyamine-related genes by whole-genome sequencing. Among the strains tested, only *S. epidermidis* FB 146 had a high putrescine production capacity, and the ornithine decarboxylase gene (*odc*), which is involved in putrescine synthesis, and the putrescine-ornithine antiporter gene (*potE*), which is thought to contribute to the release of putrescine into the culture supernatant, were present on the plasmid DNA of this strain.

polyamine, Staphylococcus epidermidis, ornithine decarboxylase gene (odc)

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2B07-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

インゲンマメ類のキノコ発酵とその解析

Analysis of four types of *Phaseolus vulgaris L.* fermented with edible mushrooms

○古橋 多聞、澤田 雄太、武田 昂大、齋藤 実奈、佐藤 利次（北見工大・食品科学）
○Tamon FURUHASHI, Yuta SAWADA, Kodai TAKEDA, Mina SAITO, Toshitsugu SATO (Food sci., Kitami Inst. Technol.)

食用キノコは、食品や医療品の原料などに幅広く利用され、ポリフェノール類を酸化分解・重合する活性が高いという特徴を持っている。一方、インゲンマメは世界中で消費されている農産物の1つで、抗酸化活性が高く、ポリフェノールを含んでいる。これまで当研究室では、食用キノコでダイズを発酵させることにより、ポリフェノール量が増加し、抗酸化活性が上昇することを報告した。本研究では、インゲンマメ 4 品種（大手亡、大正金時、シャチ豆、貝豆）をヒラタケとタモギタケで発酵させ、そのポリフェノール量と抗酸化活性を経時的に測定した。その結果、ポリフェノール量は、どの豆においてもヒラタケとタモギタケで発酵させることにより、2-5 倍程度まで増加した。一方、抗酸化活性は、ほとんどの発酵マメで減少する傾向を示したのに対して、40 日目のタモギタケ発酵大手亡のみ約 5 倍に増加した。以上の結果から、キノコ発酵インゲンマメ、特にタモギタケ発酵大手亡では、機能性上昇の可能性が期待される。

Edible mushrooms, which are widely used as raw materials for food and medical products, have the characteristics that they can decompose polyphenols oxidatively or polymerize. *Phaseolus vulgaris* L. including antioxidant activity and polyphenols is one of the most consumed beans in the world. We have reported that total polyphenols content and antioxidant activity increased in soybeans fermented with edible mushrooms. In this study, we investigated polyphenol amounts and antioxidant activities of four kidney bean cultivars (white kidney, red kidney, calypso, and kaimame) fermented with *Pleurotus ostreatus* (Po) or *Pleurotus citrinopileatus* (Pc). As a result, total polyphenol amounts of the beans fermented with Po and Pc increased about 2~5 times in any bean. On the other hand, antioxidant activity tended to decrease in most fermented beans, while increased about 5 times only at the white kidney of Pc fermentation on the 40th day. These results suggested that the functionality increased in the kidney beans fermented with mushrooms, especially with Pc.

kidney bean, mushroom, fermentation

発表責任者：佐藤利次（tosisato@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2B07-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

ヒアルロン酸発酵条件のスケールダウン検討

Scale-down study of hyaluronic acid fermentation conditions

○成田 琴美、井上 和幸、宮本 哲也、武内 章（キユーピー（株））
○KOTOMI NARITA, KAZUYUKI INOUE, TETSUYA MIYAMOTO, AKIRA TAKEUCHI (Kewpie Corp.)

【背景・目的】ヒアルロン酸（HA）は、高分子であるほど保水性が高く、医療や化粧品分野での利用価値が高い。当社では *Streptococcus zooepidemicus* を用いた発酵生産を行っている。高分子 HA の生産には、菌体内で 2 種類の前駆体をバランスよく供給し、重合を続けるとともに、菌体外に排出された HA の分解を防ぐ必要がある。HA は、鉄イオンの存在下で過酸化水素から発生するヒドロキシラジカルにより分解される。この現象に対し、実生産スケールでは低分子化が顕著に起こるものの、ラボスケールでは低分子化しにくいという、スケール差の課題があった。そこで、ラボスケールで実生産スケールの分子量を予測できるよう、培養条件の改良を試みた。
【方法・結果】培地滅菌時の F 値を計算・比較すると、実機では 25～47、ラボ機では 10～15 となり、ラボ機での熱のかかり方が小さいことが分かった。酸素移動容量係数（k_La）を計算・比較すると、ラボ機の方が最大で 2 倍程度大きかった。低～中程度の分子量 HA 用の培養条件よりも、高分子 HA 用の培養条件で、ラボ機と実機の k_La の差が大きくなっており、高分子 HA の分子量をラボで予測しにくいこととの関連が考えられた。ラボ機の F 値と k_La が実機に近くなるよう条件を設定し、培養したところ、実機に近い分子量の HA が生産できた。さらに鉄を段階的に添加した培地で培養したところ、鉄イオンの影響による低分子化を確認できた。

The production of high-molecular-weight hyaluronan requires continuous polymerization with balanced supply of two precursors and prevention of hyaluronan degradation after it is released from bacteria. Hyaluronan will be degraded by hydroxyl radicals generated from hydrogen peroxide in the presence of iron ions. This degradation is more pronounced at the production scale than at the laboratory scale. Therefore, we modified the culture conditions to predict the molecular weight in the actual production scale based on the laboratory scale.

The *F* value during sterilization of the lab scale was smaller than that of the production scale. The calculated volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) of the lab scale was up to two times larger than that of the production scale. When the conditions of the lab scale were set similar to those of the production scale, the molecular weight of the lab scale was close to the actual molecular weight of the production scale. Furthermore, even at the laboratory scale, it was confirmed that the more iron was added to the medium, the more low molecular weight hyaluronan was obtained.

hyaluronic acid, polysaccharide, fermentation engineering

発表責任者：成田琴美（kotomi_narita@kewpie.co.jp）

講演番号：2B07-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

泡盛蒸留粕を用いた可溶性紅麹色素の産生条件とその性質

Production conditions and properties of water-soluble *Monascus* pigments using Awamori distilled lees

○喜屋武 大誠、橘 信二郎（琉大農）
○Taisei Kyan, Shinjiro Tachibana (Ryukyu Univ.)

紅麹菌（*Monascus* 属）は、赤色色素をつくる食用糸状菌として沖縄を含む東アジアにおいて発酵食品の製造に使われている。近年、天然着色料の需要の高まりとともに紅麹色素も注目されている。当研究室では、泡盛蒸留粕（液部）を培養基質に用いた紅麹菌の色素高産生株スクリーニングを行い、赤色色素の高産生株を見出している。本研究では、選抜した菌株と泡盛蒸留粕を用いて、培養液中に産生される可溶性赤色色素の産生条件および諸性質について調べた。

泡盛蒸留粕は液部と固形部に分けて液部を培養基質として用いた。対照培地に PDY 液体培地を用いた。波長 500 nm における培養ろ液の吸光値を色素産生量とし、菌体生育量は乾燥重量で表した。また、PDY 培地にクエン酸やアミノ酸を添加して色素産生および菌体生育に及ぼす影響を調べた

PDY 培地に特定のアミノ酸を添加することで赤色色素の産生量が顕著に増大した。PDY 培地へのクエン酸添加は濃度依存的に色素産生を抑制したが、蒸留粕培地へのクエン酸添加は色素産生に影響しなかった。

Monascus spp., edible filamentous fungus, produce red pigments and have been used in fermented foods production in East Asia and Okinawa for a long time. Recently, *Monascus* pigments have been attracting attention due to increasing demand for natural colorant. We have successfully screened *Monascus* pigment high-producing strains by using Awamori distilled lees as a culture substrate. In this study, we examined culture conditions to produce soluble red pigments in a culture medium using the Awamori distilled lees and the selected strain, and investigated properties of their pigments. In addition, effects of presence of citric acid and amino acids in the culture medium were also investigated.

Awamori distilled lees were divided into liquid and solid parts by centrifugation, and resulting liquid part was used as the culture substrate. PDY liquid medium was used as a control medium. Productivity of red pigments was determined by measuring absorbance at 500 nm. Growth of fungus was expressed by dry weight of mycelium.

The productivity of red pigments was markedly increased by presence of certain amino acids in the PDY medium. Although the presence of citric acid in the PDY medium reduced the pigment production in a dose-dependent manner, the Awamori distilled lees supernatant medium was not affected by addition of citric acid.

Monascus, fungal pigments, Awamori

講演番号：2B07-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

乳酸菌とギ酸の併用による泡盛蒸留粕発酵飼料の開発

Development of *awamori* distillation remnant fermented feed combining lactic acid bacteria and formic acid

○新城 海聖[1]、伊村 嘉美[1]、高安 高治[2]、平良 東紀[1]、上地 敬子[1] ([1]琉大院・農、[2]金城ミート)
○Misei SHINJYO[1], YOSHIMI IMURA[1], TAKAHARU TAKAYASU[2], TOUKI TAIRA[1], KEIKO UECHI[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Kinjyou Meat)

泡盛蒸留粕はタンパク質を豊富に含むことから，畜産飼料への利用が試みられて来た。しかしながら，腐敗の進行が早いため現状では飼料としての安定した利用は困難である。本研究では，乳酸菌とギ酸の併用により腐敗を抑制し泡盛蒸留粕飼料の保存性を高める手法の確立を目指した。

泡盛蒸留粕の腐敗モデル試験には，もろみ酢培地（MV 培地：pH 4 に調整した泡盛蒸留粕液部に 1%グルコースを添加した培地）およびバイオフィルム形成を伴って泡盛蒸留粕を腐敗させる菌として分離された *Pichia* sp. AW-1 株を用いた。乳酸菌は泡盛蒸留粕嫌気発酵物より分離された *Lactobacillus plantarum* L-58 を用いた。乳酸菌前培養液を MV 培地に 1%植菌し，24 時間，30℃で静置培養した後に，*Pichia* sp. AW-1 株前培養液を 0.1%植菌した。その結果，ギ酸を乳酸菌植菌と同時に添加した場合，全ての試験区でバイオフィルムが形成された。一方，乳酸菌を植菌して 24 時間後にギ酸を添加した場合，ギ酸濃度 0.07%以上でバイオフィルム形成を抑制できた。

Since *awamori* distillation remnant (ADR) is rich in proteins, it has been attempted to be used as livestock feed. However, due to the rapid spoilage process of ADR, it is difficult to use it stably as feed. In this study, we aimed to establish a method to prevent spoilage of ADR and improve the shelf life of feed containing ADR by using a combination of lactic acid bacteria and formic acid.

For the model test of spoilage of ADR, we used *moromi* vinegar medium (MV medium, liquid part of ADR adjusted to pH 4 containing 1% glucose) and *Pichia* sp. AW-1 strain, which is one of the fungi causing spoilage of ADR with a biofilm formation. *Lactobacillus plantarum* L-58, isolated from anaerobic fermented product of ADR, was used as a candidate for lactic acid bacteria to prevent spoilage of ADR. After 24 hours from inoculation of the preculture solution of *L. plantarum* L-58 (final conc., 1 %) into MV medium, the preculture solution of *Pichia* sp. AW-1 (final conc., 0.1 %) was inoculated into the culture medium. As a result, when formic acid was added to the medium at the same time as inoculation of *L. plantarum* L-58, biofilms were formed. On the other hand, when formic acid was added to the culture medium 24 hours after the inoculation of *L. plantarum* L-58, biofilm formation was inhibited at formic acid concentrations of 0.07% or higher.

lactic acid bacteria, biofilm, awamori

講演番号：2B07-12
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム B

紅麹抽出物による前処理は CHO 細胞のコレラ毒素に対する感受性を変化させる

Pre-treatment of CHO cells using Monascus fermentation extracts varies sensitivity against cholera toxin

○金城 麗菜[1,2]、橘 信二郎[1,2] ([1]琉球大学、[2]農芸化学)
○Rena KINJO[1,2], Shinjiro Tachibana[1,2] ([1]Ryukyu Univ., [2]Nougeikagaku)

Monascus 属カビはアジア圏において伝統的に発酵食品や天然色素の製造に利用されている。コレラ毒素（CTx）の生物活性の指標として CTx 処理により伸長・変形する CHO 細胞数の割合（CHO cell elongation index; CCEI）が用いられる。本研究では、紅麹抽出物(MFE) による CHO 細胞の前処理が、その後の CTx による CHO 細胞に対する生物活性に及ぼす影響を CCEI を用いて検討した。

MFE は溶媒極性の違いにより、さらに MFE-A および MFE-B に調製した。*Vibrio cholerae* O1 El Tor N16961 株を用いて CTx を誘導し、濃縮・精製した。常法にて調整した CHO 細胞を、濃度を変えた MFE-A および MFE-B にて前処理後、CTx (200 ng/ml)入りの培養液で一晩培養した。ギムザ染色後、Image-J を用いてそれぞれの CCEI を算出した。

MFE-B で前処理した CHO 細胞の CCEI は溶媒コントロールと同程度であったが、MFE-A で前処理したときの CCEI には顕著な変化が見られた。また、その変化は濃度依存的であることが示唆された。以上より、MFE-A による CHO 細胞の前処理は、CTx の CHO 細胞に対する生物活性を著しく変化させることが示唆された。

Genus *Monascus* have been traditionally used to produce fermented foods and natural colorants in Asia. As an index of biological effects of cholera toxin (CTx), CHO cell elongation index (CCEI) is used. In this study, a research question on whether pre-treatment of CHO cells with *Monascus* fermentation extracts (MFE) affects the sensitivity of the CHO cells against bio-effects of CTx was determined.

Two different extracts referred to as MFE-A and MFE-B were prepared from red koji by difference in solvent polarity. CTx was induced from *V. cholerae* O1 biotype El Tor strain N16961 in the AKI-SW procedure and semi-purified. In the analysis of CCEI, CHO cells were reacted with CTx (200 ng/ml) at 37°C under 5% CO_2 overnight. After Giemsa staining, cell morphology of CHO cells was photographed and analyzed with Image-J software to calculate the CCEI (%).

The CCEI value was similar to that of the control when CHO cells were pre-treated with MFE-B, however, the CCEI was significantly altered when the cells were pre-treated with MFE-A with a dose-dependent manner. A further study to search a responsible compound contained in the MFE-A is urgent.

Monascus, Vibrio cholerae, Cholera toxin

講演番号：2B09-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌における RNA 分解酵素によるリジン生合成経路遺伝子の発現制御解析

Regulation of the expression of lysine biosynthesis genes by ribonucleases in *Corynebacterium glutamicum*

岡林 寿咲[2]、○田中 裕也[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
Kazusa OKABAYASHI[2], ○Yuya TANAKA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST・BIO)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる。有用物質生合成遺伝子の発現制御には、転写開始制御だけでなく転写開始後制御の理解が重要であるが、*C. glutamicum* における転写後制御の知見は少ない。当研究室では、主要 RNA 分解酵素の RNase J がリジン生合成遺伝子 mRNA の分解制御を行うことを明らかにしたが、他の RNase の関与は不明であった。今回は様々な RNase がリジン合成系遺伝子へ及ぼす影響について検討した。
【方法と結果】６種の RNase 遺伝子破壊株を用いてリジン生合成遺伝子 mRNA の発現量を観察したところ、*rneG* 遺伝子破壊により発現上昇が観察された。*rneG* 破壊株では mRNA も安定化したことから RNase E/G によりこれらの mRNA が切断されていると考えられる。リジン生産株においても *rneG* 遺伝子を破壊すると遺伝子発現上昇が観察され、さらにリジン非生産株と異なりリジン排出遺伝子の発現も上昇した。以上の結果から RNase J に加え、RNase E/G もリジン生合成遺伝子の発現制御に関与することが示された。
[Purpose] *Corynebacterium glutamicum* is widely used in the industrial production of amino acids, therefore, the molecular basis of its gene regulation is of great interest for the development of new bioprocesses. However, relatively little is known about regulation of mRNA degradation. In this study, we investigated the regulation of the expression of lysine biosynthesis genes by ribonucleases.
[Methods and Results] Previously, we showed that RNase J is involved in the regulation of lysine bio-synthesis genes in *C. glutamicum*. Here, we found that deletion of *rneG* gene encoding another major Ribonuclease increased several lysine bio-synthesis genes. Increased stability of these mRNAs was observed by *rneG* deletion indicates that RNase E/G degrades lysine bio-synthesis mRNA. The effect of *rneG* deletion was also observed in lysine-producing strain of *C. glutamicum*.

Corynebacterium glutamicum, Ribonuclease, lysine

講演番号：2B09-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌によるイソプレン生産

Investigation on isoprene production by *Corynebacterium glutamicum*

○横野 里佳[1,2]、Theresia Natalia Maria[2]、猿谷 直紀[2]、須田 雅子[2]、平賀 和三[2]、乾 将行[2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Rika YOKONO[1,2], Natalia Maria THERESIA[2], Naoki SARUYA[2], Masako SUDA[2], Kazumi HIRAGA[2], Masayuki INUI[2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

【目的】イソプレンはゴムや医薬品の原料として産業上重要な物質である。近年、カーボンニュートラル実現を目指して石油からバイオマスへ原料変換した発酵生産が期待されている。*Corynebacterium glutamicum* はイソプレン合成酵素遺伝子（*ispS*）を有していないが、イソプレン前駆体ジメチルアリル二リン酸（DMAPP）の生合成経路を保有している。本研究では、*ispS* 遺伝子を導入した *C. glutamicum* によるイソプレン発酵生産を検討した。
【方法と結果】FLAG タグを融合した *ispS* 遺伝子の発現プラスミドを構築し、ウエスタンブロット解析により *C. glutamicum* における発現を確認した。イソプレン生産は密閉バイアルにて培養し、GC/MS により分析した。DMAPP からカロテノイドへの変換に関与するゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）生合成遺伝子を 2 種破壊した。その結果、カロテノイド生成を示す黄色色素の減少が観察され、得られた菌株においてイソプレン生産の増加が確認された。加えて、発酵条件の検討によりイソプレン生産量はさらに増加した。

[Purpose] Bioproduction of isoprene, a volatile compound commonly used for rubber and other polymers, is drawing attention in recent years. While *Corynebacterium glutamicum*, a Gram-positive bacterium, does not naturally produce isoprene, this bacterium possesses a metabolic pathway to synthesize dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), the last intermediate prior to isoprene biosynthesis. In this study, we develop *C. glutamicum*-based isoprene production through heterologous expression of isoprene synthase (IspS).
[Methods and results] We constructed FLAG-tagged IspS from *Populus alba* and confirmed its expression in *C. glutamicum* by Western-blot analysis. Isoprene production was confirmed in sealed-vial cultures and gas chromatography analysis. Next, we disrupted the genes encoding geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase genes responsible for DMAPP utilization into carotenoid pathway. As a result, we observed yellow-pigment reduction and confirmed an increase in isoprene production by the resulting strain. The production was increased further by fermentation condition improvement.

Corynebacterium glutamicum, Isoprene, Fermentation

講演番号：2B09-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

Fusarium sp. No. 17 株由来のアクリル酸水和酵素の遺伝子発現系の構築
Cloning and expression of acrylic acid hydratase gene from *Fusarium* sp. No. 17
○中西 由芽、柳川 顕秀、堀部 優太、三浦 夏子、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○ Yume NAKANISHI, Akihide YANAGAWA, Yuta HORIBE, Natsuko MIURA, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

アクリル酸は短鎖不飽和脂肪酸の 1 つであり、ポリマー原料として幅広く利用されている。我々はアクリル酸の変換反応を触媒する微生物由来の酵素の探索と応用に関する研究を進めている。先行研究において、アクリル酸を 3-ヒドロキシプロピオン酸へと水和変換する *Fusarium* sp. No. 17 株が単離された。本変換反応はアクリリル-CoA、3-ヒドロキシプロピオニル-CoA を経由する 3 段階の反応であることが推定されている。本研究ではアクリル酸水和酵素（FsAH）遺伝子のクローニング及び塩基配列の決定を行った。FsAH 配列の相同性探索を行ったところ、FsAH はカルニチンの代謝に関わる酵素 CaiB (L-carnitine CoA-transferase) と関連があり、CoA transferase family III に属すると考えられた。また、大腸菌による本酵素の発現のため、pET-28a(+) を用いた発現系を構築したが、多くが不溶性タンパク質として発現することが示された。そこで、本酵素を大量調製するために発現系の改良を行った。コールドショック発現システム pCold I やシャペロンを用いた発現系を構築した結果、可溶性タンパク質の発現および酵素活性が大幅に上昇した。現在、最も高い活性を示した発現株において酵素精製を行い、組換え FsAH の単離を試みている。

Acrylic acid is an unsaturated fatty acid and is widely used as a raw material for polymers. We are studying microbial enzymes that catalyze the conversion reaction of acrylic acid. In previous studies, *Fusarium* sp. No. 17 that converts acrylic acid to 3-hydroxypropionic acid was isolated. This conversion reaction is presumed to be a three-step reaction via acrylyl-CoA and 3-hydroxypropionyl-CoA. In this study, we cloned and sequenced the acrylic acid hydratase (FsAH) gene. A homology search for the FsAH sequence revealed that FsAH was associated with CaiB (L-carnitine CoA-transferase) and was considered to belong to the CoA transferase family III. We also constructed an FsAH gene expression system using pET-28a(+) in *Escherichia coli*. However, it has been shown that most are expressed as insoluble proteins. Therefore, the expression system was improved for high expression of FsAH gene. When an expression system using the cold shock vector pCold I or chaperone was constructed, the expression of soluble proteins and the enzyme activity were significantly increased. Currently, we are trying the purification of recombinant FsAH in the best expression strain.

Fusarium, acrylic acid, 3-hydroxypropionic acid

発表責任者：片岡　道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2B09-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

組換え大腸菌におけるグリコール酸生産性の向上をもたらす lactaldehyde reductase 遺伝子の塩基置換

A single-base substitution of lactaldehyde reductase gene that improves glycolic acid production in recombinant *Escherichia coli*

○村主 渉[1]、山田 美和[1,2] ([1]岩手大院・総合科学、[2]岩手大・農)
○Wataru MURANUSHI[1], Miwa YAMADA[1,2] ([1]Iwate Univ. Grad. Sch., [2]Iwate Univ.)

【目的】グリコール酸 (GA) は、幅広い産業において有用な有機酸であり、様々な合成法が検討されている。先行研究において、*Escherichia coli* 由来 lactaldehyde reductase (FucO) および lactaldehyde dehydrogenase (AldA) を発現させた組換え *E. coli* による、エチレングリコールを基質とした GA 合成が報告されているが、生産性の低さが課題であった。我々は以前に、本反応系における律速酵素と推定される FucO にランダム変異を導入したライブラリーから、GA 生産性を向上させる FucO 変異体 (mf2-9) を取得した。本研究では、この mf2-9 変異体が組換え *E. coli* において GA 生産性を向上させるメカニズムの解明を目指した。

【方法・結果】mf2-9 のシークエンス解析を行った。その結果、3 塩基のミスセンス変異 (アミノ酸置換は D23E、E222K、G363S)、および 2 塩基のサイレント変異 (c.93G>A、c.1131T>C) が確認された。まず我々は、mf2-9 におけるミスセンス変異が GA 生産性の向上に寄与していると考え、FucO (D23E/E222K/G363S) 変異体を作製した。本変異体および *aldA* 遺伝子をプラスミドで発現させた組換え *E. coli* を、800 mM エチレングリコールおよび 1 mM IPTG を含む LB 培地 (pH 8) で 12 時間培養し、培養上清の GA 濃度を HPLC で分析した。その結果、FucO (D23E/E222K/G363S) 変異体を用いた際の GA 生産性は、野生型 FucO を用いた場合と同等であった。そこで、先述のサイレント変異のみを導入した FucO 変異体を作製し、同様に組換え *E.coli* において GA を合成させた。その結果、FucO c.1131T>C を含む変異体は、野生型の 1.3 倍の GA を合成し、mf2-9 と同等の GA 生産性を示した。よって、mf2-9 株における GA 生産性の向上は、c.1131T>C サイレント変異の影響によるものであることが強く示唆された。

Glycolic acid (GA) is the smallest alpha hydroxy acid. GA is extensively used in a wide range of industries, and various synthesis methods of GA have been investigated. Although other studies reported the microbial production of GA from ethylene glycol by recombinant *E. coli* expressing lactaldehyde reductase (FucO) gene and lactaldehyde dehydrogenase (AldA) gene, the productivity of GA was not enough for the industrial level. In our previous work, we obtained a FucO mutant mf2-9, which enhanced the GA productivity, by a screening of random mutant library generated with an error-prone PCR. To understand the mechanism by which mf2-9 improves GA production in recombinant *E. coli*, we analyzed the mutation points in mf2-9 and examined the effect of each of them on GA production. The results indicated that a single synonymous mutation (c.1131T>C) in *fucO* gene contributed to the enhancement of GA productivity in recombinant *E. coli*.

glycolic acid, ethylene glycol, lactaldehyde reductase

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2B09-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

Acinetobacter baylyi 由来ペリプラズム型デヒドロシキミ酸脱水酵素の異種発現とプロトカテク酸生産への利用

Protocatechuate production with heterologously expressed periplasmic dehydroshikimate dehydratase from *Acinetobacter baylyi*

○永木 翔[1]、松谷 峰之介[2]、片岡 尚也[1,3,4]、松下 一信[1,3,4]、藥師 寿治[1,3,4]（[1]山口大院創成科学、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]山口大農、[4]山口大中高温微セ）
○Kakeru NAGAKI[1], Minenosuke Matsutani[2], Naoya Kataoka[1,3,4], Kazunobu Matsushita[1,3,4], Toshiharu Yakushi[1,3,4] ([1]Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., [2]NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture., [3]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [4]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

プロトカテク酸はナイロンやポリエチレンテレフタラートのようなポリマーの原料であるムコン酸の前駆物質で有用な物質である。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* NBRC 3244 は，膜結合型のキナ酸脱水素酵素を持ち，キナ酸を酸化するペリプラズミック酸化系を持つ。生じるデヒドロキナ酸は脱水によってデヒドロシキミ酸へ変換され，さらにデヒドロシキミ酸は脱水によってプロトカテク酸へ変換される。私たちは，近縁種由来の細胞質型デヒドロキナ酸脱水酵素（DHQase）を *G. oxydans* のペリプラズムに発現させ，キナ酸からデヒドロシキミ酸の効率的な生産を可能にした(Nakamura, Nagaki, et al. (2021); Appl. Microbiol. Biotechnol. 105: 5883)。 本研究では *Acinetobacter baylyi* ADP1 株が保有するデヒドロシキミ酸脱水酵素（DHSase）と外膜に存在し，キナ酸輸送体と言われている QuiX の２つのタンパク質を発現する *G. oxydans* 株を構築した。まず, *G. oxydans* にて発現した DHSase の至適 pH とデヒドロシキミ酸の K_M 値を調べた。次に，以前作製したデヒドロシキミ酸生産株と本研究で構築した *G. oxydans* 株を用いて共培養を行った。この 2 株を用いることにより，キナ酸から定量的にプロトカテク酸を生産することができた。また, DHSase の単独発現株よりも QuiX と共発現させた株を用いた共培養の方がより速くプロトカテク酸を生産した。

Protocatechuic acid (PCA) is a useful chemical compound that has antioxidant effect and is a raw material for muconic acid, which is a key compound in the synthesis of polymers such as nylon and polyethylene terephthalate. *Gluconobacter oxydans* strain NBRC 3244 specifically possesses the periplasmic oxidation system for quinate to produce 3-dehydroquinate (DHQ). We constructed the recombinant *G. oxydans* strains that possess relocated DHQase to the periplasmic space (Nakamura, Nagaki, et al. (2021); Appl. Microbiol. Biotechnol. 105: 5883). This strain achieved efficient DHS production. In this study, we heterologously expressed the *quiCX* gene encoding periplasmic DHSase and outer membrane quinate transporter from *Acinetobacter baylyi* DSM 24193 (ADP1). The optimal pH and the K_M value of DHSase expressed in *G. oxydans* were determined. We attempted co-culture using the *Gluconobacter* strain expresses *quiC* or *quiCX* and the previously constructed strain that expresses the relocated DHQase. The co-culture system efficiently produced PCA. In addition, the co-expression of QuiX enhanced quinate oxidation and PCA production.

protocatechuate, dehydroshikimate dehydratase, periplasm

講演番号：2B09-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

大腸菌へのニトロゲナーゼ活性の付与に向けた検討

Towards the heterologous expression of nitrogenase genes in *Escherichia coli*

○早川 紗和子、本田 裕樹、藤井 浩（奈良女子大理）
○Sawako HAYAKAWA, Yuki HONDA, Hiroshi FUJII (Nara Women’s Univ.)

【背景・目的】アンモニアは優れた可搬性から水素に次ぐエネルギーキャリアとして注目されている。しかし、その工業的な生産方法はハーバー・ボッシュ法に依存し、高温高圧条件下で化石燃料由来の水素を大量に使用する。エネルギー投入と水素使用の点から、省エネルギーな生産方法への転換に期待が寄せられる。ニトロゲナーゼは常温常圧で窒素からのアンモニア生成を触媒する酵素であり、省エネルギーでのアンモニア生産が可能である。演者らは大腸菌でのニトロゲナーゼ遺伝子の発現およびニトロゲナーゼの大量合成を試みており、本講演ではこれまでに得られた知見を報告する。
【方法・結果】NBRC から入手した *Paenibacillus* 属細菌のゲノムからニトロゲナーゼ遺伝子クラスター（*nifBHDKENXhesAnifV*）およびその上流領域 150 bp（約 12 kb）を取得し、pUC19 に挿入してニトロゲナーゼ遺伝子発現用プラスミド（pUnif）を構築した。この上流領域に蛍光タンパク質 mCherry をコードする配列を連結し大腸菌へ導入すると mCherry が生産され、上流領域は大腸菌内でプロモーターとして機能することを確認した。pUnif を保持する大腸菌を嫌気条件で培養し、ニトロゲナーゼ遺伝子の異種発現を試みた。ニトロゲナーゼ活性測定には簡易的な測定法として汎用されるアセチレン還元法を用いた。その結果、pUnif を保持する大腸菌において、対照株には見られないアセチレンからエチレンへの変換が確認できた。さらにニトロゲナーゼの活性中心錯体や FeS クラスター合成に関わる遺伝子群（*nifUSZQ*）や大腸菌内の代謝経路に関与する酵素遺伝子（*pfoAB*,*fldA*）を共発現させた結果、アセチレン還元を指標とするニトロゲナーゼ活性の向上を確認できた。

Nitrogenase, which catalyzes ammonia formation from nitrogen, is a promising biocatalyst to develop a new ammonia production system under mild condition. To yield such system, we try to obtain the recombinant *Escherichia coli* engineered for producing a large amount of nitrogenase. The nitrogenase gene cluster (12 kb) and its upstream region of 150 bp derived from *Paenibacillus* sp. was inserted into pUC19 to construct an expression plasmid for the nitrogenase gene cluster (pUnif). *E. coli* possessing pUnif was cultivated anaerobically and the nitrogenase activity in the recombinant was confirmed by the acetylene reduction assay. The acetylene reduction was detected in *E. coli* possessing pUnif, while that was not detected in *E. coli* possessing pUC19; demonstrating the expression of the nitrogenase genes in *E. coli*.

ammonia, nitrogenase, *Paenibacillus* sp.

発表責任者：本田裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：2B09-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

有機溶媒耐性 *Kocuria* 属細菌の代謝改変およびカロテノイド類生産

Bioproduction of carotenoids by organic solvent-tolerant *Kocuria rhizophila* DC2201.

○戸田 弘、小野木 奈々（富山県大生医工研セ）
○Hiroshi TODA, Onogi Nana (Toyama Pref. Univ.)

β-carotene や astaxanthin などの各種カロテノイド化合物は微生物、藻類、植物、動物などが有する天然色素であり、様々な生理作用を示す。特に高い抗酸化作用を持つことから、近年サプリメントや化粧品等に利用されており、また一部のカロテノイドでは抗腫瘍活性や免疫賦活作用なども報告されている。微生物代謝系を利用したカロテノイドの効率的な生産プロセスの確立は今後ますます重要になると考えられ、我々はグラム陽性細菌である *K. rhizophila* の代謝経路を一部改変することで各種カロテノイド化合物の生産を試みている。*K. rhizophila* DC2201 のゲノム配列中に見い出されたカロテノイド合成遺伝子 CrtEBIYeYfEb のうち、CrtEb 遺伝子を破壊することにより lycopene 生産株を作成した。得られた破壊株のコロニーは赤色を呈し、また培養菌体からの抽出物を HPLC 分析した結果 lycopene のピークが得られたことから、破壊株において lycopene が蓄積していることが確認された。　さらに、*K. rhizophila* DC2201 内で発現可能な CrtW および CrtZ の探索を行い、*Brevundimonas aurantiaca* 由来 CrtW および *Pantoea ananatis* 由来 CrtZ 遺伝子をそれぞれ CrtEb 破壊株に導入した結果、canthaxanthin および zeaxanthin の蓄積が確認された。またこれら両遺伝子を同時に導入した株において、astaxanthin の生産が確認された。現在、これらカロテノイド類の生産量の向上を目指し、*K. rhizophila* DC2201 内の代謝系改変を検討中である。

Various carotenoid compounds including carotene and astaxanthin, are natural pigments possessed by microbes, algae, plants, animals and exhibit various physiological effects. Recently, it has been reported that many carotenoids exhibited high antioxidant effects, anti-tumor activity and immunostimulatory effects, and various carotenoids have utilized in supplements and cosmetics. Establishing an efficient production process for carotenoids using microbial metabolic systems will become increasingly important in the future, and we are trying to produce various carotenoid compounds by modifying the metabolic pathway of *K. rhizophila*. *K. rhizophila* DC2201 has carotenoid synthetic genes cluster *crtEBIYeYfEb*, and lycopene accumulation was observed by disrupting CrtEb coding gene. The *crtEb* disrupting mutant strain formed red colony, and lycopene accumulation was showed by HPLC analysis. In addition, canthaxanthin and zeaxanthin production were determined in mutant strains expressing *Brevundimonas aurantiaca* CrtW and *Pantoea ananatis* CrtZ genes, respectively.

Kocuria rhizophila, metabolic engineering, carotenoid

発表責任者：戸田　弘（htoda@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2B09-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株におけるケラチン分解性プロテアーゼ(MrH_0874)のリクルート解析

Recruitment analysis of keratinolytic protease (MrH_0874) from thermophilic *Meiothermus ruber* H328

○高岡 菜都美、渡部 邦彦（京府大院・生命環境）
○Natsumi TAKAOKA, Kunihiko WATANABE (Kyoto Pref. Univ.)

トリ羽毛はケラチンを主成分とする難分解性タンパク質の産業廃棄物で、環境に優しく、安価な微生物由来の分解酵素による処理方法が検討されている。神戸・有馬温泉源泉から単離した好熱性のグラム陰性細菌 *Meiothermus ruber* H328株は、ケラチン分解性プロテアーゼを細胞外に分泌し、トリ羽毛を液状になるまで分解する[1)]。本研究では、トリ羽毛分解の主体として働くセリンプロテアーゼ（MrH_0874）の局在性をリクルート解析として調査した。まず、培養上清、細胞表層と細胞内画分を含む無細胞抽出液（CFE）、細胞残渣である debris に対してケラチン分解活性を測定し、本酵素に対する Western blotting 解析の結果と併せて、培養に伴うケラチン分解性プロテアーゼの局在変化を追跡した。さらに、55°C 及び60°C で培養を行い、培養温度による局在の変化も調査した。

培養上清、CFE、debris に対してケラチン分解活性を測定した結果、全体の活性の 80%以上が CFE と debris で検出され、培養温度による分布の違いは無かった。また、Western blotting 解析によって本酵素タンパク質の局在変化を調査した結果、全体の約 30% を CFE、約 50% を debris、残る約 20% を培養上清が占めており、活性の分布と共に CFE と debris に本酵素が多く含まれていることが判った。未破砕の細胞を用いたケラチン分解活性が CFE と debris の活性の和に一致することから、トリ羽毛分解性プロテアーゼが細胞表層に局在しており、トリ羽毛に細胞表層で作用することが示唆された。

Chicken feathers are hard-to degrade proteins as well as industrial wastes, various degradation methods by use of bacterial enzymes have been studied. *Meiothermus ruber* H328 was isolated from Arima Hot Spring, Kobe. Strain H328 secretes extracellular protease, and aggressively decomposes chicken feathers[1)]. In this study, as the recruitment analysis of serine protease (MrH_0874) that acts as a major factor in the degradation of chicken feathers, we studied changes in localization of this enzyme. Keratinolytic activities of the culture supernatant, the cell free extract (CFE) containing cell surface fraction and intracellular fraction, and the debris were measured and 80% of the total activity was found to in the CFE and debris fractions. In addition, Western blotting analysis of this protein showed that the CFE and debris fractions contained a large amount of this enzyme. In conclusion, most of the protease involved in degradation of chicken feathers were localized in the cell surface fraction, suggesting that it is significant to contact between chicken feathers and the enzyme on cells for degradation of chicken feathers.

1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 941-950 (2009)

thermophile, serine protease, localization

講演番号：2B09-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム B

シアノバクテリアー酵母を用いたストリゴラクトンの効率的生産プラットフォームの構築
Establishment of an efficient production platform for strigolactones using cyanobacteria-yeast

○坂巻 裕[1]、高市 真一[2]、梅野 太輔[3]、千葉櫻 拓[1]、伊藤 晋作[1]、渡辺 智[1] ([1]東京農大・バイオ、[2]東京農大・分子微生物、[3]早稲田大・応用科学)
○Yutaka Sakamaki[1], Shinichi Takaichi[2], Daisuke Umeno[3], Taku Chibazakura[1], Shinsaku Ito[1], Satoru Watanabe[1] ([1]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Mol. Microbiol., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Appli. Chem., Waseda Univ.)

植物ホルモンであるストリゴラクトン (SLs) はアフリカで農業生産上、最も問題となっている根寄生雑草 Striga の発芽刺激物質であり、圃場試験から Striga の駆除に高い効果が認められている。しかし植物からの分泌量は微量であるため、SLs を安価かつ大量に生産する系の確立が求められている。SLs は β-carotene を初発物質として SL 前駆体カーラクトン (CL) まで葉緑体で合成された後、小胞体においてシトクロム P450 ファミリータンパク質 (P450) の MAX1 により合成される。葉緑体の祖先生物であるシアノバクテリアは葉緑体と同様の代謝機能を有しており、β-カロテンを含むカロテノイド化合物を細胞内に高蓄積させている。一方、酵母は P450 の発現に適しており、異種発現した MAX1 ホモログが機能することが示されている。我々は SLs の大量生産を目的としてシアノバクテリアと酵母をホストとした醗酵生産系を構築した。シアノバクテリア *Synechococcus elongates* PCC 7942 において CL 合成反応を触媒する 3 遺伝子（D27、CCD7、CCD8）を発現させることで CL 生産系を構築した(特願 2020-22999)。さらに MAX1 の一種である Os0900 と ATR1 (P450 オキシドレダクターゼ) を発現させた酵母を CL 生産シアノバクテリアと共培養することで 1.4 μg/L の 4-deoxyrobanchol (4DO) の生産を達成した(特願 2021-164871)。本系はイネの根と比べて 10,000 倍の生産効率であり、短期間で大量に SLs を生産できることから、SLs を産業利用するための生産プラットフォームとして有用である。
Strigolactones (SLs), plant hormones, are known as germination stimulant of root parasitic weed Striga that is the most problematic on agricultural production in Africa and recognized to be highly effective in extermination Striga from field test. SLs is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) by MAX1, a cytochrome P450 family protein (P450), via carlactone (CL) as a substrate. CL is synthesized from *all-trans*-β-carotene by D27, CCD7, and CCD8 in the plant chloroplast. Cyanobacteria, the ancestor organisms of chloroplasts, have metabolic functions similar to those of chloroplasts, and accumulates carotenoid compounds including β-carotene, while yeast is desirable host for functional expression of P450 proteins. Here, we constructed the SLs producing system using cyanobacteria and yeast. We have successfully produced CL by expressing D27, CCD7, and CCD8 in cyanobacterium *Synechococcus elongates* PCC 7942. Furthermore, 1.4 μg/L 4-deoxyrobanchol (4DO), one of the SLs, has been produced by co-culturing yeast expressing Os0900, a type of MAX1, and ATR1 (P450 oxidoreductase) with CL-producing cyanobacteria. This will be useful as a new platform for producing large amounts of SLs in a short period of time.

Strigolactone, Cyanobacteria, Yeast

講演番号：2C03-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

エタノール発酵性に関与する清酒酵母型遺伝子の解析

Analysis of sake yeast haplotype genes involved in alcohol fermentation

○金井 宗良[1]、柴田 智子[1]、森本 朋子[1]、水沼 正樹[2]、渡辺 大輔[3]、赤尾 健[1,2]([1]酒総研、[2]広島大院・統合生命、[3]奈良先端大)
○Muneyoshi KANAI[1], Tomoko SHIBATA[1], Tomoko MORIMOTO[1], Masaki MIZUNUMA[2], Daisuke WATANABE[3], Takeshi AKAO[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ., [3]NAIST)

清酒醸造において、清酒酵母は細胞増殖を停止させた後も細胞内で様々な代謝活動を行い、最終的に約 20%と高濃度のエタノールを生産することができる。これは、清酒酵母が、もろみ環境中で受ける様々なストレスに対して多様な応答経路を駆使することにより獲得した表現型（醸造特性）であると予想されるが、清酒酵母のエタノール高発酵性の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。また、現在までにその他醸造用酵母と比べて清酒酵母に特徴的な遺伝子及び変異がいくつか同定されているが、その遺伝子及び変異と醸造特性との関係性についても未解明な部分が多い。そこで、清酒酵母のエタノール高発酵性に寄与することが知られている *RIM15* 遺伝子と清酒酵母の *S*-アデノシルメチオニン（SAM）高蓄積に寄与する *ERC1* 遺伝子について、エタノール発酵性に対する両遺伝子の関連性を調べるため、実験室酵母の各遺伝子をそれぞれ清酒酵母型由来の変異遺伝子に改変し、総米 400g の清酒小仕込み試験を行った。結果、*RIM15* 遺伝子破壊株（清酒酵母型 *RIM15*）で示されるエタノール高発酵性と同様、実験室酵母の *ERC1* 遺伝子を清酒酵母型に改変した株についてもエタノール高発酵性を示し、さらに、清酒酵母型 *ERC1* は *RIM15* の遺伝的上流で機能している可能性が示唆された。今後、清酒酵母のエタノール高発酵性における *ERC1* と *RIM15* との関係性を更に詳細に明らかにしていく予定である。

Sake yeasts are ideally suited for sake making, producing higher levels of ethanol, proliferating at lower temperatures, and producing greater levels of various aromatic components and nutrients than laboratory yeasts. To clarify the relationship among sake yeast haplotype genes involved in high fermentation ability, we constructed recombinant strains in which the *ERC1* gene of laboratory yeast is replaced with sake yeast *ERC1* haplotype and carried out a small-scale sake making test with three mashing steps using 400 g total rice. As a result, sake yeast *ERC1* haplotype strain exhibited a significant increase in fermentation ability. This result indicated that the sake yeast *ERC1* haplotype was responsible for high fermentation ability in sake yeast.

Saccharomyces cerevisiae, Alcohol fermentation, *ERC1*

発表責任者：金井宗良（kanai@nrib.go.jp）

講演番号：2C03-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

C_1酵母 *Komagataella phaffii* TK3 株の高メタノール環境適応メカニズムの解明

Adaptation mechanism of the C_1 yeast *Komagataella phaffii* TK3 to high methanol condition

○疋田 慶史[1]、大島 悠輔[2]、川瀬 貴斗[2]、菊川 寛史[3]、柳瀬 笑子[1,2]、島田 昌也[1,2]、早川 享志[1,2]、中川 智行[1,2] ([1]岐阜大応生、[2]岐阜大院自然科学、[3]静岡県大食品栄養科学)
○yoshifumi hikida[1], Yusuke Oshima[2], Takato Kawase[2], Hiroshi Kikukawa[3], Emiko Yanase[1,2], Masaya Shimada[1,2], Takashi Hayakawa[1,2], Tomoyuki Nakagawa[1,2] ([1]Gifu Univ. Appl. Biol. Sci., [2]Gifu Univ. Nat. Sci., [3]Univ. of Shizuoka)

【目的】CO_2から直接生産できる「環境循環型メタノール」は、現在、最も環境負荷の少ないエネルギー源のひとつとされており、メタノールを出発原料とした発酵生産系は低環境負荷型社会実現に貢献できる次世代型発酵技術と考えている。しかし、メタノールを利用するC_1酵母は 5%を超える高メタノール環境下で強い生育阻害を示すことから、産業分野への応用には C_1 酵母の高メタノール適応能の強化が必要不可欠である。本研究では、私たちが育種した 7%メタノールでも生育できる変異株 *K. phaffii* TK3 株の高メタノール環境適応メカニズムの解析を行った。
【結果・考察】TK3 株の高メタノール環境下での遺伝子発現を野生株と比較したところ、*INO1* のみが 46 倍発現量が上昇していた。また *K. phaffii* の細胞内イノシトール（Ino）濃度は、高メタノール環境下で有意に上昇し、TK3 株の細胞内 Ino 濃度は野生株に比べて非常に高いレベルであった。そこでメタノール生育における Ino の影響を観察したところ、*K. phaffii* の高メタノール耐性能は大きく向上した。一方、*K. phaffii* は高メタノール下で脂肪酸合成系の発現を低下させ、β 酸化系を上昇させている。そこで、高メタノール生育細胞の脂肪酸組成を観察したところ、細胞内脂肪酸含量は減少していた。高メタノール適応株では細胞内脂肪酸含量の低下は低レベルに抑えられていたものの、Ino による脂肪酸レベルの改善は見られなかった。これらのことから、Ino は *K. phaffii* の高メタノール適応に寄与しているが、細胞内脂肪酸制御とは異なる細胞機能に関与することが推測された。
【Introduction】C_1 yeast is one of the best hosts that can contribute to the realization of a low environmental load society. However, it is indispensable to enhance the methanol adaptability of C_1 yeast for its application to the industrial field, because the yeast shows severe growth inhibition in a high methanol environment. In this study, we tried to show the adaptation mechanism of the mutant strain *K. phaffii* TK3 against high methanol condition.
【Results and Discussion】In this study, we showed that inositol (Ino) enhanced high methanol adaptability in *K. phaffii*. On the other hand, in *K. phaffii*, intracellular fatty acid composition was decreased in the methanol grown cell, but fatty acid level in the methanol grown cells was not improved with the addition of Ino. These results indicate that Ino has some important functions in the adaptive mechanism of *K. phaffii* to high methanol conditions, but it does not regulate intracellular level of fatty acids during methanol growth.

Komagataella phaffii, inositol, fatty acid

発表責任者：中川智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C03-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸発酵時におけるエタノール・ グルコース資化に関する代謝調節機構の解明

Metabolic regulation relating to ethanol and glucose utilization in *Acetobacter pasteurianus* during acetic fermentation

○松尾 弥俊[1]、小林 聖弥[1]、松谷 峰之介[2]、鈴木 敏弘[1]、石川 森夫[1] ([1]東農大院・醸造、[2]東農大ゲノム解析セ)

○Hisatoshi MATSUO[1], Seiya KOBAYASHI[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Toshihiro SUZUKI[1], Morio ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Ferment. Sci. Tokyo Univ. of Agric., [2]NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株は細胞膜上に局在するデヒドロゲナーゼと細胞内の基幹代謝経路を保有する。しかし、複数種の炭素源が共存する食酢醸造条件下における、炭素源資化の順序や代謝調節機構には不明な点が多い。本研究ではエタノール・グルコース共存下での代謝調節機構の解明を目的とし、酢酸発酵能を消失した酢酸菌株と親株の生育挙動ならびに転写挙動を比較した。

【方法及び結果】酢酸発酵能を消失した酢酸菌株を獲得するため、細胞膜上に局在し、ピロロキノリンキノンを補酵素としてエタノールを酸化するアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）遺伝子を破壊した酢酸菌株（*adh* 破壊株）を構築した。得られた *adh* 破壊株を用い、エタノール・グルコース共存下における生育挙動を親株と比較した結果、親株に対して *adh* 破壊株では酢酸生成を伴わないエタノールの減少、旺盛な菌体の増殖とグルコン酸発酵能を観察した。同生育条件下における両株の転写挙動の比較解析を RNA-seq 法で行った結果、*adh* 破壊株では TCA 回路などの基幹代謝経路、電子伝達系の NADH オキシドレダクターゼ、エタノールを細胞内で酸化する酵素群、グルコン酸発酵を行うグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）遺伝子の発現が亢進していた。このことから、*adh* 破壊株では細胞内の基幹代謝経路によるエタノールの消費と GDH の発現促進によるグルコン酸発酵が行われていることが示唆された。一方、*A. pasteurianus* NBRC 3283 親株において、エタノール・グルコース共存下において酢酸発酵が優先されるのは、転写レベルでのエタノールの細胞内資化経路、グルコン酸発酵の抑制によるものと示唆された。

Acetobacter pasteurianus is widely used for vinegar production. It oxidizes ethanol to acetic acid by alcohol and aldehyde dehydrogenases which bound to its cell membrane. On the other hand, the metabolic regulation mechanism related to carbon source utilization is still unclear. Therefore, we compared the growth behavior and the gene expression profile between the wild-type and the alcohol dehydrogenase gene (*adh*) disruptant under the coexistence of ethanol and glucose. In the *adh* disruptant, ethanol assimilation without acetic acid production, vigorous cell growth and gluconic acid fermentation ability were observed. Furthermore, the expression levels of central carbon metabolism, NADH oxidoreductase, intracellular ADH and ALDH, and membrane- bound GDH were up regulated in the *adh* disruptant by RNA-seq. These results indicated that *A. pasteurianus* has a regulatory mechanism that inhibit intracellular ethanol oxidation and on-membrane gluconic fermentation during acetic acid fermentation.

acetic acid bacteria, acetic acid fermentation, carbon metabolism

発表責任者：石川　森夫（m1ishika@nodai.ac.jp）

講演番号：2C03-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

高温酢酸発酵におけるストレス耐性と膜小胞生成

Relation between stress tolerance and vesicle formation in high-temperature acetic acid fermentation

○松下 一信[1,2,3]、水町 優希[2]、片岡 尚也[1,2,3]、藥師 寿治[1,2,3]（[1]山口大農、[2]山口大院創成科、[3]山口大中高温微セ）
○ Kazunobu Matsushita[1,2,3], Yuki Mizumachi[2], Naoya Kataoka[1,2,3], Toshiharu Yakushi[1,2,3] ([1]Yamaguchi Univ. Agr., [2]Yamaguchi Univ. Sci. & Technol. for Innovation, [3]Yamaguchi Univ. RCTMR)

私達は，酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 を酢酸発酵条件（3%エタノール, 1%酢酸）下で耐熱化育種を行い，より高温下で良好に酢酸発酵を行うことができる適応育種株 ITO-1 を取得している。高温発酵条件下で，野生株は細胞表層に小胞状の不規則な構造を有するのに対し，ITO-1 株ではその構造の生成が抑制されていることが観察されている。また，ITO-1 株は，ゲノム上に *gyrB*, *spoT*, *degP* の 3 つの遺伝子に変異を有するが，細胞表層構造の形成に関与することが知られている DegP に 4 アミノ酸残基の挿入変異が見つかっている。そこで，高温発酵での適応変異と膜小胞生成能が関係していると考え，野生株，ITO-1 株，そしてその *degP* 遺伝子破壊株（Δ*degP*）を用いて，主に発酵条件下における膜小胞生成能を比較した。

膜小胞は，培養上清から超遠心分離法に基づいて調製し，脂質含量（FM4-64 蛍光分析）を基に定量化した。結果，発酵条件下での小胞生成量は，Δ*degP* 株が最も多く，ついで野生株，ITO-1 株の順で減少した。さらに，野生株では，エタノールと酢酸を含まない非発酵条件下において，発酵条件下と比べその生成量が低下したが，ITO-1 株では顕著な違いは見られなかった。一方，ITO-1 株では，非発酵条件下において，温度上昇による生成量の増大が見られたが，発酵条件下ではその増加は見られなかった。現在，これらの種々の条件で得られた膜小胞の成分分析を進めているので併せ報告する。

Komagataeibacter medellinensis NBRC 3288, was adapted to higher growth temperatures through an experimental evolution approach in acetic acid fermentation condition. The adapted strain, ITO-1, exhibits significantly increased growth and fermentation ability, compared to the wild strain, at higher temperatures. Under this culture condition, the wild cells exhibit a rough cell surface having membrane vesicle (MV)-like structure, while ITO-1 does smoother cell surface. Related to the cell surface modification, ITO-1 strain is shown to have a mutation, having 12 bp insertion, in *degP* besides mutations in the *gyrB* and *spoT*. Thus, MV generation was expected to be related to the adaptation to the fermentation stress at high temperature. In this study, MV generation was compared based on the lipid analysis with wild, ITO-1, and Δ*degP* strains in the fermentation condition, and shown to be higher in Δ*degP*, wild, and ITO-1 strains in this order. And also, MV of wild strain, but not ITO-1, was increased in the fermentation condition, compared with non-fermentation condition. On the other hand, ITO-1 strain produced higher MV in non-fermentation, but not in fermentation, conditions by increasing the growth temperature. Now, we are trying to clarify the qualitative difference in the MVs.

acetic acid bacteria, membrane vesicle, stress tolerance

発表責任者：松下一信（kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2C03-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

プロパン資化性細菌 Gordonia sp. TY-5 株における C1 代謝と発現制御

One-carbon metabolism and gene regulation of a propane-utilizing bacterium Gordonia sp. TY-5

○木田 航平、岩崎 光司、由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○KOHEI KIDA, KOJI IWASAKI, HIROYA YURIMOTO, YASUYOSHI SAKAI (Kyoto Univ.)

ガス状アルカンは燃料としての利用だけでなく、液体アルコールへと変換することで有用物質生産原料としても利用される。我々はこれまでに、ガス状アルカンを原料とする有用物質生産宿主として有望なプロパン資化性細菌 *Gordonia* sp. TY-5 株のプロパン代謝経路についての研究を進め、プロパンから 2-プロパノール、アセトンを経て酢酸とメタノールが生じることを明らかにしたが [1)]、メタノールがどのように代謝されるかは不明であった。そこで本研究では、TY-5 株の C1 代謝経路について解析するとともに、プロパン酸化酵素の発現制御について解析した。

本菌のゲノム解析から、メタノールから CO_2 への酸化に関わる酵素群は持つが、C1 炭素を資化するためのホルムアルデヒド固定系路は持たないことがわかった。現在、メタノール酸化酵素の複数の候補遺伝子の破壊株を構築し、メタノール代謝への関与を調べている。さらに本菌のプロパン酸化酵素（PRM）の発現調節について、PRM 遺伝子プロモーター支配下に GFP を発現させて調べたところ、PRM が遺伝子レベルで 2-プロパノールにより誘導発現することが明らかとなった 以上の結果から、TY-5 株における C1 代謝の生理的意義について考察する。

1) Kotani, et al., J. Bacteriol., 186:886-893, 2007.

Gaseous alkanes are expected to be used as feedstocks of industrial chemicals via liquid alcohols. As a promising host for production of useful compounds from gaseous alkanes, we have studied on the propane metabolism of a propane-utilizing bacterium *Gordonia* sp. TY-5. We reported that methanol is generated in propane metabolism, but further methanol metabolism has yet to be clarified. Genomic analysis revealed that strain TY-5 has several candidate genes related to methanol oxidation, but not to methanol-assimilation. We knocked-out several such candidate genes and try to identify the enzyme responsible for methanol-oxidation. Together with regulatory expression pattern of propane monooxygenase (PRM), we will discuss the role of C1 metabolism in strain TY-5.

methanol metabolism, methanol oxidation, propane monooxygenase

講演番号：2C03-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

グルコース応答を介したプロリン資化抑制機構の解析

Inhibitory mechanisms of proline utilization in yeast Saccharomyces cerevisiae

○市川 和希、中澤 颯、西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○KAZUKI ICHIKAWA, HAYATE NAKAZAWA, AKIRA NISHIMURA, HIROSHI TAKAGI (Nara institute of science and technology)

プロリンは生体内において様々な機能を有する重要なアミノ酸であるとともに、ワインの原料であるブドウ中に最も豊富に含まれるアミノ酸である。発酵中の酵母*Saccharomyces cerevisiae*はプロリンをほとんど資化（取込み、利用）できず、発酵後も多量に残存することが知られている。残存したプロリンはワインの酒質の低下を引き起こすと考えられている。さらに、ブドウ中に窒素源か少ない場合は人工窒素源の添加による製造コストの増加の要因になっている。このため、プロリンは「最も無駄な窒素源」として認識されており、こいかにして酵母のプロリン資化を可能にするかという試みが以前から行われてきたが、現在でも未解決のままである。本研究では、実用ワイン酵母を用いて、プロリン資化の抑制に関与する遺伝子群の探索・解析を行うことで、プロリン資化抑制機構の解明およびプロリン高資化性酵母の創製を目指した。

まず、発酵環境下においてプロリン資化の抑制に関与している遺伝子群を探索するために、生育の有無からプロリン資化能を判断できるプロリン要求性株（ワイン酵母の二倍体）を構築した。プロリン要求性株はワインの発酵モデルであるブドウジュース培地上においてプロリンを取込めず、生育することができない。そこで、プロリン要求性株からブドウジュース培地上でも生育可能な自然突然変異株をスクリーニングしたところ、グルコース応答に関わる*CDC25*遺伝子の機能欠損変異株を取得した。Cdc25は低分子GTP結合タンパク質Ras1/2の制御因子（グアニンヌクレオチド交換因子）であり、グルコース応答において中心的な役割を担っている。このため、プロリン資化の抑制に培地中の炭素源が影響する可能性を考え、様々な炭素源を含む培地でプロリン資化能を検討した。その結果、グルコースやフルクトースの存在下ではプロリン資化が抑制されるのに対し、ガラクトースやグリセロールを含む培地ではプロリンを資化できることが判明した。以上より、グルコース応答とプロリン代謝の関連性が強く示唆され、炭素源と窒素源のクロストークの存在が考えられた。

Proline is a predominant amino acid in grape must, but it is poorly utilized by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making processes. Our present results showed that glucose-signaling regulates proline utilization. Our study could hold promise for the development of wine yeast strains that can efficiently assimilate the abundant proline under fermentation conditions.

proline, wine fermentation, glucose response

発表責任者：市川和希（ichikawa.kazuki.ig4@bs.naist.jp）

講演番号：2C03-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

大腸菌エネルギー獲得代謝切り替えにおけるリポ酸化修飾を介した 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）の活性化機構

Activation mechanism of 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH) via lipoylation during metabolic switching for energy acquisition in *E. coli*.

○上原 幹[1]、田中 寛[2,3] ([1]東京工業大学生命理工学院生命理工学系、[2]東京工業大学生命理工学研究科、[3]東京工業大学化学生命科学研究所)
○Miki UEHARA[1], Kan TANAKA[2,3] ([1]Tokyo Institute of Technology School of Life Science and Technology Department of Life Science and Technology, [2]Tokyo Institute of Technology School of Life Science and Technology, [3]Tokyo Institute of Technology Laboratory for Chemistry and Life Science)

大腸菌をカザミノ酸と限定量のグルコースを含む最小培地で培養すると、当初のグルコース存在下では解糖系からアセチル CoA を経て酢酸へ流れるエネルギー獲得代謝が進行し、グルコース枯渇後に速やかに TCA 回路を主とするエネルギー代謝への切替えが起こる。我々はこのグルコース枯渇に伴う代謝切替えが、アセチル CoA から酢酸へのオーバーフロー代謝経路欠損（*pta* もしくは *ackA*）により著しく遅延することを見出し（AEM 2016）、その原因の解析を進めてきた。これまでの研究により、１）この代謝切替えにはグルコース枯渇後の 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）の活性化が必要であること。２）この活性化には OGDH と CoA を競合する関係にあるピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）の活性抑制が重要であることを示している（FEBS Lett. 2020）。さらに、オーバーフロー代謝により生じる酢酸が、E2 サブユニットのリポ酸化を制御することで OGDH 活性化に寄与すること。この酢酸の効果がリポ酸化修飾に関与する *lipB* 遺伝子の過剰発現で模倣されることから、酢酸は *lipB* 遺伝子発現を活性化することでグルコース枯渇後の代謝切り替えを促進することが示唆された（農芸化学会、昨年度大会）。そこで今回我々は、培地中への酢酸添加が *lipB* 遺伝子発現へ及ぼす影響について検討を行った。*lipB* 遺伝子の発現調節領域について、*lacZ* 遺伝子と operon fusion、protein fusion でのレポーター遺伝子を構築し、λファージ上に移して１コピーで染色体上に溶原化させた。このモニター系を用いた測定により、protein fusion でのみ *pta* 変異株で LacZ 活性が低下し、酢酸添加によりその活性が回復した。これは酢酸が *lipB* 遺伝子の翻訳活性化に関わることを示唆しており、現在、対応する制御領域の特定を進めている。

When *E. coli* is cultivated in minimal medium containing casamino acids and a limited amount of glucose, energy obtaining metabolism proceeds from glycolysis through acetyl CoA to acetate in the initial phase, and quickly switches to energy metabolism mainly through TCA cycle after glucose depletion. We have found that this metabolic switch upon glucose depletion is significantly delayed due to defects in the overflow metabolic pathway from acetyl CoA to acetate (as in *pta* or *ackA* mutant) (AEM 2016), and have been analyzing the reason for this delay. According to previous studies, we found that activation of 2-oxoglutalate dehydrogenase (OGDH) after glucose depletion is required for this metabolic switch (1). It is also shown that suppression of the activity of pyruvate dehydrogenase (PDH), which is competing CoA with OGDH in a cell, is critical for this activation (2) (FEBS Lett. 2020). Furthermore, acetate produced by overflow metabolism contributes to the OGDH activation by controlling lipoylation of the E2 subunit. Since the effect of acetate is mimicked by overexpression of *lipB* gene involved in lipoylation, it was suggested that acetate promotes metabolic switching after glucose depletion by activating *lipB* gene expression (JSBBA annual meeting, 2021). In this study, we investigated the effect of acetate addition to the culture medium on the expression of the *lipB* gene by constructing a *lacZ* reporter gene for the regulatory region of the *lipB* gene in operon and protein fusions. Using this monitoring system, we observed that the LacZ activity was decreased in the *pta* mutant only in protein fusion, which was restored by the addition of acetate. This suggests that acetic acid is involved in the activation of the *lipB* gene at the translational level.

E. coli, metabolism, 2-Oxoglutarate Dehydrogenase

講演番号：2C03-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

分裂酵母の転写因子の高発現とキノン骨格基質の添加による CoQ 生合成への影響の解析

Analysis of the effects of the overexpression of transcription factors and the addition of precursor substrates of quinone frame for CoQ biosynthesis in *S. pombe*

○高塚 こまち[1]、角 陽香[2]、松浦 啓太[2]、柳井 良太[2]、西原 昇瑚[2]、戒能 智宏[1,2,3]、川向 誠[1,2,3]([1]島根大院・自然科学、[2]島根大・生資科、[3]島根大・農生命系)

○ Komachi TAKATSUKA[1], Haruka SUMI[2], Keita MATSUURA[2], Ryota YANAI[2], Shogo NISHIHARA[2], Tomohiro KAINO[1,2,3], Makoto KAWAMUKAI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., Shimane Univ., [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Inst. of Agricul. and Life Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q(CoQ)は呼吸鎖電子伝達系の必須因子であり、キノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成されている。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はヒトと同じ側鎖長が 10 の CoQ_{10} を合成しているが、CoQ 生合成経路は未だ完全には明らかになっていない。これまでに、CoQ 生合成に関与する新規遺伝子の探索を目的として、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングを行ったところ、野生株と比較して CoQ_{10} 量が約 0.3 倍に減少する *php2* 破壊株を得た。Php2 は Php3、Php5 と複合体を形成して機能する転写因子であるが、CoQ 生合成経路との関連性は不明である。そこで本研究では、Php 複合体が CoQ 生合成経路に与える影響についての解析を目的として、*php* 遺伝子を複数過剰発現させたとろ、CoQ_{10} 量は増加したが、生育遅延による影響であることが示唆された。次に *php* 遺伝子の破壊によるキノン骨格前駆体の生合成への影響を調べるために、CoQ_{10} 量が減少する *php* 破壊株にキノン骨格前駆体である 4-hydroxy benzoate (4-HB)や 4-hydroxy benzaldehyde(4-HBz)を培地に添加すると、*php* 破壊株の CoQ_{10} 量が野生株の約 0.6~0.8 倍まで回復した。一方、もう一つのキノン骨格前駆体である *p*-アミノ安息香酸(PABA)では CoQ_{10} 量の回復は見られなかったことから、Php 複合体は 4-HB の合成に関与していることが示唆された。

Coenzyme Q (CoQ) is an essential component in the respiratory and is composed of a quinone frame and isoprenoid side chain. Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* synthesizes CoQ_{10}, the same as humans, we have been analyzing the CoQ biosynthetic genes. We screened the Bioneer deletion library to identify the novel genes involved in CoQ biosynthesis and obtained a *Δphp2* strain, produced 0.3-told decreased CoQ_{10} content. Php2 functions as a transcription factor with Php3 and Php5, but the relationships of Php complex and CoQ biosynthesis are unknown. We constructed the strains harboring the *php* genes, the amounts of CoQ_{10} were increased, but the growth was inhibited. Next, we explored the compound that recovered the CoQ_{10} contents. In addition of 4-hydroxybenzoate (4-HB) which is the precursor of CoQ_{10}, the contents of CoQ_{10} were recovered to 0.6-0.8-fold, but *p*-aminobenzoate (PABA) did not affect. These results suggest that Php complex is involved in the 4-HB biosynthesis.

Fission yeast, Coenzyme Q, Transcription factor

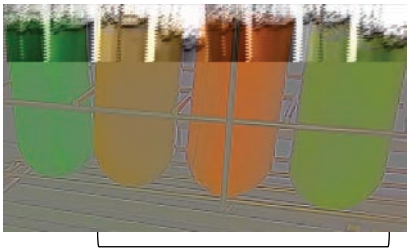
講演番号：2C03-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム C

シアノバクテリアの集光アンテナ色素改変による利用光波長の拡張

Expansion of Available Light Wavelengths by Modification of Light-Harvesting Antenna Pigment of Cyanobacteria

○佐藤 瑞穂[1]、川口 毅[1]、前田 海成[1]、渡辺 麻衣[2]、成川 礼[3]、池内 昌彦[4]、渡辺 智[1]([1]東京農大バイオ、[2]フライブルク大、[3]東京都立大、[4]東京大学生命環境科学系)
○Mizuho SATO[1], Tsuyoshi KAWAGUCHI[1], Kaisei MAEDA[1], Mai WATANABE[2], Rei NARIKAWA[3], Masahiko IKEUCHI[4], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. Acric., Dept. of Biosci., [2]Freiburg Univ., [3]Tokyo Metropolitan Univ., [4]Tokyo Univ., Dept Life Sciences(Biology))

光と CO_2 により増殖するシアノバクテリアは、カーボンニュートラルな物質生産ホストとして期待されている。シアノバクテリアは光を効率的に利用するために集光性アンテナタンパク質複合体であるフィコビリソーム(PBS)を発達させている。PBS の構成因子として Phycocyanin (PC)を持つ *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S.* 7942)の細胞色は緑色であり赤色光を光合成に利用する。一方、陸生・海洋性シアノバクテリアの中には Phycoerythrin (PE)を持つ種も見つかっており、これらの種は緑色光を利用する。環境中において、これらのシアノバクテリアは光環境に適した PBS を使い分けることで棲み分けをしている。本研究では *S.* 7942 の PBS を改変し、利用する光波長の拡張を試みた。誘導剤(IPTG)によって PE の色素合成酵素 *pebAB* の発現量をコントロールすることで細胞色を自在に制御することに成功した（図）。本株は IPTG 存在下では緑色光を利用できる PBS を細胞内に形成し、*S.* 7942 野生株に比べ緑色光下において早く増殖した。本成果は、PBS の原理の理解や進化といった基礎研究のみならず、効率的物質生産に向けた応用研究にも貢献できる成果である。



図、*S.* 7942 の細胞色制御

Cyanobacteria, which grow by light and CO_2, are expected to be a host for carbon-neutral material production. Cyanobacteria have developed a light-harvesting antenna protein complex, the phycobilisome (PBS), for the efficient light utilization. Green cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S.* 7942) containing phycocyanin (PC) as a component of PBS, uses red light for photosynthesis. On the other hand, some of the land and marine cyanobacteria have been found to possess phycoerythrin (PE), pigments that absorb green light. These species are able to utilize green light and live in deeper environments than PC-type cyanobacteria. In this study, we modified the PBS of *S.* 7942 to expand the light wavelengths utilizing for photosynthesis. The expression of PE pigment synthase *pebAB* in *S.* 7942 caused the cell color change and promoted growth under green light than that of the wild-type strain. The results of this study will contribute not only to basic research on the understanding of the principle and evolution of PBS, but also to applied research for efficient material production using cyanobacteria.

Cyanobacteria, Photosynthesis, metabolic modification

講演番号：2C05-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

カテキンの腸内微生物による代謝
Microbial metabolism of flavonoid

○藤井 裕大[1]、宮尾 歩実[1]、橋本 義輝[1,2]、熊野 匠人[1,2]、小林 達彦[1,2] ([1]筑波大生命、[2]MiCS)
○Yuto Fujii[1], Ayumi Miyao[1], Yoshiteru Hashimoto[1,2], Takuto Kumano[1,2], Michihiko Kobayashi[1,2]
([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

【背景】緑茶などに含まれるカテキンは抗酸化作用などの有用な生理活性物質を示し、健康増進のために注目されている成分である。一方、食品に含まれるカテキンの一部は腸内細菌の作用によって代謝され別の化合物に変換されることが知られている。そのようなカテキン代謝産物が腸から体内に吸収され生理活性を示している可能性も考えられるため、腸内細菌によるカテキン代謝について研究を行った。先行研究により、カテキン代謝微生物が同定され、されに一部のカテキン代謝産物について、抗酸化活性や抗腫瘍活性を示すことが報告されている。しかし、カテキン代謝に関与する酵素についてはこれまで報告がなく未知であった。本研究では、カテキン代謝に関与する腸内微生物からカテキン代謝酵素の単離同定を試みた。

【方法】カテキン代謝に関わる E 菌を、GAM 培地もしくは GAM 培地にカテキンを添加した培地にて嫌気培養した。培養した菌体を遠心分離し、バッファーに懸濁したものを休止菌体とした。また、超音波による菌体破砕後の遠心上清を無細胞抽出液とした。反応は休止菌体、無細胞抽出液をカテキンと 37^{o}C でインキュベートして行い、活性測定した。

【結果】休止菌体とカテキンをインキュベートした結果、カテキンが減少し新たな化合物 C-1 と C-2 が得られた。しかし、無細胞抽出液を用いた反応では同活性は検出されなかった。本菌が嫌気性細菌であったことから無細胞抽出液を嫌気環境下で調製し、さらに嫌気状態でカテキンとの反応を試みたところ、C-1 と C-2 の生成を確認することができた。培養条件の検討を行い、遺伝子発現量を解析した。その結果、カテキン代謝時に高発現している遺伝子の中からカテキン代謝に関わると考えられる遺伝子を見出した。

Catechin included in teas shows useful bioactivities such as antioxidant activity. On the other hand, it is known that a part of the digested catechin included in foods are metabolized by intestinal bacteria and converted into other compounds. There is a possibility that such catechin metabolites are absorbed from the intestine into the body and show physiological activities. Previous studies have identified catechin-metabolizing microorganisms, and some catechin metabolites have been reported to exhibit antioxidant and antitumor activities. In this study, we tried to isolate and identify catechin-metabolizing enzymes from gut microorganisms.

flavonoid, metabolism, bacteria

講演番号：2C05-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

ヒト腸管モデルにおけるシンバイオティクスのトリプトファン代謝産物産生亢進作用

Synbiotics enhance the production of tryptophan metabolites in a human gut microbiota model

○堀米 綾子、橋倉 那波、村上 隆太、桜井 琢磨、戸田 一弥、清水 金忠、小田巻 俊孝（森永乳業株式会社　研究本部　基礎研究所）
○Ayako Horigome, Nanami Hashikura, Ryuta Murakami, Takuma Sakurai, Kazuya Toda, Jin-zhong Xiao, Toshitaka Odamaki (Next Generation Science Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

プロバイオティクスやプレバイオティクスは、宿主にさまざまな生理作用を示すことが報告されているが、その作用機序は不明な点が多い。我々は、人工腸管モデルを用いて、*Bifidobacterium breve* MCC1274（MCC1274）（プロバイオティクス）、ラクチュロース（プレバイオティクス）、両者の組合せ（シンバイオティクス）の腸内環境への影響を評価した。糖源としてグルコース、マルトース、セロビオースの混合物（GMC）あるいはラクチュロース（LAC）を添加した YCFA 培地を作製し、糖源と MCC1274 接種の組合せについて、GMC・非接種（対照群）、GMC・接種（プロバイオティクス群）、LAC・非接種（プレバイオティクス群）、LAC・接種（シンバイオティクス群）の 4 群を設定した。CO_2 ガスを常時送入し嫌気条件とし、下限 pH6.0、温度 37℃で糞便サンプル接種後 24 時間培養を行った。腸内細菌叢の構成について、他の群と比較してシンバイオティクス群では *Bifidobacterium* が、対照群では *Blautia* の占有率が有意に高かった。CE-TOFMS および LC-TOFMS によるメタボローム解析の結果、他の群と比較してシンバイオティクス群では、indole-3-lactic acid (ILA)、indole-3-ethanol、6-hydroxymelatonin、Indole-3-carboxaldehyde-2 といったトリプトファン代謝産物など生体内でシグナル分子となる物質の相対濃度が有意に高かった。これらの結果から、MCC1274 とラクチュロースの組合せによるシンバイオティクスが、それぞれ単独よりもヒト腸管内でトリプトファン代謝産物などの産生を増強することが示唆された。

Probiotics and prebiotics have been reported to exhibit a variety of physiological effects on the host, however, the underlying mechanism remains unclear. Here, we conducted fecal fermentation in YCFA medium supplemented with either *Bifidobacterium breve* MCC1274 (probiotics), lactulose (prebiotics), or combination of them (synbiotics) to evaluate their influence on the gut environment using a pH-controlled single-batch fermenter as a human gut microbiota model. The culture was carried out under anaerobic conditions with CO_2 gas constantly pumped in, at a pH greater than 6.0 and a temperature of 37°C for 24 hours after inoculation of fecal samples. Microbiota analysis indicated that the relative abundance of *Bifidobacterium* was significantly higher in the synbiotics group while *Blautia* was enriched in the control group (without MCC1274 nor lactulose). Metabolomic analysis by CE-TOFMS and LC-TOFMS showed that the relative concentrations of tryptophan metabolites such as indole-3-lactic acid (ILA), indole-3-ethanol, 6-hydroxymelatonin, and indole-3-carboxaldehyde-2 were significantly higher in the synbiotics group than in the other three groups. These results suggest that the synbiotics of *B. breve* MCC1274 and lactulose could enhance the production of tryptophan metabolites in the human gut environment.

Bifidobacterium , lactulose, tryptophan metabolites

講演番号：2C05-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

腸内細菌によるカテキン代謝
Microbial flavonoid metabolism

○小綿 彗莉[1]、宮尾 歩実[1]、橋本 義輝[1,2]、熊野 匠人[1,2]、小林 達彦[1,2] ([1]筑波大生命、[2]MiCS)
○Eri KOWATA[1], Ayumi MIYAO[1], Yoshiteru HASHIMOTO[1,2], Takuto KUMANO[1,2], Michihiko KOBAYASHI[1,2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

【背景】カテキンは緑茶などに含まれるフラボノイドでポリフェノールの一種である。抗酸化活性などの有用な生理活性が知られている一方、食品に含まれるカテキンが摂取されたのちに腸内細菌でどのように代謝されるのかについては代謝微生物と代謝産物の一部が報告されているものの、酵素レベルの詳細は不明である。先行研究で、カテキン代謝に関わる腸内細菌は複数あり、初期の代謝(カテキンから C-1, C-2 化合物への変換)を E 菌が、続く代謝(C-1, C-2 化合物から C-3～C-6 化合物への変換)を F 菌が担うことが報告されている。本研究では、カテキン代謝の後半を担う F 菌からの、カテキン代謝に関わる酵素の同定と機能解析を目的とした。
【方法】カテキン代謝に関わる F 菌を、GAM 培地もしくは GAM 培地にカテキン代謝産物を添加した培地にて嫌気培養した。培養した菌体を回収し、バッファーに懸濁したものを休止菌体とした。また、超音波による破砕後の遠心上清を無細胞抽出液とした。F 菌による代謝の出発物質となるカテキン代謝産物 C-1, C-2 は E 菌とカテキンをインキュベートし調製した。反応は休止菌体、無細胞抽出液を各基質と 37°C でインキュベートして行い、活性測定した。
【結果】F 菌休止菌体とカテキン代謝産物 C-1, C-2 をインキュベートした結果、基質が減少し新たな化合物 C-3～C-6 が得られた。しかし、F 菌無細胞抽出液を用いた反応では同活性は検出されなかった。そこで、ゲノム情報から、C-1, C-2 代謝に関わると考えられる酵素を見出し、組換え酵素を調製して反応を試み、C-1, C-2 をそれぞれ変換することが判明した。

Catechins are flavonoids found in green tea and are a type of polyphenol. While catechins are known to have useful bioactivities such as antioxidant activity, the details of how catechins contained in food are metabolized by intestinal bacteria have been unknown at the enzyme level, although some metabolic microorganisms and metabolites have been reported. In addition, previous studies have reported that there are multiple intestinal bacteria involved in catechin metabolism. In this study, we aimed to identify the enzymes involved in catechin metabolism. The catechin-metabolizing activity was not detected in the reaction using cell-free extracts of the bacteria. From the genome information, therefore, we tried to find the enzymes that are thought to be involved in catechin metabolism.

flavonoid, metabolism, bacteria

講演番号：2C05-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

食品産業酵母の形質に関与する脂質分子の網羅解析

Untargeted analysis of lipid molecules involeved in the phenotypes of food industrial yeast

小森 柊花[1]、○岡橋 伸幸[1,2,3]、遠山 敦彦[4]、飯田 順子[2,4]、松田 史生[1,2,3]([1]阪大情報、[2]阪大島津協働研、[3]阪大先導研、[4]島津)
Shuka KOMORI[1], ○Nobuyuki OKAHASHI[1,2,3], Atsuhiko TOHYAMA[4], Junko IIDA[2,4], Fumio MATSUDA[1,2,3] ([1]Osaka Univ., [2]OsakaU Shimadzu co-lab, [3]OTRI, [4]Shimadzu Co.)

【背景および目的】発酵食品に利用される産業酵母は、株ごとに様々なストレス耐性能や風味産生能を有する。しかし、そのような表現型を実現するメカニズムは分かっていない。本研究では、オルガネラ膜やシグナル伝達の役割を担う脂質に注目し、包括的な脂質計測を可能とするノンターゲットリピドミクスを用いて、酵母の産業特性と脂質組成の関連を検討した。
【方法】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の二倍体 10 株（ワイン株、パン株、清酒株各 3 株、実験室酵母 1 株）を SD 培地中で回分培養した。対数増殖期の菌体を破砕後、Folch 法で脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析装置を用いてノンターゲットリピドミクスを行った。
【結果および考察】出芽酵母 10 株のノンターゲットリピドミクスを実施し、Glycerophopholipids、Sphingolipids、Glycerolipids などの 28 クラスに属する 404 分子種を同定した。主成分分析から、産業用途の異なる酵母株ごとにプロットが分かれ、明確な脂質組成の違いがあることが明らかとなった。主成分負荷量を見ると、産業酵母ごとに、Phosphatidylinositol (PI) 、Cardiolipin (CL)の含量が大きく異なる傾向があった。醸造時の低温ストレスに晒される清酒酵母は PI 含量が高く、PI から生合成される PIP_2 を介した Cell wall integrity 経路の活性化が低温ストレス耐性に寄与する可能性が示唆された。また、ワイン酵母と清酒酵母で含量が多かった CL はミトコンドリア機能に重要であり、TCA サイクルの活性化によって酸味を呈する有機酸を産生していると考えられた。以上のようにノンターゲットリピドミクスから、酵母の産業特性と脂質組成の関連性の一端が明らかになった。

Industrial yeasts used in fermented foods have a variety of stress tolerance and flavour-producing abilities. However, the mechanisms underlying such phenotypes are unclear. In this study, we investigated the relevance between industrial characteristics and lipid composition of 10 industrial yeast strains using untargeted lipidomics. 404 molecular species belonging to 28 lipid classes such as glycerophopholipids, sphingolipids and glycerolipids were identified. Principal component analysis revealed the clear differences in lipid composition. The loading plots revealed that the amount of phosphatidylinositol (PI) and cardiolipin (CL) was a characteristic molecules in the industrial strains. Sake yeast, which is exposed to low temperature stress during brewing, had a higher PI content, suggesting that activation of the PIP_2-mediated cell wall integrity pathway may contribute to low temperature stress tolerance. CL, which was abundant in wine and sake yeast, is important for mitochondrial function and is thought to produce sour organic acids by activating the TCA cycle.

industrial yeast, lipidomics, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：岡橋伸幸（n-okahashi@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2C05-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

Bifidobacterium longum 105-A のシステイン/メチオニン代謝に関与する酵素遺伝子の同定

Identification of enzyme genes involved in Cysteine/Methionine metabolism in *Bifidobacterium longum* 105-A

○宮森 那知[1]、松本 菜々恵[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1]、和田 大[2] ([1]北大院農、[2]摂南大農)
○Nachi MIYAMORI[1], Nanae MATSUMOTO[1], Satoru FUKIYA[1], Atsushi YOKOTA[1], Masaru WADA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Setsunan Univ.)

ビフィズス菌のヒトへの健康増進効果を十分に発揮させるためには，腸内での挙動に関わる栄養代謝学的な知見が重要である．しかし，アミノ酸代謝，特に含硫アミノ酸（システイン (Cys) /メチオニン (Met) ）代謝の知見は不十分である．そこで，ビフィズス菌の Cys /Met 代謝の全容解明を目指した．これまでに，*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A の Cys 要求性は Met で代替可能であり, Met から Cys へ代謝する逆流硫黄経路（➔）を有すると示唆された (Fig.) ．本研究では， Cys/Met 代謝に関与する酵素遺伝子の同定を目的として，他の微生物のシスタチオニン (Cth) 代謝酵素と配列相同性と RNA-Seq の結果から，BL105A_0509 (0509)，BL105A_0510 (0510)，BL105A_1451 (1451) の 3 遺伝子を選抜し，各遺伝子の欠損株および相補株を構築した．ビフィズス菌最少培地 (BMM) を用いた生育試験を行い，遺伝子の機能を検証した結果，野生株と比較して，0509 欠損株，0510 欠損株とも BMM+Met 培地で有意に生育が低下した．BMM+Cth 培地では，0510 欠損株のみ有意に生育が低下した．これらの生育低下は，当該遺伝子の相補により回復した．一方，1451 欠損株は明確な表現型を示さず，大腸菌で生産した組換え 1451 タンパク質も Cth をほとんど変換しなかった. これらの結果から 0509 と 0510 はそれぞれ CBS, CGL をコードする遺伝子であり，1451 は Cys/Met 代謝で重要な役割を持たないと考えられた.

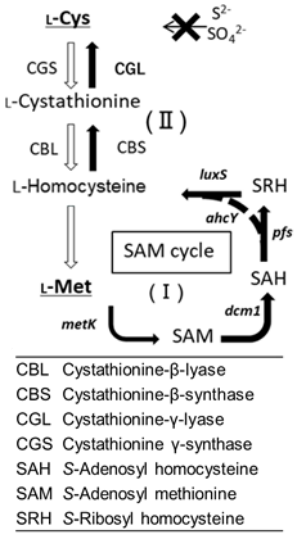


Fig. The estimated metabolism pathway of Cysteine / Methionine in 105-A.

Bifidobacteria exist in the human colon and are known to exert health-promoting effects. Because of the importance of understanding the nutrient metabolism of bifidobacteria, cysteine (Cys)/methionine (Met) metabolism has been investigated. Our previous study revealed that *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A) has a reverse transsulfuration pathway (➔) that metabolizes Met to Cys (Fig.). Furthermore, candidate genes have been selected to identify the genes encoding enzymes involved in the Cys/Met metabolism (Fig.).

In this study, knockout mutants and their complement strains of three candidate C-S lyase genes, BL105A_0509, 0510 and 1451, were constructed. Their growth was evaluated in bifidobacterial minimal medium (BMM). In addition, biochemical analysis using recombinant protein produced by *E. coli* expressing those genes was performed. As a result, it was considered that 0509 and 0510 encode CBS and CGL, respectively.

Bifidobacteria, cysteine and methionine metabolism, reverse transsulfuration pathway

発表責任者：和田　大（masaru.wada@setsunan.ac.jp）

講演番号：2C05-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

胡椒由来アルカロイド分解微生物によるユニークな代謝

Unique microbial metabolism of an alkaloid

○JIAN PU[1]、木村 澪[1]、栗崎 誠[1]、橋本 義輝[1,2]、熊野 匠人[1,2]、小林 達彦[1,2] ([1]筑波大生命、[2]MiCS)
○ PU JIAN[1], Mio Kimura[1], Makoto Kurisaki[1], Yoshiteru Hashimoto[1,2], Takuto Kumano[1,2], Michihiko Kobayashi[1,2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

【背景】胡椒はインド原産であるが、大航海時代に世界中に広がり、現在では亜熱帯地域で広く栽培されている蔓性植物である。日本では沖縄で同じくコショウ科コショウ属に属するヒハツモドキが栽培され島コショウとして利用されている。コショウ独特の辛味成分はピペリンというアルカロイド化合物で、抗菌活性等の生理活性も示す。ピペリンの構造は、ピペリジンの二級アミド基がピペリン酸のカルボキシル基と脱水縮合した３級アミド結合を有するユニークな構造をしている。ピペリンの生理活性については上述のように報告があるものの、自然界においてどのように微生物によって分解・代謝されるのかは未知である。我々はスクリーニングによりピペリンを資化する微生物(No.14 株)を土壌より取得し、ピペリン代謝経路の解明を目指してきた。これまでにピペリンの３球アミド結合を加水分解し、ピペリジンとピペリン酸を生じるピペリン代謝の初発酵素を同定している。本研究では、その下流のピペリン酸代謝に関する研究を行った。
【方法】ピペリン資化微生物 No.14 株はピペリンを添加した 1/10 2YT 培地で 28ºC、2 日間培養を行った。また、遺伝子発現解析を行い見出した酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌で異種発現して精製した。酵素反応は基質と組換え酵素をインキュベートし、活性の検出は反応溶液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などで分析して行った。
【結果】No.14 の培養条件の検討を行い遺伝子発現を解析することで、ピペリン代謝時に発現量が増大する遺伝子を複数見出した。その中にはピペリン代謝の初発酵素である加水分解酵素も含まれていた。その他の高発現遺伝子については遺伝子産物の配列を相同性検索し、機能を予測した。次にピペリン酸代謝に関与すると考えられる酵素遺伝子についてクローニングし大腸菌で組換え酵素を異種発現し、精製した。それらのピペリン酸代謝酵素候補について様々な組合せでピペリン酸とインキュベートし、反応を試みた。その結果、複数酵素による多段階反応でピペリン酸がピペロニル酸へ変換されることが分かった。本研究により、微生物によるユニークなピペリン代謝経路の一部を明らかにすることができた。

Pepper is a vine native to India that spread throughout the world during the Age of Discovery and is now widely cultivated in subtropical regions. In Japan, Hihatsumodoki, a member of the pepper family, is cultivated in Okinawa and used as “island pepper”. The unique pungent component of pepper is an alkaloid compound, which also shows biological activities such as antibacterial activity. Its structure is unique in the formation of a tertiary amide bond. Although there are reports on its bioactivity, it is unknown how it is degraded and metabolized by microorganisms in nature. We have obtained a microorganism catabolizing the compound from soil by screening, and have been trying to elucidate its metabolic pathway. We have identified the primary enzyme involved in the metabolism, which degrades the tertiary amide bond of the compound. In this study, we investigated the further metabolism. We cloned the corresponding enzyme genes, heterologously expressed the recombinant enzymes in *E. coli*, and purified them.

alkaloid, metabolism, bacteria

講演番号：2C05-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

C-配糖体代謝酵素の機能および結晶構造解析

Functional characterization and crystallization analyses of C- glycoside-metabolizing enzymes

○熊野 匠人[1,2]、渡辺 聖実[1]、堀 早苗[1]、寺下 柚子[1]、森 貴裕[3]、何 海兵[3]、千田 美紀[4]、橋本 義輝[1,2]、千田 俊哉[4]、阿部 郁朗[3]、小林 達彦[1,2]（[1]筑波大生命、[2]MiCS、[3]東大院薬、[4]高エネ機構物構研構造生物）

○Takuto Kumano[1,2], Satomi Watanabe[1], Sanae Hori[1], Yuzu Terashita[1], Takahiro Mori[3], Haibing He[3], Miki Senda[4], Yoshiteru Hashimoto[1,2], Toshiya Senda[4], Ikuro Abe[3], Michihiko Kobayashi[1,2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, [3]Univ. of Tokyo, [4]KEK)

【背景】お菓子やジュースなど食品や化粧品の着色に使用される天然の赤色色素カルミン酸はコチニールカイガラムシが生産する C-配糖体である。C-配糖体はアグリコン（非糖部分）の炭素骨格に糖のアノマー炭素が直接 C-C 結合（以下、C-グリコシド結合とする）した配糖体で、他に葛に含まれるプエラリンや、マンゴーに含まれるマンギフェリンなど 100 種類以上が植物や昆虫、微生物から単離され知られている。一般的な配糖体である O-配糖体の O-グリコシド結合と比べて C-グリコシド結合は熱や酸に安定で、グリコシダーゼによる酵素的な分解も受けない。そのような性質から、他の配糖体とは異なった代謝経路により分解・代謝されることが予想された。最近、C-配糖体を代謝する腸内細菌から C-配糖体代謝酵素が報告され、２段階の反応で C-グリコシド結合が分解されることが明らかになった。本研究では、土壌細菌から同定した C-配糖体代謝に関与する２種類の酵素およびそのホモログ酵素について諸性質解明を行い、ホモログ酵素については結晶構造解析も行った。
【方法】C-配糖体カルミン酸代謝微生物は、カルミン酸を単一炭素源とする培地で土壌から集積培養し単離した。カルミン酸代謝活性を指標にして各種クロマトグラフィー等により C-配糖体代謝酵素の精製を行った。ホモログ酵素についてはデータベース検索により見出し、大腸菌で異種発現させ精製した。
【結果】C-配糖体カルミン酸の代謝酵素として CarA および CarB、CarC を同定した。CarA は C-配糖体の糖の 3 位を酸化する FAD 依存的オキシダーゼで新規酵素であった[1)]。データベース検索の結果、腸内細菌にはホモログ酵素は見られず、土壌細菌には広く分布していることが分かり、自然環境中の C-配糖体代謝の初発反応を担っていると推定された。また、CarB と CarC はヘテロダイマーを形成し、C-C 結合を切断して糖部分とアグリコンを分離する酵素であった[2)]。こちらは腸内細菌・土壌細菌に共通してホモログ酵素が見られた。また、本発表では基質特異性や両酵素のホモログ酵素の結晶構造に基づいた反応機構についても報告する。
1) Nature Communications, 6294 [2021], 2) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 118, e2106580118 [2021]

C-glycosides are glycosides in which the anomeric carbon of a sugar is directly attached to the carbon skeleton of an aglycon (non-sugar part) (hereinafter referred to as C-glycosidic linkage). More than 100 types of glycosides have been isolated from plants, insects, and microorganisms, including carminic acid which are used for food staining. Compared to the O-glycosidic linkages of O-glycosides, C-glycosidic linkages are more stable against heat and acid, and are not hydrolyzed by glycosidases. Because of these properties, the metabolic pathway of C-glycosides was expected to be different from that of other glycosides. Recently, a C-glycoside metabolizing enzyme was reported from intestinal bacteria that metabolizes C-glycosides, and it was clarified that the C-glycosidic linkage is degraded in a two-step reaction. In this study, we investigated the properties of two enzymes (CarA and CarB/C) and their homologues involved in C-glycoside metabolism identified from soil bacteria, and the crystal structure of the homologues was also analyzed. CarA is a novel FAD-dependent oxidase that oxidizes the C3-position of the sugar of C-glycoside[1)]. A database search revealed that the homologous enzymes of CarA were not found in intestinal bacteria, but were widely distributed in soil bacteria, suggesting that they are responsible for the primary reaction of C-glycoside metabolism in the natural environment. In addition, CarB and CarC are enzymes that formed heterodimers and separated the sugar moiety from the aglycon by cleaving the C-C bond[2)]. Homologous enzymes of CarB/C were commonly found in intestinal and soil bacteria. The reaction mechanism based on the crystal structures of homologous enzymes of both enzymes will also be reported in our presentation.
1) Nature Communications, 6294 [2021]
2) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 118, e2106580118 [2021].

C-glycoside, metabolism, crystalization

講演番号：2C05-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

セサミン代謝微生物の生産する新規代謝産物

Microbial metabolites with unique structures

○西岡 悠輝[1]、岡崎 紗英[1]、ZHOU Shuo[1]、斉藤 礼華[1]、橋本 義輝[1,2]、熊野 匠人[1,2]、小林 達彦[1,2]
([1]筑波大生命、[2]MiCS)
○Hisaki NISHIOKA[1], Sae OKAZAKI[1], Shuo ZHOU[1], Ayaka SAITO[1], Yoshiteru HASHIMOTO[1,2], Takuto KUMANO[1,2], Michihiko KOBAYASHI[1,2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

【背景】ゴマの種子や胡麻油にはリグナン類が豊富に含まれ、その抗酸化作用が注目されている。中でも、セサミンは近年サプリメントとしても広く利用されており、ヒトやマウスの肝臓の CYP450 によってカテコール体セサミンへと代謝され抗酸化作用を発揮することが知られている。一方、自然界において、セサミン代謝に関与する土壌微生物や酵素・遺伝子は未知であった。我々はセサミンを資化する微生物 No.22 株を土壌から単離し、セサミン代謝の初発酵素 SesA を同定している[1)]。SesA はテトラヒドロ葉酸を補酵素として利用しセサミンをカテコール体セサミンに変換する新規酵素であった。
本研究では、カテコール体セサミンがさらにどのように代謝されるのかを解明することを目的とした。

【方法】セサミン資化微生物 No.22 株はセサミンを添加した 2YT 培地で 28ºC、2 日間培養を行った。培養した菌体を集菌し超音波破砕して遠心し、その上清を無細胞抽出液として酵素精製に供した。酵素反応は基質を無細胞抽出液とインキュベートして行い、活性の検出は反応溶液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などで分析して行った。

【結果】No.22 株によるセサミン代謝活性は培地にセサミンが存在する時にのみ誘導されることが分かっている[1)]。そこで、セサミンを代謝する際に高発現する遺伝子を遺伝子発現解析により複数見出した。それらの組換え酵素を大腸菌で異種発現し、カテコール体セサミンとの反応を試みたところ、ORF2, ORF3 がカテコール体セサミンを新たな代謝産物 X に変換した。さらに No.22 株の無細胞抽出液と代謝産物 X をインキュベートすると X は、さらに代謝産物 Y, Z へと変換された。いずれもセサミン代謝産物として新規な化合物であった。本研究により、複数の新規セサミン代謝産物が判明し、カテコール体セサミンの代謝経路について一部明らかにすることができた。

1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 9087 [2016]

Sesame seeds and sesame oil contain rich lignans, and their antioxidant effects have attracted attention. Sesamin, in particular, has been widely used as a dietary supplement in recent years. It is known to be metabolized to the catecholate sesamin by CYP450 in the liver of humans and mice, exerting antioxidant effects. On the other hand, the soil microorganisms, enzymes, and genes involved in sesamin metabolism in nature were unknown. We previously isolated a sesamin-catabolizing microorganism, No. 22, from soil and identified SesA, the first enzyme involved in sesamin metabolism[1)]. SesA is a novel enzyme that uses tetrahydrofolate as a cofactor to convert sesamin to catecholate sesamins. In this study, we aimed to elucidate how the catecholate sesamins are further metabolized. Sesamin-metabolizing activity of strain No. 22 is induced only when sesamin is present in the culture medium. The recombinant enzymes were heterologously expressed in *E. coli* and reacted with catecholate sesamin resulted in the formation of new products. Furthermore, incubation of the cell-free extract of No. 22 with catechol sesamin. This study revealed several new sesamin metabolites and partially clarified the metabolic pathway of catecholate sesamin.

1) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113, 9087 [2016].

sesamin, metabolism, bacteria

講演番号：2C05-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム C

昆虫腸内からのセサミン代謝微生物の単離

Screening of sesamin-metabolizing microorganisms

○河股 純仁[1]、橋本 義輝[1,2]、熊野 匠人[1,2]、小林 達彦[1,2] ([1]筑波大生命、[2]MiCS)
○ Yoshihito KAWAMATA[1], Yoshiteru HASHIMOTO[1,2], Takuto KUMANO[1,2], Michihiko KOBAYASHI[1,2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

【背景】セサミンはゴマに含まれる有名なリグナン類であるが、ゴマ植物の他にモクレン属の植物の組織中にも含まれていることが報告されている。セサミンには抗酸化活性だけでなく、殺幼虫活性があり、それにより植物は昆虫から身を守っている可能性が考えられる。一方、コブシハバチというハバチの一種の幼虫はセサミンを含むモクレンやコブシの葉のみを食べ、脱皮を繰り返し時期が来ると土に潜って蛹となる。すなわち、何らかの方法でセサミンのもつ殺幼虫活性を回避していると考えられる。その理由として、コブシハバチの腸内に、セサミンなどのリグナンを代謝して無毒化する能力をもつ微生物の存在が推測された。昆虫腸内細菌に関しては未解明の部分が多く、未知のリグナン代謝経路が発見される可能性がある。本研究では、コブシハバチの腸内から、代表的なリグナンの一つであるセサミンを代謝する能力をもつ微生物を同定し、セサミン代謝経路を解明することを目的とした。
【方法】モクレン、ハクモクレンより採取したコブシハバチ幼虫は数日間シャーレで飼育し、フンを採取した。その後、腸を取り出し腸内容物も採取した。採取したフンおよび腸内容物は滅菌水に懸濁し、適宜希釈後、セサミン含有 1/10 2YT 培地、セサミン単一炭素源培地に接種し、セサミン代謝候補株の単離を行った。セサミン代謝活性は、単離したコロニーをそれぞれ培養して調製した無細胞抽出液をセサミンとインキュベートさせた後、反応溶液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析して測定した。また、採取したフンの菌叢解析、単離した菌株の同定は 16SrRNA の遺伝子配列により行った。
【結果】1/10 2YT 培地、セサミン単一炭素源培地を用いて、コブシハバチ幼虫のフンおよび腸内容物から、約 200 株の細菌を取得した。単離した菌株について 16SrRNA による同定、無細胞抽出液を用いたセサミン代謝活性の検討を行い、数株で無細胞抽出液がテトラヒドロ葉酸を反応溶液に添加した時のみセサミン代謝活性を示すことが分かった。反応産物を HPLC 等で解析したところ、セサミンモノカテコールおよびセサミンジカテコールを検出した。このことから、今回単離した菌株は、先行研究で同定した土壌細菌由来セサミン代謝酵素[1)]のホモログ酵素を有している可能性が強く示唆された。
1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 9087 [2016]

Sesamin is a well-known lignan found in sesame. It has also been reported to be found in the leaves of magnolia plants. Sesamin has not only antioxidant activity but also larvicidal activity, which may help plants protect themselves from insects. On the other hand, the larvae of a type of wasp feed only leaves of magnolia. In other words, the larvae would have some way of avoiding the larvicidal activity of sesamin. The reason for this may be the presence of microorganisms in the gut of the bumblebee that have the ability to metabolize lignans such as sesamin and detoxify them. There are many unveiled aspects of insect gut bacteria, and unknown lignan metabolism pathways may be discovered. In this study, we aimed to identify microorganisms that are able to metabolize sesamin from the gut of the wasp, and to elucidate the pathway of the sesamin metabolism. About 200 bacterial strains were obtained from the feces and intestinal contents of bumblebee larvae. The isolated strains were identified by 16SrRNA and examined for sesamin-metabolizing activity. The reaction products were analyzed by HPLC and other methods, and sesamin monocatechol and sesamin dicatechol were detected. These results strongly suggest that the strain isolated in this study has a homologue enzyme of sesamin-metabolizing enzyme from soil bacteria identified in a previous study[1)].
1) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113, 9087 [2016].

sesamin, metabolism, wasp

講演番号：2C06-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

酵母 split-ubiquitin システムによるヒト・ドリコールリン酸マンノース合成酵素(hDPMS)に関する物理的相互作用のスワッピング解析

Swapping analyses on the physical interactions of human dolichol-phosphate-mannose synthase (hDPMS) by the yeast split-ubiquitin system

○大城 理樹、寺島 幸希、高橋 哲夫（東海大工生命化学）
○Riki OSHIRO, Koki TERAJIMA, Tetsuo TAKAHASHI (Tokai Univ.)

ヒト・ドリコールリン酸マンノース合成酵素(hDPMS)は、N-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)の生合成に必要なドリコールリン酸マンノース(DPM)を産生している。これまでに我々は、酵母 split-ubiquitin システムを利用した解析によって、hDPM2 及び hDPM3 ベイトが、DLO 生合成経路で働く幾つかの酵素プレイと物理的に相互作用することを明らかにしてきた。そこで本研究では、hDPM2 及び hDPM3 の欠失変異体プレイを用いて、各酵素ベイトとの相互作用に必要な領域についてスワッピング解析により詳細に解析することにした。
酵母 split-ubiquitin システムにおいて hDPM2 及び hDPM3 ベイトを用いて相互作用が検出されたプレイであるヒト GlcNac-1-P 転移酵素(hGPT)、ヒト・ドリコールキナーゼ(hDK)及びヒト・ドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP)について、今回のスワッピング解析では、ベイト発現用コンストラクトをそれぞれ用意して、hDPM2 及び hDPM3 とその欠失体のプレイを発現するコンストラクトと組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株について、レポーター遺伝子(*HIS3*, *ADE2*)発現検出用の２種類の選択培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上で増殖性を観察した。その結果、hDPM2 の *N* 末端から第２幕貫通領域(HR2)までを発現する欠失体プレイ及び hDPM3 の *N* 末端から第２ループ領域(LR2)までを発現する欠失体プレイは、全長 hGPT ベイトとの相互作用を大きく損なっていることが判明した。現在、hDK 及び hDPP ベイトに対しても、hDPM2 及び hDPM3 の欠失体プレイを用いたスワッピング解析を当システムで検証中であり、その結果を報告する予定である。

Human dolichol-P-mannose synthase (hDPMS) serves as supplier of dolichol-P-mannose (DPM) for several enzymes involved in biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharide (DLO). Using the yeast split-ubiquitin system, we have found that the baits of hDPM2 and hDPM3 subunits of hDPMS physically interact with the preys of human GlcNAc-1-P transferase (hGPT), human dolichol kinase (hDK) and human dolichol-pyrophosphate phosphatase (hDPP). Therefore we tried to further analyze the interactions between the hDPMS subunits and these enzymes by swapping analysis. For this purpose, we prepared deletion version of the prey constructs of hDPM2 and hDPM3. As a result of interaction of DPMS with hGPT, deletant preys of hDPM2 which lacks loop region 3 (LR3) and hDPM3 which lacks hydrophobic region 2 (HR2) and loop region 3 (LR3) hardly interacted with hGPT bait. Other results will be also presented and discussed in this lecture.

DPMS, swapping analysis, physical interaction

講演番号：2C06-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

ヒト・ドリコールリン酸グルコース合成酵素 hDPGS との物理的相互作用に重要な複数酵素における領域の限定

Refinement of the regions on several enzymes which are critical for the physical interactions with human dolichol-phosphate-glucose synthase (hDPGS)

○寺島 幸希、大城 理樹、細谷 海咲、高橋 哲夫 (東海大・工・生命化学)
○Koki TERAJIMA, Riki OSHIRO, Misaki HOSOYA, Tetsuo TAKAHASHI (Tokai Univ.)

ヒト・ドリコールリン酸グルコース合成酵素(hDPGS)は、*N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)生合成の最後の3段階のグルコース付加に必要な糖供与体基質であるドリコールリン酸グルコース(Dol-P-Glc)を供給する粗面小胞体(rER)膜に局在する酵素である。我々は、酵母split-ubiquitinシステムを利用してhDPGSがDLO生合成経路で働くヒト・ドリコールリン酸マンノース合成酵素複合体(hDPMS)の2種類の膜貫通サブユニット(hDPM2及びhDPM3)、ヒトGlcNac-1-P転移酵素(hGPT)、ヒト・ドリコールキナーゼ(hDK)及びヒト・ドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP)と物理的に相互作用することを明らかにした。そこで本研究では、hDPGSとの相互作用に重要と考えられるこれら相手側酵素中の領域をそれぞれ正確に限定することを試みた。

hDPGS全長を発現するためのベイトコンストラクトpBT-C-hDPGSに対して、hDPM2及びhDPM3の*C*-末端から第2疎水性領域(HR2)までの欠失蛋白質を発現するためのプレイコンストラクトpPR-N-hDPM2/LR2及びpPR-N-hDPM3/LR2を組み合わせて酵母NMY51株に形質転換し、レポーター遺伝子*HIS3*及び*ADE2*の発現を検出する2種類の選択培地(SD-LWH及びSD-LWHA)上で、共発現株の増殖性を観察した。その結果、全長プレイコンストラクトで観察された増殖性がpPR-N-hDPM2/LR2の使用時では維持され、pPR-N-hDPM3/LR2の使用時では消失することが分かった。このことは、hDPGSとの相互作用にhDPM2では*N*-末端側の領域、hDPM3では*C*-末端側の領域がそれぞれ重要であることを示唆している。現在、他の酵素に関してもhDPGSとの相互作用に必要な領域を限定するための解析を進行している。

Human dolichol-P-glucose synthase (hDPGS) is involved in the late step of dolichol-linked oligosaccharide (DLO) assembly. Using the yeast split-ubiquitin system, we have already demonstrated that the enzyme physically interacts with hDPM2 and hDPM3 subunits of human dolichol-P-mannose synthase (hDPMS), human GlcNAc-1-P transferase (hGPT), human dolichol kinase (hDK) and human dolichol-pyrophosphate phosphatase (hDPP). Hence we tried to refine the regions on these enzymes, which are critical for the interaction with hDPGS.

For this purpose, we prepared deletion versions of the prey constructs of these enzymes for analyses with the yeast split-ubiquitin system. As for hDPM2 and hDPM3, we obtained the data which indicates that the *N*-terminal side of the former and *C*-terminal side of the latter are crucial for the interaction with the hDPGS. The results on the other enzymes will be also presented and discussed in this lecture.

DPGS, split-ubiquitin system, physical interaction

講演番号：2C06-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

酵母 split-ubiquitin システムを利用したヒト MPDU1 に関する物理的相互作用の変異解析

Mutational analyses on physical interactions of human MPDU1 using the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、傳能 康成、岩本 栄介（東海大工）
○Tetsuo Takahashi, Yasunari Dennou, Eisuke Iwamoto (Tokai Univ.)

真核細胞の *N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)の生合成は、粗面小胞体(rER)膜に局在する各種糖転移酵素やフリッパーゼなどが働くドリコールサイクルと呼ばれる経路で行われる。ヒト mannose-P-dolichol utilization defect 1 (hMPDU1) は、ドリコールサイクルにおいて rER 膜の細胞質側で生合成された dolichol-P-Man(DPM)の内腔側での利用に必須な役割を果たす rER 膜局在蛋白質である。これまでに我々は、酵母 split-ubiquitin システムを用いて、本蛋白質が同経路のヒト DPM 合成酵素の膜貫通サブユニット hDPM3、ヒトドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP1)及びヒト DPM 依存性マンノース転移酵素 hALG9 と物理的に相互作用していることを実証した。本研究では、変異解析によりこれら 3 種類の酵素との相互作用に不可欠な hMPDU1 中の領域の限定を試みた。hMPDU1 の *C*-末端側から疎水性領域(HR)を段階的に欠失させた 3 種類の欠失ベイト発現コンストラクト(pBT-STE-hMPDU1HR2,3,5)を作製した。これらを上記 3 種類の酵素を発現するプレイコンストラクト(pPR-N-hDPM3, pPR-N-hDPP1,pPR-N-hALG9) と 1 つずつ組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換した。得られたベイト/プレイ共発現株を用いて、2 種類のレポーター検出用培地(SD-LWH および SD-LWHA)上で増殖性試験を行った。その結果、hDPP1 プレイとの相互作用が pBT-STE-hMPDU1HR5 を用いた場合に、hDPM3 プレイとの相互作用が pBT-STE-hMPDU1HR3 を用いた場合に、hALG9 プレイとの相互作用が pBT-STE-hMPDU1HR2 を用いた場合に、それぞれ消失した。これらの観察結果は、hMPDU1 が 3 つの異なる領域で各酵素と相互作用している可能性を示唆している。現在、さらに詳しい変異解析を進めている。

Human mannose-P-dolichol utilization defect 1 (hMPDU1) plays an essential role in late mannosylation steps of dolichol-linked oligosaccharide (DLO) assembly. Using the yeast split-ubiquitin system, we have already demonstrated that hMPDU1 physically interacts with hDPM3 subunit of human dolichol-P-mannose synthase (hDPMS), human dolichol-pyrophosphate phosphatase (hDPP) and human ALG9 mannosyltransferase. Thus, we tried to refine the regions critical for the interaction with three enzymes in hMPDU1 by mutational analysis.

For this purpose, we prepared various truncated versions of the hMPDU1 bait constructs which are deleted from *C*-terminal side. As a result, we obtained the data which suggests that hMPDU1 interacts with three enzymes via three distinct regions. More detailed results by mutational analysis will be presented and discussed in this lecture.

split-ubiquitin system, MPDU1, physical interaction

講演番号：2C06-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

Enterococcus faecalis 由来 GH31 α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼと基質との複合体構造解析

Crystal structures of *Enterococcus faecalis* GH31 α-*N*-acetylgalactosaminidase complexed with substrates

○宮崎 剛亜[1,2]、池谷 真里奈[2]、Alonso-Gil Santiago[3] ([1]静大・グリーン科技研、[2]静大・創造院・バイオサイエンス、[3]ウィーン大・マックスペルーツ研)
○Takatsugu MIYAZAKI[1,2], Marina IKEGAYA[2], Santiago ALONSO-GIL[3] ([1]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Dep. Biosci., Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Max Perutz Labs, Univ. Vienna)

【目的】糖質加水分解酵素ファミリー31（GH31）には α-グルコシダーゼ、α-ガラクトシダーゼ、α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ（Nag31）などの α-グリコシド結合に作用するアノマー保持型加水分解酵素が分類されている。Nag31 は腸内細菌や鱗翅目昆虫から見出されており、*p*-nitrophenyl α-*N*-acetylgalactosaminide（GalNAc-pNP）や *O* 型糖鎖の GalNAc と Ser/Thr の間の α-グリコシド結合を加水分解することが報告されている。Nag31 の立体構造の報告は、我々が決定した腸内細菌 *Enterococcus faecalis* 由来 Nag31 の触媒ドメイン（EfGH31）のリガンドフリー及び GalNAc 複合体のみであり、活性部位が open 型と closed 型の２種類のコンフォメーションを取ることが明らかになっている。本研究では、本酵素の基質特異性やその反応機構の詳細を立体構造から明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】組換え EfGH31 を *O* 型糖鎖が付加しているフェチュインやウシ顎下腺ムチンに作用させたところ、ムチンより GalNAc の遊離が確認された。一方で、Tn 抗原（GalNAc-Ser）はごく僅かにしか分解しなかった。EfGH31 の求核触媒残基（D455）を Ala または Asn に置換した変異体と GalNAc-pNP および GalNAc-Ser との複合体構造を決定した。いずれも活性部位にリガンドが結合しており、酵素は closed 型を呈していた。さらに、量子力学的計算によって加水分解反応中における基質の糖のコンフォメーション変化を解析したところ、$^4C_1 \rightarrow {}^1S_3 \rightarrow {}^4C_1$ の経路を取ることが示唆された。

Glycoside hydrolase family 31 (GH31) contains retaining α-glycosidases including α-glucosidases, α-galactosidases, and α-*N*-acetylgalactosaminidases (Nag31s). Nag31s have been found in human gut bacteria and lepidopteran insects and release *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) from *p*-nitrophenyl α-*N*-acetylgalactosaminide (GalNAc-pNP) and *O*-glycoproteins. We previously determined the crystal structures of the catalytic domain (EfGH31) of Nag31 from a gut bacterium *Enterococcus faecalis* in unliganded form and in complex with GalNAc, where the catalytic site adopts the open and closed forms, respectively. In this study, we investigated the specificity of EfGH31 for naturally-occurring sugars and the crystal structures complexed with substrates. Recombinant EfGH31 directly liberated GalNAc from mucin, but hardly hydrolyzed Tn antigen (GalNAc-Ser). The crystal structures of the catalytic nucleophile mutants (D455A or D455N) in complexes with GalNAc-pNP and GalNAc-Ser were determined, and both structures adopt the closed form to fit the ligands. Quantum mechanics calculations indicated that EfGH31 hydrolyzes α-*N*-acetylgalactosaminides through a conformational itinerary $^4C_1 \rightarrow {}^1S_3 \rightarrow {}^4C_1$ in GalNAc of substrates.

mucin, glycoside hydrolase, gut bacteria

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C06-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

GH65 α-1,2-グルコシダーゼとグルコシダーゼ阻害剤の複合体構造解析

Structural analysis of GH65 α-1,2-glucosidase in complex with glucosidase inhibitors

○中村 駿太郎[1]、朴 龍洙[1,2]、宮崎 剛亜[1,2]([1]静大・創造院・バイオサイエンス、[2]静大・グリーン科技研)
○Shuntaro NAKAMURA[1], Enoch. Y PARK[1,2], Takatsugu MIYAZAKI[1,2] ([1]Dept. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ.,, [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】糖質加水分解酵素ファミリー65 (GH65) には糖質加リン酸分解酵素と糖質加水分解酵素が属している。我々は *Flavobacterium johnsoniae* 由来の GH65 酵素 (FjGH65A) がコージビオースを特異的に加水分解する新規な α-1,2-グルコシダーゼであることを明らかにし、その立体構造も決定した[(1]。本研究では一般的なグルコシダーゼ阻害剤の FjGH65A に対する影響と複合体構造を解析することで、各種阻害剤の FjGH65A に対する阻害機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】大腸菌 BL21 (DE3) により生産し、精製した組換え FjGH65A とグルコシダーゼ阻害剤を用いて、コージビオースを基質とした酵素活性阻害試験を行った。阻害剤は 1-deoxynojirimycin (DNJ)、castanospermine (CSP)、isofagomine (IFG) を使用した。FjGH65A は DNJ により拮抗的に阻害され、CSP と IFG には非拮抗的に阻害された。また、K_i はそれぞれ 2.95±0.05 μM、3.69±0.26 μM、3.29±0.31 mM であった。また、FjGH65A と DNJ および CSP の共結晶と IFG をソークした FjGH65A の結晶を調製し、高エネルギー加速器研究機構にて X 線回折強度測定を行った。その結果、FjGH65A と DNJ、CSP、IFG の複合体構造をそれぞれ 1.9、1.6、1.6 Å 分解能で決定した。DNJ は FjGH65A のサブサイト−1 に結合しており、CSP と IFG は FjGH65A のサブサイト−1 と+1 に結合していた。グルコース複合体構造[(1] と比較すると、CSP 複合体構造では Tyr337 のコンフォメーションが変化しており、IFG 複合体構造では Glu472 のコンフォメーションが変化していた。

Glycoside hydrolase family 65 (GH65) contains glycoside phosphorylases and glycoside hydrolases. We previously discovered a novel α-1,2-glucosidase (FjGH65A) specific for kojibiose, and determined its unliganded and glucose-complex crystal structures [(1]. In this study, we analyzed effects of glucosidase inhibitors on FjGH65A and determined the crystal structure to elucidate the inhibition mechanism of glucosidase inhibitors on FjGH65A. FjGH65A activity against kojibose was kinetically measured in the presence of inhibitors, 1-deoxynojirimycin (DNJ), castanospermine (CSP), or isofagomine (IFG). FjGH65A was competitively inhibited by DNJ and non-competitively inhibited by CSP and IFG. The crystal structures of FjGH65A in complexes with DNJ, CSP, or IFG were determined. DNJ was bound to subsite −1 of FjGH65A, while CSP and IFG were bound to subsites −1 and +1 of FjGH65A. Compared with the glucose-complex structure, the conformation of Tyr337 was changed in the CSP-complex structure, while the conformation of Glu472 was changed in the IFG-complex structure.

1) Nakamura S et al., *J. Biol. Chem.,* **297**, 101366, 2011.

kojibiose, glucosidase inhibitor, crystal structure

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C06-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

糖質加水分解酵素ファミリー31 に属するα-1,3-グルコシダーゼの構造と基質特異性の相関の解析
Structural basis for substrate specificity of an α-1,3-glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 31

○池谷 真里奈[1]、朴 龍洙[1,2]、宮崎 剛亜[1,2]([1]静大・創造院・バイオサイエンス、[2]静大・グリーン科技研)
○Marina IKEGAYA[1], Enoch Y. PARK[1,2], Takatsugu MIYAZAKI[1,2] ([1]Dept. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】我々は、これまでに乳酸球菌 *Lactococcus lactis* のゲノムより糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH31) に属する、既報の酵素より α-1,3-グルコシド結合への特異性の高い酵素 (LlGH31_u1) を見出し、その X 線結晶構造を決定した(1。LlGH31_u1 は、グルコースが α-1,3-結合した三糖のニゲロトリオース (Nig3)、四糖のニゲロテトラオース (Nig4) に対して二糖のニゲロース (Nig2) よりも高い親和性を示す。また、グルコースが α-1,2-結合した二糖であるコージビオース (Koj2) に対する加水分解活性は低く、Koj2 に対する k_{cat} は Nig2 の約 1/8.6 と低いが、両基質に対する K_m 値はほぼ同等であった(1。そこで、LlGH31_u1 の基質特異性と立体構造の相関を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】LlGH31_u1 の触媒残基である D394 を Ala に置換した変異体を用い、10 mM の各基質と共結晶化を行うことで、これまでに得られていた Nig2 に加え、Nig3、Nig4、Koj2 との基質複合体構造を決定した。Nig3 と Nig4 の非還元末端から 3 番目のグルコースの 4 位のヒドロキシ基は、Ser455 と水素結合を形成していたが、Ser455 の側鎖は結晶中で二通りの回転異性体を取ることが示唆された。Koj2 との複合体構造では、Koj2 の α-アノマーの明瞭な電子密度が観察されたが、野生型の LlGH31_u1 と重ね合わせると、1 位のヒドロキシ基が D394 と立体障害を生じる位置にあると考えられた。

We previously found an α-1,3-glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 31 (LlGH31_u1), which showed higher substrate specificity than other known α-1,3-glucosidases, from the genome of *Lactococcus lactis*(1. LlGH31_u1 had higher affinity for nigerotriose (Nig3) and nigerotetraose (Nig4) than nigerose (Nig2). LlGH31_u1 also exhibited a little hydrolytic activity for kojibiose (Koj2): while the k_{cat} value for Koj2 was 8.6 times lower than that for Nig2, K_m values for both substrates were almost the same(1. Therefore, we aimed to clarify the relationship between the substrate specificity and the three-dimensional structure. We determined the X-ray crystal structures of inactive mutant (D394A) in complexes with Nig2, Nig3, Nig4, and Koj2. The third glucose residues from the reducing ends of Nig3 and Nig4 form hydrogen bonds with Ser455, but two different rotamers of Ser455 were observed. In the complex structure with Koj2, a clear electron density for an α-anomer of Koj2 was observed, and superposition of this structure with the unliganded wild-type structure suggested that the 1-OH group causes steric hindrance with the acid/base catalytic residue, D394.

1) 池谷真里奈ら, 日本応用糖質科学会 2021 年度 (第 70 回) 大会要旨集, C12 (2021)

glycoside hydrolase family 31, nigerose, X-ray crystallography

発表責任者：宮崎 剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C06-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

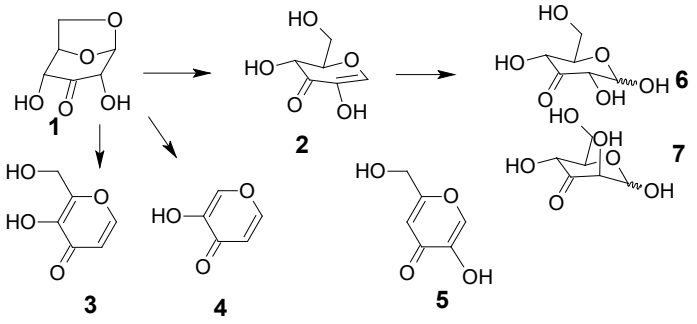
3-ケトグルコシドのアルカリ条件下で生じる 340 nm 吸光に関わる分子種の同定

Molecular species representing absorption at 340 nm under alkaline conditions of 3-keto-glucosides

高野 亜優[1]、山川 凱生[2]、伏信 進矢[3]、吉田 信行[4]、○北岡 本光[1]（[1]新潟大・農、[2]東大・農、[3]東大院・農生科、[4]静大院・総合科技）

Ayu Takano[1], Yoshiki Yamakawa[2], Shinya Fushinobu[3], Nobuyuki Yoshida[4], ○Motomitsu Kitaoka[1] ([1]Fac. Agr., Niigata Univ., [2]Fac. Agr., Univ. Tokyo, [3]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [4]Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

3-ケトグルコシド類はアルカリ条件下で 340 nm 付近に極大吸光波長を示すことが 1960 年代に報告されており、これらの確認に利用されている。3-ケト-1,6-アンヒドロ-β-グルコース(3kLG, **1**)を用いた解析により吸光に関わる分子種を同定した。



1 の 30℃、0.1 M NaOH 条件下での 340 nm の吸光度は、反応 3 分で極大に達しそれ以降徐々に減少した。反応液を経時的に中和し、NMR により分析したところ、反応初期に 1,5-anhydro-D-*erythro*-hex-1-en-3-ulose (**2**), 3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4*H*-pyran-4-one (**3**), 3-hydroxy-4*H*-pyran-4-one (**4**)を主要生成物として確認した。**2** のみ経時的に減少し反応 1 日後にほぼ消失した。**3**,**4** はコウジ酸(**5**)の類縁体である。**2** 及び **5** は 0.1 M NaOH 中で 340 nm 付近を極大波長とする吸光を示した。

2,**3**,**4** はエノール構造の化合物であり、アルカリ条件下における水酸基の解離型が 340 nm に吸収を持つと考えられる。**2** はアルカリ条件下では徐々に二重結合が水和されることにより 340 nm の吸収を持たない 3-ケトグルコース/マンノース(**7**,**8**)に変化すると考えられる。

It was reported in the 1960s that 3-ketoglucosides exhibit a maximum absorbance wavelength around 340 nm under alkaline conditions. The absorption has been used to confirm their occurrence. We here report identification of the molecular species representing the absorbance using 3-keto-1,6-anhydro-β-glucose (3kLG, **1**).

Abs_{340} of **1** reached the maximum in 3 minutes in 0.1 M NaOH at 30 °C, and gradually decreased thereafter. When the reaction solution was neutralized and analyzed by NMR, 1,5-anhydro-D-*erythro*-hex-1-en-3-ulose (**2**), 3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4*H*-pyran-4-one (**3**), 3-hydroxy-4*H*-pyran-4-one (**4**) was confirmed as the main products. Only **2** decreased over time and almost disappeared after 1 day of reaction. **3** and **4** are analogues of kojic acid (**5**). **2** and **5** showed absorbance with a maximum wavelength of around 340 nm in 0.1 M NaOH.

2, 3 and 4 are enols and the dissociated forms of the OH group may possess absorption at 340 nm. **2** is considered to be gradually hydrated into 3-keto glucose/mannose (**7**,**8**) that do not show absorption at 340 nm under the alkaline conditions.

3-ketoglucoside, absorption, alkaline ocnditions

発表責任者：北岡本光（mkitaoka@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2C06-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

脱皮に関連した陸ガニ由来キチナーゼの解析
Characterization of a molting-related chitinase from a land crab, *Chiromantes haematocheir*
○三宅 克英、永倉 佑真（名城大理工）
○Katsuhide MIYAKE, Yuuma NAGAKURA (Meijo Univ.)

【背景及び目的】カニをはじめエビ、昆虫などの節足動物の外骨格はキチンが主要成分である。キチンは N-アセチルグルコサミンがβ–1, 4 結合で直鎖状に数百から数千もつながった難分解性，不溶性の多糖であり、これらの動物ではカルシウムなどと結合し、強度成分として機能している。地球上で合成される量は年間で約 1,000 億トンともいわれており、植物由来のバイオマスであるセルロースに次ぐ資源量となっている。このキチンからは、構成糖である N-アセチルグルコサミンに変形性膝関節症の改善効果や美肌効果などが確認され、分解オリゴ糖には動植物の自然免疫系を活性化して生体防御反応を惹起するエリシター活性も報告されている。本研究では，分解産物を得るための酵素としてカニ本体のキチナーゼに着目した。日本の海岸林に多く生息するアカテガニの RNA-seq を行い、キチナーゼを単離し，解析した。
【結果及び考察】アカテガニを採集し、解剖後、肝臓と膵臓の機能を持ち、多くの酵素の生産を担っている中腸腺から全 RNA を精製し、RNA-seq に供した。この際、通常のカニと脱皮直後のカニの２つのサンプルを用意した。この RNA-seq の解析から、キチナーゼ遺伝子を複数見出した。ほとんどのキチナーゼは脱皮直後のカニで発現が昂進していた。そのうち最も発現量の多い酵素（29294）は、GH18 ファミリーに属するエキソ型のキチナーゼであり、全キチナーゼ発現量の大半（通常カニ 87%、脱皮カニ 98%）を占めていた。カニの脱皮の際のキチンの再構成に重要な役割を果たしていると考えられる。29294 キチナーゼを大腸菌に生産させて活性を解析したところ、分解産物は N-アセチルグルコサミンダイマーとトリマーであり、エキソ型であることを示唆していた。キチン廃棄物はほとんどがカニ、エビ由来であり、本酵素がそれらの分解に有用であると期待している。

Chitinases play an important role in many biological processes in crustaceans, including molting, digestion, and immunity. In order to apply the chitinases in the field of biotechnology, we tried to detect chitinase mRNAs from a land crab *Chiromantes haematocheir* by transcriptome analysis and analyze their properties. Twenty-three chitinase genes were identified from transcriptomes of the midgut glands. Among the 23 chitinases, TRINITY_DN29294 transcripts (29294) accounted for virtually all of total expression of the chitinases. The 29294 cDNA contains a 1467 bp open reading frame (ORF), coded for 488 amino acid residues and was classified into the GH18 chitolectin chitotriosidase and ChtBD2 domain-containing protein. The transcripts increased significantly in the molting crab compared to the non-molting crab. The 29294 chitinase was produced in *E. coli* and the activity was analyzed. The expression of the 29294 mRNA was detected in all tissues, with the highest expression in the midgut glands. Overall, 29294 expression was up-regulated in crabs reared with chitin-containing diets compared with the control group. This result indicate that the enzyme is likely involved in digestion as well as molting.

Chitinase, Chitin, Crab

発表責任者：三宅克英（miyake@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2C06-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

バイオエタノール生産を目指したキシリトール脱水素酵素の構造生物学的解析

Structural analysis of xylitol dehydrogenase for bioethanol production

○吉原 健太郎[1]、渡辺 誠也[1,2]、渡邊 康紀[3]([1]愛媛大院農、[2]愛媛大沿岸環境科研セ、[3]山形大理)
○Kentaro YOSHIWARA[1], Seiya WATANABE[1,2], Yasunori WATANABE[3] ([1]Ehime Univ., [2]Ehime Univ. CMES, [3]Yamagata Univ.)

【背景・目的】キシリトール脱水素酵素（XDH）は、酵母を用いたリグノセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産における五炭糖発酵の鍵となる酵素であり、活性中心に亜鉛原子を有している。我々はこれまでに、S96C/S99C/Y102C の変異により第 2 の亜鉛原子がループ領域に導入され、顕著な熱安定化と酵母細胞内での発現向上が達成できることを報告している。本研究では、この生化学的知見を含む本酵素の触媒機構の原子レベルでの解明を目的に、X 線結晶構造解析を行った。【方法・結果】上記変異体を材料とした分子置換法により、XDH としては初めて立体構造決定に成功した（分解能 2.7Å）。全体構造は、同じポリオール脱水素酵素ファミリーのメンバーとよく似ていた。その１つである L-アラビニトール脱水素酵素（LADH）と活性部位を比較したところ、Phe56 と Phe299 のみが異なり基質特異性に関与すると示唆された。また異常分散差フーリエマップは人工的に導入された第 2 の亜鉛の存在を明瞭に証明した（図）。この熱安定性向上が他のポリオール脱水素酵素へも適用できることを検証した結果についても報告する。

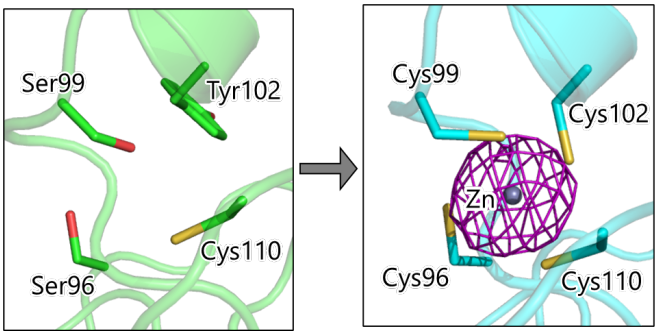


図 異常分散差フーリエマップ（左が野生型、右が C4 変異体）

Xylitol dehydrogenase (XDH) is the key enzyme for bioethanol production from lignocellulosic biomass containing pentoses such as xylose and L-arabinose, using *Saccharomyces cerevisiae*. This enzyme has the catalytic zinc in the active site. We have previously obtained several biochemical evidences that the S96C/S99C/Y102C mutations (C4) within a loop region leads to the significant thermostabilization *in vitro* and overexpression in yeast cells *in vivo*, probably due to the introduction of an additional zinc atom. To elucidate these insights in more detail, crystal structure of XDH was now determined at 2.7Å, using the molecular replacement. The overall structure was similar to the members of the polyol dehydrogenase protein family. Among putative active sites, Phe56 and Phe299 in XDH were not conserved in L-arabinitol dehydrogenase, indicating that these residues are responsible for substrate specificity. Crystal structure of the C4 mutant showed the coordination of the additional zinc atom (Fig.). We also attempted whether this strategy is applicable for thermostabilization of other polyol dehydrogenases nor not.

xylitol dehydrogenase, crystal structure, bioethanol

講演番号：2C06-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

Paenibacillus borealis 由来新規酵素 4-*O*-β-D-グルコシル-L-フコースホスホリラーゼの同定
Identification of 4-*O*-β-D-glucosyl-L-fucose phosphorylase from *Paenibacillus borealis*
○佐田 俊[1]、仁平 高則[2]、北岡 本光[1]、中井 博之[1] ([1]新潟大院自然、[2]新潟大農)
○Takashi SATA[1], Takanori NIHIRA[2], Motomitsu KITAOKA[1], Hiroyuki NAKAI[1] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ.)

ホスホリラーゼは、糖質を可逆的に加リン酸分解する酵素であり、その厳密な反応位置特異性を活かした逆反応はオリゴ糖合成の有用な手法の一つとなる。一方、合成可能なオリゴ糖のバリエーション拡大には、新たな基質特異性を有する新規ホスホリラーゼの探索が必須である。本研究では、糖質加水分解酵素ファミリー(GH)94 に属する *Paenibacillus borealis* 由来 PBOR_31870 の機能解析を行い、PBOR_31870 が L-フコースを最適な糖受容体、α-D-グルコース 1-リン酸を糖供与体として、4-*O*-β-D-グルコシル-L-フコースを合成することを明らかにした。GH94 において L-フコースを最適な糖受容体とする酵素はこれまで報告されていないため、本酵素を 4-*O*-β-D-グルコシル-L-フコースホスホリラーゼと命名した。また、D-アラビノース、L-ガラクトースおよび D-フルクトースも糖受容体として作用し、4-*O*-β-D-グルコシル-D-アラビノース、4-*O*-β-D-グルコシル-L-ガラクトース、5-*O*-β-D-グルコシル-D-フルクトースを生成したことから、サブサイト+1 にて L-フコースの 4 位のアキシャル水酸基、2 位と 3 位のエカトリアル水酸基を PBOR_31870 は認識していると推察された。さらに今回、当該酵素とスクロースホスホリラーゼを組み合わせることにより、安価なスクロースを出発原料として用いて、上述した二糖類の One-pot 大量調製系も確立した。

Phosphorylases are enzymes that catalyze the reversible phosphorolysis of carbohydrates, and their strict regioselectivities are useful for the syntheses of particular oligosaccharides. Screening for new phosphorylases is required to expand the variation of oligosaccharides that can be enzymatically synthesized. In this study, we characterized PBOR_31870 from *Paenibacillus borealis*, which belongs to the glycoside hydrolase family (GH) 94. The results showed that PBOR_31870 catalyzed the synthesis of 4-*O*-β-D-glucosyl-L-fucose from L-fucose as the best acceptor substrate and α-D-glucose 1-phosphate as the donor substrate. Because such activity has not been reported, we here propose 4-*O*-β-D-glucosyl-L-fucose phosphorylase as the names for PBOR_31870. In addition, PBOR_31870 synthesized 4-*O*-β-D-glucosyl-D-arabinose, 4-*O*-β-D-glucosyl-L-galactose, 5-*O*-β-D-glucosyl-D-fructose from D-arabinose, L-galactose, and D-fructose, respectively, as the acceptor substrate, suggesting that the enzyme recognizes the axial 4-OH, equatorial 2-OH and 3-OH of L-fucose at the subsite +1. Furthermore, we established one-pot mass production systems of the disaccharides as described above from sucrose that was inexpensive starting materials by combining PBOR_31870 with a sucrose phosphorylase.

phosphorylase, glycoside hydrolase family 94

発表責任者：中井博之（nakai@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2C06-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム C

ヘテロ二量体構造を有する新規ヒアルロン酸リアーゼ

A novel hyaluronate lyase with heterodimeric composition

○増沢 望[1]、毛利 智海[1]、中西 優太[1]、近藤 敬子[2]、片平 正人[2]、武田 穣[1]([1]横国大工、[2]京大エネ研)
○ Nozomi MASUZAWA[1], Tomomi MOURI[1], Yuta NAKANISHI[1], Keiko KONDO[2], Masato KATAHIRA[2], Minoru TAKEDA[1] ([1]Yokohama Natl.Univ., [2]Kyoto Univ.)

既知のヒアルロン酸(HA)リアーゼは単量体である。我々は活性汚泥細菌 *Haliscomenobacter hydrossis* よりヘテロ二量体の HA リアーゼを発見したので報告する。*H. hydrossis* は活性汚泥の固液分離障害との関連が指摘されている糸状性細菌である。本細菌の多糖資化性を調べたところ、ゲノム情報に基づく予想に反し HA を資化可能であることが判明した。培養液中には HA 分解活性が検出され、分解の進行に伴って 235 nm における吸光度が上昇したことから HA リアーゼ（EC 4.2.2.1）の分泌が予想された。クロマトグラフィーで精製した酵素は native-PAGE では単一ながら、SDS-PAGE では 74 および 15 kDa のバンドが検出された。単一ピークとなったゲルろ過では 110 kDa と推算されたことから、ヘテロ二量体と推定した。各サブユニットの部分アミノ酸配列をゲノム情報と照合したところ、モリブドプテリンと 2Fe–2S を補因子とするアルデヒド脱水素酵素のサブユニットの予想配列に合致した。しかし、調べた限りアルデヒド脱水素活性は検出されなかった。一方、両補因子の存在は分光分析によって示唆された。既知の酵素と同じく本酵素は HA を不飽和二糖に分解することを分解物の NMR 解析で確認した。また、コンドロイチン硫酸 C にも作用した。現時点においてはリアーゼ活性に対する電子伝達系補因子の関与の有無は不明であるものの、単量体酵素の活性中心に作用して阻害をもたらすアスコルビン酸の影響を受けないことから独自の触媒機構を有すると予想される。

Known hyaluronate (HA) lyases are commonly monomeric. We report a heterodimeric HA lyase found in the activated sludge bacterium, *Haliscomenobacter hydrossis*. In the course of polysaccharide utilization testing of this bacterium, HA was found to serve as carbon source. However, no hyaluronate lyase gene was found in this genome. A novel hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1) was expected be secreted by this bacterium, because absorbance at 235 nm increased as depolymerization proceeded. The purified enzyme exhibited two bands on SDS-PAGE, but appeared homogeneous by gel filtration and native-PAGE, revealing its heterodimeric composition. Partial amino acid sequencing revealed that the peptides are encoded by genes for putative subunits of an aldehyde dehydrogenase, which contains molybdopterin and 2Fe–2S as cofactors. Though dehydrogenating activity was not detected, the presence of both electron transferring cofactors was supported by spectrometric analyses. Structural analysis of the enzymatic products revealed that the enzyme breaks HA and chondroitin-6-sulfate down to their dimer units. The enzyme was resistant to ascorbic acid, which is a non-competitive inhibitor of known (monomeric) HA lyases, suggesting the enzyme has a distinctive catalytic mechanism.

hyaluronate lyase, *Haliscomenobacter hydrossis*, molybdopterin

発表責任者：武田穣（takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp）

講演番号：2C08-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

Bacillus halosaccharovorans 由来 β-アミラーゼの熱安定性の増強

The enhancement of the thermostability of β-amylase from *Bacillus halosaccharovorans*

○前田 泰輝、田中 真奈、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛士（府大農）
○Taiki MAEDA, Mana TANAKA, Shuji TANI, Jyunichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Prefecture Univ.)

β-アミラーゼは餅菓子やパンに含まれるデンプンの老化防止に利用されているが穀物由来のものが多用されており、工業利用において耐熱性の高いものが望まれる。そこで穀物との市場競争に関わらず安定供給可能で耐熱性を有する、微生物由来 β-アミラーゼの獲得が求められている。

当研究室で土壌から耐熱性 β-アミラーゼ生産菌のスクリーニングが行われ、耐熱性を有する β-アミラーゼ生産菌 *Bacillus halosaccharovorans* が得られた。本菌の生産する β-アミラーゼは市販製品中で最も熱安定性が高いとされるダイズ由来酵素よりも優れた熱安定性を示した。X 線結晶構造解析を行った結果、本酵素は$(\beta/\alpha)_8$バレル構造の触媒ドメインと CBM20 に属する SBD を有し、熱安定性が低い *B. cereus* var. *mycoides* 由来 β-アミラーゼと非常に類似した立体構造であることが判明した。

本研究では本酵素の熱安定性をさらに上昇させることを目的として部位特異的変異を導入した。変異導入は①Gly 残基を他アミノ酸残基へ置換、他のアミノ酸残基を Pro へ置換、②Helix dipole の電荷を相殺し得る荷電アミノ酸残基の導入、③タンパク質表面に存在する疎水性アミノ酸の置換の 3 点を基に、21 ヵ所に対して行った。その結果、野生型（WT）と比較して熱安定性の向上したものが 4 種類（T4P, T15K, T15R, Q306D）得られ、T4P は 65˚C の熱処理で 60 分後の残存活性が WT の 2 倍の 80%となり飛躍的に熱安定性が向上した。

β-amylase is used for a food additive for retrogradation of starch in rice-cake sweets and breads. β-amylase is mainly from grains and expected to have heat resistance. Now, β-amylase is desired stable supply like microbial enzymes and thermostability.

We found a β-amylase producer, *Bacillus halosaccharovorans* from soil, whose β-amylase had higher thermostability than that from soy beans. According to X-ray crystallography, this β-amylase has the catalytic domain of $(\beta/\alpha)_8$ barrel and starch-binding domain belonged to Carbohydrate-Binding Module 20. In addition, overall three-dimensional structure of the β-amylase was almost the same as unstable β-amylase from on *B. cereus* var. *mycoides*.

In this study, we tried to obtain mutant β-amylase with higher thormostability by site-directed mutagenesis of β-amylase gene from *B. halosaccharovorans*. Four mutant enzymes from 21 mutants have more thermostable than wild type (WT). Especially, residual activity of T4P after 65˚C incubation for 1 hour is twice than WT.

β-amylase, thermostability, Bacillus

講演番号：2C08-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

好酸性アーケア *Thermoplasma volcanium* GH15 トレハラーゼの立体構造解析
Crystal structure analysis of GH15 trehalase from an acidophilic archaeon *Thermoplasma volcanium*

○横山 紘平[1]、宮坂 祐希[1]、小薗 拓馬[1]、西河 淳[1]、酒匂 拓海[2]、坂口 政吉[2]、殿塚 隆史[1]([1]東京農工大学院農、[2]工学院大先進工生命化学)
○Kohei YOKOYAMA[1], Yuki MIYASAKA[1], Takuma KOZONO[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Takumi SAKOH[2], Masayoshi SAKAGUCHI[2], Takashi TONOZUKA[1] ([1]School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Department of Chemistry and Life Science, Kogakuin University)

【緒言】トレハラーゼは、グルコースがα, α-1, 1-グルコシド結合でつながった二糖トレハロースを加水分解する。トレハラーゼは、CAZy データベースにおいて GH37 および GH65 に分類されるものがほとんどであるが、GH15 に分類されるものが存在する。一方、GH15 に属しているほとんどの酵素は、グルコアミラーゼである。好酸性アーケア *Thermoplasma volcanium* の GH15 トレハラーゼ TVN1315 は、酸性の狭い範囲のみ活性を示す特徴的な酵素である。本研究では TVN1315 の立体構造を決定した。
【方法と結果】TVN1315 遺伝子を pET21a に組み込んだプラスミドにより形質転換した大腸菌を用い、酵素を発現させた。His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーで精製し、結晶化した。X 線回折は、高エネルギー加速器研究機構 BL-5A ビームラインで収集し、位相の決定は AlphaFold2/ColabFold で作製したモデルを用いた分子置換法により、2.8-Å分解能での立体構造を決定した。TVN1315 は、N 末端側の super-β-sandwich ドメインと C 末端側の$(\alpha/\alpha)_6$ barrel で構成される触媒ドメインを 2 つのα-helix がつないでいる構造であった。活性中心のポケットを他の GH15 と比較すると、サブサイト-1 を構成する残基のいくつかは保存されておらず、サブサイト+1 を構成する残基はほぼ全く異なっていた。

[Introduction] Trehalases hydrolyze trehalose that is composed of two glucose units linked by α,α-1,1-bond. Trehalases are mostly classified into families GH37 and GH65 in the CAZy database, but a few trehalases belong to GH15, while most of GH15 members are glucoamylases. The GH15 trehalase, TVN1315, from an acidophilic archaeon *Thermoplasma volcanium* shows activity at a narrow range of acidic pH. Here we determined the crystal structure of TVN1315.
[Methods and Results] The enzyme was expressed using *E. coli* transformed with plasmid carrying TVN1315 gene in pET21a. The enzyme was purified by with affinity chromatography using the His-tag, and crystallized. X-ray diffraction data was collected at BL-5A beamline at KEK PF. The structure was determined with the molecular replacement using a model produced by the AlphaFold2/ColabFold pipeline, and the structure at 2.8-Å resolution was obtained. TVN1315 is composed of N-terminal super-β-sandwich domain and C-terminal $(\alpha/\alpha)_6$ barrel catalytic domain, and the two domains are linked with a linker consisting of two α-helices. Comparison of the catalytic pockets of TVN1315 and GH15 glucoamylases shows that some residues at subsite -1 are not conserved, and residues at subsite +1 in TVN1315 are completely different from those in GH15 glucoamylases.

Thermoplasma volcanium, GH15, trehalase

講演番号：2C08-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

ミツバチ腸内細菌 *Frischella perrara* GH32 β-フルクトフラノシダーゼの基質選択性の改変
Alteration of substrate preference of GH32 β-fructofuranosidase from the honeybee gut bacterium *Frischella perrara*

○窪田 有紗[1]、川合 礼華[1]、松浦 明香[1]、小薗 拓馬[1]、西河 淳[1]、藤井 匡[2]、栃尾 巧[2]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大学院農、[2]物産フードサイエンス研究開発センター)
○ Arisa KUBOTA[1], Reika KAWAI[1], Akika MATSUURA[1], Takuma KOZONO[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Tadashi FUJII[2], Takumi TOCHIO[2], Takashi TONOZUKA[1] ([1]School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]R&D Center, B Food Science Co., Ltd.)

【緒言】フラクトオリゴ糖はプレバイオティクスとして知られ、主に三糖 1-ケストースおよび四糖ニストースから成っている。特に 1-ケストースは, 酪酸産生菌などの腸内有用菌を選択的に増殖させるなど、プレバイオティクス機能が特に高いことが報告されている。ミツバチの腸内細菌 *Frischella perrara* 由来の糖質加水分解酵素ファミリー（GH）32 に属するβ-フルクトフラノシダーゼ（以下 *Fper*FFase）は、四糖ニストースおよび二糖スクロースを分解する一方、三糖 1-ケストースに対する活性は低いという特徴的な性質を示す。本研究では、1-ケストースの効率生産を見据え、さらに 1-ケストースに対する活性を低下させた酵素を得ることを目的に基質結合部位に変異を導入した。
【方法と結果】*Fper*FFase の遺伝子を PCR で増幅し、pET44a を用いてプラスミドを構築し、さらに部位特異的変異導入により変異体を作製した。大腸菌 BL21(DE3)株を用いて Nus タグ融合タンパク質として発現させ、Ni-NTA アガロースにより精製し、スロンビン処理によってタグを切断後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製 *Fper*FFase 変異体を得た。60 mM の各糖を反応させ時間経過を見たところ、野生型 *Fper*FFase の 1-ケストース/ニストースに対する活性比は 49%であったのに対し、Asp298 と Ser299 の間にプロリン残基を挿入した変異体 298P299 の活性比は 18%であり、Trp297-Asp298-Ser299 からなるループの構造が *Fper*FFase の基質選択性と相関していることがわかった。

[Introduction] Fructooligosaccharide is known as a prebiotics, and mainly contains trisaccharide 1-kestose and tetrasaccharide nystose. 1-Kestose especially shows strong prebiotic effects, such as the promoting of specific growth of beneficial butyrate-producing bacteria. A β-fructofuranosidase belonging to glycoside hydrolase family 32 (GH32) from the honeybee gut bacterium *Frischella perrara* (*Fper*FFase) is an unique enzyme that hydrolyzes tetrasaccharide nystose and disaccharide sucrose, while the enzyme less efficiently hydrolyzes trisaccharide 1-kestose. To intend to establish the efficient production of 1-kestose, the substrate-binding site was mutated to obtain *Fper*FFase that has lower activity for 1-kestose.

[Methods and Results] *Fper*FFase was expressed in *Escherichia coli* and purified using Ni-NTA agarose and anion exchange column. The variant 298P299 was made by insertion of a proline residue between Asp298 and Ser299 using site-directed mutagenesis, and the activity was measured. The ratio of activities for 60 mM 1-kestose/nystose by wild-type *Fper*FFase was 49%, while that of 298P299 was 18%, indicating that the structure of the loop comprising Trp297-Asp298-Ser299 correlated with the substrate preference of *Fper*FFase.

Frischella perrara, GH32, 1-kestose

発表責任者：殿塚隆史（tonozuka@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2C08-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

単糖異性化酵素の平衡における有機ゲルマニウム Ge-132 の影響

Effect on organogermanium Ge-132 for equilibrium of　monosaccharide isomerases

○永田 洋也[1]、森本 兼司[2] ([1]香川大院農、[2]香川大国際希少糖)
○Hiroya NAGATA[1], KENJI MORIMOTO[2] ([1]Graduate School Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ.)

［目的］希少糖の主要な生産方法である異性化反応の平衡比は固有である。希少糖への転換率を向上させるために、有機ゲルマニウム Ge-132 が糖分子内の *cis*-ジオール構造と錯体を形成する性質を利用して、平衡比がどのように変化するかを調べた。本研究では、7 種の異性化酵素が触媒する平衡比に対する Ge-132 の影響について報告する。［方法・結果］Ge-132 の存在下で各種異性化酵素を単糖に作用させた。反応液の単糖の組成を HPLC で分析し、Ge-132 無添加と比較することで平衡比の変化を確認した。各種イソメラーゼが触媒するアルドース-ケトース間の異性化反応では、Ge-132 の添加により平衡比がケトースである D-フルクトース、D-アルロース、D-タガトース、D-キシルロース、D-リブロース、L-リブロースに偏った。アルドースと比較してケトースはフラノース型の存在比が多いことから、Ge-132 はフラノース型との親和性が高いことが示唆された。ケトース間の 3-エピ化反応では、Ge-132 の添加により D-アルロースや D-キシルロースに平衡比が偏ったが、L-ソルボース・L-タガトース間の平衡比はほぼ変化しなかったため、ケトースと Ge-132 との親和性に関しては規則性が明確にならなかった。本研究の一部は、文部科学省「地域イノベーション・エコシステム形成プログラム」の支援により行われた。

Rare sugar is mainly produced by enzymatic isomerization with specific equilibrium ratio. To improve conversion rate for rare sugar, Ge-132, which forms a complex with *cis*-diol of monosaccharide, was utilized. In this study, we report the effect of Ge-132 for equilibrium ratio of rare sugars. Aldose isomerases or ketose 3-epimerase were reacted to monosaccharides in the presence of Ge-132. The composition of monosaccharides was monitored by HPLC analysis.
The isomerization equilibrium between aldose and ketose with the addition of Ge-132 favored the formation of D-fructose, D-allulose, D-tagatose, D-xylulose, D-ribulose or L-ribulose, suggesting that Ge-132 has a higher affinity for ketoses than aldoses. In the epimerization between ketoses, Ge-132 favored the formation of D-allulose from D-fructose and D-xylulose from D-ribulose, however, the equilibrium ratio between L-sorbose and L-tagatose was not varied. The part of this work was funded by a Grant-in-Aid for Regional Innovation Ecosystem Formation Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

rare sugar producing enzyme, equilibrium, Ge-132

発表責任者：永田　洋也（s21g638@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2C08-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

ヒト腸内細菌 *Phocaeicola plebeius* のキシラナーゼの解析
Analysis of xylanase from human gut bacteria *Phocaeicola plebeius*

○辻 省吾[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Shogo TSUJI[1], Hidenori HAYASHI[1,2] ([1]Maebashi institute of technology Grad., [2]Maebashi institute of technology Univ.)

【目的】日本人の糞便より単離された *Phocaeicola plebeius* をキシランで培養し、活性染色により解析したところ複数のキシラナーゼが発現していた。またゲノム DNA 上には GH10 に属する 2 つの *xyn10A* と *xyn10B* 遺伝子が存在していた。本研究では Xyn10B の諸性質を明らかにし、*P. plebeius* の発現解析をタンパク質レベルで行った。【方法】*xyn10B* の塩基配列を大腸菌のコドンに最適化させ、人工遺伝子合成を行い、pET28a に連結後、大腸菌で発現させた。Xyn10B の精製を行い、諸性質の解析を行った。精製 Xyn10B を使用して抗 Xyn10B 抗体を作成し、各種炭素源を用いて *P. plebeius* の培養を行い、Xyn10B の発現をウエスタンブロッティング解析により行った。【結果および考察】Xyn10B は至適温度が 55℃、20℃から 55℃の範囲で 80%以上の熱安定性を示した。さらに至適 pH は 6.5 であった。酵素反応速度論的解析では、*V*max、*K*m、*k*cat、*k*cat/*K*m はそれぞれ 384.6、52.9、526.5、9.95 であった。当研究室で既に解析されている *P. plebeius* の Xyn10A と比較すると反応速度は高いものの基質に対する親和性が低いことが明らかになった。さらに各種キシランに対する基質特異性は Xyn10A と比較して 1/4 ほど低下していた。ウエスタンブロッティング解析では Xyn10B はキシラン培養時に発現が増加しており、これは RT-qRCR および活性染色で解析時と同様な結果であった。また、培養上清に対してウエスタンブロッティング解析を行ったところ、キシラン培養時に Xyn10B が検出され、菌体外へ分泌されていることが明らかとなった。

Pchocaeicola plebeius isolated from Japanese feces was cultured in xylan, analyzed by zymogram. As a result, some xylanases were expressed. In addition, two *xyn10A* and *xyn10B* genes belonging to GH family 10 were present in genomic DNA. In this study, we revealed the properties of Xyn10B and performed expression analysis on *P. plebeius* at the protein level. In addition, *P. plebeius* was cultured on Oat-spelt xylan, Beech wood xylan, xylose, glucose, and cellobiose. Western blotting was performed using anti Xyn10B antibody. Xyn10B was expressed when *P. plebeius* was cultured using xylan as a carbon source. The optimal temperature of Xyn10B was 55℃, and it showed thermal stability from 20 ℃ to 55℃. The optimum pH was 6.5. Enzyme kinetic analysis showed that *V*max, *K*m, *k*cat, and *k*cat/*K*m were 384.6, 52.9, 526.5, and 9.95. Western blotting analysis using culture supernatant suggested that Xyn10B was secreted outside the outer membrane.

Phocaeicola plebeius, xylanase, GH10

発表責任者：林秀謙（h-hayashi@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2C08-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

Microdochium nivale 由来 GH55 ラミナリナーゼによるラミナリン分解機構の解明

Laminarin degradation mechanism of GH55 laminarinase from *Microdochium nivale*

○太田 智也[1]、佐分利 亘[1]、今場 司朗[2]、ジュウェル リンダ[3]、シャン トム[4]、今井 亮三[2]、森 春英[1] ([1]北大院農、[2]農研機構、[3]カナダ農務省、[4]ゲルフ大)
○Tomoya OTA[1], Wataru SABURI[1], Shiro KOMBA[2], Linda JEWELL[3], Tom HSIANG[4], Ryozo IMAI[2], Haruhide MORI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]NARO, [3]Agriculture Canada, [4]Univ. of Guelph)

研究背景）糖質加水分解酵素ファミリー55 (GH55) は，エンド型とエキソ型の β-1,3-グルカナーゼからなる．*Microdochium nivale* 由来ラミナリナーゼ (MnLam55A) は，GH55 エンド型酵素に特徴的なアミノ酸配列をもつ．我々はこれまでに，本酵素がラミナリン (β1-6 結合による主鎖折れ曲がり構造や側鎖を有する β1-3 グルカン) にエンド型の反応様式を示すこと，カードラン (直鎖 β1-3 グルカン) には作用しないこと，およびラミナリオリゴ糖 (直鎖 β1-3 オリゴ糖，3–6 糖) にはエキソ様式で作用することを明らかにした．本研究では，GH55 エンド型酵素のラミナリンへの最初の作用点の解明を目的とし，MnLam55A によるラミナリン分解反応を詳細に解析した．

結果と考察）*Pichia pastoris* を宿主として組換え MnLam55A を生産，精製した．本酵素のラミナリン分解反応の初期では，グルコースおよびゲンチオビオースの生成量に比べ，還元糖の総生成量がはるかに多く，ラミナリン内部の結合への作用が示唆された．反応の進行に伴いグルコースおよびゲンチオオリゴ糖 (2–4 糖) が蓄積した．初期反応液の NMR 分析では，ラミナリン主鎖中の 1 位と 6 位がグルコシル化されたグルコシル基と，1 位と 3 位がグルコシル化されたグルコシル基の 1-H のシグナルの減少，ならびに 6 位がグルコシル化された還元末端グルコース残基の 1-H のシグナルの増加が確認された．以上より，本酵素はまずラミナリン主鎖の折れ曲がり構造 (β1-6 結合) の還元末端側にある β1-3 結合を加水分解し，その後，生成したオリゴ糖にエキソ型で作用すると考えられた．

Background) Glycoside hydrolase family 55 (GH55) consists of endo- and exo-β-1,3-glucanases. A laminarinase from *Microdochium nivale* (MnLam55A) is a typical GH55 endo-β-1,3-glucanase in its sequence, and hydrolyzes laminarin in endo-acting manner, while showing no activity on curdlan and exo-glucanase activity on laminarioligosaccharides (DP3–6). In this study, we analyzed the reaction of MnLam55A with laminarin in detail.

Results and discussion) Recombinant MnLam55A was produced in *Pichia pastoris* and purified. In the initial stage of laminarin hydrolysis, reducing ends were increased first, then glucose and gentiooligosaccharides (DP2–4) accumulated as the reaction progressed. NMR analysis of the initial reaction indicated the decrease of 1-H of 1,6- and 1,3-diglucosylated glucosyl residues and the increase of 1-H of 6-*O*-glucosylated reducing-end glucose residue. These results suggest that MnLam55A hydrolyzes the non-reducing end glucosidic bond of β1-3 linked chain even if its non-reducing end residue is 6-*O*-glucosylated in the middle of laminarin chain.

laminarinase, Microdochium nivale, Glycoside hydrolase family 55

発表責任者：太田智也（t_ota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C08-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KT13 のマンナナーゼ複合体の解析

Analysis of the mannanase complex of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KT13

○岡村 侑紀[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○ Yuki Okamura[1], Hidenori Hayashi[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology, [2]Maebashi institute of technology)

【目的】土壌より分離した *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KT13 はコンニャクグルコマンナンを分解可能な菌株であった。培養上清から様々なクロマトグラフィーを用いてマンナナーゼの精製を行ったところ、単一なタンパク質まで精製できず、マンナナーゼ複合体を形成している可能性が示唆された。マンナナーゼ複合体の形成の確認をするためにゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行い、分子量の決定とマンナナーゼ活性の測定を行った。【方法】コンニャクグルコマンナンを含む GS 培地で KT13 を嫌気培養し、培養上清を回収した。培養上清を限外ろ過により濃縮を行った後、HiPrep 16/60 Sephacryl S-400 HR を用いてゲルろ過を行った。マンナナーゼ活性画分は SDS-PAGE と活性染色により解析を行った。また、高分子に溶出した活性画分をさらに TSKgel SuperSW3000 より分子量測定を行った。【結果および考察】約 1.6 MDa 付近の溶出ピークにマンナナーゼ活性を確認したが、タンパク質量としては少量であった。その画分を SDS-PAGE と活性染色で解析したところ、複数のマンナナーゼ活性のあるタンパク質バンドを確認した。この画分はコンニャクグルコマンナンとローカストビーンガムで活性を確認することができた。回収した高分子のマンナナーゼ画分を充填剤が異なる TSKgel SuperSW3000 で分子量を測定したところ、約 1.3 MDa であった。以上のことから KT13 株は高分子の「マンナナーゼ複合体」を形成することが判明した。一方、主要なマンナナーゼ活性は分子量 33~225 kDa にかけて大きなピークとして確認し、こちらが KT13 株の主要なマンナナーゼ活性画分であった。

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KT13 which isolated from soil can degrade konjac glucomannan. KT13 may form mannanase complexes of high molecular weight which is 1 MDa or more. KT13 was cultured with konjac powder as a carbon source, and after collecting the culture supernatant, it was concentrated by ultrafiltration. The concentrated culture supernatant was purified by gel filtration chromatography (HiPrep 16/60 Sephacryl S-400 HR). Mannanase activity was detected at the peak with a molecular weight of about 1.6 MDa. On the other hand, the major mannanase activity were present over a wide range with a molecular weight of 33-225 kDa. When the peak of 1.3 MDa was analyzed by zymogram and SDS-PAGE, active bands of multiple mannanases were detected. In addtion, when the molecular weight of the peak of 1.6 MD was further analyzed by gel filtration chromatography (TSKgel Super SW3000) with a different filler, its molecular weight was about 1.3 MDa. Mannanase, which is a part of KT13, formed a mannanase complex.

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, β-mannanase, mannanase complex

発表責任者：林秀謙（h-hayashi@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2C08-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

糖転移能向上を目指した *Paenibacillus* sp. が生産するガラクトオリゴ糖高生産酵素の変異導入

Protein engineering of the galacto-oligosaccharides high-producing enzyme from *Paenibacillus* sp. to enhance transglycosylation

○尾髙 伶、佐野 涼子、馬場 将弘（合同酒精）
○Rei ODAKA, Ryoko SANO, Masahiro BABA (GODO SHUSEI)

ガラクトオリゴ糖（GOS）は、腸内のビフィズス菌を選択的に増殖させるプレバイオティクス効果を持つオリゴ糖の一種で、ラクトース分解酵素（β－ガラクトシダーゼ）の糖転移反応を利用して工業生産されている。*Paenibacillus* sp. S5390 株由来 GOS 高生産酵素 BGL8 は、既存酵素とは異なり、3'-GL を主要構造とする GOS を生成する特徴を有しており、高ラクトース濃度および高温下において効率的に GOS を生成する。本研究では、GOS 生成収率の向上を目的とし、タンパク質工学的手法による BGL8 の高機能化を試みた。

ランダムまたは部位特異的変異導入を用いたスクリーニングにより、野生型と比べて耐熱性を約 10℃向上させる変異点（N437H）、および高 GOS 転移活性を示す変異点（R77A、Y296F、T297A および F414L）を特定することに成功した。このうち、比活性を高度に維持していた変異点の組み合わせである N437H/T297A 二重変異体について転移能を評価した結果、野生型酵素と比較して 3 糖以上の GOS 生成量は 5%、転移 2 糖を含めた GOS 生成量は 8%向上した。二重変異体が生成する GOS の構造を HPAEC-PAD により解析したところ、アロラクトースや 6'-GL を始めとする β-1,6 結合のオリゴ糖が特異的に増加していることがわかった（特許取得済み）。

Galacto-oligosaccharides (GOS) are functional oligosaccharides that has a prebiotic effect that selectively grows bifidobacteria. The β-galactosidase has become industrially used in the synthesis of GOS. The high transglycosylation enzyme BGL8 from *Paenibacillus* sp. S5390, which produces 3'-GL as the main structure, efficiently produces GOS at high lactose concentrations and high temperatures. In this study, we attempted to improve the functionality of BGL8 by protein engineering for enhancing transglycosylation activity of the enzyme.

By screening using random or site-directed mutations, we obtained thermoresistant mutant (N437H) and high transglycosylation mutants (R77A, Y296F, T297A, and F414L). The N437H / T297A double mutant exhibited higher GOS production by 5% (>DP3) and by 8% (>DP2) than wild-type, respectively. Its structure was found that β-1,6-linked oligosaccharides were specifically increased.

Galacto-oligosaccharides, β-galactosidase, Protein engineering

発表責任者：馬場　将弘（m-baba@oenon.jp）

講演番号：2C08-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

好熱菌由来アセチルキシランエステラーゼの触媒反応と基質認識に関する機能解析

Functional analysis of catalytic reaction and substrate recognition of thermophilic acetylxylan esterase

○武田 悠杜[1]、佐々本 康平[2,3]、下澤 勇弥[2,3]、氷見山 幹基[3]、森芳 邦彦[4]、大本 貴士[4]、上垣 浩一[5]、西矢 芳昭[1,2]、中村 努[3]（[1]摂南大理工、[2]摂南大院理工、[3]産総研、[4]大阪産技研、[5]近大農）
○Yuto TAKEDA[1], Kohei SASAMOTO[2,3], Yuya SHIMOZAWA[2,3], Tomoki HIMIYAMA[3], Kunihiko MORIYOSHI[4], Takashi OHMOTO[4], Koichi UEGAKI[5], Yoshiaki NISHIYA[1,2], Tsutomu NAKAMURA[3] ([1]Sci. Eng. Setsunan Univ., [2]Grad. School. Sci. Eng. Setsunan Univ., [3]AIST, [4]ORIST, [5]Kindai Univ.)

酢酸セルロース（CA）はフィルターやメンブレンに利用される生分解性プラスチックで、水酸基のアセチル化に伴い熱可塑性を示す。しかし、CA のアセチル基は生分解を阻害する。*Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* 由来アセチルキシランエステラーゼ（TTE0866）は、高アセチル化度 CA の脱アセチル化を触媒するため、資源の再利用の観点から産業利用が期待される。我々は TTE0866 の結晶構造を決定し、活性部位付近の芳香族アミノ酸残基（W264）の特徴的な配向を明らかにした。そして W264 の役割を基質認識と基質結合部位形成の寄与と考察し、昨年度の本学会にて報告した。本研究では、TTE0866 のアラニンスキャンニングにより、各アミノ酸残基が酵素活性に与える影響を検討した。アラニン置換で活性が消失した残基のうち、D144 及び H289 は一般酸/塩基触媒残基として働き、D145、H195 及び H199 は金属イオンのキレート残基として働くと考えられた。一方、W264A は酵素活性が検出されたが、野生型と比較して 1/25 に低下した。この結果から W264 は脱アセチル化活性に必須ではないが重要な残基と考えられた。この他にも変異解析を進行中であり、その成果についても議論したい。

Cellulose acetate (CA) is a biodegradable plastic used for filters and membranes, CA exhibits thermoplasticity associated with the degree of acetylation in hydroxyl groups. However, the acetyl group of CA inhibits its own biodegradation. Acetylxylan esterase from *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* (TTE0866) catalyzes the deacetylation of highly degree of acetylated CA, and therefore is expected to be industrially used for resource reuse. We have determined a crystal structure of TTE0866 and revealed the unique conformation of an aromatic amino acid residue (W264) near the active site. It was suggested that W264 may play the roles of the substrate recognition and forming the substrate-binding site. These results were reported at last year's conference. In this study, we investigated the effects of amino acid residues in TTE0866 on enzyme activity by using the alanine scanning technique. Based on analysis of inactive mutants, it was considered that D144 and H289 act as general acid/ base catalyst residues, while D145, H195 and H199 act as metal-chelating residues. On the other hand, the activity of W264A was detected although it was decreased 1/25 of that of the wild type. This result suggests that W264 is not required but important for the deacetylation activity.

Carbohydrate esterase, Mutant analysis, Deacetylation

発表責任者：西矢　芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2C08-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

Clostridium cellulovorans が生産するマンナナーゼ A とセルロソーム骨格タンパク質 CbpC の相互作用解析

The analysis of interaction between Mannnanase A and scafolding protein CbpC from *Clostridium cellulovorans*

○柴田 奈緒美、三宅 英雄（三重大院生資）
○Naomi Shibata, Hideo Miyake (Grad. Sch. Bioresour. Mie Univ.)

【目的】*Clostridium cellulovorans* は、セルロソーム骨格タンパク質のコヘシンドメインとセルロソーム形成酵素のドックリンドメインが相互作用することでセルロソームと呼ばれる酵素複合体を形成する。これまでの研究で *C. cellulovorans* はコヘシンドメインやドックリンドメインの種類により結合力が変化する可能性が示唆された。本研究では、セルロソーム形成酵素であるマンナナーゼ A(ManA)とセルロソーム骨格タンパク質である CbpC に注目し、結合力の評価を行った。
【結果】*C. cellulovorans* の全ドックリンドメインのアミノ酸配列を調べたところ、特異的に保存されている領域（Ala, Ile）が存在することがわかった。しかしながら ManA では Ser, Ile となっていた。そこで、野生型である ManA, ManA の 45 番目の Ser を Ala に置換した ManA_S45A, CbpC を作製し、等温滴定型熱量計を用いて相互作用解析を行った。ManA と CbpC、ManA_S45A と CbpC の熱力学的パラメータを算出した結果、両者ともエントロピー駆動型の結合を示した。しかしながら、K_d の値は ManA と比べ ManA_S45A は約 100 倍低い結合力を示した。これらの結果から ManA のドックリンドメインの Ser45 は CbpC との相互作用において重要であることが分かった。

Clostridium cellulovorans forms an enzyme complex called “cellulosome” by the interaction of the cohesin domains of scafolding proteins and the dockrin domains of cellulosomal enzymes. Previous studies have suggested that *C. cellulovorans* has different binding affinities depending on the type of cohesin domain or dockrin domain. In this study, we focused on mannanase A (ManA), which is a cellulosomal enzyme, and CbpC, which is a cellulosome scafolding protein, and evaluated the binding affinity. As a result of investigating the amino acid sequences of all the dockrin domains of *C. cellulovorans*, it was found that there are specifically conserved regions (Ala, Ile), but that region of ManA was Ser, Ile. Therefore, we prepared ManA, a mutant of ManA in which the 45th Ser was replaced with Ala (ManA_S45A), and CbpC. These interactions were analyzed by using an isothermal titration calorimetry. ManA/CbpC and ManA_S45A/CbpC showed entropy-driven binding. However, the K_d value of ManA_S45A/CbpC was about 100 times lower than that of ManA/CbpC. From these results, it was found that Ser45 in the dockrin domain of ManA is important for the interaction with CbpC.

cellulosome, Clostridium cellulovorans, mannanase

発表責任者：三宅 英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2C08-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム C

細菌由来推定 GH2 β-ガラクトシダーゼの牛乳中乳糖の分解特性の解析
Property of lactose degradation in milk of putative bacterial GH2 ß-galactosidases
○奥野 剛基[1]、佐分利 亘[1]、尾髙 伶[2]、馬場 将弘[2]、森 春英[1] ([1]北大院農、[2]合同酒精)
○Koki OKUNO[1], Wataru SABURI[1], Rei ODAKA[2], Masahiro BABA[2], Haruhide MORI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]GODO SHUSEI)

【背景・目的】β-ガラクトシダーゼ(BGal)はラクトース(lac)などの基質の非還元末端 β-ガラクトシド結合を加水分解するアノマー保持型酵素であり，乳中 lac の分解酵素として産業利用されている．乳中 lac の分解は，乳糖不耐症状向け乳製品等幅広い用途があり，更なる BGal の開発が望まれる．本研究では, 細菌由来推定 GH2 BGal について大腸菌組換え酵素を用いて乳中 lac の分解特性を解析した．
【結果・考察】細菌由来 28 酵素から牛乳中 lac の分解性に基づき 5 種を選抜した．一定の初速度となる酵素濃度で，乳中 lac の分解反応を行った．実験条件下，*B. longum* 由来 BL1453 が早期にほぼ完全分解に達した一方, 同菌由来 BL0698 は分解率 92%に留まった. これら 2 酵素の反応特性を解析した．lac 分解速度は，水溶液中では牛乳中より顕著に低いが，牛乳と同程度の塩数種の添加により乳中と同程度にまで上昇した．基質 *p*NP β-Gal の反応では，両酵素はともに Glc により混合阻害を，Gal により競合阻害を示したが，阻害定数は両者間に大きな差は無く，また Glc に対して 1.4 M 以上，Gal に対して 102–105 mM と高値であった．従って乳中 lac の分解に関して，2 酵素間の分解の差は Glc と Gal の阻害には依らず，また生成物阻害の影響は限定的であると考えられた．

β-Galactosidase (BGal) hydrolyzes β-galactosidic bond of substrates. It is used in industry particularly for degradation of lactose in milk for production of lactose-free milk and other dairy products. In this study, we analyzed milk lactose-degradation property of some recombinant putative GH2 BGals derived from bacteria.

Twenty-eight bacterial putative BGals were produced in *E. coli*. Five BGals, which showed high lactose degradation in milk, were purified and analyzed. The degradation of lactose in milk reached almost 100% with a *B. longum* BGal BL1453, but 92% with another *B. longum* BGal BL0698 under the experimental conditions, even with enzyme concentrations giving the same initial reaction velocity. Their lactose-degrading velocities were much lower in lactose solution than in milk, but increased up to those in milk, with some salts as in milk. Inhibitions of the two BGals with Glc and Gal were very similar in reactions with *p*NP β-Gal as substrate. For both the BGals, Glc was a mixed-type inhibitor with K_i and K_i' of 1.4 M or higher, and Gal was a competitive-type inhibitor with K_i of 102–105 mM. Therefore, the difference of the lactose degradation in milk was not due to the inhibition with Glc and Gal. In addition, the effect of the product inhibition on lactose degradation in milk is limited.

β-galactosidase, lactose, Glycoside hydrolase family 2

発表責任者：奥野　剛基（k.okuno@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2D02-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

安定的な国際標準試験法の構築に向けた実海域における生分解性プラスチック付着菌叢の季節変動の調査

Investigation of seasonal variation of biodegradable plastic adherent microbial community in real sea for development of stable international standard test method

○三浦 隆匡[1]、島村 麻美子[1]、臼井 絵里香[1]、森 美穂子[1]、内野 佳仁[1]、山口 薫[1]、笠石 里江子[1]、森 知里[1]、寺尾 拓馬[1]、日高 皓平[1]、齋藤 祐介[2]、山田 美和[2]、加藤 太一郎[3]、吉田 真明[4]、植木 龍也[5]、田川 訓史[5]、木下 浩[1]、髙橋 幹男[1]、紙野 圭[1]([1]製品評価技術基盤機構、[2]岩手大、[3]鹿児島大、[4]島根大、[5]広島大)

○Takamasa MIURA[1], Mamiko Shimamura[1], Erika Usui[1], Mihoko Mori[1], Yoshihito Uchino[1], Kaoru Yamaguchi[1], Rieko Kasaishi[1], Chisato Mori[1], Takuma Terao[1], Kohei Hidaka[1], Yusuke Saito[2], Miwa Yamada[2], Dai-ichiro Kato[3], Masa-aki Yoshida[4], Tatsuya Ueki[5], Kunifumi Tagawa[5], Hiroshi Kinoshita[1], Mikio Takahashi[1], Kei Kamino[1] ([1]NITE/NBRC, [2]Iwate Univ., [3]Kagoshima Univ., [4]Shimane Univ., [5]Hiroshima Univ.)

近年、海洋に流出したプラスチックゴミやそこから生じるマイクロプラスチックが、海洋生物、ひいては地球生物の生存を脅かしており、海洋プラスチックゴミの低減は急務である。これに対し、開発された海洋生分解性プラスチックの生分解性を評価する試験法の発行は進んでいるものの、既に発行されている ISO 18830、19679 等は再現性に乏しく、試験期間が最長 2 年など複数の課題があるため、試験機関への導入が進んでおらず新素材導入への障壁になっている。そこで我々は、実海域における生分解メカニズムに裏付けされた信頼性の高い国際標準評価法を構築するため、海水や実海域に浸漬したプラスチックフィルムに付着する微生物の菌叢データや分解菌等の収集を行っている。
本研究では、実海域における生分解性プラスチックに付着する微生物の挙動を調査するため、2021 年の冬期と夏期に、岩手、鹿児島、島根、広島の 4 海域にプラスチックフィルム（PHBH、PBSA、PCL 等）を最長 60 日間浸漬し、フィルムの崩壊度測定や付着菌叢の解析を行った。その結果、海水中の菌叢は季節変動や地域差があることが確認されたが、どちらの季節においても、崩壊度と微生物量は正の相関関係、崩壊度と菌叢の多様度指数は負の相関関係にあることが確認された。このことから、崩壊度が高いフィルムの付着菌叢では集積が起きていることが示唆された。一方で、その付着菌叢は、β 多様性解析によりプラスチックの種類や海域、季節に関わらず比較的類似していることが示され、ある一定の系統群に偏っていることが示唆された。このことは、実海域での生分解性プラスチックの生分解メカニズムの解明並びに安定的な試験法の構築に非常に重要な知見となると考えている。
本研究は、NEDO プロジェクト「海洋生分解性プラスチックの社会実装に向けた技術開発事業／海洋生分解性に係る評価手法の確立（2020 年度～2022 年度）」において実施したものである。

In this study, in order to investigate the behavior of microorganisms attached to biodegradable plastic in real seawater, we immersed biodegradable plastic film in four sea areas (Iwate, Kagoshima, Shimane and Hiroshima) during the winter and summer of 2021, and analyzed the degree of film degradation and attached microbial community. As a result, it was confirmed that there were seasonal and regional differences in the microbial community in seawater. In both seasons, the degree of film degradation was positively correlated with the 16S rRNA gene copy number, and negatively correlated with the alpha-diversity of the microbial community. On the other hand, beta-diversity analysis suggested that the adherent microbial community of the film with high degradation was biased toward a certain phylogenetic group regardless of plastic type, sea area, and season.

Biodegradable plastics, Marine microorganisms, Plastisphere

発表責任者：三浦　隆匡（miura-takamasa@nite.go.jp）

講演番号：2D02-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

実海域に浸漬した生分解性プラスチックナイロン 4 における付着菌叢の解析
Analysis of microbial community of biodegradable plastic, nylon 4, plastisphere in a marine environment
○齋藤 祐介[1]、三浦 隆匡[2]、山口 薫[2]、紙野 圭[2]、山田 美和[1] ([1]岩大農、[2]NITE・NBRC)
○Yusuke Saito[1], Takamasa Miura[2], Kaoru Yamaguchi[2], Kei Kamino[2], Miwa Yamada[1] ([1]Iwate Univ., [2]NITE・NBRC)

[目的]海洋環境においてプラスチックごみの蓄積が引き起こす諸問題に対する解決策のひとつとして、生分解性プラスチックの利用が注目を集めている。また、自然環境中に長期間放置されたプラスチック表面では「plastisphere」と呼ばれる周囲の環境とは異なる微生物叢を形成することが知られている。しかし、海洋での生分解が確認されている生分解性プラスチックであるナイロン 4 の plastisphere を調査した報告はない。そこで、本研究では実海域に浸漬したナイロン 4 付着菌叢の解析と分解菌の単離を行い、海洋環境におけるナイロン 4 の plastisphere の解明を試みた。
[方法・結果]岩手県山田湾にて、ナイロン 4 の浸漬試験を行い、10、20、60 日目に回収された海水とナイロン 4 表面からゲノム DNA を抽出して MiSeq を用いたメタ 16S 解析に供した。その結果、周囲の海水とナイロン 4 表面では菌叢が異なっており、plastisphere を形成していることが示唆された。特に 10 日目に回収したナイロン 4 表面の菌叢では、既知のナイロン 4 分解菌が属する *Alteromonadales* 目細菌の割合が顕著に高かった。本目に属すると推定される細菌は、20、60 日後に回収したナイロン 4 表面からも検出されたが、その割合は徐々に低下しており、ナイロン 4 表面の菌叢が時間経過とともに変化していることが示唆された。一方で、ナイロン 4 表面からの分解菌の選抜は、ナイロン 4 含有寒天培地におけるコロニー周囲のクリアゾーン形成の有無によって行った。選抜された分解菌は、いずれも *Pseudoalteromonas* 属細菌であると推定された。本属の細菌はナイロン 4 分解菌として初の報告であるが、既知のナイロン 4 分解菌と同様に *Alteromonadales* 目に属する。菌叢解析の結果を考慮すると、今回試験した海洋環境では、*Pseudoalteromonas* 属細菌がナイロン 4 の生分解に主として寄与していることが示唆された。本研究は、NEDO プロジェクト「海洋生分解性プラスチックの社会実装に向けた技術開発事業／海洋生分解性に係る評価手法の確立 (2020~2022 年度)」において実施した。
We first investigated microbial community of biodegradable plastic, nylon 4, plastisphere in a marine environment. Genomic DNAs from seawater and nylon4 surface were analyzed by 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis using MiSeq. The result showed a difference of microbial community composition between seawater and nylon 4 surface. Furthermore, we isolated nylon 4-degradation microorganisms belonging to *Pseudoalteromonas* species from nylon 4 surface. *Pseudoalteromonas* sp. is classified into the order *Alteromonadales* which was found in the microbial community of nylon 4 surface, indicating that *Pseudoalteromonas* sp. bacteria mainly contribute to nylon 4 degradation in the marine environment.

bioplastic, microbiome, biodegradation

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2D02-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

光刺激応答性バイオナイロンの海洋生分解性評価および分解性微生物の特定
Biodegradation of light-response bionylon by marine microorganisms
○若井 暁[1,2]、塚谷 京[1]、西風 隆司[3]、山崎 雄三[3]、磯部 紀之[4]、野牧 秀隆[1]、Asif Ali Mohammad[5]、金子 達雄[5] ([1]海洋研・超先鋭、[2]JST・さきがけ、[3]島津製作所、[4]海洋研・海洋機能、[5]北陸先端大・環境エネ)
○Satoshi WAKAI[1,2], Misato TSUKATANI[1], Takashi NISHIKAZE[3], Yuzo YAMAZAKI[3], Noriyuki ISOBE[4], Hidetaka NOMAKI[1], Mohammad Asif Ali[5], Tatsuo KANEKO[5] ([1]X-star, JAMSTEC, [2]PRESTO, JST, [3]Shimadzu Corp., [4]MRU, JAMSTEC, [5]Grad. Sch. Adv. Sci. Technol., JAIST)

近年、海洋のプラごみ問題が大きく取り上げられ、社会的に海洋分解性材料の需要が高まりつつある。さらに、使用中は分解が起こりにくく環境中に流失してしまった場合に分解のスイッチが入る刺激応答分解性材料の開発が進められている。本研究では、開発が進められている光刺激応答性バイオナイロンの海洋生分解性について、微生物分解の証拠をつかむと共に分解性微生物について明らかにしたので報告する。

光刺激応答性バイオナイロンは、水の存在下で紫外線を浴びることで親水化が起こり、水溶化する。まず、この水溶化状態を MALDI 質量分析により明らかにした。次に、水溶化バイオナイロンを用いた BOD 試験により、添加した水溶化バイオナイロン依存的に BOD 値が上昇し、生物分解が起こっていることを明らかにした。この BOD 試験後の溶液を再び質量分析に供した結果、水溶化バイオナイロンのピークは消失していた。さらに、微生物群集構造解析を実施することで、*Pseudohongiella* 属細菌が微生物群集構造の 60-70%にまで上昇をしていることを明らかにした。この BOD 試験後の溶液を水溶化バイオナイロン添加人工海水プレートに播種することで、バイオナイロンを唯一の炭素源として生育する微生物コロニーの獲得にも成功した。本菌によるナイロン系材料の分解については報告がなく、海洋環境におけるバイオナイロンオリゴマーの分解菌として期待される。

海洋分解性材料は海洋環境中に長期間残留しないことが大事であるが、部分的な分解後に環境中に残留して生物毒性を示すこともあってはならない。本光刺激応答性バイオナイロンは、特定の中間代謝産物を蓄積せずに速やかに分解されており、海洋分解性材料として期待できる。

Marine-biodegradable materials have attracted attention as a useful material for constructing a sustainable society. In this work, we evaluated the biodegradability of light-response bionylon. BOD experiment using UV-irradiated soluble bionylon showed bionylon-depending respiration by marine microorganisms. After the BOD experiment, degradation of bionylon oligomers was demonstrated by MALDI-mass spectrometry, and enrichment of *Pseudohongiella* sp. was observed by microbial community analysis. Furthermore, we successfully acquired bionylon-consuming microbial colonies by cultivation using artificial seawater plate supplied with bionylon as a sole energy and carbon sources. Conclusively, the light-response bionylon can be expected as a useful marine biodegradable material.

biodegradation, marine debris, nylon

発表責任者：若井暁（wakais@jamstec.go.jp）

講演番号：2D02-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

麹菌 *Aspergillus oryzae* による PET 分解酵素の異種発現

Heterologous expression of PET-degrading enzymes in *Aspergillus oryzae*

○戸所 健彦[1]、伊出 健太郎[1]、南 はつね[2]、河野 恵美[2]、小高 敦史[1]、吉田 昭介[2]、石田 博樹[1] ([1]月桂冠・総研、[2]奈良先端大・バイオ)
○Takehiko Todokoro[1], Kentaro Ide[1], Hatsune Minami[2], Emi Kawano[2], Atsushi Kotaka[1], Shosuke Yoshida[2], Hiroki Ishida[1] ([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【背景・目的】Poly(ethylene terephthalate)（PET）はペットボトルや衣料品の原料として世界中で使用されている合成樹脂である。PET は石油を原料とし、その廃棄物が環境汚染を引き起こすことから、効率的なリサイクルによる環境負荷低減が望まれる。近年、PET を分解資化する細菌 *Ideonella sakaiensis* が単離された(1)。*I. sakaiensis* は PETase により PET を mono (2-hydroxyethyl) telephthalate に分解し、続いて MHETase により terephthalate と ethylene glycol に分解する。PET の酵素分解は PET のリサイクルや有用化合物への変換につながるため、その研究の進展が期待されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒・味噌など発酵食品の製造に用いられてきた糸状菌であり、高い酵素生産能力を生かして酵素の工業生産や、異種タンパク質の発現ホストにも用いられる。本研究では *A. oryzae* をホストに PETase, MHETase を異種発現させ、PET 分解への利用の可能性を検討した。
【方法・結果】*I. sakaiensis* 由来の PETase, MHETase をコドン改変し、N 末端に菌体外排出シグナルを結合し、*sodM* プロモーター下で恒常発現するベクターを作成した。続いて *A. oryzae* OSI1013 *leu*-株にロイシン要求性マーカーとともに導入した。GPY 培地で培養し上清および菌体内における PETase, MHETase の存在を Western blot 解析したが、目的タンパク質は確認できなかった。mRNA をシーケンスの結果、RNA スプライシングと終止コドン手前でのポリ A 付加がみられた。スプライシングサイトおよびポリ A シグナルの除去とコドン再設計した麹菌形質転換体を作成した結果、PETase, MHETase の菌体外分泌が確認された。現在、培養液における酵素の活性測定を実施しており、その結果も合わせて報告する。(1) Yoshida S. *et al.*, *Science*, 351, 1196–1199 (2016).
【Background】Poly(ethylene terephthalate)（PET）is a plastic polymer used in food containers and clothing. As PET contributes to environmental pollution, efficient recycle system is investigated. Recently, PET-degrading bacteria *Ideonella sakaiensis* and its corresponding enzymes (PETase and MHETase) were found. *Aspergillus oryzae* is a filamentous fungus used for the production of Japanese fermentation foods such as sake and miso. *A. oryzae* shows high protein productivity and used for industrial enzyme production and heterologous protein production. In this study, we assessed the ability of *A. oryzae* as the host for PETase and MHETase production.
【Method and Result】Expression vector was constructed with *sodM* promoter, N-terminus signal peptide for extracellular secretion, and codon optimized sequence of PETase or MHETase. *A. oryzae* OSI1013 *leu*- was transformed using leucine marker. The culture supernatant was analyzed by Western blot analysis, but neither protein was detected. mRNA sequencing revealed several RNA splicing and incorrect polyadenylation. Finally, codon was re-optimized, which lead to the expression of the proteins.

Poly(ethylene terephthalate) (PET), *Aspergillus oryzae*, heterologous expression

発表責任者：戸所 健彦（todokoro@gekkeikan.co.jp）

講演番号：2D02-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

LC/MS/MS を用いた生分解性プラスチック分解物分析による海洋微生物のプラスチック分解様式の解析

Investigation of plastic degradation patterns of marine microorganisms with LC/MS/MS analysis for detecting monomers and oligomers of biodegradable plastics

○寺尾 拓馬、森 美穂子、島村 麻美子、内野 佳仁、山口 薫、三浦 隆匡、日高 皓平、臼井 絵里香、笠石 里江子、森 知里、木下 浩、髙橋 幹男、紙野 圭（NITE・NBRC）
○ Takuma TERAO, Mihoko MORI, Mamiko SHIMAMURA, Yoshihito UCHINO, Kaoru YAMAGUCHI, Takamasa MIURA, Kohei HIDAKA, Erika USUI, Rieko KASAISHI, Chisato MORI, Hiroshi KINOSHITA, Mikio TAKAHASHI, Kei KAMINO (NBRC, NITE)

【背景と目的】近年、海洋流出したプラスチックごみによる環境汚染が世界中で問題視されており、生分解性プラスチックへの期待が高まっている。生分解性プラスチックは様々な種類が開発されているが、いずれも海洋環境での生分解メカニズムに関する知見は十分ではなく、新規素材や生分解試験法を開発する上での律速要因となっている。そこで我々は、生分解性プラスチックの分解メカニズムの解明を目的に、機器分析により海洋微生物のプラスチック分解能の判定と分解様式の解析を行った。
【方法】生分解性プラスチック PBSA [poly(butylene succinate-*co*-adipate)]、PCL [poly(ε-caprolactone)]、PHBH [poly((*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-(*R*)-3-hydroxyhexanoate)]のモノマーからオリゴマーまでを一斉分析可能な LC/MS/MS 評価系を構築した。実海域に浸漬したプラスチックから海洋微生物を単離し、PBSA、PCL、PHBH それぞれのフィルムとともに N/P 源を添加した人工海水をもとに試験管で培養した。適宜サンプリングした培養液を LC/MS/MS で分析し、分解物の有無により分解能を判定するとともに、培養期間中の分解物の組成・割合の変遷を調べることで各分解菌の分解様式を推定した。
【結果と展望】複数の微生物の培養液中に PBSA、PCL、PHBH の分解生成物を認めた。LC/MS/MS プロファイルから、分解がモノマーまで進行するもの、オリゴマーで止まるものなど微生物種によって様々であり、またその組成や量比は経時的に変化していた。本手法はプラスチック分解菌の評価と分解様式の解析に有効であると考えられ、今後 LC/MS/MS 解析データを蓄積するとともに、生分解能を有する海洋微生物の分解酵素の解析を進める。
【謝辞】本研究は、NEDO プロジェクト「海洋生分解性プラスチックの社会実装に向けた技術開発事業／海洋生分解性に係る評価手法の確立」において実施したものである。

We developed LC/MS/MS methods for detecting monomers and oligomers of three biodegradable plastics, PBSA, PCL, and PHBH. In this study, we investigated the degradation patterns of three plastics cultured with marine microorganisms isolated from plastics immersed in the sea areas. The microorganisms were cultured with each plastic film in artificial seawater supplemented with N/P sources, then the culture was analyzed by LC/MS/MS. According to LC/MS/MS profiles, several microorganisms degraded those plastics, and the degradation patterns were diverse among different species. It was also confirmed that the ratio of each degraded product changed gradually depending on the culture period. From these results, our methods were useful for investigating plastics degradation patterns of marine microorganisms.

biodegradable plastic, marine microorganism, LC/MS/MS

発表責任者：寺尾　拓馬（terao-takuma@nite.go.jp）

講演番号：2D02-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

ミルワーム腸内細菌によるプラスチック分解

Plastics biodegradation by gut microflora of mealworm

○増田 映旗[1,2]、鈴木 研志[3,4]、三條場 千寿[3]、後藤 康之[3]、野尻 秀昭[4,5]（[1]城北高等学校、[2]東大 GSC、[3]東大院・農生科、[4]東大・CRIIM、[5]東大院 農生科・アグテック）
○ Eiki MASUDA[1,2], Kenshi SUZUKI[3,4], Chizu SANJYOUBA[3], Yasuyuki GOTO[3], Hideaki NOJIRI[4,5] ([1]Johoku High School, [2]UTokyoGSC, [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [4]CRIIM, UTokyo, [5]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo)

本研究では主要プラスチックごみである polyethylene（PE）、polystyrene（PS）および polypropylene（PP）を食べる *Tenebrio molitor*（ミルワーム）の腸内細菌叢を解析し分解菌および関連遺伝子を特定することを目的とした。一般飼料である Bran あるいは PE、PS および PP を与えてミルワームを飼育したところ、Bran を与えたミルワームは成長し成虫まで変態するが、プラスチックを与えたミルワームは全く成長せず殆ど変態もしないことが明らかとなった。一方で、飼料を与えないミルワームは 1 か月で死亡率が 30%を超えるにも関わらず、本研究で飼育したミルワームは 4 か月以上生存することが明らかとなった。従って、プラスチックをエネルギー源として生命維持していることが考えられたことから、プラスチック分解に関与する微生物が生息していることが示唆された。そこで、飼育 1 週間後および 1 か月後に 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的としたアンプリコンシーケンス解析を実施した。その結果、Bran を与えたミルワームでは *Firmicutes* が優占化した一方で、プラスチックを与えたミルワームでは *Tenericutes* が 50%以上を占めることが明らかとなった。特に PP を与えたミルワームでは *Tenericutes* が 97%を占め、属レベルでは *Spiroplasma* が優占化していた。これまでに報告されているプラスチック分解菌は *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Cyanobacteria* および *Actinobacteria* に属しており、*Spiroplasma* 属細菌による分解報告はない。一方で、PP を与えたミルワーム腸内に生息することもわかっていることから、本研究で飼育したミルワームでは *Spiroplasma* 属細菌がプラスチック分解を担っていたことが推察された。本研究で使用したプラスチックには窒素源が含まれない。そのため、ミルワームが生命維持するためには腸内細菌による窒素固定が必要不可欠である。そこで、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく予測メタゲノム解析の結果、窒素固定に関係する遺伝子が予測された。

プラスチックを与えたミルワームの腸管内容物を接種源とし各プラスチックを入れた無機塩培地で培養したところ、PE および PP を入れた培養物で微生物の増殖が確認され、プラスチック表面に付着していることが確認された。現在、分解菌の単離およびメタゲノム解析を実施し、分解菌および分解遺伝子の特定を進めている。

Polyethylene (PE), polystyrene (PS) and polypropylene (PP) are major plastic wastes worldwide. Since it has been revealed that the gut microflora of *Tenebrio molitor* (mealworm) can degrade these plastics, mealworm was cultured with bran, PE, PS or PP to identify plastic-degrading bacteria and related genes. Although *Firmicutes* was dominant in bran-fed mealworms, *Tenericutes* was predominated in plastics-fed individuals with more than 50% of abundance. Interestingly, *Spiroplasma* represented the totality of *Tenericutes*, suggesting that *Spiroplasma* contributes to plastic degradation. To isolate plastic-degrading bacteria, gut contents were incubated in inorganic medium with the plastics. Microscopy observation indicated that cells attached to the plastic surface, suggesting that plastic-degrading bacteria grew using plastic as source of nutrients. Isolation and identification of plastic-degrading bacteria is ongoing.

plastic biodegradation, Mealworm, Spiroplasma

発表責任者：野尻　秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D02-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

脂肪族ポリエステルの生分解性の迅速評価法に関する研究

Study on a rapid evaluation method of biodegradability of aliphatic polyester

○高屋 朋彰、江田 脩真、田谷 明香、西井 圭（小山高専・物質）
○Tomoaki KOUYA, Syuma EDA, Haruka TAYA, Kei NISHII (NIT. Oyama Col.)

【背景・目的】　本研究では，環境中へのプラスチック廃棄物の放出・蓄積量を低減させるため，微生物を用いた脂肪族ポリエステルの生分解性の迅速評価法について検討を行った．
【方法】　4 種類の脂肪族ポリエステルを溶媒に溶解し，浸漬法によりガラスろ紙へのコーティングを行った．溶媒を乾燥させた後，ガラスろ紙の重量増加率を測定した．さらに， SEM を用いて表面の観察を行った．分解性評価は，無機塩のみを含む合成寒天培地上に唯一の炭素源として脂肪族ポリエステルをコーティングしたガラスろ紙を設置し，指標菌（ONCT 10002 株（*Streptomyces* sp.））を播種して 30℃で好気培養した後，SEM 観察，および GPC を用いた分子量分布の変化を評価した．
【結果】PBSA，PCL，PLLA，PHB のすべてが，コーティング後のガラスろ紙は多孔質構造を維持したまま，平均重量が 6.7～10.6%増加した．分解性評価により，指標菌は PBSA や PCL をコーティングしたガラスろ紙上で増殖することが明らかとなった．さらに GPC の結果から，PBSA については培養 4 週間，PCL については培養 2 週間でほぼ不検出となり，これらのポリマーは ONCT 10002 株によって低分子化ならびに生分解されていることが示唆された．

The purpose of this study was to build a new carbon recycling system which can reduce environmental burden by using microorganisms that have a potential for biodegradation of generic polymers.　In this study, we have developed a rapid evaluation method for aliphatic polyester biodegradation.

Polycaprolactone (PCL), polybutylene succinate-co-adipate (PBSA), poly L-lactic acid (PLLA), and polyhydroxy　butyrate (PHB) were used as aliphatic polyesters. *Streptomyces* sp. ONCT 10002 strain, isolated in our laboratory was used as a indicator strain. The coating membrane was prepared by dipping a glass filter membrane in each polymer solution.　Biodegradability evaluation was performed using the polymer-coating membrane placed on the synthetic agar medium (W medium).　The biodegradability of these polymers was evaluated by scanning electron microscopic observation (JEOL JSM-7800F, Japan) and gel permeation chromatography (GPC) measurement of molecular weight distribution.

Biodegradability evaluation revealed that the indicator bacteria grew on PBSA or PCL coated glass filter membrane.　GPC analysis showed that PBSA and PCL were biodegraded by 4 weeks or 2 weeks, respectively.

polycaprolactone, polybutylene succinate-co-adipate, *Streptomyces*

講演番号：2D02-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

大気及び土壌中の酸化亜鉛ナノ粒子が引き起こす菌叢変化と食物連鎖内の毒性の解析

Analysis of changes in bacterial flora and toxicity in the food chain induced by zinc oxide nanoparticles in air and soil

○正田 幸太郎[1]、倉橋 健介[2]、徳本 勇人[1] ([1]阪府大院理、[2]阪府大高専)
○Kotaro MASADA[1], Kensuke Kurahashi[2], Hayato TOKUMOTO[1] ([1]Osaka Prefecture University, [2]Osaka Prefecture University College of Technology)

近年、新たな物理的・化学的性質を持った新素材として金属ナノ粒子が市販化され、使用量が年々増加している。一方で、使用後のナノ粒子は環境中に放散され、生態系に与える影響が懸念されている。水域生態系では、藻類（*Synechocystis* sp.）に対し酸化亜鉛ナノ粒子（ZnO NP）が毒性を発現することがわかっている。しかし、植物を取り巻く生態系に対し、ZnO NP の毒性がどのように発現するかは不明な点が多い。そこで、本研究では微生物と線虫を用いて、食物連鎖内における ZnO NP の毒性を網羅的に解析することを目的とした。まず、植物の葉面に浮遊ナノ粒子が付着すると考え、葉面微生物への影響を評価した。同様に土壌微生物への影響も評価した。その結果、ZnO NP を曝露すると、葉面、土壌微生物ともに増殖が抑制されることがわかった。ここで、食物連鎖内における影響を解析するため、ZnO NP を含んだ大腸菌（*Escherichia coli*）を調製し、線虫（*Caenorhabditis elegans*）に給餌した。その結果、線虫の増殖が抑制され、線虫体内に ZnO NP が蓄積する可能性が示唆された。以上より、大気及び土壌に放散された ZnO NP により、葉面、土壌ともに菌数が減少し、菌叢が変化することが推察される。また、ZnO NP は細菌を介して、生態系内に滞留する可能性が示唆された。

In recent years, metal nanoparticles have become commercially available as new materials with new physical and chemical properties. On the other hand, used nanoparticles are released into the environment, and there are concerns about their impact on ecosystems. It remains unclear how the toxicity of Zinc oxide nanoparticles (ZnO NP) affects the ecosystems surrounding plants. In this study, we aimed to comprehensively analyze the toxicity of ZnO NP in the food chain using microorganisms and nematodes. First, we evaluated the effects on foliar microorganisms, considering that floating nanoparticles adhere to the leaf surface of plants. Similarly, the effects on soil microbes were also evaluated. The results showed that the growth of both foliar and soil microorganisms was inhibited by exposure to ZnO NP. Here, to analyze the effect in the food chain, *E. coli* (*Escherichia coli*) containing ZnO NP was made and fed to nematodes (*Caenorhabditis elegans*). As a result, the growth of the nematode was inhibited. These results indicate that ZnO NPs released into the air and soil may reduce the number of bacteria and change the bacterial flora in both foliage and soil. It was also suggested that ZnO NP could be retained in the ecosystem.

nanoparticle, bacterial flora, nematode

講演番号：2D02-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

活性酸素種を指標に用いた線虫の金属耐性機構の網羅的解析

Comprehensive analysis of metal resistance mechanism of nematodes using reactive oxygen species as an index

○遠藤 悠衣[1]、倉橋 健介[2]、徳本 勇人[1] ([1]大阪府立大学院、[2]大阪府立大学工業高等専門学校)
○Yui ENDO[1], Kensuke KURAHASHI[2], Hayato TOKUMOTO[1] ([1]Osaka Prefecture University, [2]Osaka Prefecture University College of Technology)

日本では､約 1 万件の金属汚染土壌の除染が滞っており､対象土壌の優先順位の決定が必要とされる。金属汚染土壌では、金属吸着した細菌を捕食する線虫の遊動性により、金属の移動による汚染土壌の拡大も起こりうる。そこで、線虫の強弱の異なる金属耐性に依存して、非汚染土壌への金属の拡散のしやすさに違いがあると考え、優先的に除染を要する土壌の探知により除染を進展できるのではないかと着想した。線虫の金属耐性機構とは、金属や金属に誘発された活性酸素種（ROS）に誘引される金属結合性のメタロチオネイン（MT）が、金属毒や ROS を軽減すると報告されている。そこで、MT を誘引する過酸化水素（H_2O_2 aq）を用いて、簡易的に金属耐性を比較する手法を考案した。考案した手法の検討をすると、線虫の半減時間で金属耐性機構の働きの強弱を確認できた。続いて、H_2O_2 aq を用いた手法により、5 種の線虫の半減時間を比較した結果、最大 4 時間程度の差が確認された。この差は、半減時間が長い線虫種の方が、短い線虫種よりも金属耐性機構が強いことを示しており、H_2O_2 aq の毒をより軽減できたと推察できる。今後は、土壌における線虫種の割合を調査し、早急な除染が求められる金属が拡散されやすい土壌を探知することで、金属除染の進展が可能になると考えている。

In Japan, about 10,000 metal-contaminated soils are still decontaminated, so it is important to determine the priority of the target soil. Expansion from metal-contaminated soil to non-contaminated soil can occur due to the migration of Nematode that prey on bacteria adsorbed by metals. It was considered that there was a difference in the ease of diffusion of contamination to non-contaminated soil depending on the metal tolerance of Nematode. Therefore, we thought that investigating their metal tolerance would be useful in prioritizing the target soils. Nematode has been reported to reduce toxicity by drawing metals and metal-induced ROS with its metal-binding Metallotionines (MTs). Therefore, we devised a simple method for comparing metal tolerance using hydrogen peroxide (H_2O_2 aq), which induces MTs. As a result of the experiment, we were able to confirm the strength of metal tolerance by the difference in half-life of Nematode. Thereafter, the half-life of five Nematode isolated from the soil was compared by a method using H_2O_2 aq, and a difference of up to about 4 hours was confirmed. This difference may have occurred because the Nematode species with longer half-life had stronger metal tolerance, reducing the effects of H_2O_2 aq. In the future, other parameters will also be investigated to detect soils where metals requiring decontamination are likely to be diffused, which will enable progress in decontamination.

nematode, Metal resistant, reactive oxygen species

発表責任者：徳本勇人（tokumoto@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2D02-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

キトサンナノファイバーヒドロゲルによる金属の吸着と金、パラジウムの回収

A porous chitosan nanofiber hydrogel for metal adsorption and recovery of Au and Pd

○岩本 博行[1]、深光 純弥[1]、織田 楓[1]、立神 翔太[1]、新田 祥子[2]([1]福山大生命工、[2]福山大 GSC)
○ Hiroyuki IWAMOTO[1], Junya FUKAMITSU[1], Kaede ODA[1], Shota TATSUKAMI[1], Sachiko NITTA[2] ([1]Fukuyama Univ. LSB, [2]Fukuyama Univ. GSC)

【目的】甲殻類の甲羅の成分であるキチンを脱アセチル化したキトサンは、生分解性、生体適合性に優れ無毒な機能性素材として注目されている。本研究室ではキトサンを微細繊維化したキトサンナノファイバーを PEGDA で架橋することにより、キトサンのアミノ基を残したまま多孔質性と高い膨潤性を持つキトサンナノファイバーヒドロゲルを作成し、その機能性を調べている。本研究では本ゲルによる溶液からの金属イオンの吸着と、特に金およびパラジウムの回収について検討した。
【方法】各種条件でキトサンナノファイバーヒドロゲルを調製し、その物理的特性を SEM や物性測定で調べた。金属イオンの吸着は、金属標準液にゲルを浸漬し、溶液の金属イオン濃度を ICP で測定することにより求めた。また金属イオンを吸着したゲルから硝酸または王水で金属イオンを抽出し、ICP で測定して金属イオンの回収量を求めた。
【結果】キトサンは分子内のアミノ基によるキレート効果で金属を吸着するため、キトサンを PAGDA で架橋することにより、アミノ基を残したまま（FT-IR でアミノ基を確認）多孔質構造のゲルを構築していることをクールステージ付き SEM で確認した。ICP 用多元素標準液を用いて吸着実験を行ったところ、吸着する金属には特異性が見られ、鉄、銅、鉛、クロムなどをよく吸着し、亜鉛、マンガン、アルカリ金属、アルカリ土類金属はほとんど吸着しなかった。銅イオンを使った吸着実験により、ゲルへの金属の吸着はラングミュアの吸着等温式に従い、吸熱反応であった。金などの貴金属を含む金属混合液を用いた吸着実験で、本ゲルはパラジウムや金に対して高い吸着特異性を示し、抽出実験で乾燥ゲル重量の 10%程度のパラジウムが回収された。

Chitosan is a natural polymer with many advantages such as biodegradability, biocompatibility and nontoxicity that is used for biomedical purposes. In this study, we prepared porous chitosan nanofiber (CNF)-PEG hydrogels by cross-linking fibers with PEGDA for the adsorption of metal ions from aqueous solutions. We found the hydrogel selectively adsorbed heavy metals (e.g., Fe, Cu) with optimal efficiency for Cu achieved at pH 4-5. The equilibrium adsorption data for Cu due to chelation fit the Langmuir isotherm model. Moreover, we found the CNF hydrogel has selective adsorption capacity for precious metals such as Pt or Au. By acid extraction, more than 100mg/g dry gel weight for Pd was recovered.

chitosan, nanofiber, hydrogel

発表責任者：岩本　博行（iwamoto@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2D02-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

金ナノ粒子の生成に関与する微生物の生体分子に関する研究
Investigating biomolecules of microorganisms involved in the formation of gold nanoparticles

○唐 冬林[1]、加藤 由悟[1]、安藤 司[2]、亀田 学[2]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2](株)ジパング)
○ DONGLIN TANG[1], YUGO KATO[1], TSUKASA ANDO[2], MANABU KAMEDA[2], MICHIO SUZUKI[1] ([1]Toyo Univ., [2]JIPANGU INC.)

これまでの金ナノ粒子の合成では、反応に高温・高圧条件を必要とすることや、有機溶媒中で有害な反応副産物の生成などの問題による環境への負荷が懸念されている。そこで、私たちは秋田県の土壌から見つかった微生物 *Collimonas sp.* D-25(D-25)を用いて、金ナノ粒子を生物により有機的に合成した。そこで形成に働く特殊な分散剤を見出し、高機能金ナノ粒子を合成することを目的とした。

逆相 HPLC、SDS-PAGE、二次元電気泳動、LC-MS/MS による菌体超音波破砕液の分析を行った結果、新規タンパク質である DP-1 が分散剤として金ナノ粒子合成に寄与する可能性が示唆された。次に、大腸菌を用いて大量合成した組み換え体 DP-1 により金ナノ粒子の合成に対するタンパク質の影響を調べたところ、DP-1 を添加したサンプルは、より低い濃度でより小さい金ナノ粒子を長時間分散することができた。合成した金ナノ粒子の安定性をテストしたところ、DP-1 の添加量の増加に伴い、高塩濃度の環境下での金ナノ粒子溶液の安定性が増加した。このことから、DP-1 は強力な分散剤として、高機能の金ナノ粒子の合成に応用可能であることが示された。

The conventional synthesis of gold nanoparticles requires high temperature and high pressure conditions for the reaction, and there are concerns about the environmental impact due to problems such as the formation of harmful reaction by-products in organic solvents. In this study, we introduce bio-organic methods for the synthesis of gold nanoparticles using *Collimonas sp.* D-25 (D-25), that was found in the soil of Akita Prefecture, Japan. We aimed to identify the special dispersants from the microorganism to synthesize the high functional gold nanoparticles.

Analysis of the extraction from the bacteria by reversed-phase HPLC, SDS-PAGE, two-dimensional electrophoresis, and LC-MS/MS suggested that DP-1, a novel protein, may contribute to the synthesis of gold nanoparticles as a dispersant. The effect of the protein on the synthesis of gold nanoparticles was investigated using recombinant DP-1 (rDP-1) using *E. coli*. rDP-1 was able to disperse smaller gold nanoparticles at a lower concentration for a longer time. When the stability of the synthesized gold nanoparticles was tested, the stability of the gold nanoparticle solution was kept in a high salt solution as the concentration of DP-1 increased. These results indicated that DP-1 can be applied to the application for the synthesis of high functional golf nanoparticles as a powerful dispersant.

goldnanoparticles, biosynthesis, metal-binding protein

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D02-12
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム D

アオイソメとフタホシコオロギの下顎における亜鉛濃集について

Zinc concentration in the mandible of *Glycera aibuhitensis* and *Gryllus bimaculatus*

○柏原 亘[1]、飯島 まゆみ[1]、加藤 由悟[1]、根岸 瑠美[2]、前川 優[3]、佐々木 猛智[3]、武田 志乃[6]、保倉 明子[5]、永田 晋治[4]、鈴木 道生[1]([1]東大院農、[2]東大定量研、[3]東大総合研究博物館、[4]東大院創域、[5]東京電機大工、[6]量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所)
○ WATARU KASHIWABARA[1], MAYUMI IIJIMA[1], YUGO KATO[1], RUMI NEGISHI[2], YU MAEKAWA[3], TAKENORI SASAKI[3], SHINO TAKEDA[6], AKIKO HOKURA[5], SHINJI NAGATA[4], MICHIO SUZUKI[1] ([1]Agri Univ. Tokyo, [2]IQB Univ. Tokyo, [3]Res. Museum Univ. Tokyo, [4]Frontier Sci. Univ. Tokyo, [5]Tokyo Denki Univ., [6]QST)

遷移金属である亜鉛(Zn)を硬組織化に利用しているという点で特異なアオイソメとフタホシコオロギの下顎について，1.Zn の化学形態，2.Zn の濃集に関連するタンパク質，の２点を探究した。
<Zn の化学形態> アオイソメ，コオロギの下顎を用い，Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)と Particle Induced X-ray Emission(PIXE)によって断面の元素の局在を調べた。アオイソメにおいては下顎の先端部に Zn が多く存在していることがわかった。さらに，塩素(Cl)，Br は輪切り面の外側部に多く存在していることがわかった。一方コオロギにおいては，下顎の鋭利な部分に Zn と Cl が多く存在していることがわかった。次に，亜鉛の化学形態を調べるため，X-ray diffraction(XRD)・Fourier transform infrared(FT-IR)・X-ray absorption fine structure(XAFS)によって化学形態の解析を行った。アオイソメについては XAFS の結果から，Zn^{2+}に水が配位しているものとハロゲンイオンに配位しているものの 2 種類で存在している可能性が示唆された。コオロギについては，XRD スペクトルが $Zn(OH)_2$ の鉱物の一種である Wulfingite とほぼ一致し，FT-IR や XAFS の結果もそれと矛盾しなかったことから，鉱物結晶を作っている可能性が高いと考えた。
<Zn 濃集関連タンパク質>
アオイソメの Zn 関連タンパク質を探索するため，下顎から RNA を抽出し，transcriptome 解析を行いアミノ酸配列のデータベースを構築した。次に下顎内の Zn 濃集に関与するタンパク質を探索するため，アオイソメの下顎のタンパク質を抽出し，SDS-PAGE を行った。すると，先端特異的なバンドの中から，His リッチで Zn に結合する可能性が高いとみられるタンパク質を見出した。
【まとめ】
本研究では，アオイソメとコオロギの下顎における Zn の局在の様子と，Zn の化学形態について明らかにした。さらに，アオイソメについては固有の Zn 輸送因子を発見し，また Zn 結合能が高く Zn の濃集に関連している可能性が高いタンパク質を見出すことに成功した。

In this study, we clarified the localization and the chemical form of Zn in the mandible of *Glycera aibuhitensis* and *Gryllus bimaculatus*. In addition, we found a unique localization of Zn and identified a protein with high Zn-binding capacity that is likely to be associated with Zn accumulation.

biomineralization, zinc, mandible

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D04-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

廃鉱山から単離した鉛耐性微生物による鉛回収と鉛ナノ化機構の解明

Recovery of lead by lead-resistant bacteria isolated from abandoned mines and elucidation of the mechanism of lead nanoparticles synthesis

○加藤 由悟[1]、山本 俊義[1]、木村 聡[1]、根岸 瑠美[2]、胡桃坂 仁志[2]、小暮 敏博[3]、鈴木 道生[1,4]（[1]東大院農、[2]東大定量研、[3]東大院理、[4]東大微生物連携機構）
○ Yugo KATO[1], Toshiyoshi YAMAMOTO[1], Satoshi KIMURA[1], Lumi NEGISHI[2], Hitoshi KURUMIZAKA[2], Toshihiro KOGURE[3], Michio SUZUKI[1,4] ([1]GSALS, UTokyo, [2]IQB, UTokyo, [3]GSS, UTokyo, [4]CRIIM, UTokyo)

本研究では、高濃度の鉛溶液中で増殖しながらナノ化する生物を利用して高効率に金属回収することを目的に、鉛ナノ粒子合成を行う鉛耐性のある環境微生物を単離することで、鉛ナノ粒子生成のメカニズムを解明した。鉛は人体にとっては急性・慢性ともに中毒性が認められている毒性元素である一方、鉛ナノ粒子は蓄電池など、電気化学的に応用可能である。本研究成果は、生体を模倣した新たな金属回収手法やナノ粒子合成手法の開発につながると期待される。

廃鉱山周辺から発見した *Pseudomonas* 属の KKY-29 株は高濃度の鉛溶液中で Pyromorphite ($Pb_5(PO_4)_3Cl$) および Hydrocerussite ($2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$) からなるナノ粒子を菌体内で合成した。合成されたナノ粒子をゲルろ過カラムによる高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析（HPLC-ICP-MS）に供することで、鉛ナノ粒子と結合した画分を特定した。特定した画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）により外膜タンパク質として金属イオン輸送に寄与する TonB-dependent receptor（TBDR）を同定した。遺伝子発現解析の結果、鉛イオン添加時に発現量が増加していることが分かり、鉛ナノ粒子の沈着に TBDR が寄与していることが示唆された。

Metal recovery with high efficiency can be achieved by lead-tolerant microorganisms, which can grow in a concentrated metal solution and synthesize lead nanoparticles. The lead nanoparticles have electrochemical applications such as in storage batteries, while lead has both acute and chronic toxicity for human. Our study will lead to the development of new metal recovery methods and nanoparticle synthesis methods learning from living organisms.

Pseudomonas sp. strain KKY-29 isolated from the water near closed mine could synthesized hydrocerussite and pyromorphite nanoparticles inside the cell. The synthesized nanoparticles were subjected to High performance liquid chromatography-Inductively coupled plasma-Mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) using a gel filtration column to identify the fraction bound to the lead nanoparticles. The fraction was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis, and TonB-dependent receptor (TBDR), which contributes to metal ion transport as an outer membrane protein, was identified by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). Analysis of gene expression showed that the expression level of the TBDR increased after addition of lead ions, suggesting that it contributes to the deposition of lead nanoparticles.

metal nanoparitcles, biomineralization, bioremediation

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D04-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

X線吸収分光法を用いたオオカナダモ（*Egeria densa*）に集積する Mn の化学形態調査

Synchrotron-radiation based X-ray absorption spectroscopy revealed oxidation states of Mn accumulated in a submerged plant *Egeria densa*

○原田 英美子[1]、奥井 啓介[1]、東 友夢[1]、田中 佐和[1]、水田 洋一[2]、保倉 明子[3]（[1]滋賀県大・環境科学、[2]ヴィトロプランツ、[3]東京電機大・工）
○Emiko Harada[1], Keisuke Okui[1], Yumu Azuma[1], Sawa Tanaka[1], Yoichi Mizuta[2], Akiko Hokura[3] ([1]The Univ. of Shiga Pref., [2]Vitroplants, [3]Tokyo Denki Univ.)

オオカナダモ（*Egeria densa*）は、全国の湖沼・河川・水路に群生する南米原産のトチカガミ科沈水植物であり、その繁茂が問題視されている。筆者らは琵琶湖水圏のオオカナダモから、陸生の超集積植物を越える濃度の Mn が検出される現象に注目している。これまでの研究から、その要因が植物に付着する微生物の作用により生じた Mn 酸化物の集積によると推測した。本研究では、放射光を利用した Mn K 端 XANES（X 線吸収微細構造、X-ray absorption fine structure）測定を行い、オオカナダモに集積されている Mn の化学形態を調べた。オオカナダモ表面で生じる付着微生物による反応の影響を除くため、種々の表面滅菌法を検討した。ナタマイシンを主成分とする植物除菌剤である sirViP G（ヴィトロプランツ製／Vitroplants）と次亜塩素酸カルシウムを併用してオオカナダモを処理することで良好な結果が得られた。野外で採取した植物を表面滅菌後、実験室内で生育させて分析すると、還元型の 2 価の Mn が検出された。一方、琵琶湖水圏で採取したオオカナダモは酸化型の Mn の混合物が含まれていた。また、生育地から採取した底泥からは還元型の Mn 化合物が検出された。以上の結果からも、オオカナダモに付着する微生物が環境中の還元型の Mn を植物表面で酸化していることが支持された。

Egaria densa (Brazilian waterweed, Hydrocharitaceae) is a submerged, freshwater perennial macrophyte native to South America. The authors previously reported that Mn concentrations in these plants in Lake Biwa basin were generally above those of terrestrial hyperaccumulators, and the accumulation of Mn might be mediated by the production of Mn oxide by epiphytic bacteria on the plant surfaces. In this work, the oxidation states of Mn accumulated in *Egeria densa* were investigated. *E. densa* plants collected in the field were analyzed by synchrotron radiation based Mn K-edge XANES (X-ray absorption fine structure) and a mixture of oxidized Mn were detected. Reduced divalent Mn were detected in the sediment collected from the habitat. In order to eliminate the contribution of the epiphytic bacteria, various sterilization methods of the plants were evaluated. The plants from the Lake Biwa basin were successfully sterilized by the treatment by sirViP G (Vitroplants), a disinfectant containing natamycin, combined with calcium hypochlorite. Reduced form of Mn was detected in the sterilized plants. Our results strongly suggested the production of biogenic Mn oxide on the surface of *E. densa* plants in the field.

Egeria densa, Manganese, XANES

発表責任者：原田英美子（harada.e@ses.usp.ac.jp）

講演番号：2D04-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

紅藻類ツルシラモの成長と栄養塩吸収への水温の影響

Effects of water temperature on the growth and nutrient uptake of the red alga Gracilariopsis chorda

○末次 桃子[1]、黒須 泰行[1]、本間 悠里[1]、小比賀 秀樹[2]、垣田 浩孝[1]([1]日大院・総合基、[2]産総研・健康工学)
○ Momoko SUETSUGU[1], Yasuyuki KUROSU[1], Yuuri HONMA[1], Hideki OBIKA[2], Hirotaka KAKITA[1] ([1]NihonUniv.Graduate School of Intergrated Sciences, [2]AIST,Helth Research Institure)

魚類養殖場廃水中の窒素やリン等の富栄養塩類はヒトの健康リスク因子である。効率の良い海水中の富栄養塩低減技術の確立が現在望まれている。一方、海藻は成長に栄養塩を必要とする生物である。そこで、紅藻類大型海藻オゴノリ科ツルシラモ属海藻（*Gracilariopsis chorda*）が栄養塩吸収材、すなわち海藻バイオフィルターとして適しているかどうかを判定することを目的とした。そこで各水温、栄養塩での海藻成長と栄養塩吸収量を比較した。熊本県沖で採取した海藻を使用した。水温は 10℃から 4℃おきに 6 条件でおこなった。光強度 80 mol･m^{-2}･s^{-1}、日長時間 14 時間明間_10 時間暗間、塩分濃度約 33‰で振とう培養を行った。海藻湿重量測定と培地交換はクリーンブース内で 1 週間毎に行った。母藻から切り出した海藻切片 12 本を 200 mL の海水の入った 200 mL 三角フラスコに植え付けた。実験点数は 4 とした。4 週間の培養実験の結果は、熊本産ツルシラモが幅広い温度範囲で壊死することなく成長することを示した。アンモニア態窒素濃度及び硝酸態窒素含有濃度は海藻により低減した。当該海藻は海藻バイオフィルターとして有用であることが示唆された。

High concentration nutrients such as nitrogen and phosphorus in fish farm wastewater are the human health risk factors. It is currently desired to establish an efficient technology for reducing nutrients in seawater. On the other hand, seaweed is an organism that requires nutrients for growth. Therefore, the purpose of this research was to determine whether the red alga, *Gracilariopsis chorda* is suitable as a nutrient absorber, that is, a seaweed biofilter. Seaweed growth and nutrient absorption at each water temperature and nutrient salt were compared. The water temperature was 6 conditions every 4 ° C from 10 ° C. The culture conditions with shaking at 100rpm were set an irradiance of 80 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$, a light:dark regime of 14:10h, in salinity of about 33‰. Algal wet weight measurement and medium renewal were carried out weekly in a clean booth, For each experiment, four replicates of twelve apical segments cut from the stock culture strains were inoculated into 200 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of seawater.. *Gracilariopsis chorda* tolerated a wide range of temperature variation. Ammonia nitrogen concentration and Nitrate nitrogen concentration were lowered by *G. chorda*. *Gracilariopsis chorda* seems to be useful as biofilter for water purification.

Seaweed, Growth, Temperature

講演番号：2D04-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

培養槽壁面に付着する微細藻類の観察（第 1 報：レースウェイ式培養槽の場合）

Observation of microalgae adhesion on a reactor wall (Part 1, in the case of a Raceway pond)

○大橋 弘明[1]、森野 魁人[2]、逢坂 竜之介[3]、酒井 祐介[3]、城山 真恵加[3]、植田 芳昭[2] ([1]摂南大院理工、[2]摂南大理工、[3]株式会社熊谷組)
○ Hiroaki OHASHI[1], Kaito MORINO[2], Ryunosuke OSAKA[3], Yusuke SAKAI[3], Maeka SHIROYAMA[3], Yoshiaki UEDA[2] ([1]Grad. Sch., Setsunan Univ., [2]Setsunan Univ., [3]Kumagai Gumi Co., Ltd.)

微細藻類を培養する際，低コストで多量の培養を可能とするレースウェイ・ポンドと呼ばれる回流式培養槽が用いられる。微細藻類は培養過程において，培養槽底部に堆積することで生産性の低下を招くことが知られているが，実際の微細藻類培養液は不透明で視覚的に堆積領域を把握することが困難であり，培養槽の内部構造も不明瞭である。そのため，これまでは経験的に予測された領域のみに着目した改善策が講じられてきた。したがって，生産性の低下に繋がる微細藻類が堆積するメカニズムを明らかにする必要がある。そこで，培養槽の内部構造を容易に把握するため，透明なアクリル樹脂製の小型レースウェイ・ポンド式藻類培養槽（全長 500 mm，全幅 100 mm）に微細藻類を混入して実験を行い，十分時間が経過した後の微細藻類の堆積領域を培養槽下方から観察した。本実験では，屋外で採取した雑多な微細藻類から単離したイカダモ様藻類を用いる。本報では，レースウェイ・ポンドを用いた微細藻類培養における高効率生産を目指して，微細藻類が堆積するメカニズムを解明する基礎研究の第一段階として，小型レースウェイ・ポンド式藻類培養槽内で微細藻類が堆積する領域を観察し，微細藻類が堆積するメカニズムを解明する手段として有効かを検討した。

This study aims to observed the sedimentation area of microalgae in a raceway pond. For the cultivation of microalgae, Large-scale culture is realized at low cost by using a circulation cultivate channel called a raceway pond. During the culture process, microalgae sink to the bottom, reducing productivity. However, because the medium is opaque, it is difficult to determine the extent of the microalgae sedimentation area. In the experiment, mix microalgae in an acrylic aquarium (length 500 mm, width 100 mm) and observe the microalgae sedimentation area after sufficient time has passed from under the culture channel. This experiment uses *Scenedesmus*-like algae isolated from a variety of microalgae harvested outdoors. The results of microalgae precipitation are used to determine if this experiment was effective. In this study, as a first step to elucidate the deposition mechanism of microalgae, we observed the sedimentation area of microalgae in a raceway pond (500 mm scale). Our group has investigated whether it is effective.

Microalgae, Raceway pond, Sedimentation

講演番号：2D04-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

培養槽壁面に付着する微細藻類の観察（第２報：オイル塗布による付着低減）

Observation of microalgae adhesion on a reactor wall (Part 2, on the reduction of maicoalgae adhesion due to a coating of oil)

○逢坂 竜之介[1]、酒井 祐介[1]、城山 真恵加[1]、大橋 弘明[2]、植田 芳昭[3]([1]株式会社熊谷組、[2]摂南大院理工、[3]摂南大理工)
○Ryunosuke OSAKA[1], Yusuke SAKAI[1], Maeka SHIROYAMA[1], Hiroaki OHASHI[2], Yoshiaki UEDA[3] ([1]Kumagai Gumi Co., Ltd., [2]Grad. Sch., Setsunan Univ., [3]Setsunan Univ.)

微細藻類を工業的に利用するためにはコスト面や安定供給の面で多くの課題が残っており，培養過程から微細藻類の生産性を高め，培養コストを抑えることが求められている。微細藻類は成長が進むと水槽壁面に付着するため，外部からの水槽内部への光が遮断され，微細藻類の成長を阻害することが知られている。そのため，薬剤による化学的洗浄やスポンジなどで水槽壁面を払拭する物理的洗浄による微細藻類の除去作業が頻繁に必要となり，生産コストがかさむ原因となっている。このような微細藻類が水槽壁面に付着する原因として，水槽壁面上の微細な傷が考えられる。そこで，微細な傷の影響を軽減する目的で，複数の透明なアクリル樹脂性矩形容器に動粘度の異なるジメチルシリコーンオイルをそれぞれ塗布し，その容器内で微細藻類（パラクロレラ様藻類）を室温がコントロールされた室内で約一ヶ月間培養した。数日おきに培養液を静かに排出し，空になった容器の側壁と浴底部をデジタルカメラで撮影し，微細藻類（パラクロレラ様藻類）の付着領域の観察を行った。本報では，容器内に塗布するオイルの動粘度が微細藻類の付着量に及ぼす影響について検証した。

Since microalga produces various substances depending on the variety, research on their utilization is becoming active worldwide. However, many problems remain on the cost side and steady supply to use a microalga industrially and increase microalga productivity and it is demanded from a cultivate process that holds down cultivate cost. When it cultivate a microalga, microalga attaches to the inside wall surface of the reactor, and it becomes a problem to inhibit microalgal growth by interrupting light. The cause of such microalga adhering to the reactor wall surface is considered to be minute scratches on the reactor wall surface. Therefore, we cultivated microalga using the rectangle container which applied different silicone oil of the kinematic viscosity for the reduction of the microalga adhesion to a reactor wall surface in this report and inspected it about the influence that a difference of the kinematic viscosity of the silicone oil gave to microalga adhesion.

Microalgae, Photobioreactor, Biomass productivity

講演番号：2D04-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

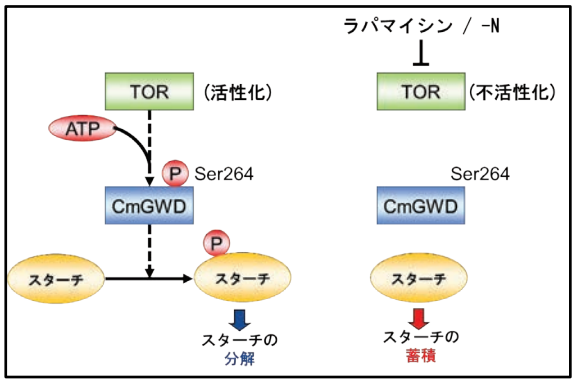
単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における TOR シグナル経路によるスターチ分解制御機構の解明

Elucidation of the regulatory mechanism of starch degradation by TOR signaling pathway in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

○小宮 聡太[1]、パンチャ イムラン[1,2]、高谷 和宏[3]、田中 寛[1]、今村 壮輔[1,3]（[1]東工大生命、[2]SRM 大、[3]NTT 宇宙環境研）
○Sota KOMIYA[1], Imran PANCHA[1,2], Kazuhiro TAKAYA[3], Kan TANAKA[1], Sousuke IMAMURA[1,3]
([1]Tokyo Tech, [2]SRM Univ. AP, [3]NTT SE Labs)

藻類は、光合成により固定された過剰な炭素の一部をスターチとして細胞内に蓄積する。スターチは液体燃料や医薬品、プラスチックなどの原料となるため、その蓄積量を増加させることで、藻類の利用価値を飛躍的に高めることができる。しかし、スターチの蓄積量を制御する機構には未解明な点が多く残されている。

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* を用いた当研究室の先行研究により、target of rapamycin（TOR）が、スターチ蓄積のチェックポイントキナーゼであることが明らかとなっている。さらに、ホスホプロテオーム解析によって、TOR シグナル経路でリン酸化制御を受ける、スターチ合成と分解に関わるタンパク質が数個同定されている [Pancha *et al.* (2019) Plant J.]。本研究では、その中からスターチ分解に関わるタンパク質である GWD（Glucan, Water Dikinase）に注目した。GWD はスターチの分解の初期においてスターチをリン酸化してその構造を変化させることで、スターチ分解に関わる他の酵素がその切断サイトにアクセス可能となる。そのため、GWD はスターチ分解開始の引き金を引く重要なタンパク質である。 本研究では、TOR シグナル経路による GWD の 264 番目のセリン残基のリン酸化によって、GWD の活性が制御されていることを明らかにした。



Algae accumulate starch granules using excess carbon fixed by photosynthesis in their cells. Increase the amount of starch can dramatically increase the utilization value of algae since starch can be used as feedstocks for liquid fuels, pharmaceuticals, plastics, and other products. However, the fundamental molecular mechanisms that control the accumulation of starch remain largely unclear.

Our previous studies using the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* have revealed that target of rapamycin (TOR) is a checkpoint kinase for starch accumulation. Furthermore, it has been identified that phospholylation status of several proteins involved in starch synthesis and degradation are regulated by TOR-signaling pathway [Pancha *et al.* (2019) Plant J.]. In this study, we focused and studied GWD (Glucan, Water Dikinase), a protein involved in starch degradation, which is the trigger for starch degradation. We revealed that the activity of GWD is regulated by phosphorylation status of serine 264 by TOR-signaling pathway.

Starch, Algal biomass, Target of rapamycin

発表責任者：小宮聡太（komiya.s.ab@m.titech.ac.jp）

講演番号：2D04-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

細菌によるブルーカーボン・レアメタル含有褐藻類の高度利用

Advanced utilization of brown macroalgae containing blue carbon and rare earth elements by bacteria

○中辻 早希子[1]、日尾 守[2]、髙瀬 隆一[1]、渡辺 大輔[3]、橋本 渉[1]（[1]京大院・農、[2]京大・農、[3]奈良先端大・バイオ）
○ Sakiko NAKATSUJI[1], Mamoru HIO[2], Ryuichi TAKASE[1], Daisuke WATANABE[3], Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Div. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Technol.)

【背景と目的】持続可能な開発目標 SDGs の一つとして、脱炭素社会の構築が喫緊の課題である。近年、陸上よりも海洋植物による CO_2 固定量が多いことが示され、海洋での固定炭素（ブルーカーボン）資源の利活用が重要になってきている。当研究室では、微生物によるブルーカーボンの高度利用を目指し、褐藻類の主要成分であるアルギン酸からのバイオエタノール生産を達成している。また、褐藻類はレアメタルなどの金属を含むことが知られている。本研究では、細菌による褐藻類藻体からのバイオ燃料生産、及びレアメタル水溶液からの金属回収の高効率化を目指した。
【方法と結果】褐藻類（コンブ）藻体を単一炭素源とする栄養制限培地で、エタノール生産能を付与した *Sphingomonas* 属細菌 A1 株を培養した。その結果、藻体 1 g あたり 0.31 g のエタノールを得た。また、レアメタルの一種であるサマリウムを含むアルギン酸最少培地で A1 株を培養し集菌した結果、培地中の 76%のサマリウムが菌体に回収された。炭素源をグルコースとした条件では回収率が 41%であったことから、アルギン酸がレアメタル回収に寄与することが示唆される。以上のことから、A1 株を用いることにより高効率で、藻体から直接バイオ燃料を生産できること、及びレアメタルを回収できることが示された。なお、本研究の一部は東洋水産財団の支援を受けて行われた。

[Background and objectives] As one of SDGs, Sustainable Development Goals, construction of decarbonized society is an urgent subject. Because fixation mass of CO_2 by marine plants is demonstrated to be more than that by land plants, utilization of “blue carbon” fixed in marine becomes important. In our laboratory, to utilize “blue carbon” by microbes, alginate, a major component of brown algae, has been converted to bioethanol. Brown algae is also known to contain metals including rare earth elements. In this study, we tried to establish the highly efficient processes of biofuel production directly from algae and of rare earth element recovery by bacteria.
[Methods and results] *Sphingomonas* sp. strain A1 cells with an addition of ethanol productivity were cultivated in nutrition-limited medium containing brown algae as a sole carbon source. As a result, ethanol (0.31 g) was obtained from algae (1 g). Strain A1 cells were also cultivated in alginate minimal medium containing samarium, a rare earth element. Seventy six % of samarium added in the medium was recovered in the bacterial cells. The recovery ratio was reduced to 41% in the case of glucose used instead of alginate in the medium, suggesting that alginate was involved in the metal recovery. These results indicated high bacterial production of biofuel directly from algae and recovery of rare earth element. This work was supported in part by The Toyo Suisan Foundation.

bioethanol, blue carbon, rare earth element

発表責任者：橋本 渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2D04-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

ユーグレナワックスエステル合成系におけるミトコンドリア補酵素変換の重要性

NADPH-to-NADH conversion by mitochondrial transhydrogenase is indispensable for sustaining anaerobic metabolism in *Euglena gracilis*

○中澤 昌美[1]、髙橋 夢月[1]、柏山 祐一郎[2]、乾 博[1]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1]([1]阪府大生命、[2]福井工大工)
○Masami Nakazawa[1], Mutsuki Takahashi[1], Yuichiro Kashiyama[2], Hiroshi Inui[1], Mitsuhiro Ueda[1], Tatsuji Sakamoto[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Fukui Univ. Tech.)

【背景・目的】真核単細胞藻類ユーグレナは、嫌気や低酸素環境に曝されるとワックスエステル (WE) を合成する。我々はバイオ燃料としての利用が期待される WE の合成能向上を目指し、代謝メカニズム解析を進めている。これまでに、呼吸鎖と脂肪酸β酸化逆行による長鎖脂肪酸合成が共役し、嫌気的呼吸鎖として機能していることを見出してきた。しかし、既知の代謝系にはこれらの反応を駆動する還元力 NADH の供給反応は存在せず、ピルビン酸:$NADP^+$ oxidoreductase (PNO) による NADPH 供給系のみが知られてきた。そこで本研究では補酵素変換酵素トランスヒドロゲナーゼ (NNT) に着目した。さらに、寄生虫等で NNT との関連が知られる $NADP^+$型リンゴ酸酵素 (ME)についても、役割を調べた。
【結果・考察】NNT および ME を対象に RNAi による遺伝子発現抑制を行い、代謝への影響を調べた。NNT 発現抑制細胞を低酸素曝露した結果、WE 合成量が対照群の約 30%まで減少するとともに、細胞内 ATP 量が大幅に減少した。ME 発現抑制細胞でも同様の応答がみられた。一方、ピルビン酸トランスポーターを UK-5099 により阻害しても WE 合成は変化せず、解糖系由来の炭素はピルビン酸ではなくリンゴ酸としてミトコンドリアに輸送されることが示唆された。以上のことから、ME と PNO の機能によりリンゴ酸がアセチル-CoA に変換され、WE へ炭素を供給すると同時に、生成された NADPH が NNT により NADH に変換され、嫌気的呼吸鎖による ATP 獲得に寄与していることが明らかとなった。

Euglena gracilis produces ATP in the anaerobic mitochondria with the concomitant wax ester formation, and NADH is essential for both ATP formation and fatty acid synthesis in the anaerobic mitochondria. In this study, we demonstrated that cofactor conversion in mitochondria by nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT), which converts NADPH/NAD^+ to $NADP^+$/NADH, was indispensable for sustaining anaerobic metabolism. Silencing of NNT genes significantly decreased wax ester production and intracellular ATP levels during anaerobiosis but had no such marked effects under aerobic conditions. An analogous phenotype was observed in the silencing of the gene encoding a mitochondrial $NADP^+$-dependent malic enzyme. On the other hand, inhibition of the mitochondrial pyruvate transporter by UK-5099 did not affect WE synthesis, suggesting that glycolysis-derived carbon is transported to the mitochondria as malate rather than pyruvate.

Euglena, biofuel, transhydrogenase

発表責任者：中澤 昌美（mami@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2D04-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

代謝改変した油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* によるブルーカーボンアルギン酸からの油脂生産

Production of lipids from “blue carbon” alginate by utilizing the engineered oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*

森 大輔[1]、橋本 渉[2]、○河井 重幸[1] ([1]石川県大、[2]京大農)
Daisuke MORI[1], Wataru HASHIMOTO[2], ○Shigeyuki KAWAI[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

我が国の海域を含む世界の海域では膨大な量の炭素が褐藻（コンブやアカモクなど）として海中に固定されており、ブルーカーボンとしてその利活用が求められている。我々は、油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* (Yli) を用いた「海に固定された炭素（褐藻）から油脂へ」の新しい炭素の流れの創造を目指して研究を進めている。褐藻の主要多糖アルギン酸はアルギン酸リアーゼ処理によりモノウロン酸（DEH）に変換される。DEH 資化に必要な 4 つの遺伝子を導入して、DEH を資化できるように代謝改変したパン酵母は好気条件で DEH を良好に資化した[1)]。そこで、好気条件で著量の油脂を蓄積する Yli に、DEH 資化に必要な 4 遺伝子を導入して Yli 株に DEH 資化能を付与し、この代謝改変 Yli 株（Yli DEH+株）を用いて、DEH から効率的に油脂を生産し得ると期待した。

本発表では、ゲノム編集による Yli DEH+株の構築、最適窒素源の決定、Yli DEH+株の DEH 培地とグルコース培地での生育ならびに生育させた同株の油脂の生産量と組成を紹介する。これは油糧酵母を用いてアルギン酸から油脂を生産した最初の例である。

1) Matsuoka et al. Sci. Rep. 2017, 7:4206.

In the sea area of the earth including that around Japan, a huge amount of carbon is fixed as “blue carbon” into brown macroalgae (kelp and akamoku etc.). We have been conducting the research to create a new carbon-flow from the marine fixed-carbon (the brown macroalgae) to lipids by utilizing oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* (Yli). Alginate, a major polysaccharide in the brown macroalgae, is converted into a monouronate (DEH) by the treatment with alginate lyases. The engineered budding yeast with the capacity to assimilate DEH, which had been constructed through introducing the 4 genes for the assimilation of DEH, preferably metabolized DEH under aerobic condition [1)]. The Yli strain vigorously accumulates lipids under an aerobic condition. Thus, it was expected that the engineered Yli (Yli DEH+ strain) on which the ability to assimilate DEH had been conferred, could effectively produce lipids from DEH.

In this presentation, we will show the construction of Yli DEH+ strain based on the genome-editing technology, determination of the optimum nitrogen source, the growth behaviors in the DEH medium and the glucose medium, and the amounts and compositions of lipids in the Yli DEH+ strain grown in these media. This is the first demonstration to produce lipids from alginate by using engineered oleaginous yeast strain.

1) Matsuoka et al. Sci. Rep. 2017, 7:4206.

Yarrowia lipolytica, alginate, lipid

発表責任者：河井　重幸（kawais@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2D04-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* を用いた食用代替パーム油の開発

Development of edible alternative palm oil produced by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○三根 健太郎[1]、高城 博也[1]、小倉 治朗[1]、相部 かおり[1]、島 隆[1]、池上 香織[1]、佐藤 里佳子[2]、高久 洋暁[2]([1]日清食品 HD（株） グローバルイノベーション研究センター、[2]新潟薬大・応生科)
○Kentaro MINE[1], Hiroya TAKI[1], Jiro OGURA[1], Kaori AIBE[1], Ryu SHIMA[1], Kaori IKEGAMI[1], Rikako SATO[2], Hiroaki TAKAKU[2] ([1]Nissin Foods Holdings Co., Ltd Global Innovation Center, [2]NUPALS)

即席フライめんを始めとした多くの食品に利用されているパーム油は，環境破壊や，労働環境，気候変動リスクなどの問題をはらんでいる．近年，これらの課題に配慮した生産システムや認証制度の導入が進む一方で，持続可能なパーム油の代替品が求められている．

油脂産生酵母である *Lipomyces starkeyi* が産生するトリグリセライド（以降，酵母油）はパーム油と脂肪酸組成が類似しているため，上記問題を解決する一助となることが期待されている．しかし，これまでの酵母油に関する研究は，実験用試薬や食品加工に使用できない有機溶媒を使用していたため，実験室レベルに留まっていた．

そこで本研究では，食品利用可能な培地原料や油脂抽出法，即席めんのフライ手法について検討を行った．その結果，非食用物質を使用していない食用代替パーム油製造法の開発に成功した．さらに，作製した酵母油とフライめんの官能評価および理化学的分析を実施したところ，パーム油と比較して官能的に遜色がなく，3-モノクロロプロパンジオール脂肪酸エステルやグリシドール脂肪酸エステルといった危害候補物質の量も低減していた．今後は，マススケールの製造法の確立ならびにコストダウンに関する検討を行い，製品への応用を目指す．

Palm oil, which is used in many foods such as instant fried noodles, has some points to be solved, including environmental destruction, poor working environment, and climate change risk. The need for sustainable alternatives to palm oil has been increasing in recent years.
Triglyceride produced by an oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* (hereinafter referred to as “yeast oil”) has fatty acid composition similar to palm oil and is expected to solve the above-mentioned points. However, to date, studies on yeast oil have remained at the laboratory level owing to the use of experimental reagents and organic solvents that are not edible.
In this study, we investigated culture media, oil extraction methods, and instant noodle frying methods. We succeeded in developing a method of manufacturing an edible alternative palm oil without using non-edible substances. Sensory evaluation and physicochemical analyses showed that noodles fried in palm oil and yeast oil had similar taste and the amounts of harmful substances in yeast oil were reduced.

SDGs, Oleaginous yeast, Instant fried noodles

講演番号：2D04-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

油糧酵母による廃グリセロールからの脂質生産

Practical-use lipid production from industrial waste by oleaginous yeast

○吉本 真[1]、梶浦 裕之[2]、三﨑 亮[2]、藤山 和仁[2] ([1]阪大院工、[2]阪大生国セ)
○Shin YOSHIMOTO[1], Hiroyuki KAJIURA[2], Ryo MISAKI[2], Kazuhito FUJIYAMA[2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech)

近年バイオディーゼル燃料（BDF）が化石燃料の代替エネルギーとして注目されている。油糧生産酵母による油脂生産は、植物油や動物脂肪由来の生産方法と比較して、食糧との競合がなく生産効率が高いといったメリットが多い。生産コストが高いといった課題があるが、油糧生産酵母の培養に安価な炭素源を用いることでコストダウンが見込める。廃グリセロールは油脂から BDF を生産するエステル交換反応での副製産物であり不純物が多く含まれることから廃棄物として扱われている。本研究では、この廃グリセロールを炭素源に油糧生産酵母 *Rhodotorula toruloides* NBRC0880 を用いて、BDF 生産に適した培養条件の構築を行うことを目的とした。はじめに廃グリセロールを炭素源として培養を行ったところ、細胞増殖が大きく阻害された。これより廃グリセロールに含まれるグリセロール以外の不純物の細胞増殖への影響を調査した。結果、不純物である脂肪酸、脂肪酸メチルエステル、メタノールは細胞増殖への大きな影響がなかった一方で、脂肪酸石鹸によって細胞増殖が大きく阻害された。これらの結果を踏まえて、廃グリセロールに有効な処理を行うことにより炭素源としての利用を試みた。処理した廃グリセロールを炭素源として培養した場合、市販のグリセロールを用いた場合と比較して細胞増殖と油脂生産の共に遜色ない結果が得られた。

Biodiesel has attracted as an alternative energy source of fossil fuels in recent years. Although the lipid production by oleaginous yeast has several advantages in terms of efficiency and food competition, its high production cost is a serious challenge for practical-use. Crude Glycerol (CG), a main by-product from biodiesel plants, has a potential to alter the carbon source. However, it contains numerous impurities. To utilize CG for biodiesel production, this study investigated the lipid production from CG using *Rhodotorula toruloides* NBRC0880. Cell growth was completely inhibited by utilizing CG as a carbon source, thus the effect of impurities for cell growth was researched, resulting in finding the fact that soap content was the main inhibitor in CG. The method to neutralize CG was performed based on this finding. Cell growth and lipid production by utilizing neutralized CG were the same or higher than those by utilizing pure glycerol.

Oleaginous yeast, Lipid production, Crude glycerol

講演番号：2D04-12
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム D

油脂生産酵母 Lipomyces starkeyi の脂質生産に及ぼす糖および金属イオンの影響

Effect of sugars and metal ions on triglyceride production by the yeast lipomyces starkeyi

○河村 駿、星田 尚司、赤田 倫治（山口大創）
○Shun KAWAMURA, Hisashi HOSHIDA, Rinji AKADA (Yamaguchi Univ.)

近年、地球温暖化の影響で、バイオディーゼル燃料の利用による二酸化炭素の排出削減が期待されている。本研究では、油脂生産性酵母である *Lipomyces starkeyi* を種々の培地で培養し、培地成分の脂質生産に対する効果を調べた。*L. starkeyi* 内に蓄積した脂質は BODIPY による染色後の顕微鏡観察で定性的に評価し、また、細胞破砕後、トリアシルグリセロール定量試薬で定量した。

培地の炭素源として 15 種の糖を調べたところ、マルトースの時、*L. starkeyi* の増殖が最も良く、最も培養液あたりの脂質生産量が高くなった。また、マルトースの濃度を 2 から 10%まで調べたところ、2%が最も多くの脂質を生産した。次にグルコースを炭素源とする培地に 8 種の金属イオンをそれぞれ加えて培養すると、鉄イオン(Fe^{3+})の時に最も多くの脂質を生産した。また、鉄イオン(Fe^{3+})の濃度を 1mM から 20mM まで調べたところ、5mM で最も多くの脂質を生産した。上記の結果から 5mM の Fe^{3+}を種々の糖(2%)に加えて試したところ、ほとんどの糖で脂質生産量が増えた。その中でもマルトースと Fe^{3+}の組み合わせが最も多くの脂質を生産した。

In recent years, the demand for biodiesel fuel has been increasing to reduce carbon dioxide emissions. In this study, we investigated the culture conditions to increase the triglyceride (TGA) production in *Lipomyces starkeyi*, which accumulates a large amount of lipid as TGA. *L. starkeyi* was cultured in various medium and lipid accumulation was evaluated by BODIPY staining and a calorimetoric method.

Fifteen types of sugars in the culture medium were tested. The cells cultured in maltose medium produced highest amount of TGA among the fifteen sugars. Growth level was also highest in maltose medium. In addition, the concentration of maltose from 2 to 10% were tested. As a result, 2% was the most suitable for TGA production. The effect of metal ions on TGA production was also examined. As a result, iron was strongly enhanced TGA production. The concentration of iron from 1 mM to 20 mM were tested and the highest production was demonstrated at 5 mM. Iron (5 mM) was also added in the various sugar media. Iron increased TGA production in most of sugar media. Among them, the combination of maltose and iron produced highest amount of TGA.

triglyceride, maltose, lipomyces starkeyi

講演番号：2D07-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

NMR 分光法によるバクテリオファージ ϕX174 スパイクタンパク質とレセプター糖鎖の相互作用解析

An Interaction Analysis of Bacteriophage φX174 Spike Protein with Receptor Glycans Using NMR Spectroscopy

○松澤 朋生、篠田 知奈美、増田 裕一、稲垣 穣（三重大院生資）
○Tomoki MATSUZAMA, Chimani SHINODA, Yuichi MASUDA, Minoru INAGAKI (Mie Univ.)

バクテリオファージϕX174 は，ビリオン表面のスパイクタンパク質によってグラム陰性菌の持つリポ多糖 (LPS) を認識し，宿主を選択する。我々は糖鎖の認識機構を有機化学的に解析するため，核磁気共鳴 (NMR) 分光法を用いた相互作用解析を行った。

^{13}C 同位体標識した *E. coli* C 株 LPS の糖鎖部分 (deON) にスパイク G タンパク質 5 量体を等モル混合して HSQC スペクトルを測定した (図 1)。deON のみのスペクトルと比較して, glucose や galactose といった Outer core 由来の糖の非アノメリック領域の信号に化学シフトの変化が認められ, Outer core が糖鎖認識に大きく寄与することが示唆された [1]。この部分の信号の挙動を帰属することができれば相互作用解析を達成できると考えられ，NMR 分光法で完全に帰属できる二糖，三糖の単位で Outer core を模倣した糖鎖の網羅的な合成を行っている。

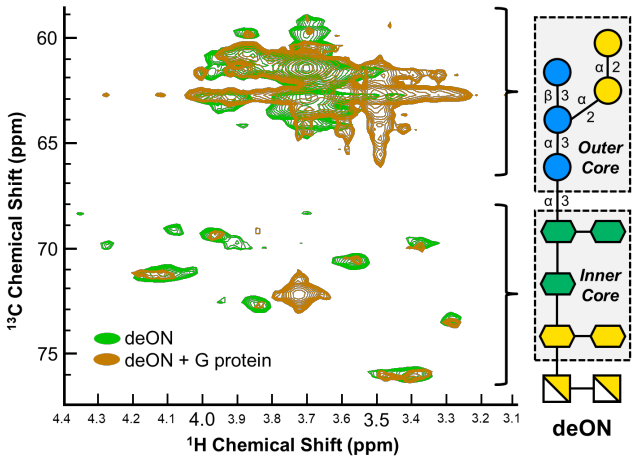


図 1 deON とスパイク G タンパク質の相互作用解析

Bacteriophage ϕX174 selects its host gram-negative bacteria by recognizing their lipopolysaccharides (LPS) using spike proteins on the surface of virion. In order to analyze the carbohydrate recognition mechanism, we performed an interaction analysis using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

^{13}C-labeled deON (glycan part of LPS) from *E. coli* C strain was mixed with an equimolar of spike G protein pentamer and was analyzed by HSQC experiment (Fig. 1). The differences of chemical shift were observed, compared with deON only, more significant of sugar residues non-anomeric region derived from the outer core such as glucose and galactose [1]. The outer core might contribute to glycan recognition of spike proteins; we are conducting a comprehensive synthesis of glycans mimicking di- or tri-saccharide units, which enables completely assignment by NMR spectroscopy.

[1] E. V. Vinogradov *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261* (3), 629-639.

bacteriophage, NMR spectroscopy

発表責任者：稲垣　穣（inagaki@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2D07-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

RSLs ミセルサイズに着目した細胞毒性の解析

Analyzing RSLs Cytotoxicity Based on the Micelle Size

○齋藤 里花子[1]、平田 圭亮[1]、モハメッド モハメッド シェイク[1,2]、中島 義賢[3]、前川 透[1,2]、水木 徹[1,2] ([1]東洋大院 学際・融合、[2]東洋大 BNERC、[3]阪大 INSD)
○Rikako SAITO[1], Keisuke HIRATA[1], Mohamed Sheikh MOHAMED[1,2], Yoshikata NAKAJIMA[3], Toru MAEKAWA[1,2], Toru MIZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. IdNS, Toyo Univ., [2]BNERC, Toyo Univ., [3]INSD, Osaka Univ.)

希少糖とは自然界において存在量が少ない単糖のことであり、これまで約 50 種が発見されている。希少糖には、血糖値上昇抑制効果、生活習慣病予防効果、抗がん作用などの健康効果があることが明らかになっており、希少糖やその化合物についての研究が盛んに行われている。我々は希少糖を側鎖にもつ糖脂質 (RSLs) について研究してきた。その過程で、側鎖の希少糖の種類により細胞毒性強度が異なることが明らかになった。また、RSLs は両親媒性物質のひとつである。両親媒性物質の二次構造であるミセルは、我々の生活において洗剤などに利用される一方、先端医療分野においてはドラッグデリバリーシステムのキャリアに利用され、応用範囲が広い物質である。しかしながら、ヒトの身体に対するミセル構造の毒性発揮のメカニズムは未だ明らかになっていない。本研究ではまず、RSLs のヒト培養細胞に対する毒性評価を行った。ミセル分子の粒径を測定し、これが毒性に及ぼすかを解析した。測定結果から表面積を算出し、細胞毒性との比較を行ったところ相関が見られた。本発表では、RSLs が細胞内機構に及ぼす影響に加え、ミセルの表面積と毒性の関係性に関する詳細な分析について考察する。

Rare sugars are monosaccharides that are rarely existent in nature of which about 50 types have been found so far. Regarded as “healthy sugars” owing to the positive effects they have on the human body, they have been reported to suppress blood sugar levels, prevent lifestyle diseases, and even possess anti-cancer effects. Therefore, rare sugars and their compounds have been gaining increased attention. In this regard, we investigated 6 types of rare-sugar lipids (RSLs)-glycolipids synthesized from a rare sugar and octanoic acid. Glycolipids are amphiphilic substances that form micellar structures with multifarious applications as in detergents to carriers in drug delivery systems. However, it has been discovered that micelles display a cytotoxic behavior as well. In this study, first, the RSLs cytotoxicity was analyzed by two methods, Presto Blue and LDH assay. The toxicity was found to be dependent on the rare sugar part of the RSLs. Secondly, the RSLs’ micelle diameter was measured by zetasizer. We calculated the micelle’s surface area and discovered that the cytotoxicity had a proportional relationship with the micelle size. Therefore, this investigation intends to report the RSLs cytotoxicity mechanism from the perspective of cellular metabolic activity, with focus on the micelle size-cytotoxicity relationship.

Glycolipids, Cytotoxicity, Micelle Structure

講演番号：2D07-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

ドリコールピロリン酸結合型糖鎖を追跡する膜反応場の構築を目指した UDP-GlcNAc プローブの合成

Synthesis of UDP-GlcNAc probe to modify *N*-glycan on artificial liposomes for development of a dolichol-linked oligosaccharides tracking system

○佐野 加苗[1]、菊間 隆志[1]、高橋 諭[2]、石井 希実[2]、松尾 一郎[2]、武田 陽一[1]([1]立命館大学 生命科学部、[2]群馬大学大学院 理工学府)
○Kanae SANO[1], Takashi KIKUMA[1], Satoshi TAKAHASHI[2], Nozomi ISHII[2], Ichiro MATSUO[2], Yoichi TAKEDA[1] ([1]College of life sciences, Ritsumeikan University, [2]Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

新生タンパク質 *N*-グリコシル化のドナー基質であるドリコールピロリン酸結合型糖鎖（Dolichol-linked Oligosaccharides: DLO）は、小胞体膜の細胞質側で形成された後、内腔側へフリップフロップすることが知られている。我々は、フリップフロップのような DLO の膜上反応機構を分子レベルで解明することを目指し、糖鎖プローブを利用して、DLO の挙動を直接的に追跡できる膜反応場の構築を目指している。

DLO の膜反応場を構築する戦略として、人工リポソーム膜に埋め込んだドリコールピロリン酸に対し、化学修飾した糖誘導体を糖転移酵素で修飾する方法を検討した。具体的には、（１）標識化した UDP-*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を利用して *N*-acetylglucosamine-phosphotransferase（DPAGT1）の作用で GlcNAc を修飾し、続いて（２）GlcNAc 一残基を有するオキサゾリン化糖鎖を利用して endo-β-N-acetylglucosaminidase（ENGase）の作用で糖鎖修飾することを検討した。本発表では、（１）に示した DPAGT1 の糖転移反応の基質として、GlcNAc 残基の 2 位をアルキン標識化した UDP-GlcNAc 誘導体を合成した結果を中心に示す。

Dolichol-linked oligosaccharides (DLO), which are precursors of *N*-glycans, flip from the luminal face of the endoplasmic reticulum (ER) into the luminal face during biosynthesis. In order to develop a highly sensitive tracking system of DLO, we proposed a new *N*-glycan modification method against artificial liposomes as well as ER membranes by transglycosylation activity of *N*-acetylglucosamine-phosphotransferase (DPAGT1) and endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase). In this presentation, we mainly report about synthesis of the UDP-GlcNAc probe are used as DPAGT1 substrate.

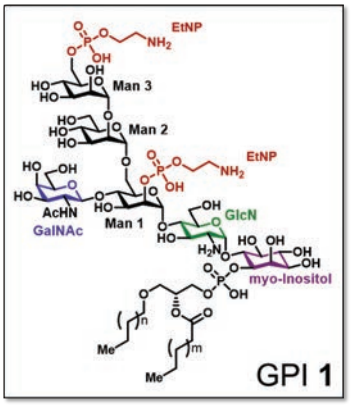
N-glycan, flip flop

講演番号：2D07-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

GalNAc 側鎖を有する哺乳動物 GPI の全合成研究

Synthetic study toward mammalian GPI with GalNAc side-chain

○平塚 諒大[1]、田中 秀則[2,3]、浜島 将伍[1,2]、河村 奈緒子[3]、今村 彰宏[1,2,3]、石田 秀治[1,2,3,4]、安藤弘宗[2,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大院・連合農学、[3]岐阜大・iGCORE、[4]岐阜大・G-CHAIN）
○Ryota HIRATSUKA[1], Hide-Nori TANAKA[2,3], Shogo HAMAJIMA[1,2], Naoko KOMURA[3], Akihiro IMAMURA[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2,3,4], Hiromune ANDO[2,3] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]United Grad. Sci. Agr. Sci., Gifu Univ., [3]iGCORE, Gifu Univ., [4]G-CHAIN, Gifu Univ.)



【背景・目的】グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）は、翻訳後修飾においてタンパク質に付加される糖脂質の一種であり、タンパク質の細胞膜外葉への輸送などに非常に重要な働きをする生体分子である。哺乳類の GPI には側鎖構造(Neu5Acα2-3Galβ1-4GalNAc)の存在が知られているが、その生物学的意義は全く分かっていない。我々は、意義解明の足掛かりを作るため、側鎖の生合成に関わる Gal 転移酵素 B3GALT4 に着目した。B3GALT4 は、スフィンゴ糖脂質 GM1 の生合成酵素として発見されたが、最近 GPI 側鎖生合成でも働くというユニークな性質が見出されている。本研究では、B3GALT4 の酵素学的性質を詳解するため、GalNAc 側鎖を有する GPI **1** の全合成を目的とした。

【方法・結果】脂質部位のアシル鎖を損なわずに最終脱保護を行うため、酸で除去可能な保護基を主に用いた Man1、Man2、Man3、GalNAc の単糖ユニットを合成した。次に Man1 と GalNAc の縮合反応及び Man2 と Man3 の縮合反応を行い、二糖をそれぞれ合成した。最後に[2+2]グリコシル化反応によって四糖を構築した。今後、GlcN-Inositol-リン脂質のビルディングブロックを合成し、四糖との縮合反応に供することで、**1** の全合成を達成する予定である。

Glycosylphosphatidylinositols (GPIs), a family of glycolipids, which are attached to proteins during post-translational modification, play important roles in various biological processes such as the transportation of proteins to the outer plasma membrane. Although the mammalian GPIs are branched with the side chains (Neu5Acα2-3Galβ1-4GalNAc), their biological significances are still unclear. To explore the biology of GPI side chain, we have been focusing on a galactosyltransferase B3GALT4 involved in biosynthesis of the side chain. The initial aim of this study is to synthesize GPI with GalNAc (**1**).

To achieve final deprotection without loss of the acyl moiety in the lipid part, monosaccharide units (Man1, Man2, Man3, GalNAc), mainly protected with acid-labile groups, were prepared. Next, the couplings of Man1 with GalNAc and Man2 with Man3 were performed to give two different disaccharides, respectively. Finally, tetrasacchaide was constructed by [2+2] glycosylation. Total synthesis of **1** will be achieved by coupling with the pesdodisaccharyl lipid part.

GPI, B3GALT4, Total synthesis

発表責任者：田中秀則（htanaka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2D07-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

Rbo5P-3GalNAc の系統的合成と FKRP による Rbo5P 付加

Systematic synthesis of Rbo5P-3GalNAc and the addition of Rbo5P by FKRP

○田村 純一[1]、田村 敬裕[1]、永瀬 真央[2]、真鍋 法義[2]、大野 詩歩[2]、星野 駿介[3]、山口 芳樹[2]、萬谷 博[3]、遠藤 玉夫[3] ([1]鳥取大院・連大農、[2]東北医科薬科大・薬、[3]都健康長寿研・分子機構)
○Junichi Tamura[1], Takahiro Tamura[1], Mao Nagase[2], Noriyoshi Manabe[2], Shiho Ohno[2], Shunsuke Hoshino[3], Yoshiki Yamaguchi[2], Hiroshi Manya[3], Tamao Endo[3] ([1]Tottori Univ., [2]Tohoku Med. Pharm. Univ., [3]Tokyo Metro. Inst. Gerontol.)

近年、筋組織を構成する糖鎖構造が明らかになった。筋肉組織を構築する糖鎖であるコア M3 *O*-マンノシルグリカンは、還元側でジストログリカンに共有結合し、非還元側でマトリグリカンと呼ばれる繰返し糖鎖が高い親和性でラミニンと結合し、筋組織を安定化している。筋ジストロフィー症の多くは、転移酵素をコードする遺伝子の変異や欠損に起因する。福山型筋ジストロフィー症は、コア M3 部分の N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)にリビトールリン酸(RboP)を転移する FKTN をコードする遺伝子が変異している。そこで、転移酵素が機能しない箇所の糖鎖を適切な複合糖質として合成し、外部から供給することで筋組織の再構築が可能になると考えた。今回、異なるアグリコンを持つ Rbo5P-3GalNAc を合成し、二番目の RboP 転移酵素である FKRP の基質となることを検証した。

2-アジド-ガラクトース供与体と HOC_2H_4NHZ を立体選択的に縮合し、3 位水酸基を遊離させた。別途合成したリビトール誘導体を 5 位ホスホネートとしてこの水酸基と縮合させ、酸化を経てリン酸ジエステルとした。この化合物のアジドを選択的に還元して N-アセチルガラクトサミンに変換し、全ての保護基を除去した。最後に、遊離となった末端アミンに 4-ニトロベンゾイルや末端アルキンを有するエチレングリコール鎖を結合させた。いずれの基質にも FKRP により CDP-Rbo を供与体として RboP が転移された。

Recently, total structure of core M3 *O*-mannosyl glycan (MG) composing muscular tissue has been clarified. The core M3 OMG binds with dystroglycan and laminin to stabilize muscular tissue. Many muscular dystrophies are caused by the mutation or genomic deficiency concerning to the corresponding glycosyl transferases. Fukuyama-type muscular dystrophy has mutated *FKTN,* thus defected FKTN cannot transfer ribitol phosphate (PboP) to 3-OH of GalNAc at core M3. Supply of the glycans which could not be synthesized due to the defected transferases may reconstruct the muscular tissues. Here, we report the synthesis of Rbo5P-3GalNAc having different types of aglycons which corresponds to FKTN product to skip the defected step. 2-Azido-galactosyl donor was stereoselectively glycosylated with HOC_2H_4NHZ to give β-galactoside. Liberated 3-OH of $GalN_3$ was coupled with ribitol 5-phosphonate to give phosphate diester after oxidation. Reduction of N_3, N-acetylation and deprotection procedures afforded final Rbo5P-3GalNAcβ1-$OC_2H_4NH_2$ which was equipped with different types of linkers. FKRP transferred RboP to these substrates as expected.

Ribitol phosphate, Glycosylation, Enzymatic elongation

発表責任者：田村純一（jtamura@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2D07-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

ENGase の触媒機構に基づく糖鎖型阻害剤の合成

Synthesis of an inhibitor based on catalytic mechanism of ENGase

○石井 希実、佐藤 樹、高橋 諭、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Nozomi ISHII, Itsuki SATO, Satoshi TAKAHASHI, Ichiro MATSUO (Gunma Univ.)

エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニザーゼ（ENGase）は、糖タンパク質上のアスパラギン結合型糖鎖の還元末端にある GlcNAcβ1-4GlcNAc 構造を切断する糖加水分解酵素である。細胞質に局在する ENGase は不要糖タンパク質糖鎖の代謝を担う酵素の一つであり、糖代謝不全疾患に関わることも示唆されているが、未だ機能の全容は明らかでない。我々は ENGase のさらなる機能解明に向けて、ENGase 阻害剤を開発することとした。ENGase が触媒する糖加水分解反応は *N*-アセチルグルコサミンの 2 位のアセトアミドが関与する基質補助型機構で進行する。そこで、2 位のアセトアミド基をヒドロキシ基に置換することで、ENGase により加水分解されず、阻害剤として働くと考えた。すなわち、アスパラギン結合型糖鎖の還元末端から 2 残基目の *N*-アセチルグルコサミンをグルコース残基に替えた Glc 型 5 糖をデザインした（Fig）。Glc 型 5 糖を合成し、ENGase で処理したところ、ENGase による加水分解を受けないことを確認した。また、ENGase の阻害活性を検証した結果、Glc 型 5 糖が ENGase の糖加水分解反応を阻害することを明らかにした。

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) is an endoglycosidase that hydrolyzes the β1,4-glycosidic bond in the *N*,*N*'-diacetylchitobiose (GlcNAcβ1–4GlcNAc) core of *N*-glycans. Cytosolic ENGase is related to the degradation pathway of free oligosaccharides. However biological roles of ENGase are still not fully understood. To investigate ENGase functions, we developed an inhibitor against ENGase activity. The ENGase-catalyzed reaction is suggested to proceed via a substrate-assisted mechanism through the participation of the 2-acetamido group. Based on this catalytic mechanism, we designed and synthesized an unnatural pentasaccharide with a glucose residue at the subsite -1 position instead of *N*-acetylglucosamine (Fig). The synthetic *gluco*-type pentasaccharide was confirmed that it is not hydrolyzed by ENGase and shows inhibitory activity.

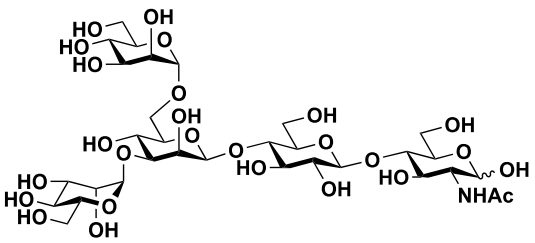


Fig. Structure of *glucose* type inhibitor

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase), inhibitor, synthesis

発表責任者：石井希実（nozomiishii@gunma-u.ac.jp）

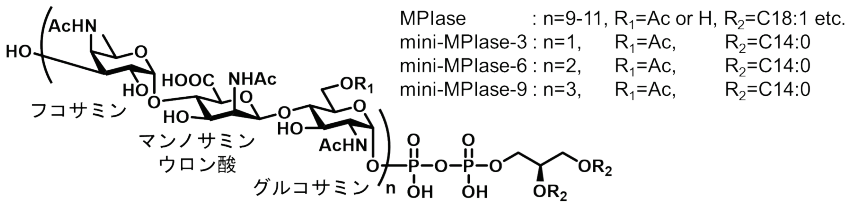
講演番号：2D07-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明を目的とした糖脂質 MPIase 類縁体の合成

Syntheses of glycolipid MPIase derivatives for elucidating the mechanism on membrane protein integration in the inner membrane of *E.coli*

○藤川 紘樹[1]、大澤 月穂[1]、西山 賢一[2]、島本 啓子[1] ([1](公財)サントリー生科財、[2]岩手大農)
○ Kohki FUJIKAWA[1], Tsukiho OSAWA[1], Ken-ichi NISHIYAMA[2], Keiko SHIMAMOTO[1] ([1]SUNTORY Foundation for Life Sciences, [2]Iwate Univ.)

我々は、大腸菌の内膜から大腸菌の膜タンパク質膜挿入に必須な因子 MPIase(Membrane Protein Integrase)を発見し、新規のピロリン酸糖脂質である事を明らかにした。MPIase の作用機構解明を目的に、部分構造である 3 糖ピロリン脂質(mini-MPIase-3)を合成したところ、化学合成した mini-MPIase-3 にも有意な膜タンパク質膜挿入活性が確認でき、糖脂質が活性の本体である事が分かった。本研究では、MPIase に特徴的な官能基や糖鎖長の役割を調べるため、グルコサミン 6 位の Ac 基やカルボキシ基、ピロリン酸構造を改変した mini-MPIase-3 類縁体や 6 糖ピロリン脂質(mini-MPIase-6)、9 糖ピロリン脂質(mini-MPIase-9)の合成に取り組んだ。3 糖単位で糖鎖伸長する戦略を採用し、アクセプターにもドナーにも誘導可能な 3 糖ユニットを設計・合成した。新戦略を用いる事で、化学的に構築が難しい α グルコサミニド結合でユニット間を繋ぐことに成功し、種々の MPIase 類縁体の合成を達成した。



MPIase is a novel pyrophosphoglycolipid, which is an essential factor for membrane protein integration in the inner membrane of *E. coli*. To clarify the mode of action of MPIase, we synthesized a trisaccharyl pyrophospholipid (mini-MPIase-3) as a minimal structural unit of MPIase. Mini-MPIase-3 induced significant integration revealing the glycolipid is an essential substance for the activity. In this study, to investigate the role of the functional groups of MPIase, we worked on syntheses of mini-MPIase-3 derivatives, in which 6-OAc group on GlcNAc, carboxy group, or pyrophosphate structure are modified. In addition, a synthetic strategy for elongating the trisacharide units was designed. A key trisaccharide intermediate was capable of being converted to both an acceptor and a donor. Synthetic difficulties including α-glucosaminylation were overcome by using the novel strategy, and MPIase derivatives possessing a longer glycan (mini-MPIase-6 and mini-MPIase-9) were successfully synthesized.

glycolipid, membrane protein integration, chaperone-like activity

講演番号：2D07-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

タンパク質膜挿入に関与する糖脂質 MPIase の化学合成類縁体を用いた構造機能解析
Structural and functional analysis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration by means of the chemically synthetic derivatives

○韓 裕晶[1]、藤川 紘樹[2]、大澤 月穂[2]、村本 真規[1]、島本 啓子[2]、西山 賢一[1]([1]岩手大農、[2]公益財団法人サントリー生命科学財団)
○ Youjung HAN[1], Kohki FUJIKAWA[2], Tsukiho OSAWA[2], Maki MURAMOTO[1], Keiko SHIMAMOTO[2], Ken-ichi NISHIYAMA[1] ([1]Iwate Univ., [2]Suntory Foundation for Life Sciences)

膜タンパク質は物質輸送やエネルギー生産など、生命維持に重要な役割を果たしている。大腸菌におけるタンパク質膜挿入反応には、SecYEG や YidC などのタンパク質性の因子だけでなく、糖脂質 MPIase (Membrane Protein Integrase)が必須である。MPIase は、GlcNAc、ManNAcA、Fuc4NAc から成る三糖ユニットが約 10 回繰り返した糖鎖とジアシルグリセロール(DAG)がピロリン酸を介して結合した構造となっている。MPIase の構造と機能の関係を解析するため、MPIase の最小機能単位である mini MPIase (n=1)を始め、三糖ユニットの繰り返しの数が異なる mini MPIase(n=2、3)を化学合成し、モデルタンパク質 3L-Pf3 coat を用いて膜挿入活性を調べた。その結果、糖鎖ユニットが長くなるにつれて膜挿入活性も増加した。また、GlcNAc の *O*-アセチル基と ManNAcA のカルボン酸が膜挿入反応に重要であることが示された。さらに、DAG 欠く三糖ユニットにリン酸が結合した誘導体(Sac-P (n=1)、Sac-P (n=2)、Sac-P (n=3))を化学合成した。膜挿入反応に Sac-P (n=3)を加えると膜タンパク質の凝集が抑制され、膜挿入活性が大幅に上昇したが、Sac-P (n=1)、Sac-P (n=2)を加えても膜挿入活性は変化しなかった。これより、基質膜タンパク質を可溶化するには糖鎖ユニットの n=3 以上の繰り返しが必要であることが判明した。

Membrane proteins play an important role in survival of organisms by transporting materials or producing energy. In *E. coli*, not only proteinaceous factors such as SecYEG or YidC, but also glycolipid MPIase (Membrane Protein Integrase) are involved in membrane protein integration. MPIase has ~10 trisaccharide units, each of which is comprised of GlcNAc, ManNAcA and Fuc4NAc, which is connected to diacylglycerol (DAG) through a pyrophosphate linker. To analyze structure-function relationship of MPIase, we chemically synthesized mini-MPIase (n=2 and 3), in addition to mini MPIase (n=1), a minimal functional unit of MPIase. We examined the activities toward membrane protein integration by using a model substrate, 3L-Pf3 coat. We found that the longer trisaccharide units have the higher integration activities. We then examined the integration activities of derivatives, in which some characteristic residues were modified. We found that the both *O*-acetyl residue in GlcNAc and the carboxyl residue in ManNAcA are important for integration. Moreover, we synthesized some derivatives that lacks DAG in mini-MPIase (Sac-P (n=1~3)). Sac-P (n=3) significantly stimulated integration by solubilizing 3L-Pf3 coat when added in the integration reactions, while both SacP (n=1) and Sac-P (n=2) did not affect the integration activities. These results indicate that more than 3 trisaccharide units are necessary to prevent aggregation of substrate membrane proteins and to solubilize them.

Membrane protein integration, Glycolipid, Reconstitution

発表責任者：韓裕晶（a0218036@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2D07-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

ルイス a 抗原含有型および液胞型植物抗原性糖鎖ポリマーの合成と樹状細胞の抗原提示抑制解析

Synthesis of glycopolymers carrying Lewis a antigen-containing plant antigenic *N*-glycans or vacuolar type ones and functional analysis of the glycopolymers on the antigen-presentation mechanism of dendritic cells

○蓮井 泉帆、木村 吉伸、前田 恵（岡大環境生命）
○Mizuho HASUI, Yoshinobu KIMURA, Megumi MAEDA (Okayama Univ.)

【目的】日本スギ・ヒノキ花粉アレルゲン (Cry j1・Cha o3) は植物抗原性糖鎖を発現し，約半数はルイス a 抗原を含む構造である[1, 2]。また，ルイス a 抗原含有糖鎖を結合させた糖鎖ポリマーが，樹状細胞様細胞の HLA-DR（MHC クラスⅡ分子）の発現を濃度依存的に抑制することが示された[3]。本研究では，この結果が植物抗原性糖鎖のどの構造に起因するのか明らかにするために，ルイス a 抗原含有糖鎖，コア構造である $Man_3Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$ (M3FX) ，Xyl 残基が露出した $Man_2Xyl_1Fuc_1GlcNAc_2$ (M2FX) をそれぞれ主要構造として結合させた 3 種類の糖鎖ポリマーを作製し，抗原提示の抑制について解析を試みた。【方法・結果】ルイス a 抗原含有糖鎖，M3FX および M2FX を主要構造として有する糖ペプチドを, それぞれオオカナダモ, 銀杏種子貯蔵タンパク質, サトイモ貯蔵タンパク質から，各種プロテアーゼ消化，イオン交換，ゲルろ過，逆相・親水性クロマトを組み合わせて精製した。得られた糖ペプチドのアミノ基を，ポリ-γ-L-グルタミン酸のカルボキシ基に縮合させることで糖鎖ポリマーの合成を行った[4]。樹状細胞様細胞は，ヒト単球性細胞株 THP-1 を PMA と IL-4 の存在下で誘導し，糖鎖ポリマー刺激後の HLA-DR 発現をフローサイトメトリーにより解析する予定である。

Plant antigenic *N*-glycans containing Lewis a antigen(s) occur in Japanese cedar/cypress pollen allergens[1, 2]. We have already reported that glycopolymers carrying multivalent plant antigenic *N*-glycans containing Lewis a antigens suppressed the expression of HLA-DR (one of MHC class II molecules) of dendritic cell-like cells in a dose-dependent manner[3]. In this study, to clarify what structural feature(s) of the plant antigenic *N*-glycans lead to this result, we prepared three types of glycopolymers carrying multivalent plant antigenic *N*-glycans and analyzed the effect of plant *N*-glycans on the suppression of antigen presentation. The glycopeptides containing Lewis a antigen-containing *N*-glycan, M3FX and M2FX, as the major structures, were purified from the proteins of *Egeria densa*, the storage proteins of *Ginkgo biloba* seeds and taro, respectively, by a combination of protease digestion, ion exchange, gel filtration, and reversed-phase/hydrophilic chromatography. Glycopolymers were prepared by condensing the amino groups of glycopeptides with the carboxy groups of poly-γ-L-glutamic acid [4]. The expression of HLA-DR in dendritic cell-like cells, which was derived from human monocytic cell line THP-1, in the presence of glycopolymers will be discussed.

[1] Maeda, M., *et al., B. B. B.*, **69**, 1700-1705 (2005); [2] Osada, T., *et al., Carbohydr. Res.*, **448**, 18-23 (2017);
[3] Maeda, M., *et al., Glycoconj. J.*, **36**, 343 (2019); [4] Takeda, N., *et al., Int. J.B.Macromol.*, **147**, 1294-1300 (2020)

plant antigenic *N*-glycans, glycopolymers, pollinosis

発表責任者：蓮井　泉帆（puhg1pbz@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：2D07-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

ミクログリア細胞にヒト特異的な発現をする Siglec-11 の解析

Molecular properties of Siglec-11, a potential human-specific receptor for brain polySia

○羽根 正弥[1,2,3,4]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3]、ヴァルキ アジト[4]（[1]名大・糖鎖生命コア、[2]名大院・生命農、[3]名大・生物機能セ、[4]UCSD, CMM）
○Masaya HANE[1,2,3,4], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3], Ajit VARKI[4] ([1]iGCORE, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [4]CMM, UCSD)

Siglecs はシアル酸を含む糖鎖を認識するレクチン様分子である。Siglec は広く保存された古典的 Siglec および、種間で多様性を持つ CD 33 類似 Siglec に大別される。Siglec-11 は CD 33 類似 Siglec の一つであり、霊長類において組織マクロファージに発現し、加えて脳ではヒト特異的にミクログリアに variant を発現している。Siglec-11 のリガンドとしてポリシアル酸（polySia）が同定されており、この相互作用は脳において抗炎症作用を促進することが報告されている。polySia は、シアル酸のホモポリマーであり、脳において時・空間特異的な発現しており、その構造の破綻は精神疾患や神経変性疾患と関わることから、脳機能の制御に重要である。この様に、Siglec-11 はその機能や発現に関する報告はあるが、分子そのものの性質の詳細な解析は行われていなかった。そこで、我々は Siglec-11 の性質を解析することを目的とし、多量体形成、翻訳後修飾に着目し、解析を行った。その結果、Siglec-11 は多量体を形成すること、脂質修飾を受けること、*N*型糖鎖が安定性に関わることがわかった。また、解析の過程で、マクロファージ型の Siglec-11 は、細胞外ドメインの膜貫通部近位でプロテアーゼにより切り出され、ミクログリア型 Siglec-11 は、細胞外ドメインが露出したエクソソームとして分泌されることが明らかになった。これらの結果から、マクロファージ型およびミクログリア型 Siglec-11 は多量体形成や脂質修飾の共通性が見出された。一方、ミクログリア型のみエクソソームとして分泌されることから、ヒト特異的に脳内に polySia 結合能を持つミクログリア細胞が存在するだけでなく、polySia 結合能を持つエクソソームが分泌されていると考えられ、ヒトの脳機能に広く影響を与えていることが示唆された。

Siglecs are a family of cell surface lectins that recognize sialic acid containing ligands. CD33-related Siglecs are a subgroup of the Siglecs that is often found on innate immune cells. One of the CD33-related Siglecs, Siglec-11 is expressed on microglia in human but not in chimpanzee brain. Siglec-11 specifically recognizes polysialic acid, a homopolymer of sialic acid that is expressed in embryonic brains and distinct regions of adult brains where neurogenesis is ongoing and modulate neurotoxicity of microglia. Despite these reported functions and human-specific expression in the brain, little is known about the molecular properties of Siglec-11. We investigated the properties of human and chimpanzee Siglec-11. The results indicate that the uniquely human expression of Siglec-11 in microglia is accompanied by secretion as exosomes, suggesting that it might affect brain functions in human. [Hane M. et al., Glycobiology. 31: 231–242. (2021)]

Siglec, Exosome, polysialic acid

講演番号：2D07-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム D

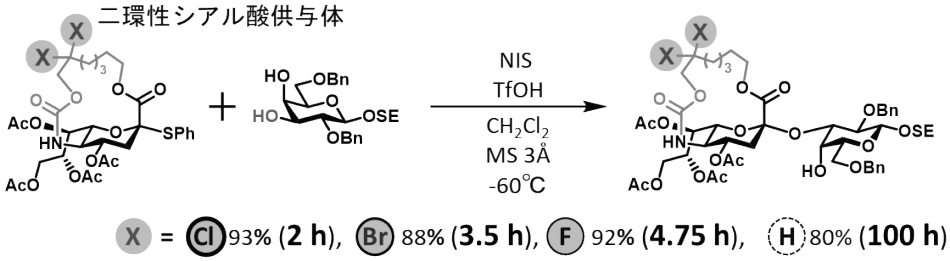
架橋部ハロゲン置換が二環性シアル酸供与体の反応性にもたらす効果の検証

Examination of the influence of halogen-substituents in the tether part on the reactivity of macrobicyclic sialic acid donors

○安武 作真[1]、河村 奈緒子[2]、宇田川 太郎[3]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2,4]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・iGCORE、[3]岐阜大・工、[4]岐阜大・G-CHAIN)
○Sakuma YASUTAKE[1], Naoko KOMURA[2], Taro UDAGAWA[3], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,4], Hiromune ANDO[2] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Cehmistry, Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ., [3]Dept. of Chemistry and Biomolecular Science, Gifu Univ., [4]G-CHAIN, Gifu Univ.)

シアル酸含有糖鎖は細胞膜上でシグナル伝達を担う重要な生体分子である。その機能を解明するため、シアル酸含有糖鎖の効率的化学合成法が必要とされてきた。近年、当研究室で、シアル酸の完全な立体選択的グリコシド化法を開発した[1]。本手法で用いる二環性シアル酸供与体はシアル酸のＣ１位とＣ５位をβ側で架橋した構造を有し、これがα–グリコシドのみの合成に寄与する。しかしながら、二環性供与体の反応性に関する知見は未だ十分に得られていない。本研究では架橋部のハロゲン置換基に着目し、これが供与体の反応性に及ぼす影響を検証した。二環性供与体には、活性化剤のカチオンを捕捉する可能性のある求核性のカーバメート基がある。その近傍をハロゲン置換した供与体は、ハロゲンの誘起効果によりカーバメートの求核性が抑えられることで、高い反応性を示すと予想した。そこで、三種のハロゲン置換体（Cl 体、Br 体、F 体）および無置換体（H 体）をグリコシド化反応に供することで供与体の反応性を比較した。その結果、無置換体と比較し、全てのハロゲン置換体が優れた反応性を示すことを明らかにした。続いて、各供与体の DFT 計算を行った結果、ハロゲン置換体のカーバメート基の求核性が無置換体よりも低いことが示唆された。以上より、二環性供与体の反応性とカーバメート基の求核性の相関が示された。

The chemical synthesis of sialoglycans has been required to elucidate their biological functions. Recently, we have developed a fully α-selective glycosidation of sialic acids using bicyclic sialic acid donors, in which C1 and C5 positions were tethered with an alkyl linker [1]. In this study, we focused on the influence of halogen substituents in the tether moiety on the reactivity of bicyclic donors. For this purpose, dichloro- (Cl), dibromo- (Br), difluoro- (F), and unsubstituted (H) donors were subjected to glycosidation reactions, respectively. As a result, the halogen-substituted donors showed significantly higher reactivities than the unsubstituted one. The DFT calculations of these donors suggested correlations between the reactivity of donors and the carbamate nucleophilicities of each of the donors.



[1] N. Komura *et al*. *Science* **2019**, *364*, 677–680.

sialoglycan, glycosylation, α-sialylation

発表責任者：安藤 弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2D09-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

細胞評価及び動物行動試験評価を用いた新規塩味ペプチドの発見

Discovery of novel salty peptides using cell evaluation and animal behavioral test

○竹内 友里、池田 彩、秋山 裕和、清水 一憲、本多 裕之（名大院工）
○Yuri TAKEUCHI, Aya IKEDA, Hirokazu AKIYAMA, Kazunori SHIMIZU, Hiroyuki HONDA (Nagoya Univ.)

近年、減塩の手段として塩味増強・代替物質が注目されている。しかし、既報の塩味物質にはえぐみや渋みが含まれ、塩味増強ペプチドには増強効果が弱いといった課題があり、新たな塩味物質が求められている。本研究では、塩味を評価できる細胞・動物実験評価系を構築し、既報の塩味ペプチドを残基伸長することで新規塩味ペプチドの探索を試みた。まず、塩味受容体 ENaC を一過性に発現した HEK293 細胞を作製し、カルシウムイメージングによって塩味を評価する評価系を構築した。次に、その細胞評価系で伸長ペプチドの評価を行った。最後に、取得した塩味ペプチドの活性を、マウスを使った二瓶選択実験で評価した。細胞評価の結果、NVRA というペプチドが高活性であった。NVRA は既報の塩味ペプチドで最も活性の高い WW の 1.5 倍の活性を持つことがわかった。続いて、NVRA の塩味を C57BL/6J マウスを用いた二瓶選択実験で評価した。その結果、NVRA 水溶液は 30 mM NaCl と同等の嗜好性を示し、30 mM NaCl に NVRA を添加すると嗜好性が上昇する傾向を示した。NVRA の残基置換体を評価することで、食品由来ペプチドの探索を行ったところ、大豆タンパク質由来の NGRA にも活性があることが判明した。

Recently, salty enhancers have been attracted to reduce the salt intake. However, salty substances previously reported show bad taste such as harsh or astringent taste and salty dipeptides previously reported have a weak enhancing effect, so new salty substances are strongly desirable. In this study, we constructed a cell/animal experimental evaluation system to evaluate a saltiness and find novel saltiness peptides by extending the salty dipeptides previously reported. First, we generated HEK293 cells expressing ENaC to assess a salty taste by a calcium imaging. Next, we evaluated the residue-extending peptides in the assay system and identified NVRA as a new salty peptide. Finally, the saltiness of the salty tetrapeptides was evaluated in a two-bottle selection experiment using C57BL/6J mice. From the results of the cell evaluation, it was found that NVRA was highly active; NVRA was 1.5 times more active than the most active salty dipeptide previously reported (WW). From the two-bottle selection experiment, it was also found that NVRA showed similar preference compared with 30mM NaCl. When the NVRA substituents was assessed to explore salty peptides from food protein, it was found that NGRA from soybean was an active salty peptide.

peptides, ENaC, salty enhancer

発表責任者：本多裕之（honda@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2D09-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

シリカゲル吸脱着法による米タンパク質由来抗菌ペプチドの迅速探索

Antimicrobial peptides from rice endosperm protein identified easily by silica gel adsorption

○本多 裕之[1]、羽川 瞳[1]、今井 健人[1]、谷口 正之[2]、秋山 裕和[1]、清水 一憲[1]([1]名大工、[2]新潟青陵大)

○ Hiroyuki HONDA[1], HITOMI HAGAWA[1], KENTO IMAI[1], MASAYUKI TANIGUCHI[2], HIROKAZU AKIYAMA[1], KAZUNORI SHIMIZU[1] ([1]Nagoya University, [2]Niigata Seiryo University)

食品や化粧品分野で、身体の機能や状態にプラスの影響を与える生理活性中分子としてタンパク質断片から製品化した生理活性ペプチドが注目されている。しかし、その探索や製品化には、タンパク質の精製、酵素分解、分離分画、活性評価と多段階の工程が必要になる。我々は、分子標的性を示す化学官能基を用いず、無垢の多孔性シリカゲルを高温焼成するだけで、特定のペプチドを濃縮できる担体（HT-silica）の開発に成功した。この担体は、中性条件で塩基性ペプチドを吸着し、酸性条件で疎水性ペプチドを吸着する。このため例えば中性条件で、苦味ペプチドを吸着除去できる[1)]。今回、米タンパク質のペプシン加水分解物を、中性条件下で HT-silica と混合し、酸性条件下、エタノールおよび塩添加で溶出させたところ、アクネ菌に抗菌活性を示すペプチド混合物を得ることに成功した。この混合物を質量分析で解析した結果、いずれも新規の 5 種類の抗菌ペプチドの特定に成功した。そのうちの 2 種類はアクネ菌だけでなく、歯周病菌、う蝕原因菌、大腸菌に対しても抗菌活性を示した。また、これらはいずれもグルテリン由来の配列で塩基性アミノ酸を 4 つもつ 27 残基ペプチドであり、分子シミュレーションの結果、β シート構造が示唆された。

Bioactive peptides provide health benefits to consumers, and many bioactive pep-tides have been identified from protein sources such as milk, plant seed, seafood etc. The basic approach to identify bioactive peptides proceeds as follows: protein extraction, isolation, enzymatic hydrolysis, peptide purification, and verification of bioactivity. This conventional method is laborious and time-consuming due to the trial-and-error process. Previously we developed heat-treated (HT) porous silica gel so as to be able to adsorb decided characteristic peptides; basic peptides for neutral pH and hydrophobic peptides for acidic pH. Therefore, bitter peptides have been removed from peptide mixture under neutral pH by selective adsorption[1)]. In the present paper, after pepsin hydrolysis of rice endosperm protein, the resultant was mixed with HT-silica gel under neutral pH, and then the desorption was carried out using releasing solution containing ethanol and NaCl at pH2. The peptide mixture obtained by adsorption / desorption treatment was found to be the antimicrobial activity for Cutibacterium acnes. After MS analysis, we identified 5 novel antimicrobial peptides. Two of them, 27-mer peptides from glutelin type-B, showed a broad spectrum. Those have positive charge and were suggested to have β-sheet structure.

Reference 1) Imai, et al., Food Sci. Technol. Res., 25(2), 179-186 (2019)

Peptide, Antimicrobial activity, Silica gel

発表責任者：本多裕之（honda@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2D09-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

ヒトとそのオルソログが有する cathelicidin ファミリー抗菌ペプチドに対する NMR 法を用いた構造・機能解析のための新規カルモジュリン融合発現系による大量発現

Structural and functional analysis of primate cathelicidin using NMR and overexpression of these peptides by novel calmodulin fusion system

○柴垣 光希[1]、上田 和佳[1]、加納 康平[2]、谷 昊[2]、相沢 智康[3] ([1]北海道大理、[2]北海道大院生命科学、[3]北海道大院先端生命科学)
○MITSUKI SHIBAGAKI[1], WAKA UEDA[1], KOHEI KANO[2], HAO GU[2], TOMOYASU AIZAWA[3] ([1]School of science, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of science, Hokkaido Univ., [3]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido Univ.)

ヒト由来抗菌ペプチド LL-37 は、脊椎動物に広く保存される cathelicidin ファミリーに属している。このファミリーに属する抗菌ペプチドは、共通の相同性の高い前駆体構造を有するが、成熟型の活性部位は LL-37 が分類されるα-helix 型の他、β-sheet 型やランダム型等の様々な立体構造を持ち、1 つの種が多様なパラログを有することもある。一方、ヒトを含む霊長類ではただ一つの helical タイプの分子しか有さない。また、これらの霊長類オルソログは、近縁種でも配列の保存性が低く(Fig. 1)、CD 分光法などを用いた構造や活性の差異についての議論が行われている。しかし、NMR 法などを用いた原子分解能での議論は不十分である。そこで本研究では、LL-37 とそのヒト近縁種のオルソログを、我々のグループが開発した新規のカルモジュリン融合での大腸菌発現系を用いて大量発現させ、安定同位体標識による NMR 法での構造・相互作用解析を進めることを目的としている。今回は、目的ペプチドの大量発現と、現在取り組んでいる構造・機能相関解析の結果について発表する。

The human LL-37 is an antimicrobial peptide which has an α-helical structure. This peptide belongs to the cathelicidin family, which is widely conserved in vertebrates. Cathelicidin family peptides have a variety of structures, and one species may have paralogs. However, primates, including humans, have only one helical-type molecule. Despite their structural similarity, the amino acid sequences of these primate orthologs are not well conserved (Fig. 1), so some groups discuss the differences in structure and activity. Structural analysis by CD and peptide-membrane interaction was reported, but there has been insufficient discussion at atomic resolution using NMR and other techniques. In this study, we aimed to overexpressed LL-37 and its orthologs using a novel calmodulin fusion overexpression system and to perform structural and functional analyses using high-resolution NMR with ^{15}N and ^{13}C labeled peptides. In this presentation, we will show the results of the expression of the target peptides and the structure-function relationship analysis that we are currently working on.

```
LL-37     (Homo sapiens)          LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES  37
mmuRL-37  (Macaca mulatta)        RLGNFFRKVKEKIGGGLKKVGQKIKDFLGNLVPRTAS  37
cjaRL-37  (Callithrix jacchus)    RLGDILQKAREKIEGGLKKLVQKIKDFFGKFAPRTES  37
                                   **:::* :***   :*:: *:****: ::.*** *
```

Fig. 1. The sequence alignment of LL-37 and its orthologs carried out by Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). The origin of the abbreviations is underlined.

antimicrobial peptide, nmr, overexpression

発表責任者：柴垣光希（humickey409@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：2D09-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

ε-poly-L-lysine による CPP 修飾タンパク質の細胞内送達促進

Promotion of intracellular delivery of CPP-modified protein by ε-poly-L-lysine

○武内 大和、長谷部 文人、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大院生物資源）
○Yamato TAKEUCHI, Fumihito HASEBE, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

細胞膜透過性ペプチド（CPP）は様々な分子サイズの化合物を細胞内に送達するツールとして注目されている。その中でも 8 残基のアルギニンから成るオクタアルギニンペプチド（R8）は基礎研究において汎用されている。しかし、R8 修飾したタンパク質は、エンドサイトーシスなどの能動的な経路によって取り込まれるため、タンパク質が機能発現するにはエンドソームからの脱出が不可欠である。これまでに、我々は微生物由来のポリカチオン性ペプチドである ε-poly-L-lysine（ε-PL）が高い細胞膜透過性を示すことを明らかにしており、ε-PL が R8 修飾したタンパク質の細胞膜直接透過を助ける促進剤として利用できると期待した。

蛍光色素と ε-PL（ε-PL-FAM）、緑色蛍光タンパク質と ε-PL（ε-PL-mAG）のコンジュゲートを促進剤として、赤色蛍光タンパク質と R8 のコンジュゲート（R8-mKO）と共に HeLa 細胞に処理し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。R8-mKO のみで処理した場合、細胞内に顆粒状のシグナルが観察され、エンドソームからリリースされていないことを確認した。ε-PL と ε-PL-FAM を添加した場合にも R8-mKO は顆粒状であったが、ε-PL-mAG を添加した場合、細胞質全体に R8-mKO が拡散した。すなわち、予想通り ε-PL-mAG が R8-mKO の細胞膜直接透過を促進することを明らかにした。

Cell-penetrating peptide (CPP) is spot-lighted as a potent tool for drug delivery, and octa-arginine peptide (R8) is often used as a CPP. R8-protein conjugates employ the energy-dependent pathway such as endocytosis or/and micropinocytosis to enter cells. Therefore, the conjugates need to escape from endosomal to cytosol to exert their function. Recently, we demonstrated that a bacterial polycationic peptide, ε-poly-L-lysine (ε-PL), has cell-penetrating activity and can delivery proteins *via* direct penetration pathway. This finding allowed us to hypothesize that ε-PL can promote the direct penetration of R8-protein conjugate.

To address this hypothesis, HeLa cells were treated with R8-protein conjugate (R8-mKO) for 60 min at 37 ˚C together with intact ε-PL, ε-PL-fluorescent dye conjugate (ε-PL-FAM), or ε-PL-protein conjugate (ε-PL-mAG). After incubation, we carried out confocal microscopic observation. In R8-mKO treatment, R8-mKO was observed as punctate signals, suggesting the endosomal trapping of R8-mKO. Although the endosomal escape was not improved by addition of ε-PL or ε-PL-FAM, R8-mKO was diffused by treatment with ε-PL-mAG. This result demonstrated that ε-PL-mAG can promote the direct penetration of R8-mKO.

Cell-penetrating peptide, ε-poly-L-lysine, Protein

講演番号：2D09-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

ペプチド抗原タグ付き一本鎖 Fv 抗体の発現と構造機能解析

Expression of single-chain Fv antibody covalently linked to antigen peptides and its structural and functional evaluation

○織田 昌幸、林 隆宏（京府大院生環）
○Masayuki ODA, Takahiro HAYASHI (Kyoto Pref. Univ.)

ニワトリプリオンタンパク質断片(ChPrP)を免疫することにより得られたモノクローナル抗体の G2 は、免疫原以外の複数のタンパク質とも反応した。それぞれのタンパク質上のエピトープ配列 4 種類を比較した結果、相互のアミノ酸配列に相同性はなく、何れに対しても特異的に結合することが明らかとなった[1,2]。この特徴的な抗原認識機構を解明するため、G2 の一本鎖 Fv 抗体（scFv)の大腸菌発現系を構築し、さらにその N 端部にリンカーを介して各抗原ペプチドを繋げた G2 scFv を作製した[3,4]。本研究では、G2 scFv の構造や抗原認識機構を解明するとともに、各抗原ペプチドを分子内付加（タグ化）することによる scFv への安定化効果や、構造解析への有用性を示すことを目的とした。

円二色性分散（CD)、示差走査熱量計（DSC）を用いた熱安定性解析の結果、分子内への抗原ペプチドの導入により、G2 scFv の熱安定性は上昇し、この安定化の効果は、単離した抗原ペプチドを加えた場合よりも顕著であった[4]。この安定化は結晶化にも効果的で、免疫原のペプチドエピトープ(Pep18mer）付加体 G2 scFv の高分解能結晶構造の取得に成功した。Pep18mer の結合構造は、ChPrP 該当部分の立体構造と類似した特徴的なループ構造を形成し、ループ先端部分が抗体のポケットに収まるような認識モチーフで、これは表面プラズモン共鳴（SPR)や等温滴定熱量計（ITC)で得られた結合特性とも相関づけられた。また一般論としてペプチド免疫する場合に、親タンパク質の立体構造を考慮したペプチドデザインの有効性も示唆された。

The monoclonal antibody G2 specifically recognizes different peptides [1,2]. The single-chain Fv (scFv) antibodies of G2 covalently linked to antigen peptides via a flexible linker were expressed in *Escherichia coli* and purified [3,4]. The thermal stabilities of peptide-linked G2 scFvs were higher than those of antigen-free G2 scFv in the absence or presence of peptides. The present method to covalently link the peptide could contribute to the stable complex structure, enabling us to solve the crystal structure. The bound conformation of peptide was similar to its 3D structure in the parent protein. The results also indicate the useful method of peptide design to generate the anti-peptide antibody.

[1] Kamatari *et al*. Protein Sci. 23, 1050, 2014. [2] Mahmud *et al*. Protein Sci. 26, 2162, 2017. [3] Usui *et al*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 490, 1205, 2017. [4] Hayashi *et al*. Anal. Biochem. 629, 114312, 2021.

antibody, molecular recognition, structure and function

発表責任者：織田 昌幸（oda@kpu.ac.jp）

講演番号：2D09-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

バイオミネラルタンパク質の low complexity region の構造、機能解析

Structure and function analysis of low complexity region of biomineral proteins

○二川 慶[1]、森岡 太一[1]、池谷 鉄兵[2]、降旗 一夫[1]、渡辺 裕之[1]、永田 宏次[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大農、[2]東京都立大院理)
○Kei Futagawa[1], Taichi Morioka[1], Teppei Ikeya[2], Kazuo Furihata[1], Hiroyuki Watanabe[1], Kouji Nagata[1], Michio Suzuki[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Metropolitan Univ.)

アコヤガイ貝殻は炭酸カルシウム ($CaCO_3$) を主成分とするバイオミネラルである。外側が稜柱層、内側が真珠層という異なる結晶多形から構成され、貝殻内の有機物が $CaCO_3$ 結晶の微細構造を形成すると考えられている。真珠層の酸不溶性成分から抽出されたタンパク質（Pif80）はアラゴナイト結晶と特異的に結合する DDRK という酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の繰り返し配列を有し、二枚貝を繋ぐ靭帯部分には MMMKPD という Met リッチなタンパク質の繰り返し配列である low complexity region が存在している。本研究では DDRKDDRKGG 及び N 末端の G に変更した GDDRKDDRKG、Met リッチタンパク質に含まれる MMMKPDMMM、MMMKED といった合成ペプチドを用いて low complexity region と炭酸カルシウムとの相互作用を解析することとした。

核磁気共鳴法（NMR）を用いて合成ペプチドの構造決定を行った。その結果、DDRKDDRKGG の場合は N 末端の Asp の側鎖のカルボキシ基が、他の Asp の側鎖と異なる平面上に存在していたのに対し、GDDRKDDRKG の場合は Asp の側鎖のカルボキシ基 4 つが同一平面上に存在し、それを塩基性残基である Arg と Lys が支えているような構造をとることが明らかになった。これにより、Asp の側鎖のカルボキシ基が $CaCO_3$ 結晶内に入り込み、相互作用することで、アラゴナイト結晶形成に寄与する可能性がより強く示唆された。また、MMMKPDMMM と MMMKPD ではいずれも主鎖が螺旋状の構造をとっており、外側に露呈した親水性残基が $CaCO_3$ と相互作用して構造形成に寄与する可能性が示唆された。さらに、*in vitro* で合成ペプチドの有無で $CaCO_3$ 結晶形成実験を行った。走査型電子顕微鏡（SEM）、 Image J での結晶長測定の結果、合成ペプチドは $CaCO_3$ の表面への結合の強さに応じて、結晶の細長さやサイズ、形状保持時間に影響を与えることが明らかとなった。

これらの研究結果から、アコヤガイに含まれる low complexity region が $CaCO_3$ 結晶の成長を抑制し、結晶保持に寄与していることが分子レベルで明らかになった。

Pif80, a protein extracted from the insoluble component of the nacreous layer of *Pinctada fucata,* contains repeat domains of acidic and basic amino acids called DDRK that specifically binds to aragonite crystals. On the other hand, Met-rich protein called LMP from the ligament of *P. fucata*, has the repeat sequence of MMMKPD. The 3D-structure of synthetic peptides from such low-complexity regions with CaCO3 solution was determined using NMR. These results suggested that the acidic residues were oriented to the surface of CaCO3 and control the crystallization in the biominerals

Low complexity region, Pif80, Pinctada fucata

発表責任者：二川慶（keif3512507hand@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D09-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

溶液散乱法によるダイズ種子貯蔵タンパク質の構造解析

Structural analysis of soybean seed storage protein by small angle scattering

○奥田 綾、佐藤 信浩、守島 健、井上 倫太郎、清水 将裕、柚木 康弘、杉山 正明、裏出 令子（京大複合研）
○ Aya OKUDA, Nobuhiro SATO, Ken MORISHIMA, Rintaro INOUE, Masahiro SHIMIZU, Yasuhiro YUNOKI, Masaaki SUGIYAMA, Reiko URADE (KURNS)

ダイズの主要種子貯蔵タンパク質であるグリシニン(11S)およびβ-コングリシニン(7S)は、ゲル化や乳化といった優れた食品加工特性を持つ。通常、食品中では加工に伴う加熱・変性によりタンパク質が凝集し、ジスルフィド結合や非共有的な分子間相互作用を伴って複雑な構造を形成している。結晶構造では 11S は六量体、7S は三量体を形成することが明らかとなっているが、結晶構造はパッキングされた単一の構造であるため、食品加工時の構造を反映していない。そこで、物質の状態（個体・液体）に関わらずナノスケールの構造観察が可能な X 線小角散乱(SAXS)法により 11S および 7S の構造観察を試みた。まずは精製過程の改良を行い、散乱実験に適した高純度のリコンビナント pro11SA1aB1b および pro7Sα'を調製した。これらを SAXS 測定に供試すると、NaCl を含む溶液中において非変性状態では三量体を基本構造とした不均一な複合体混合物として存在していることが明らかとなった。さらに、pro11S と pro7S が形成する超複合体の構造解析のために、複合体中の個々のタンパク質の構造が観察可能なコントラスト同調中性子小角散乱(SANS)の測定を計画している。そのために必要な重水素ラベルタンパク質試料調製技術の開発についても紹介したい。

The major seed storage proteins of soybean, glycinin (11S) and ß-conglycinin (7S), have remarkable food processing properties such as gelation and emulsification. During food processing, the proteins aggregate due to heating and denaturation and form complexes with disulfide bonds and non-covalent intermolecular interactions. Crystallographic study shows that 11S and 7S form a hexamer and a trimer, respectively. However, those do not represent the structures during food processing because they are packed in crystals. In this study, we examined the structures with small-angle X-ray scattering (SAXS), which observes a nanoscale structure regardless of the status of the sample (solid or liquid). Using the highly purified recombinant pro11SA1aB1b and pro7Sα', the SAXS measurements revealed that, in a non-denatured state, both of them form the trimer mainly in a buffer containing NaCl. In addition, we planned inverse contrast matching small-angle neutron scattering (iCM-SANS) measurement for the structural analysis of the super-complex formed with pro11S and pro7S. We will also introduce the development of deuterated protein preparation techniques for this method.

Soybean, Glycinin, ß-conglycinin

講演番号：2D09-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

麹菌由来界面活性タンパク質 hydrophobin RolA の微細な表面構造観察
Detailed surface structure analysis of self-assembled structures of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA

○高橋 尚央[1]、寺内 裕貴[2]、吉見 啓[3]、田中 拓未[4]、三ツ石 方也[5]、石崎 裕也[5]、藪 浩[6,7]、阿部 敬悦[8] ([1]東北大農、[2]京大院地球環境学堂、[3]京大院農、[4]農研機構、[5]東北大院工、[6]東北大 AIMR、[7]東北大多元、[8]東北大院農)
○Nao Takahashi[1], Yuki Terauchi[2], Akira Yoshimi[3], Takumi Tanaka[4], Masaya Mitsuishi[5], Yuya Ishizaki[5], Hiroshi Yabu[6,7], Keietsu Abe[8] ([1]Agric., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Glob. Env. Stud, Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]NARO・NIAES, [5]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [6]WPI-AIMR, Tohoku Univ., [7]IMRAM, Tohoku Univ., [8]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* が分泌する hydrophobin（Hyp）RolA は分生子や気中菌糸表面に局在する低分子量の界面活性タンパク質である。RolA を含む Hyp は多様な生物学的機能を有し，例えば，胞子への気中飛散性の付与や疎水性固体表面の被覆，Hyp 被覆膜による高分子分解酵素のリクルートと固体基質の分解促進といった機能が知られている。RolA は固体表面に吸着した後，rodlet と呼ばれる β - amyloid 様の棒状構造で構成された薄膜を形成する。現在までに我々は，気液界面を圧縮して自己組織化を促す Langmuir 膜（L 膜）作製装置を用いた RolA 自己組織化膜の作製・制御，原子間力顕微鏡（AFM）を用いた自己組織化構造の観察を行い，RolA の気液界面での膜構造モデルを明らかにしてきた。本報告では，L 膜作製法よりも自然状態に近い自己組織化過程での RolA 自己組織化構造の解明を目指し，RolA 溶液の液滴を用いて自己組織化膜を作製した（液滴法）。AFM 観察の結果，液滴法で得られた自己組織化膜は L 膜よりも厚く，起伏の激しい構造であった。また，液滴法により形成される RolA 自己組織化膜では，個々の自己組織化構造の長さと液滴保持時間に相関が認められた。現在，RolA の濃度，pH，温度が自己組織化構造の伸長に与える影響について解析中である。

Hydrophobin RolA, an amphipathic protein secreted by *Aspergillus oryzae*, is localized on the surface of conidia and aerial hyphae. Hydrophobin including RolA possess various biological functions of such as enhancing conidial dispersibility in air, coating of hydrophobic solid surface, and promotion of solid polymer degradation by recruiting hydrolytic enzymes. After adsorption of RolA onto solid surfaces, RolA forms self-assembled structures so called “rodlet” of which structure is similar to β-amyloid fibers. In our previous studies, we used the Langmuir-Blodgett (LB) method and atomic force microscopy（AFM）to analyze the process by which RolA formed rodlet at the air-water interface. In the present study, we prepared the self-assembled structures of RolA in a state that resembles the natural air-liquid interface by using droplets of RolA solution (droplet method). AFM observation revealed that the self-assembled structures formed by the droplet method were thicker and more undulating than that by the LB method. There was a correlation between the length of the self-assembled structures formed by the droplet method and the elapsed time for maintaining droplets. We will also discuss the effects of experimental conditions (e.g., RolA concentration, pH, and temperature) on the elongation of the self-assembled structures.

Hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, self-assembled structure

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：2D09-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

細菌由来糖質加水分解酵素の FnIII ドメインの物性解析

Structural stability of FnIII domains of bacterial glycoside hydrolases

○太田垣 太朗[1]、鈴木 一史[1,2]、杉本 華幸[1] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・日本酒学センター)
○Taro OTAGAKI[1], Kazushi SUZUKI[1,2], Hayuki SUGIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., [2]Sakeology Ctr., Niigata Univ.)



フィブロネクチンタイプ III (FnIII) ドメインは, β-サンドイッチ構造を形成する小型ドメインで(右図), 様々な生物のタンパク質に存在する。真核生物由来の FnIII ドメインは, タンパク質のフォールディングや構造安定性を解析するためのモデルタンパク質としてこれまで知見が蓄積されてきた。他方, 細菌由来の多くの糖質関連酵素にも FnIII ドメインが存在しているが, その物性についてはほとんど明らかになっていない。本研究では, 細菌由来のキチナーゼ分子内に存在する, 2 種類の FnIII ドメインについて物性解析を行った。すなわち, *Bacillus circulans* キチナーゼ A1 および *Serratia marcescens* キチナーゼ C に存在する FnIII ドメイン (BcChiA1 FnIII, SmChiC FnIII) を解析対象とした。これらの一次構造は, 真核生物由来の FnIII ドメインと配列同一性が低い (およそ 30%)。また BcChiA1 FnIII と SmChiC FnIII 間の配列同一性は 41%と低く, これらは細菌由来 FnIII ドメインの物性を比較解析するための好個のモデルである。BcChiA1 FnIII, SmChiC FnIII をフラグメントタンパク質として単離して, 変性剤変性反応の平衡論的解析を行った (pH 7.0, 25°C) 。両タンパク質ともに変性は可逆であった。二状態転移モデルを仮定して変性の熱力学量を評価したところ, BcChiA1 FnIII と SmChiC FnIII の変性の中点濃度はそれぞれ, 2.7, 3.3 M であった。変性のギブズエネルギー変化 [$\Delta G^0_{(H2O)}$] は, BcChiA1 FnIII で 27.3 kJ mol^{-1}, SmChiC FnIII で 34.9 kJ mol^{-1} であった。これらの値は, 真核生物の FnIII ドメインの$\Delta G^0_{(H2O)}$と比べて比較的大きかった。また, SmChiC FnIII の方が BcChiA1 FnIII よりも安定性が高いことが分かった。これは分子内部の疎水性コアを形成するアミノ酸残基の差異によるものである可能性が考えられた。

We attempted to examine the structural stability of the following two fibronectin type III (FnIII) domains from bacterial proteins: 1) FnIII domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* (BcChiA1 FnIII) and 2) FnIII domain of chitinase C from *Serratia marcescens* (SmChiC FnIII). The Gibbs energy changes for unfolding of these FnIII domains in water solvent were relatively large compared to those from eukaryotic proteins. SmChiC FnIII was more stable than BcChiA1 FnIII. This may result from the differences in the amino acid residues at the hydrophobic core.

FnIII domain, Structural stability, Bacterial glycoside hydrolase

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2D09-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

結晶構造解析と組み合わせた X 線吸収分光法による低温適応無機ピロホスファターゼの触媒反応機構の解明

X-ray absorption spectroscopy combined with crystallography reveals catalytic mechanism of cold-adapted inorganic pyrophosphatase

○丸岡 早紀[1]、馬込 栄輔[2]、瀬戸山 寛之[2]、河本 正秀[2]、堀谷 正樹[1]、渡邉 啓一[1,3]（[1]佐大農、[2]SAGA-LS、[3]九州栄養福祉大）
○ Saki MARUOKA[1], Eisuke MAGOME[2], Hiroyuki SETOYAMA[2], Masahide KAWAMOTO[2], Masaki HORITANI[1], Keiichi WATANABE[1,3] ([1]Saga Univ., [2]SAGA-LS, [3]Kyushu NW Univ.)

無機ピロホスファターゼ（PPase）は、無機ピロリン酸をリン酸に加水分解する反応を触媒する。先に我々は、南極産好冷細菌 *Shewanella* sp.AS-11 由来の低温適応無機ピロホスファターゼ（Sh-PPase）の活性中心に配位する 2 個の金属イオンを変換することによって、触媒活性の強さや温度依存性が大きく変化することを明らかにしている。本研究では、Sh-PPase の触媒反応機構を原子レベルで明らかにすることを目的として、Zn(II)Sh-PPase 単独および基質類似物イミド二リン酸（PNP）との複合体の Zn K 端の広域 X 線吸収微細構造（EXAFS）測定を試みた。

PNP の有無により、フーリエ変換 EXAFS データに明らかな違いが認められ、PNP 結合によっておこる Zn の配位構造変化をとらえることに成功した。X 線結晶構造を基に作成した理論散乱パスのカーブフィッティングを行った結果、PNP 複合体の場合は 6 配位の Zn を有し、Zn 原子と水の O 原子との距離は 1.78Å と求められた。この結果と X 線結晶構造を合わせて、触媒反応機構として、2 個の活性中心金属を架橋する水の O 原子がオキソ型（O^{2-}）でリン原子を求核攻撃し、加水分解反応が進むことが示唆された。

Inorganic pyrophosphatase (PPase) catalyzes the reaction of hydrolyzing inorganic pyrophosphate to phosphate. We have previously reported that the intensity and temperature dependency of catalytic activity of the cold-adapted PPase from the psychrophilic bacterium *Shewanella* sp. AS-11 (Sh-PPase) are greatly changed by converting two metal ions coordinated to the active center. In order to elucidate the catalytic mechanism of Sh-PPase at the atomic level, we performed Zn K-edge EXAFS measurement of Zn(II) Sh-PPase and its complex with a substrate analog, imide phosphate (PNP).

A clear difference was observed in the Fourier-transformed EXAFS data depending on the presence or absence of PNP, indicating the change in the coordination structure of active center Zn caused by PNP binding. Fitting the theoretical scattering paths created based on the X-ray crystal structure to Fourier-transformed EXAFS data showed that Sh-PPase complexed with PNP has 6-coordinated Zn, and the distance between Zn and O of water was determined to be 1.78 Å. Combined with this result and the X-ray crystal structure, it is suggested, as a catalytic mechanism, that O atom of water bridging two active center metals nucleophilically attacks the phosphorus atom in the oxo form (O^{2-}).

Extended X-ray absorption fine structure, X-ray crystallography, Inorganic pyrophosphatase

発表責任者：渡邉　啓一（watakei@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：2D09-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム D

アクチノロージン結合タンパク質の結晶化
Crystallization of the actinorhodin binding protein
○深澤 茉愛[1]、長安 伶奈[1]、西山 辰也[1]、富田 武郎[2,3]、西山 真[2,3]、上田 賢志[1]([1]日大生資科、[2]東大・院農生科、[3]東大・微生物連携機構)
○Mana FUKAZAWA[1], Reina NAGAYASU[1], Tatsuya NISHIYAMA[1], Takeo TOMITA[2,3], Makoto NISHIYAMA[2,3], Kenji UEDA[1] ([1]College of Bioresource Sciences, Nihon University, [2]Graduate School of agriculture and life sciences, The Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】これまでに我々は、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の生産するアクチノロージン(ACT)が酸化反応触媒活性を有する有機触媒（金属を含まない低分子有機化合物の触媒）であること、さらにそれが ACT 生合成遺伝子クラスター中にコードされる分泌性タンパク質と特異的に結合することを明らかにしてきた。生物が生産する有機触媒の機能と役割は、それ自体が未解明であるが、それが細胞外でタンパク質との複合体を形成することにも知見も例がない。そこで、本研究では ACT 結合タンパク質（ABP）と ACT との複合体構造を決定してその結合様式を明らかにし、タンパク質-ACT 間結合の生理機能を推定することを目的とした。
【結果】本研究ではまず、ABP の大量精製を試みた。遺伝子組換えによって作成した ABP 高発現放線菌株を大量培養して培養上清を取得し、そこから疏水性相互作用クロマトグラフィー担体により回収した。次に、硫酸アンモニウムによる分画、弱陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、強陰イオン交換カラムクロマトグラフィーの順で精製を重ねることで純度の高い組換え ABP を大量に精製することに成功した。濃縮したタンパク質を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った結果、硫安を沈殿剤とした条件で結晶が得られることを見いだした。2.4Å分解能の回折データを収集し、Native SAD 法による構造決定に成功した。ABP にはACTを結合すると推定される大きなポケットが存在していた。発表では ABP の立体構造の詳細について報告する予定である。

Previously, we discovered that actinorhodin (ACT) produced by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) is an oxidative organocatalyst, and that it binds to a secretory protein encoded in ACT biosynthetic gene cluster. To gain our knowledge regarding the physiological functions and roles of natural organocatalysts, here, we tried to crystallize ACT-binding protein (ABP). ABP collected from the culture supernatant of a hyper-producing *Streptomyces* recombinant strain was purified several column chromatography steps and used for the screening of crystallizing condition. A crystal successfully obtained under ammonium sulfate condition was then used for X-ray analysis yielding a dataset at a resolution of 2.4 Å. The result demonstrated that ABP retains a large pocket possibly involved in the binding with ACT.

organocatalyst, streptomyces

講演番号：2E01-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

ニガクリタケ（*Hypholoma fasciculare*）子実体由来の生物活性物質の探索
Search for bioactive compounds from the fruiting bodies of *Hypholoma fasciculare*

○王 俊紅[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）
○ Junhong WANG[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

[目的] キノコの形態や機能は多種多様であり、様々な生物作用を示す化合物の単離が数多く報告されている。ニガクリタケ（*Hypholoma fasciculare*）は担子菌類であり、モエギタケ科クリタケ属に属し、日本では日本東北部に分布する。カサの直径は 2～5 cm ほど、柄の長さは 4～10 cm の比較的小さなキノコで食用のクリタケ（*H. sublateritium*）とよく似ているが，苦い毒キノコである。このキノコの毒性成分はファシキュロール類（fasciculol A-F），ファシキュリン酸類（fasciculic acid A-C）などがあると報告されている[1,2)]。本研究では、ニガクリタケ子実体の酢酸エチル可溶部から、新たな生物活性物質の単離、精製、構造決定を目的とした。
[方法・結果] 新鮮なニガクリタケ子実体をエタノール、アセトンにより抽出し、両抽出物をまとめて、減圧濃縮した。その後、*n*-ヘキサン、酢酸エチルを用いて順次液-液分配、減圧乾固後エタノールを用いた固-液分配を行うことで各可溶部を得た。このうち酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーにて分画し、数種の化合物の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および NMR スペクトルにより決定した。現在これらの化合物を各種活性試験に供し、生物活性について検討している。

[Purpose] *Hypholoma fasciculare* is a toxic basidiomycete fungus belonging to the family Hyphomycetaceae and is distributed in northeastern Japan. It has been reported that isolation of fasciculols A-F and fasciculic acids A-C as the toxic components from the mushroom. [1,2)] In this study, we aimed to isolate and determine the structure of new bioactive compounds from the ethyl acetate part of this mushroom.
[Method・Results] The fresh fruiting bodies of *H. fasciculare* were extracted with ethanol and acetone and then concentrated under reduced pressure. The concentrated extracts were partitioned between *n*-hexane and water, and then EtOAc and water, successively. The water soluble part was dried under reduced pressure, and then extracted with EtOH. The EtOAc soluble part was fractionated by repeated chromatography, and several compounds were successfully isolated. The structures of the compounds were determined by analyses of MS, IR and NMR spectral data. These compounds are now being tested for their biological activity.

参考文献
1) Ikeda M., *et al., Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1803−1805 (1977)
2) Suzuki K., *et al., Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2176-2178 (1983)

structure determination, *Hypholoma fasciculare*, bioactive compounds

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E01-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

キナメツムタケ（*Pholiota spumosa*）子実体由来の生体機能性物質の探索

Search for biofunctional compounds from the fruiting bodies of *Pholiota spumosa*

○池尾 太良[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）

○Taira IKEO[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的・背景】キナメツムタケ（*Pholiota spumosa*）はモエギダケ科スギタケ属のキノコで、秋から晩秋にかけて倒木上やその周辺に発生する食用キノコである。この子実体から単離された maytenine、pholiotic acid、putrescine-1,4-dicinnamide は、前立腺がん細胞の細胞増殖を阻害するという報告が以前にされているが、研究例は多くは無い[1,2]。また、当研究グループでは、過去にキナメツムタケの子実体の酢酸エチル可溶部から免疫チェックポイント阻害活性、AXL 阻害活性および HIF 阻害活性を持つ物質を単離した[3]。本研究では更なる生体機能性物質の単離・精製を試みた。

【方法・結果】新鮮なキナメツムタケ子実体をエタノールとアセトンで抽出し、両抽出物をまとめて減圧濃縮した。その後、*n*-ヘキサン-水、酢酸エチル-水で順次液-液分配を行い、*n*-ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部を得た。酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーを用いて分画し、新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および NMR スペクトルデータの解析によって決定した。現在、単離した化合物の免疫チェックポイント阻害活性など各種活性試験を行っている。

【Purpose・Background】*Pholiota spumosa* is an edible mushroom in the family strophariaceae that grows on and around fallen trees from autumn to late autumn. Our research group has previously isolated the compounds with immune checkpoint and AXL inhibitory activity, AXL inhibitory activity, and HIF inhibitory activity from the ethyl acetate soluble part of the mushroom. In this study, we attempted to isolate further biofunctional compounds from the fruiting bodies of the fungus.

【Method・Results】The fruiting bodies of *P. spumosa* were extracted with ethanol and acetone. After the solutions were combined and concentrated under reduced pressure. The extracts were fractionated into *n*-hexane soluble part and an ethyl acetate soluble part. The ethyl acetate soluble part was fractionated by repeated chromatography. As a result, several compounds including new ones were successfully isolated. In addition, bioassays for immune checkpoint activity and other bioactivity are now on going.

参考文献

1）Marco C, *et al*., *Eur. J. Org. Chem.*, **33**, 5551-5559 (2007)

2）Russo A, *et al*., *Phytomedicine*, **14**, 185-191 (2007)

3)池尾太良, 河岸 洋和ら, 日本農芸化学会令和 3 年度大会講演要旨集, p 348（2021）

Pholiota spumosa, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E01-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

ヒメマツタケ *Agaricus blazei* 菌糸体由来の生物活性物質の探索

Search for bioactive compounds from the mycelia of *Agaricus blazei*

○呉 静[1]、小椋 隆平[2]、小堀 一[3]、多田 有人[3]、池田 豊[3]、崔 宰熏[1,2,4]、平井 浩文[1,2,4]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大・グリーン研、[2]静大院・総合農、[3]岩出菌学研究所、[4]静大院・創造)

○Jing WU[1], Ryuhei OGURA[2], Hajime KOBORI[3], Naoto TADA[3], Yutaka IKEDA[3], Jae-Hoon CHOI[1,2,4], Hirofumi HIRAI[1,2,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]Grad. sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology CO., Ltd.,, [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的・背景】ヒメマツタケ（*Agaricus blazei*）はハラタケ科ハラタケ属のキノコである。岩出菌学研究所が南米ブラジル原産の種菌をもとに 1965 年より栽培を始め，1975 年に世界で初めて人工栽培に成功した。当研究室では，過去にヒメマツタケ子実体から抗腫瘍活性を有する(1→6)-*β*-D-グルカン・タンパク複合体, レクチン，新規脂肪酸および HeLa 細胞増殖抑制活性を持つステロイド類化合物の単離に成功している[1-4]。最近，我々の研究グループは，ヒメマツタケ子実体アルカリ抽出物、亜臨界水抽出物が免疫チェックポイント阻害活性を有することを明らかにした。本研究では，この菌糸体から比較的研究例の少ない低分子生物活性物質の単離・精製，構造決定を目的とした。

【方法・結果】ヒメマツタケ乾燥粉末を *n*-ヘキサン，酢酸エチル，エタノール，水で順次抽出することで各可溶部を得た。酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー, MPLC および HPLC 等を用いて分画し，化合物の単離・精製を試みた。その結果，新規化合物を含む数種化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS，IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。さらに各種活性試験に供した。

【Purpose・Background】*Agaricus blazei* is a species of mushroom belonging to the genus Agaricus. The Iwade Institute of Mushrooms started cultivation of *A. blazei* in 1965 using a species from Brazil, and succeeded in artificial cultivation for the first time in the world in 1975. We have already isolated (1→6)-*β*-D-glucan-protein, a lectin, and fatty acids, as well as steroids with cytotoxicity against HeLa cell from the fruiting bodies of the fungus[1-4]. Recently, our research group revealed that the alkaline extract and subcritical water extract of *A. blazei* fruiting bodies possessed immune checkpoint inhibitory activity. In this study, we attempted to isolate and determine the structures of low-molecular weight bioactive compounds from the mycelia of *A. blazei*.

【Methods・Results】The dried powders of the mycelia were extracted with *n*-hexane, ethyl acetate, ethanol, and water. The ethyl acetate-soluble part was fractionated using flash column chromatography, MPLC, and HPLC to isolate the compounds. As a result, we succeeded in isolating several compounds. The structures of these compounds were determined by MS and various NMR spectra. These compounds are now being tested for their biological activity.

1) Kawagishi H., et al. Phytochemistry, 27, 2777-2779 (1988). 2) Kawagishi H., et al. Carbohydr. Res., 183, 150-154 (1988).
3) Kawagishi H., et al. Carbohydr. Res., 186, 267-273 (1989). 4) Kawagishi H., et al. Carbohydr. Polym., 12, 393-403 (1990).

Agaricus blazei, structure determination, bioactive compound

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E01-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

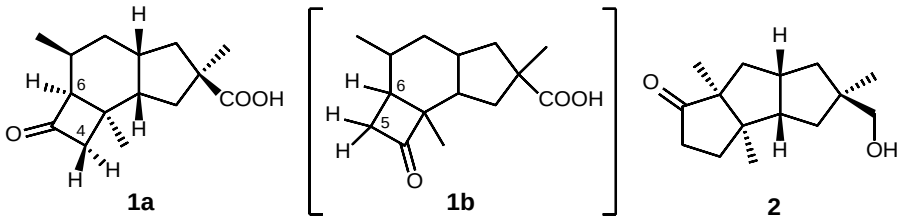
Daedaleopsis tricolor の生産するシクロフムラノイド (3)

Cyclohumulanoids from *Daedaleopsis tricolor* (3)

○金原 龍飛[1]、殿内 暁夫[1]、紺野 勝弘[2]、越野 広雪[3]、橋本 勝[1] ([1]弘前大農生、[2]富山大和漢研、[3]理研 SCRS)
○Ryuhi KANEHARA[1], Akio TONOUCHI[1], Katsuhiro KONNO[2], Hiroyuki KOSHINO[3], Masaru HASHIMOTO[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Toyama Univ., [3]Riken SCRS)

Trichoderma sp. 1212-03 は *Daedaleopsis tricolor* から分離された。我々は両菌の菌間コミュニケーションを検討する目的で *D. tricolor* が生産する二次代謝物を解析し、これまで複数の cyclohumulanoid を単離してきた[1)]。更なる探索を行い、新たに新規化合物を複数単離した。

Tricoprotoilludanone A の構造を NMR スペクトル解析から **1a** と推定した。しかし 4 位メチレンシグナルは、共にカルボニル基を跨いだ H-6 との間に比較的大きなスピン結合を有すると帰属する必要があった。構造を **1b** とした場合、それらはビシナルの関係となり一見合理的に見えるが、DFT による ^{13}C 化学シフト計算では、実験値との偏差二乗平均平方根（RMSD 値）が最小となるジアステレオマーでも 12.0 ppm と極めて大きい。一方 **1a** の場合、δ^{13}C RMSD 値は 1.6 ppm と実験値をよく再現した。そこで、理論スピン結合値を計算したところ、実験値とよく符合することが判明した。さらに 3-benzoxycyclobutanone を用いて、$^{4}J_{\mathrm{H\text{-}2/H\text{-}4}}$ が比較的大きい値を示すことを実験的に確認した。本発表では、ceratopicane 誘導体 (**2**) の構造や、これらの生合成についても合わせて報告する。



$^{4}J_{\mathrm{H\text{-}4\alpha/H\text{-}6}}$ = 5.6 Hz (calcd 5.0 Hz)
$^{4}J_{\mathrm{H\text{-}4\beta/H\text{-}6}}$ = 2.9 Hz (calcd -3.7 Hz)
δ^{13}C RMSD = 1.6 ppm

δ^{13}C RMSD < 12.0 ppm

In the course of our investigation of chemical relationship between *Trichoderma* sp. 1212-03 (parasite) and *Daedaleopsis tricolor* (host),[1)] we newly identified tricoprotoilludanone A from the latter fungus.

The NMR spectral analysis of this compound suggested structure **1a** although that required to assign the $^{4}J_{\mathrm{H\text{-}4/H\text{-}6}}$ with considerable values. We found that the DFT-based ^{13}C NMR chemical shift calculations supported **1a** (δ^{13}C RMSD = 1.6 ppm). The long-range $^{4}J_{\mathrm{HH}}$ was experimentally confirmed by using 3-benzoxycyclobutanone as the model compound. Assumption **1b** seemed to rationally explain these as vicinal spin couplings, but the δ^{13}C RMSD values were unacceptably large (>12.0 ppm) in any diastereomers. In my talk, the details of the above analysis and the biosynthesis are discussed together with the other new compound **2**.

1) Kanehara *et. al. Molecules.* **2021**, 26 (14), 4364

Daedaleopsis tricolor, DFT calculations, Cyclohumulanoid

発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

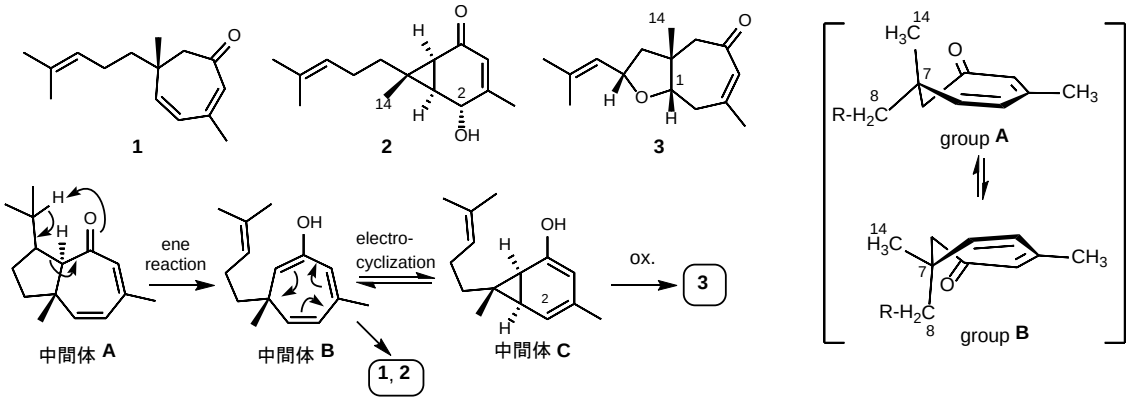
講演番号：2E01-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

水生菌 *Neohelicascus aquaticus* KT4120 から単離した Sesquikarahanadienone 類について

Isolation of Sesquikarahanadienones from Freshwater Dothideomycetes *Neohelicascus aquaticus* KT4120

○早坂 絢音[1]、橋本 和樹[1]、紺野 勝弘[2]、田中 和明[1]、橋本 勝[1] ([1]弘前大農生、[2]富山大和漢研)
○Ayane HAYASAKA[1], Kazuki HASHIMOTO[1], Katsuhiro KONNO[2], Kazuaki TANAKA[1], Masaru HASHIMOTO[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Toyama Univ.)

淡水生菌　*Neohelicascus aquaticus* KT4120 の培養液から、sesquikarahanadienone (**1**), sesquicarenol (**2**)、及び sesquikarahanaether (**3**)を単離した。**1**-**3** の平面構造は NMR スペクトル解析に基づいて推定した。**1** の構造は合成することにより確認した。**2** の相対配置は H-2 を照射すると、H_3-14 に NOE を観測したことにより、同様に **3** は、H-1 の照射により H-9 及び H_3-14 に NOE を観測したことから推定した。次に推定した構造を DFT 化学シフト計算により確認した。**1** では C-14 メチル基がシクロヘプタン環に対して、*pseudo-axial* をとる配座群 group A と *pseudo-equatorial* をとる配座群 group B とに分けられるが、両者の比およびδC_8 (exp 40.5 ppm), δC_{14} (exp 24.1 ppm)は用いた汎関数により大きく変化した。検討の結果、B3LYP/6-31G*による自由エネルギーを適用した場合、実験値をよく再現した（それぞれ 40.0, 24.7 ppm）。この時 group A:group B =47:53 となり、Winstein–Holness の A 値ともよく符合することが判明した。**1**-**3** の絶対配置は円二色性スペクトルを、DFT 計算により再現することで決定したが、**1** において group A と group B との比は重要であることが判明した。**1**, **2** はダウカンのエン反応により、**3** は続く電子環化反応によって生成すると考えている。



Sesquikarahanadienone (**1**) and its congeners **2** and **3** were isolated from freshwater Dothideomycetes *Neohelicascus aquaticus* KT4120. The structure of **1** was confirmed by synthesis. Their structures were elucidated based on mass and NMR spectral analysis. The suggested structures were verified by the DFT based NMR chemical shift calculations. Although conformation of the cycloheptane ring of **1** depended on the DFT functionals, we found application of free energy B3LYP/6-31G* nicely reproduced the experimental data. This information was quite critical in the ECD spectral reproduction. We will also discuss the biosynthesis of these compounds.

isolation, structure determination, biosysnthesis

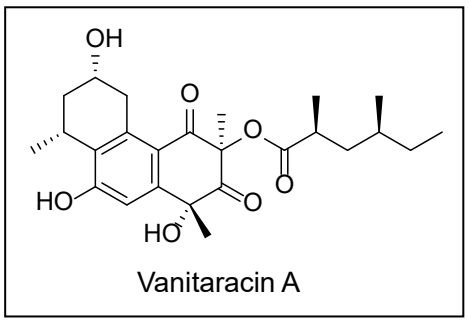
講演番号：2E01-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

抗 B 型肝炎ウイルス活性を示す vanitaracin A の絶対配置決定

Determining the absolute configuration of vanitaracin A, an anti-hepatitis B virus agent

○紙透 伸治[1,2]、柴崎 久宣[1]、芦川 広大[1]、菅野 和紀[1]、村上 裕信[1,2]、藤野 寛[1,2]、渡士 幸一[3,4,5]、菅原 二三男[5]、倉持 幸司[5]([1]麻布大獣医、[2]麻布大ヒトと動物の共生科学センター、[3]感染研治療薬・ワクチン開発研究センター、[4]感染研ウイルス第二部、[5]東理大理工)

○ Shinji KAMISUKI[1,2], Hisanobu SHIBASAKI[1], Koudai ASHIKAWA[1], Kazuki KANNO[1], Hironobu MURAKAMI[1,2], Kan FUJINO[1,2], Koichi WATASHI[3,4,5], Fumio SUGAWARA[5], Kouji KURAMOCHI[5] ([1]School of Veterinary Medicine, Azabu Univ., [2]Center for Human and Animal Symbiosis Science, Azabu Univ., [3]Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases, [4]Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, [5]Tokyo Univ. of Science)



Vanitaracin A

B 型肝炎ウイルス（HBV）は慢性肝疾患の原因となるウイルスであり、肝硬変や肝細胞がんを引き起こす。WHO による推計では、世界で HBV 持続感染者は 3 億人存在し、年間 82 万人が HBV 関連疾患で死亡している。以前我々は、真菌の 2 次代謝産物からなる化合物ライブラリーから抗 HBV 物質を探索し、*Talaromyces* 属の真菌から新規 3 環性ポリケチド vanitaracin A を見出している [1)]。Vanitaracin A は、sodium taurocholate co-transporting polypeptide（NTCP）に結合することで HBV の宿主細胞への侵入を阻害し、IC_{50}=0.61 μM で抗 HBV 活性を示す [2)]。Vanitaracin A は既存の薬剤とは異なる作用機序をもつ抗 HBV 薬として期待されるが、6 つの不斉炭素の立体配置が未だ明らかにされていない。本研究では、改良モッシャー法及び結晶スポンジ法により相対・絶対配置を解析した。さらに、NOESY による解析と加水分解により生じた側鎖部分の NMR 解析を組み合わせることにより vanitaracin A の全ての不斉炭素の絶対配置を決定した。

Hepatitis B virus (HBV) infections can cause chronic liver diseases, such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. According to the WHO, 296 million people worldwide were chronically infected, and 820,000 deaths were caused by cirrhosis or hepatocellular carcinoma. We previously discovered a novel anti-HBV tricyclic polyketide vanitaracin A from the culture broth of the fungus *Talaromyces* sp. [1)] Vanitaracin A inhibits the entry of HBV into host cells with an IC_{50} value of 0.61 μM. [2)] Although vanitaracin A is expected to constitute a new class of anti-HBV agents, the absolute configurations of the six stereogenic centers in the structure of vanitaracin A have not yet been determined. In the present study, we used the crystalline sponge method to clarify the configuration of the compound after determining the absolute configuration of the secondary alcohol using a modified Mosher ester method. Combining these analyses with the NOESY spectrum of vanitaracin A and NMR analyses of the crude side-chain carboxylic acid obtained by the alkaline hydrolysis of vanitaracin A revealed the absolute configurations of all stereogenic centers.

1) Matsunaga H *et al. Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25:4325-8.

2) Kaneko M *et al. J Virol.* 2015;89:11945-53.

antiviral, crystalline sponge, absolute configuration

発表責任者：紙透伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：2E01-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

cayG 導入による *Pseudomonas protegens* Cab57 株における caryoynencin 類の高生産

High production of caryoynencins in *Pseudomonas protegens* Cab57 by introducing *cayG* gene

○末永 真友菜、片山 直香、甲斐 建次（阪府大院・生命環境）
○Mayuna SUENAGA, Naoka KATAYAMA, Kenji KAI (Osaka Pref. Univ.)

一部の細菌は、末端から共役した C≡C 結合を有する細菌ポリイン類を産生する。我々は以前、*Pseudomonas protegens* Cab57 が抗卵菌・抗真菌性を有する protegenin A を著量産生することを報告した。Protegenin 類の生合成遺伝子クラスターの構造は、他のポリイン生合成遺伝子クラスターと比べるとシンプルで代謝経路の遺伝子工学的改変に向いていることが期待された。*cayG* 遺伝子はシトクロム P450 をコードし，*Burkholderia caryophylli* が作る caryoynencin 類の最終酸化ステップを触媒する。今回、*cayG* 遺伝子を恒常的発現プロモーター制御下で Cab57 株に導入し、*P. protegens* 株における caryoynencin 類の産生と拮抗細菌としての特性を改変に成功したので報告する。

改変 pDSK ベクターの *psbA* プロモーターの下流に *cayG* 遺伝子を組込み、Cab57 株のコンピテントセルンにエレクトロポレーションで導入した。Cab57-*cayG* 株を WYA-GlcNAc 培地上で生育させると、protegenin A のピークは消失し、caryoynencin 類と 2 種の未知類縁体と思われるピークが観察された。Caryoynencin 類はこれまでに、A–C の 3 種が報告されているが、混合物の ^{1}H NMR データのみに頼っており、^{13}C NMR や 2D NMR 測定は行われておらず、構造決定に曖昧さがあった。そこでこれらの化合物の単離と完全な構造決定を達成した。未知類縁体は、CayG が触媒する反応の中間体であるようであった。現在、これらの化合物の単離・構造決定を進めている。Cab57 株と Cab57-*cayG* 株の抗真菌・抗卵菌活性の比較も報告する。

Bacteria of some genera produce “bacterial polyynes” possessing a conjugated C≡C bond started with a terminal alkyne. Protegenin A, an octadecanoic acid derivative possessing an ene-tetrayne moiety discovered from *Pseudomonas protegens* Cab57, exhibits strong antioomycete and moderate antifungal activities. Here we report an engineered *P. protegens* recombinant that produces high levels of caryoynencins. The introduction of CayG, a gene encoding a cytochrome P450 from *Burkholderia caryophylli*, into *P. protegens* resulted in the conversion of protegenin A to more complex polyynes, caryoynencins A–E. The assighnment of the ^{1}H and ^{13}C NMR signals of caryoynencins A–C was achieved for the first time by performing 1D/2D NMR experiments of the isolated compounds. Caryoynencins D and E, new derivatives, were converted to caryoynencins A–C by CayG, indicating that are the catalytic intermediates.

polyynes, biosynthesis, bacteria

発表責任者：甲斐 建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

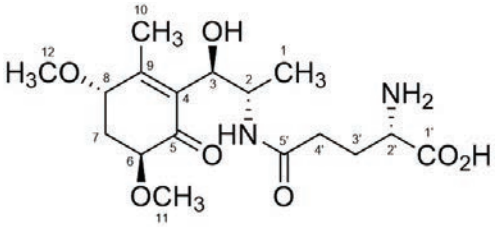
講演番号：2E01-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

キシメジ属キノコに含まれる生物活性物質の化学的研究

Chemical Studies on Bioactive Compounds from *Tricholoma* species

○大場 由美子[1]、中村 有里[2]、呉 静[3]、浦井 誠[2]、冨澤 元博[2]、河岸 洋和[1,3,4]、橋本 貴美子[2]([1]静大院・創造、[2]東農大・生命、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・総合農)
○Yumiko OBA[1], Yuri NAKAMURA[2], Jing WU[3], Makoto URAI[2], Motohiro TOMIZAWA[2], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4], Kimiko HASHIMOTO[2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

キノコの味や匂いは種を識別する上で重要な手がかりとなる。これまでに、苦味をもつ 2 種のキシメジ属キノコ（カラキシメジ、ネズミシメジ）より苦味成分 lascivol を単離した。[1] 本研究では、苦味をほとんど持たないが形態はカラキシメジと類似したキシメジ属キノコ（キシメジ、シモコシ、ニオイキシメジ）に含まれる生物活性物質の単離および構造解析を行なった。



lascivol

凍結したキシメジ属キノコの子実体を粉砕し、MeOH で抽出した後、抽出物を EtOAc と水で分配した。水抽出物を活性炭に吸着させてクロマトグラフィーを行い、EtOH と水の混合物で段階的に溶出した。25 %EtOH 画分を濃縮し、TLC に供し、lascivol と類似した Rf 値をもち、強い紫外線吸収をもつスポットが 3 つあることが判明した。TLC を用いてこれらを精製し、3 種の化合物を単離した。

各種スペクトル測定による構造解析の結果、3 種の化合物はすべて新規化合物であり、苦味は lascivol に比べて弱いことがわかった。

Recently we isolated a bitter compound, lascivol, from bitter mushrooms, *Tricholoma aestuans* and *T. virgatum*.

In this study, we studied the chemical constituents of less bitter mushrooms, *T. flavovirens*, *T. auratum* and *T. sulphureum*, which are closely similar to *T. aestuans* in form.

Methanol extraction and repeated chromatographic separation afforded three compounds, whose structures were determined by the interpretation of spectroscopic data including X-ray crystallographic analysis.

All three compounds taste far less bitter than lascivol.

1) Oba Y., Urai M., Wu J., Tomizawa M., Kawagishi H., Hashimoto K., *J. Antibiot.*, **73**, 697-701 (2020).

mushroom, Tricholoma, bitter

発表責任者：橋本貴美子（kh206428@nodai.ac.jp）

講演番号：2E01-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）の fruiting liquid 由来の生物活性物質の探索

Search for bioactive compounds from the fruiting liquid of *Hericium erinaceus*

○吉川 蒼人[1]、呉 静[2]、近藤 満[2,3]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大・農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）
○Aoto YOSHIKAWA[1], Jing WU[2], Mitsuru KONDO[2,3], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】 キノコ（子実体）を形成する高等菌類は，胞子から菌糸，菌糸から子実体，そして子実体から胞子という生活環を持っている。また，一般にキノコの発生時に菌糸体表面に液体が分泌される。我々はこれまで誰も注目していなかったこの液に着目し，子実体形成に関与していると考え，fruiting liquid（FL）と命名した。ヤマブシタケ FL はエノキタケに対して子実体形成促進あるいは誘導活性が確認された[1)]。本研究では，ヤマブシタケ FL から生物活性物質の単離・精製および構造決定を目的とした。

【方法・結果】 ヤマブシタケ FL を減圧濃縮し，*n*-ヘキサンおよび酢酸エチルで順次液-液分配，乾固した後エタノールで固-液分配し，減圧乾固後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部を，MPLC，HPLC を用いて分画し，化合物の単離・精製を試みた。その結果，酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR，各種 NMR および X 線結晶構造解析によって決定した。また，以前に単離した化合物の絶対配置決定のため，化学合成を行っている。現在，これらの化合物を子実体形成誘導活性など各種活性試験に供している。

【Purpose】 Mushroom produces spores, and the spores germinate and create mycelium. The mycelium eventually produces a primordium, which grows into a new whole mushroom, and the life cycle continues. In general, liquid is secreted on the mycelia's surface just before formation of fruiting bodies of mushroom-forming fungi. However, no researchers involved in mushroom science have paid attention to the liquid up until the present. We hypothesized that the liquid played an important role in fruiting-body formation and produced various bioactive compounds that do not exist in mycelia, fruiting bodies, and other parts of the fungi, and named it “fruiting liquid (FL)”. In this study, we attempted to isolate bioactive compounds from FL of *Hericium erinaceus*.

【Methods and Results】 The FL of *H. erinaceus* was concentrated under reduced pressure, and the concentrate was fractionated into a *n*-hexane part, an ethyl acetate part, an ethanol part and an aqueous part. Then, the ethyl acetate-soluble part was fractionated by repeated chromatography, and a few new compounds were successfully isolated. The structures of the compounds were determined by analyses of MS, IR and NMR spectral data and X-ray crystallography. We are also working on the synthesis to determine their absolute configuration of compounds. In addition, bioassays for fruiting body inducing activity and other bioactivity are now on going.

1）呉静，河岸洋和ら、第 62 回天然有機化合物討論会 講演要旨集 p37

fruiting liquid, *Hericium erinaceus*, structure determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E01-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム E

昆虫の腸管由来担子菌酵母からの新規化合物の探索

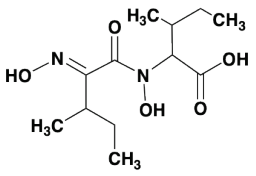
Exploration of novel compounds from insect gut derived basidiomycetous yeast

○近藤 直純[1]、酒井 一成[1,2]、君嶋 葵[1,2]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[1,2]、浅見 行弘[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大大村研)

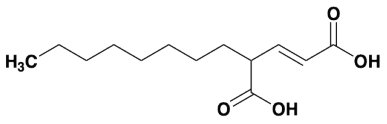
○Naozumi KONDO[1], Kazunari SAKAI[1,2], Aoi KIMISHIMA[1,2], Masato IWATSUKI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Yukihiro ASAMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Omura Inst., Kitasato Univ.)

菌類、特に糸状菌は天然物探索における重要な微生物資源であり、これまでに多くの有用物質や毒性物質が報告されている。しかし近年、糸状菌からの新規化合物の発見効率は低下傾向にある。

天然物データベース Dictionary of Natural Products によれば、菌類(糸状菌・きのこ・酵母)より単離された低分子化合物は約 19,000 種存在するが、そのうち酵母から単離された化合物は約 60 種と非常に少ない。加えて、酵母は系統的に子嚢菌門と担子菌門に分かれるが、担子菌門に属する酵母は PKS や NRPS といった生合成遺伝子を有することが報告されている[1]。これらの背景より、菌類から新規化合物を効率的に探索する一つの試みとして、担子菌酵母を用いた新規化合物の探索研究を実施した。



1



2

LC/MS を用いて物理化学的性状を指標とした化合物探索を行った結果、ガ類昆虫の 1 種であるクロメンガタスズメの腸管より分離した担子菌酵母 *Moesziomyces* sp. FKI-9540 株の培養抽出物より新規化合物 moeszionine (**1**) および moeszioic acid (**2**) を見出した。現在、これら 2 化合物の絶対立体配置の決定に向けて取り組んでいる。

Fungi, especially filamentous fungi, are important microbial resources in the discovery of natural products, and many useful and toxic substances have been reported. In recent years, however, the discovery efficiency of new compounds from filamentous fungi has been declining. According to the Dictionary of Natural Products, a database on natural products, there are about 19,000 reports of small molecules isolated from fungi (filamentous fungi, mushrooms, and yeasts), of which only about 60 reports are from yeast. In addition, it has been reported that yeasts belonging to the phylum Basidiomycota have biosynthetic genes such as PKS and NRPS [1], although yeasts are phylogenetically divided into the phylum Ascomycota and Basidiomycota. As an attempt to efficiently search for new compounds from fungi based on these backgrounds, we conducted exploratory research for new compounds using basidiomycetous yeasts.

The new compounds, moeszionine (**1**) and moeszioic acid (**2**), were found from the culture broth of the basidiomycete yeast *Moesziomyces* sp. FKI-9540 isolated from the gut of a moth, *Acherontia lachesis*. We are now working to determine the absolute configuration of these two new compounds.

[1] Rokas, A.; Wisecaver, J. H.; Lind, A. L. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 731–744.

Basiodiomtcetous yeast, Insect gut, Novel compounds

発表責任者：浅見行弘（yasami@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2E03-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

新規微生物資源 *Tumebacillus* からの新規二次代謝産物の探索

Isolation of novel natural products from new microbial source *Tumebacillus*

○菊池 雄太[1]、川島 未来[2]、岩月 正人[1,3]、君嶋 葵[1,3]、堤 隼馬[1,3]、浅見 行弘[1,3]、稲橋 佑起[1,3] ([1]北里大院 感染制御科学府、[2]北里大 理学部化学科、[3]北里大 大村研)
○Yuta Kikuchi[1], Miku Kawashima[2], Masato Iwatsuki[1,3], Aoi Kimishima[1,3], Hayama Tsutsumi[1,3], Yukihiro Asami[1,3], Yuki Inahashi[1,3] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Department of chemistry, Kitasato Univ., [3]Omura Inst., Kitasato Univ.)

現在までに知られている細菌 4887 属の内、約 90%からは天然物の単離報告が無く、限られた細菌のみが微生物資源として用いられている。そのため、更なる新規天然物の取得のためには未利用微生物資源からの天然物探索が必要であると考えられる。本研究では新規微生物資源の拡張と新規天然物の取得を目指し、未利用細菌のゲノム情報をもとに、天然物生合成遺伝子クラスター（BGC）を豊富に有する細菌属を探索し、選出した属の細菌から新規天然物の探索を試みた。

National Center for Biotechnology Information より細菌の全ゲノム（21053 株 1392 属）を取得し、antiSMASH により解析したところ、微生物資源として未利用な細菌属である *Tumebacillus* 属は非リボソームペプチドやポリケチドの BGC を多数有し、多くの天然物を生産すると推定された。本属の細菌の培養液エタノール抽出物を用いて抗菌活性試験を行った結果、*T. permanentifrigoris* JCM 14557^T の培養液抽出物は *Bacillus subtilis* に対して抗菌活性を示した。活性物質を培養液から溶媒抽出により精製し、NMR 解析を行った結果、新規テトラミン酸化合物であることが明らかになった。加えて、本菌株の培養液から新規物質を含む複数の化合物が単離されたことから *Tumebacillus* 属細菌は新たな微生物資源として有用であることが示された。

本公演では、上記の研究とともに現在取り組んでいる *Tumebacillus* 属細菌の分離研究についても報告したい。

A limited number of bacteria genera was used as a source of natural products (NPs) and about 90% of bacteria genera were not used. Thus, the novel microbial sources of NPs must be required for the discovery of various novel bioactive compounds. We analyzed 21053 genomes with antiSMASH to search promising genera as the source of NPs. As a result, we discovered that *Tumebacillus* possesses many biosynthetic gene clusters of NPs. A cultural broth of *T. permanentifrigoris* JCM 14557^T showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis*. Isolation and structure elucidation revealed that this active compound was a novel tetramate derivative. Moreover, we also isolated other novel and known NPs from this strain. Based on these results, we propose that *Tumebacillus* is a promising source of natural products. We would also like to talk about our recent research about isolation of *Tumebacillus* in this presentation.

Tumebacillus, Genome mining, Natural product

講演番号：2E03-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

リゾチーム添加寒天培地より分離された希少放線菌 *Embleya* sp. K20-0267 が生産する新規物質 Emblestatin

Emblestatin discovered from *Embleya* sp. K20-0267 which isolated by agar medium containing lysozyme

○粟野 友太[1]、管藤 裕貴[1]、菊池 雄太[1]、君嶋 葵[1,2]、堤 隼馬[1,2]、岩月 正人[1,2]、浅見 行弘[1,2]、稲橋 佑起[1,2] ([1]北里大院　感染制御、[2]北里大　大村研)
○Yuta AWANO[1], Hiroki KANTO[1], Yuta KIKUCHI[1], Aoi KIMISHIMA[1,2], Hayama TSUTSUMI[1,2], Masato IWATSUKI[1,2], Yukihiro ASAMI[1,2], Yuki INAHASHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Omura. Inst., Kitasato Univ.)

放線菌は創薬研究における微生物資源として長く注目されてきた。特に、放線菌の中でも主に分離頻度が高い *Streptomyces* 属が広く利用されてきたことから、放線菌由来の天然物の大部分は *Streptomyces* 属に由来する。一方、分離頻度の低い一部の希少放線菌も高い二次代謝産物生産能を有し、様々な有用物質を生産していることも明らかになっている。そのため、本研究では、放線菌の細胞壁の違いに着目し、細胞壁溶解酵素であるリゾチームを用いた希少放線菌の選択分離と、分離菌株の培養液の二次代謝産物の解析を行い、新規生物活性物質取得を試みた。

6 種の土壌試料から、69 種の希少放線菌を上述のリゾチームを用いた分離手法を用いて分離し、そのうち生育の良好な 13 株について 4 種類の液体培地で培養した。各培養液中の二次代謝産物について LC/UV/MS 解析を行い、その分子量および UV スペクトルをデータベースと照合することで新規物質を探索した。その結果、*Embleya* sp. K20-0267 が生産する *m/z* 663.3048 の化合物を新規物質として推定し、培養液より各種クロマトグラフィーを用いて本物質を単離した。本物質について NMR 解析を行った結果、2-hydroxyphenyl-oxazoline を含む新規ペプチド化合物 emblestatin と決定した。さらに、その絶対立体化学を改良マーフィー法により決定した。本化合物に関して種々の活性評価を行った結果、金属キレート能を有し、*Stapylococcus aureus* に対して弱い抗菌活性を示すことが明らかになった。

Actinomycetes are attractive sources of natural products (NPs) and many NPs have been discovered from *Streptomyces.* It is difficult to isolate some rare actinomycetes from soil samples, however, they also produce various secondary metabolites. In this study, we focused on the differences among the cell wall structure of actinomycetes and attempted selective isolation of rare actinomycetes using medium which contains lysozyme. Furthermore, we attempted to obtain novel natural products from the isolates.

Sixty-nine species of rare actinomycetes were isolated from 6 soil samples. HR-MS and UV spectrum analysis revealed that the culture broth of *Embleya* sp. K20-0267 contained a novel natural product which showed *m/z* 663.3048 $[M+H]^+$. Isolation and structural elucidation revealed that this compound was a novel peptide conjugated with 2-hydroxyphenyl-oxazoline, namely emblestatin. The absolute stereochemistry was determined by using modified Marfey's method. Emblestatin had metal chelating ability and antibacterial activity against *Stapylococcus aureus*.

rare actinomycetes, Lysozyme, antibiotic

発表責任者：稲橋佑起（y-ina@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2E03-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

菌寄生菌類を探索源とした抗真菌活性物質の探索
Search for antifungal compounds produced by mycoparasitic fungi
○渡邊 善洋[1,2]、高橋 周平[3]、吉田 百合香[3]、常盤 俊之[1]、稲橋 佑起[1,2]、穂苅 玲[1,2]、石山 亜紀[1,2]、石川 春樹[3]、伴 さやか[4]、知花 博治[4]、矢口 貴志[4]、野中 健一[1,2]、岩月 正人[1,2] ([1]北里大 感染制御、[2]北里大 大村研、[3]北里大 理、[4]千葉大 真菌医学)
○ Yoshihiro WATANABE[1,2], Syuhei Takahahi[3], Yurika Yoshida[3], Toshiyuki Tokiwa[1], Yuki Inahashi[1,2], Rei Hokari[1,2], Aki Ishiyama[1,2], haruki Ishikawa[3], Sayaka Ban[4], Hiroji Chibana[4], Takasi Yaguchi[4], Kenichi Nonaka[1,2], Masato Iwatsuki[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Omura Satoshi Memorial Inst., Kitasato Univ., [3]Sch. Science, Kitasato Univ., [4]MMRC, Chiba Univ.)

《背景・目的》深在性真菌症は真菌よって引き起こされる致死率の高い日和見感染症であり、近年罹患者数は増加傾向にある。現在、抗真菌薬として 4 系統のみが上市されているが多剤耐性菌の蔓延や全ての原因菌種に有効な薬剤の不在が問題となっている。このため新たな抗真菌薬の創出が急務である。演者らは抗真菌薬リード化合物の探索源として菌寄生菌類に着目した。真菌である菌寄生菌類は別の真菌を攻撃し、死菌にしてから栄養を吸収することが報告されている。本研究では菌寄生菌類から「広域真菌スペクトルを有し」「既存薬耐性菌に効果のある」「新規骨格の」抗真菌薬リード化合物の発見を目的とした。
《方法》スクリーニングと活性評価にはペーパーディスク法を用いた。*Aspergillus fumigatus* および *Candida auris* の薬剤感受性および耐性菌株（全 4 種）を植菌した GY 寒天培地上にサンプルを染み込ませたペーパーディスクを置き、27℃で 48 時間培養した。その後、形成された阻止円の直径とクリア度を測定することで抗真菌活性を評価し、全ての菌株に抗真菌活性を示した菌寄生菌の培養抽出液より活性物質の取得を試みた。
《結果》東京都武蔵村山市湖畔東大和公園から分離された菌寄生菌類である *Hypomyces* 属糸状菌 TT21014 株の培養抽出液は 4 種の検定菌に対して抗真菌活性を示した。米を主成分とした生産培地 8 kg を用いて本株を大量培養し、抗真菌活性物質の単離および構造決定を試みた。各種クロマトグラフィーを用いた精製により複数の抗真菌活性物質を取得した。ESI-MS および NMR を用いた構造解析により新規化合物 2 成分を構造決定した。

Deep mycoses are opportunistic infections with a high mortality rate caused by fungi, and the number of patients has been on the rise in recent years. Currently, only four types of antifungal drugs have been used, but the spread of multidrug-resistant fungi. Therefore, there is an urgent need to create new antifungal agents. We focused on mycoparasitic fungi as a source of lead compounds for antifungal drugs. We expect to discover antifungal drug lead compounds from mycoparasitic fungi broth that have broad fungal spectra, are effective against existing drug-resistant fungi, and have a novel skeleton. We isolated and structurally characterized two new antifungal compounds from cultures of the mycoparasitic fungus *Hypomyces* sp. TT21014 strain.

antifungal, natural products, *Aspergillus*

発表責任者：渡邊善洋（yosiwata@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2E03-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

好熱菌 *Meiothermus ruber* の主なカロテノイド：Deinoxanthin 配糖体エステル

Identification of major carotenoids in *Meiothermus ruber*: Deinoxanthin glucoside esters

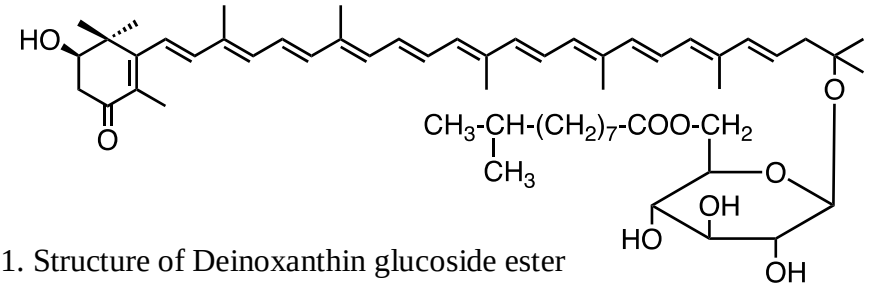
○浅香 龍[1]、眞岡 孝至[2]、川﨑 信治[1]、高市 真一[1] ([1]東農大 分子微生物、[2]生産開発科研)
○ Ryo ASAKA[1], Takashi MAOKA[2], Shinji KAWASAKI[1], Shinichi TAKAICHI[1] ([1]TUA Mol. Microbiol., [2]DIPS)

Meiothermus ruber DSM 1279^T はロシアの温泉で単離された赤色の好熱菌である。Burgess らは鹸化処理を行い、*M. ruber* の主なカロテノイドが 1'-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4,3',4'-tetradehydro-1',2'-dihydro-β,ψ-caroten-2-one であると報告した (Burgess et al. J. *Nat. Prod.* 1999, 62, 859-863) 。

本研究では主なカロテノイドが Deinoxanthin 配糖体脂肪酸エステル **(1)** であると NMR と質量分析を含む種々のスペクトルデータから再同定した。また、リパーゼ処理により Deinoxanthin 配糖体を分離し、結合脂肪酸は 4 種類のイソ脂肪酸で菌体脂質とは組成が異なっていた。したがって、以前に報告されたカロテノイド配糖体は鹸化処理によって Deinoxanthin 配糖体エステルが構造変化したものであると判明した。さらに、*M. ruber* には Ketomyxocoxanthin と 1'-Hydroxytorulene の配糖体エステルも存在した。ゲノム塩基配列と同定したカロテノイドに基づいて、本カロテノイドの生合成経路、及び合成遺伝子を推定した。

Meiothermus ruber was isolated from a hot spring in Russia and its color was red. Its major carotenoid was identified to be 1'-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4,3',4'-tetradehydro-1',2'-dihydro-β,ψ-caroten-2-one after saponification (Burgess et al. J. *Nat. Prod.* 1999, 62, 859-863).

In this study, we isolated major carotenoids without saponification and reidentified to be deinoxanthin glucoside iso fatty acid esters **(1)** using spectroscopic data and enzymatic hydrolysis of the fatty acid moieties. The bound fatty acids were 4 species of iso type, whose composition was different from that of the bacterial lipids. Previously identified carotenoid glucoside might be saponification artifact of deinoxanthin glucoside esters. Ketomyxocoxanthin glucoside ester and 1'-hydroxytorulene glucoside ester were also present. Based on the identification of all the carotenoids and the entire nucleotide sequence of the genome in *M. ruber*, we propose a biosynthetic pathway of the carotenoids and the corresponding genes.



1. Structure of Deinoxanthin glucoside ester

thermophilic bacteria, carotenoid, *Meiothermus*

発表責任者：高市真一（shintakaichi@gmail.com）

講演番号：2E03-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

ジャガイモ水耕液からのジャガイモシストセンチュウに対する新規ふ化促進物質の同定

Identification of novel hatching factor for potato cyst nematode from potato hydroponic culture solution

○清水 宏祐[1]、増田 裕貴[1]、岡村 勇哉[1]、小川 千景[1]、秋山 遼太[1]、渡辺 文太[2]、坂田 至[3]、串田 篤彦[3]、谷野 圭持[4]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]（[1]神戸大院農、[2]京大化研、[3]農研機構北農研、[4]北大院理）

○Kosuke SHIMIZU[1], Yuki MASUDA[1], Yuya OKAMURA[1], Chihiro OGAWA[1], Ryota AKIYAMA[1], Bunta WATANABE[2], Itaru SAKATA[3], Atsuhiko KUSHIDA[3], Keiji TANINO[4], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Kobe Univ., [2]Kyoto Univ., [3]NARO/HARC, [4]Hokkaido Univ.)

ジャガイモシストセンチュウ（potato cyst nematode; PCN）はジャガイモ（*Solanum tuberosum*）やトマト（*S. lycopersicum*）などナス科作物の根に寄生することで大幅な作物収量の減収を引き起こす重大害虫である。土壌にて休眠状態の PCN 卵は、宿主作物が作付けられると根から分泌される化合物に特異的に反応することでふ化する。これまでに PCN ふ化促進物質（hatching factor; HF）として solanoeclepin A が単離されてきた。しかし、solanoeclepin A に関する植物化学的な研究報告例は乏しく、また別物質の存在も示唆されている。そこで本研究では、大規模ジャガイモ水耕液を材料に新規 PCN ふ化促進物質の単離および構造決定を目指した。ジャガイモ水耕設備に設置した合成吸着剤 SP207 をメタノールで溶出した画分を、PCN の一種である *Globodera rostochiensis* 卵に対するふ化試験に供した結果、強いふ化促進活性が確認された。そこでこの画分を液相分配、4 段階のオープンクロマトグラフフィーおよび 2 段階の分取 HPLC に供して精製を行なった結果、2 つの活性画分 Fr-A および Fr-B を得た。LC-MS 分析の結果、Fr-B からは既知の solanoeclepin A が検出された一方、Fr-A には新規 HF と推定される化合物が含まれることが明らかとなった。現在、Fr-A に含まれる新規化合物の構造解析を進めている。

Potato cyst nematodes (PCNs) are plant parasitic nematodes which parasitize roots of Solanaceae plants and cause serious damages on the production of crops such as potatoes (*Solanum tuberosum*) and tomatoes (*S. lycopersicum*). The hatching of dormant PCN eggs occurs in response to the host-derived hatching factors (HFs) excreted from the root of host plants. Solanoeclepin A is the only compound isolated from potatoes as PCN-HF. However, little is known about the biosynthesis and secretion of solanoeclepin A. Moreover, the presence of other HF has been suggested. In this work, we conducted the purification and isolation of novel HFs from potato hydroponic culture solution. In order to collect HFs, the Sepabeads SP207 resin was placed in the bulk potato hydroponic culture system. By evaluating with a hatching assay against *Globodera rostochiensis*, the potent hatching stimulation activity was observed in the methanol-eluted fraction. To purify HFs, we conducted liquid phase extraction, 4 step open column chromatography, and subsequent 2 step preparative HPLC, and obtained two active fractions, Fr-A and Fr-B. By their LC-MS analysis, Fr-B was identified as solanoeclepin A, whereas Fr-A was suggested to contain a novel HF.

cyst nematode, hatching factor, solanoeclepin

講演番号：2E03-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

ジャガイモシストセンチュウふ化促進物質の活性を増強する共力因子の解析

Analysis of synergy factor that enhances the activity of hatching factor for potato cyst nematode

○小川 千景[1]、岡村 勇哉[1]、清水 宏祐[1]、坂田 至[2]、串田 篤彦[2]、谷野 圭持[3]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神戸大院農、[2]農研機構北農研、[3]北大院理)
○Chihiro OGAWA[1], Yuya OKAMURA[1], Kosuke SHIMIZU[1], Itaru SAKATA[2], Atsuhiko KUSHIDA[2], Keiji TANINO[3], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Kobe Univ., [2]NARO/HARC, [3]Hokkaido Univ.)

ジャガイモシストセンチュウ(potato cyst nematode, PCN)は、ジャガイモやトマトなどのナス属作物の根に宿主特異的に寄生して栄養奪取し大幅な減収を引き起こす最重要害虫である。雌成虫は数百の卵が硬い殻に覆われたシストを形成し、土壌中で 20 年以上も休眠状態を維持できる。シスト内の卵は宿主植物の根から分泌される孵化促進物質（hatching factor, HF）を特異的に感知して孵化する。ジャガイモ水耕液から HF として Solanoeclepin A（SEA）が 20 年以上前に単離同定されたが、その後、HF に関する研究はほとんど進んでいない。そこで、無菌培養できるトマト毛状根を実験材料として、HF の解析を行った。トマト毛状根の培養液は 500 倍希釈で PCN 卵に対して約 90%の孵化率を示すことから高い孵化促進活性を示した。毛状根培養液を合成吸着剤 SP207 により分画した結果、HF は吸着画分に回収されたが、その活性はもとの培養液に比べ顕著に減少した。一方、非吸着画分と吸着画分を再び混合すると活性が回復した。そこで、SP207 により HF を吸着除去して得られた非吸着画分を用いて、SEA 合成標品の孵化促進活性に対する影響を評価した。非吸着画分単独ではほとんど活性を示さないのに対して、非吸着画分を SEA と混合すると、SEA 単独に比べて顕著に高い活性を示した。以上の結果、非吸着画分には HF と共存することで孵化促進活性を増強する共力因子（Synergy factor, SF）の存在が示唆された。

Potato cyst nematodes (PCNs) are plant parasitic nematodes which parasitize specifically on the roots of Solanaceae plants such as potatoes and tomatoes and cause a serious decrease in yield of these crops. The cyst of PCN is the dead body of female nematode and contains hundreds of the dormant eggs which can stay dormant in the soil for a long time. PCN eggs hatch in response to a host plant-derived hatching factor (HF). Solanoeclepin A (SEA) was identified as an HF from potato hydroponic solution, but little progress has been made in HF research. In this work, we analyzed HF from the culture solution of tomato hairy roots. When the culture solution was fractionated with the synthetic resin, HF was collected in the adsorbed fraction, but its hatching stimulation activity was significantly reduced. On the other hand, the activity was enhanced when the non-adsorbed fraction with almost no activity was mixed with the HF fractions. Therefore, it was suggested that there is a synergy factor that enhances the hatching stimulation activity by coexisting with a HF.

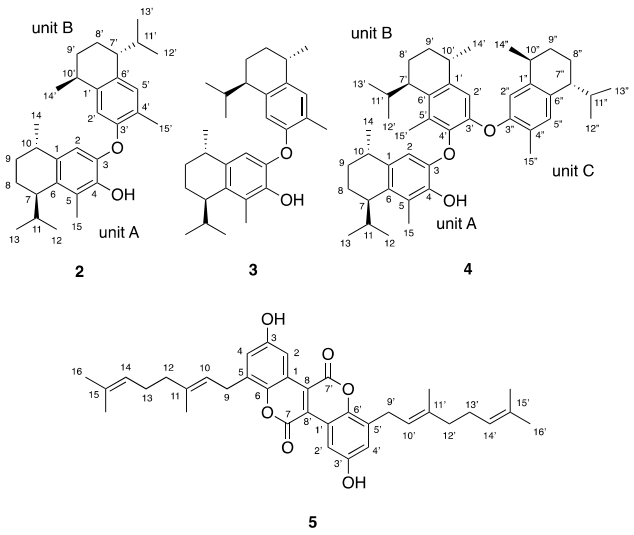
cyst nematode, hatching factor, tomato

講演番号：2E03-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

Undescribed dimeric and trimeric sesquiterpene phenols and a bicoumarin derivative isolated from the leaves of *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm.

○Ferry Ferdiansyah Sofian[1,2,3], Anas Subarnas[3], Mayuka Hakozaki[4], Shota Uesugi[4], Takuya Koseki[2], Yoshihito Shiono[1,2] ([1]Iwate Univ., [2]Yamagata Univ., [3]Univ. Padjadjaran, [4]Iwate Biotech. Res. Center)

Dysoxylum parasiticum (Osbeck) Kosterm. (Meliaceae) is a species of rainforest trees. In Indonesia, this plant grows in the Pangandaran Nature Reserve of West Java, as a primate-consumed plant. Two undescribed sesquiterpene phenol dimers, bidysoxyphenols B and C (**2** and **3**); an undescribed sesquiterpene phenol trimer, tridysoxyphenol B (**4**); an undescribed bicoumarin derivative, bidysoxyletine (**5**); along with a known sesquiterpene phenol, 7*R*,10*S*-3-hydroxycalamenene (**1**), were isolated from the leaves of *D. parasiticum*. The structures of **2**–**5**, were elucidated by extensive spectroscopic analyses of nuclear magnetic resonance (NMR), high-resolution electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (HRESITOFMS), ultraviolet (UV), and infrared (IR). The absolute configurations of **2**–**4** were determined using the electronic circular dichroism (ECD) data. In addition, the structure of **5** was confirmed by quantum chemical calculations in the TDDFT approach using the B3LYP exchange-correlation function for ^{13}C NMR and UV spectroscopic data. Compound **1** showed cytotoxicity against human promyelocytic leukemia (HL60) cells (IC_{50} = 119.85 μM).



Dysoxylum parasiticum (Osbeck) Kosterm., sesquiterpene phenols, bicoumarin derivative

発表責任者：Ferry Ferdiansyah Sofian（ferry.ferdiansyah@unpad.ac.id）

講演番号：2E03-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

ニンジンの生産する新規非典型的ストリゴラクトンの同定

Identification of a novel non-canonical strigolactone from carrot (*Daucus carota*)

山本 裕起[1]、吉田 祐規[2]、謝 肖男[3]、○秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]阪府大・生命環境、[3]宇都宮大・バイオ)
Yuki Yamamoto[1], Yuki Yoshida[2], Xiaonan Xie[3], ○Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.,, [2]Col. of Life, Environ. & Adv. Sci., Osaka Pref. Univ.,, [3]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.,)

【目的】ストリゴラクトン (strigolactone, SL) はシュートの分岐を抑制する植物ホルモンである。根から分泌される SL はアーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する共生シグナル“ブランチングファクター”としても働く。AM 菌は約 4 億年前から存在し、陸上植物の 70％と共生している土壌真菌の一種であり、植物にリン酸やミネラルを供給し、植物からは光合成産物である糖や脂質などを受け取っている。セリ科植物であるニンジン (*Daucus carota*) は、その毛状根を宿主とした *in vitro* 培養法による AM 菌の無菌的な大量生産に古くから用いられている。ニンジンは根から複数のブランチングファクターを分泌していることがこれまでに明らかにされているが、それらはいずれも単離同定されていない。そこで本研究では、ニンジンの生産する新規ブランチングファクター活性 SL を同定することを目的とした。
【方法及び結果】ニンジンを水道水で水耕栽培し、根分泌物を活性炭循環吸着法により採取した。活性炭から回収した根分泌物から酢酸エチル可溶中性物質画分を調製し、AM 菌 *Gigaspora margarita* の発芽胞子を用いた菌糸分岐アッセイに供したところ、100 ng/disc で顕著な高次の菌糸分岐を誘導した。本画分を LC-MS/MS 分析に供したところ、メトキシ基や D 環のメチルブテノライドの脱離など多くの非典型的 SL に特徴的なマススペクトルを示す 3 つのピークが検出された。そのうち 1 つはイネの生産する推定 methoxy-5-deoxystrigol 異性体-3 と同じ保持時間とマススペクトルを示した。3 つのうち、最も主要であった分子量 376 の化合物をシリカゲルカラム、続く分取逆相 HPLC を用いて単離した。1D および 2D NMR スペクトル解析により平面構造を決定した。次に、置換シクロヘキサンノンを出発物質とした A 環構造の構築と Stille カップリングを含む 8 段階の反応による本新規 SL の合成法を開発した。続いて、不斉合成により 4 つの立体異性体を合成した。合成した立体異性体を標品としたキラル LC-MS/MS 分析により、絶対立体配置を含めた化学構造を決定した。本新規 SL の AM 菌菌糸分岐活性は 1 ng/disc であり、カーラクトン酸メチルと同程度であった。
Strigolactones (SLs) are carotenoid-derived phytohormones that act as branching factors for arbuscular mycorrhizal fungi. Although it has previously been shown that carrot (*Daucus carota*) secretes several AM branching factors from roots, none of them have been isolated and identified. In this study, we purified a novel non-canonical SL from root exudates of carrot and determined its structure by spectral analysis and chemical synthesis.

strigolactone, carrot, arbuscular mycorrhizal fungi

発表責任者：秋山　康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2E03-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

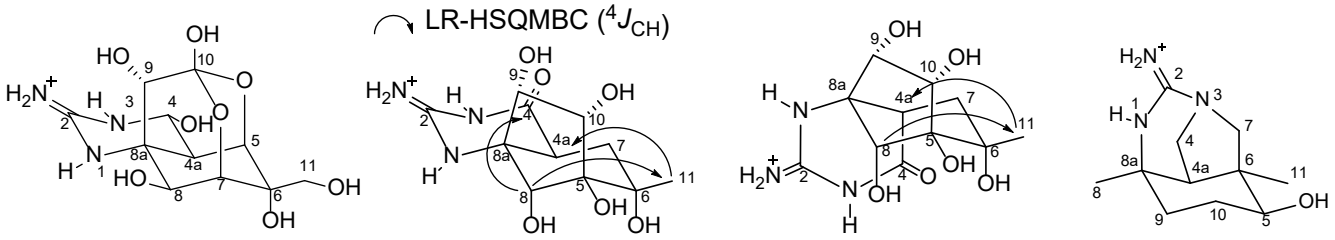
テトロドトキシン含有イモリ由来の新規三環性骨格を持つ 2 種のグアニジノ化合物

Two novel skeletal tricyclic guanidino compounds from the tetrodotoxin-bearing newt

○工藤 雄大[1,2]、Charles T. Hanifin[3]、長 由扶子[2]、此木 敬一[2]、山下 まり[2] ([1]東北大学際研、[2]東北大院農、[3]ユタ州立大生物)

○Yuta Kudo[1,2], Charles T. Hanifin[3], Yuko Cho[2], Keiichi Konoki[2], Mari Yotsu-Yamashita[2] ([1]Tohoku Univ. FRIS, [2]Tohoku Univ. Agr., [3]USU Uintah-Basin Biol.)

テトロドトキシン（tetrodotoxin, TTX, **1**）は環状グアニジンを含む複雑な化学構造を有する自然毒であり、海洋のフグや貝、陸上のイモリやカエルに広く分布する。我々は有毒生物から TTX 関連化合物を探索することで、未解明である TTX の生合成経路を推測してきた。本発表では、有毒イモリから得られた新規三環性骨格を有するグアニジノ化合物について報告する。アメリカ産サメハダイモリ（*Taricha granulosa*）の粗抽出物を HILIC カラムと ODS カラムを用いた 2 種の条件で LC-MS に供し、新規成分を探索した。検出された新規成分（Tgr-288 (**2**), Tgr-210 (**3**)）を精製し、NMR で構造を解析した。化合物 **2** は平衡関係にある **2a** と **2b** に分離され、含グアニジン 6 員環とビシクロ[3.2.1]オクタンが縮環した新規三環性骨格を有することが判明した。$^4J_{CH}$ の検出に有効な LR-HSQMBC を用いた *w* 型配座の解析などから相対立体化学を推定した。一方、**3** は **2** とは異なる新規三環性骨格を持つことが示された。これまで有毒イモリから C-10 単位とグアニジノ基を有する推定生合成関連化合物を得ることで、陸上 TTX がモノテルペンに由来する説を提唱してきた。同様の構成単位を持つ **2**, **3** はシャント化合物と推測される。化合物 **2**, **3** の発見によって仮説が支持されるのと同時に、陸上 TTX の生合成・シャント経路においてユニークな構造を持つ化合物が生産されることが示された。



tetrodotoxin (TTX, **1**)　Tgr-288A (**2a**)　Tgr-288B (**2b**)　Tgr-210 (**3**)

Tetrodotoxin (TTX, **1**), a potent neurotoxin, occurs in a wide range of marine animals and terrestrial amphibians. The biosynthesis of this unique toxin remains unresolved. We found two novel skeletal tricyclic guanidino compounds, Tgr-288 (**2a** and **2b**) and Tgr-210 (**3**), from the TTX-bearing newt, *Taricha granulosa*, via a MS-guided screening. These structures were elucidated using NMR spectroscopy, including a LR-HSQMBC. Discovery of **2** and **3** provided insight into the biosynthetic and shunt pathways of TTX in the terrestrial organisms.

[Reference] Kudo, Y.; Hanifin, C.T.; Yotsu-Yamashita, M. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 3513.

tetrodotoxin, structural elucidation, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E03-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム E

オアカムロ由来の HIF 阻害物質の探索

Search for HIF inhibitors from *Decapterus tabl*

○下崎 康平[1]、呉 静[2]、正田 千穂[3]、三輪 幸裕[3]、二村 和視[4]、岡本 一利[4]、崔 宰熏[1,2,5]、平井 浩文[1,2,5]、栗原 俊英[3]、河岸 洋和[1,2,5]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]慶大医、[4]静岡県水産・海洋技術研、[5]静大院・創造）

○ Kouhei SHIMOZAKI[1], Jing WU[2], Chiho SHODA[3], Yukihiro MIWA[3], Kazumi NIMURA[4], Kazutoshi OKAMOTO[4], Jae-Hoon CHOI[1,2,5], Hirofumi HIRAI[1,2,5], Toshihide KURIHARA[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Grad. sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Med., Keio Univ., [4]Shizuoka Pref. Res. Inst. of Fishery and Ocean, [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的・背景】　低酸素誘導因子（HIF : hypoxia-inducible factor）は、細胞に対する酸素供給が不足状態に陥った際に誘導される転写因子であり、低酸素適応応答、幹細胞の維持、炎症の制御等の恒常性維持を含む様々な生理活性を有している。最近、網膜変性疾患、網脈絡膜病的血管新生疾患等について、HIF が発生から病態生理に至るまで重要な役割を担っていることが明らかになっている。私たちの研究グループは、オアカムロ（*Decapterus tabl*）を HIF に対して抑制効果のある魚類として見出した[1)]。本研究ではオアカムロ白身のエタノール可溶部から HIF 阻害物質の単離、精製、構造決定を目的とした。

【方法・結果】　凍結乾燥させたオアカムロ白身を粉砕した後、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出することで各可溶部を得た。HIF 阻害活性が見られたエタノール可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC および HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS および各種 NMR スペクトルにより決定し、HIF 阻害活性試験に供した。

【Purpose・Background】　Hypoxia-inducible factors (HIFs) are transcription factors that are induced when cells are deprived of oxygen and have a variety of physiological activities including homeostasis, such as hypoxia adaptation, stem cell maintenance, and regulation of inflammation. Recently, it has become clear that HIF plays important roles in retinal degenerative diseases and retinal choroidal pathological angiogenesis diseases from occurrence to pathophysiology. Our research group found that *Decapterus tabl*is a fish with inhibitory effect on HIF[1)]. The aim of this study was to isolate and determine the structure of HIF inhibitors from the ethanol-soluble part of the white meat of *Decapterus tabl*.

【Methods・Results】　The freeze-dried white flesh of *Decapterus tabl* were extracted with *n*-hexane, ethyl acetate, ethanol, and water. The ethanol-soluble part that showed HIF inhibitory activity was fractionated using flash column chromatography, MPLC, and HPLC to isolate the compounds. As a result, we succeeded in isolating several compounds. The structures of these compounds were determined by MS and various NMR spectra. These compounds were subjected to HIF inhibitory activity test.

1) T. Kurihara, *et al*., *Nutrients*, **12**(4), 1055 (2020)

Decapterus tabl, structural determination, HIF inhibitor

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E05-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

Buthacus leptochelys サソリ毒液に含まれるジスルフィド結合を持つペプチドの単離と構造決定

Isolation and structure determination of a peptide with multiple disulfide bonds in the venom of the scorpion *Buthacus leptochelys*

○田中 柾人[1]、Mohammed Abdel-Wahab[2]、Moustafa Sarhan[2]、宮下 正弘[1]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大農、[2]Al-Azhar Univ.)
○Masato TANAKA[1], Mohammed Abdel-Wahab[2], Moustafa Sarhan[2], Masahiro MIYASHITA[1], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Al-Azhar Univ.)

【目的】サソリは獲物を捕獲し、捕食者から身を守るために毒を利用している。この目的のために、サソリ毒液には様々な成分が含まれており、それらは殺虫作用、抗菌作用、溶血作用などを示す。このような生理活性を担っている主な成分はペプチドである。また、これらのペプチドの多くはジスルフィド結合によって架橋された構造をもち、神経毒性を示す場合が多い。そこで本研究では、北アフリカに棲息するサソリである *Buthacus leptochelys* の毒液から、ジスルフィド結合を含むペプチドを探索し、その単離ならびに構造決定をおこなった。

【方法・結果】エジプトの西地中海沿岸砂漠において採集された *B. leptochelys* から毒液を採取し、凍結乾燥したものを実験に用いた。粗毒液を逆相 HPLC により分画し、比較的疎水性の高い成分を含む画分に対して還元・アルキル化反応をおこなった。アルキル化反応後において質量変化を示した成分、つまりジスルフィド結合を含むペプチドとして、7785.0 Da の質量をもつ成分を見出した。得られたペプチド（Bl-6 と命名）について、エドマン分解ならびに酵素消化後に得られたペプチドの MS/MS 解析によって配列決定を試みた。MS/MS 解析には MALDI-TOF/TOF MS（Autoflex III, Bruker）を用いた。ペプチド配列中の Leu と Ile の判別は、側鎖の MS/MS フラグメンテーションの違いを基にしておこなった。Leu/Ile の判別ができなかった場合は、候補配列ペプチドをそれぞれ合成し、それらの LC/MS 分析の保持時間を天然由来のものと比較することで決定した。配列解析の結果、Bl-6 は 4 つのジスルフィド結合で架橋された 66 残基のペプチドであることが分かった。相同性検索の結果、Bl-6 は *Androctonus australis* から見出された殺虫性ペプチドである AaIT4 と類似した構造をもつことが分かり、Bl-6 も殺虫活性を示すことが示唆された。

EHGYLLNKYTGCKVWCVINNESCNSECKLRGGYYGYCYFWKLACYCQGARKSELWNYKTNKCNGRN-NH_2

Fig.1. Bl-6 の配列

The scorpion venom contains various components, in which peptides are the main components responsible for the activities of the venom, such as neurotoxicity. Most of these peptides have multiple disulfide bonds and often exhibit insecticidal activity. In this study, we searched for a peptide with multiple disulfide bonds from the venom of the North African scorpion *Buthacus leptochelys* and determined its structure using Edman degradation and MS/MS sequencing analysis. As a result, we could determine the sequence of a 66-residue peptide cross-linked by four disulfide bonds, similar to insecticidal peptides.

peptides, scorpion venom, MS/MS

発表責任者：田中柾人（tanaka.masato.26w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2E05-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

フェンネルに含まれるアカスジカメムシの吸汁刺激物質の同定
Identification of attractants and sucking stimulants for a Apiceae-feeding stripe shield bug, *Graphosoma rubrolineatum*, in fennel
○野下 浩二、吉村 諒一朗（秋田県大・生資科）
○Koji NOGE, Ryoichiro YOSHIMURA (Akita Pref Univ.)

アカスジカメムシ *Graphosoma rubrolineatum* は，フェンネルなどセリ科植物を好んで吸汁する．一般的に，特定の植物種のみを餌資源とする昆虫は，その植物に含まれる特有の化学成分を手掛かりに餌となる植物を探索し，摂食・吸汁する．このような活性物質の探索は，昆虫の生理生態をより深く理解するとともに，化学物質を介した害虫制御技術の開発にも繋がると期待できる．本研究では，アカスジカメムシの餌探索や吸汁行動がセリ科特有の化学成分により刺激されると予想し，フェンネルを材料にその活性物質の探索を行った．まず，実験室でアカスジカメムシにフェンネルの若い果実や成熟果実，花を与えると，いずれに対しても短時間のうちにたどり着き，吸汁を開始することが確認できた．次に，フェンネルの果実や花をメタノールに浸漬し含まれる化学成分を除去したところ，アカスジカメムシはそのフェンネルに関心を示さなくなった．さらに，フェンネルの若い果実をメタノールで抽出した液をアカスジカメムシに与えると，抽出液に触れなくても本カメムシが口吻を伸ばし，だ液を出しながら徘徊する様子が観察された．以上の結果から，アカスジカメムシの餌探索ならびに吸汁行動はフェンネルに含まれる揮発性の化学成分により刺激されることが示唆された．フェンネル果実のメタノール抽出液を GC/MS で分析したところ，アネトール，フェンコン，リモネンが含まれることがわかり，少なくともアネトールとフェンコンにアカスジカメムシを誘引し，その吸汁行動を刺激する活性が認められた．

The stink bug, *Graphosoma rubrolineatum*, prefers to suck apiaceous plants, such as fennel. In general, phytophagous insects that feed only a limited number of plant species perceive unique plant chemicals as olfactory and gustatory cues to find food. Here, we report chemical stimulants found in fennel that elicit foraging and sucking behaviors of *G. rubrolineatum* adults. First, we confirmed that the stink bugs were attracted to fennel fruits (young and mature fruits) and flowers in the laboratory. On the other hand, when the fruits and flowers were soaked in methanol to remove their chemical components, the stink bugs were no longer attracted to the treated fennel. Furthermore, the stink bugs stretched their proboscis when they were exposed to methanol extract of fennel young fruits. Bioassays and chemical analyses revealed that anethole and fenchone found in fennel stimulate foraging and sucking behavior of *G. rubrolineatum*.

host recognition, anethole, fenchone

発表責任者：野下浩二（noge@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2E05-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

オオムギの根浸出物に含まれるストリゴラクトンの構造決定

Isolation and structure determination of novel strigolactones from Hordeum vulgare

○新井 菜摘[1]、米山 香織[2]、井上 美智[1]、内田 健一[3]、秋山 康紀[4]、謝 肖男[1] ([1]宇大農、[2]愛媛大農、[3]帝京大バイオ、[4]大阪府立大生命)
○Natsumi ARAI[1], Kaori YONEYAMA[2], Misato INOUE[1], Kenichi UCHIDA[3], Kohki AKIYAMA[4], Xiaonan XIE[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Ehime Univ., [3]Teikyo Univ., [4]Osaka Pref Univ.)

根寄生植物の種子発芽刺激物質として発見されたストリゴラクトン(strigolactone, SL)は、アーバスキュラー菌根菌(AM 菌)の共生に必須なシグナル分子であり、さらには植物地上部および地下部の形態形成を制御する植物ホルモンである。オオムギは根寄生植物の宿主であり、さらに枝分かれが多い品種が多数存在している。そこで、本研究では、まず、オオムギが生産する SL の同定および新奇 SL の構造解析を行った。オオムギは既知 SL が検出されていなかったが、機器分析および HPLC による生理活性試験により、オオムギには少なくとも３種類の新奇 SL の存在が示唆され、質量分析および NMR 解析から構造決定した。これら構造決定した SL の中に、これまで発見されていない、エノールエーテル結合がエポキシ化された新奇 SL も含まれている。

Strigolactones function as germination stimulants of root parasitic plants and hyphal branching factors of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere, and in plants they act as a novel class of plant hormones inhibiting shoot branching. In this study, isolation and structure determination of strigolactones from *Hordeum vulgare* was conducted. Three novel SLs were found from *Hordeum vulgare* root exudate. Purification and structure elucidation of the novel SLs will be presented.

barley, strigolactone, plant hormones

講演番号：2E05-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

N-fatty acyl 5-hydroxytryptamines isolated from *Dialium corbisieri* Staner (Fabaceae)

○Atakuru Dradre[1,2], Takuya Koseki[2], Yoshihito Shiono[1,2] ([1]UGAS, Iwate Univ., [2]Yamagata Univ.)

Dialium corbisieri is belonging to a species of flowering plant in the family Fabaceae in rain forest of Democratic Republic of Congo and Central Africa Region. Belonging to Congolese traditional medicine, the seeds of *D. corbisieri* manage several infectious and chronic conditions probably through the secondary metabolites which are contained therein. Dried seeds (1000 g) of *D. corbisieri* were extracted with ethanol (EtOH). After removal of the solvent, the EtOH extract was suspended in water and partitioned with ethyl acetate (EtOAc) to give the EtOAc (17.4 g) residue. This ethyl acetate residue was subject to passage over silica gel column chromatography and eluted with CHCl3-EtOAc and ODS column with MeOH-H_2O (0-100-100-0) before a purification by flash column $CHCl_3$/MeOH (95:5), to obtain two compounds **1** and **2**. Both compounds were detected and identified as *N*-fatty acyl 5-hydroxytryptamines by analysis of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Compound **1** was obtained as a yellow powder. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of **1** showed signals consistent with a tryptamine and a fatty acid amide moieties. The characteristic ^{1}H NMR signal at δ_H 2.60, 3.30, 7.82, 8.54 and 10.43 and ^{13}C NMR signals at δ_C 39.6, 102.7, 111.4, 111.7, 112.1, 123.5, 128.4, 131.3 and 150.7 in **1**, indicated the presence of the 5-hydroxytryptamine moiety. The NMR signals at δ_H 0.80, 1.18, 1.21, 1.49 and 2.00 and δ_C 14.5, 22.7, 29.6, 31.8 and 172.5 revealed the presence of fatty acid amide in the molecule. Finally long-range correlations of δ_H 3.30 to δ_C 172.5 in HMBC showed that fatty acid was attached to the tryptamine moiety through amide bond. The further structure determination of **1** will be discussed as well as compound **2**.

Dialium corbisieri Staner, Fabaceae, N-fatty acyl 5-hydroxytryptamines

講演番号：2E05-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

カテキン酸化反応における C 環 2 位の立体化学の影響

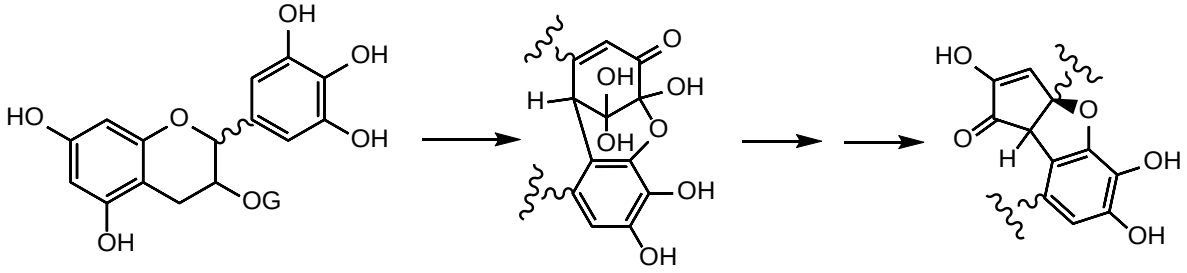
Oxidation of gallocatechin gallate

○坪井 未裕[1]、柳瀬 笑子[2] ([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生)
○Miyu TSUBO[1], Emiko YANASE[2] ([1]Gifu Univ, [2]Gifu Univ.)

ウーロンテアニン類は、ウーロン茶の茶葉中から単離されたカテキンの二量体であり、B 環に由来する特徴的な部分構造を有している。EGC および EGCG を塩化銅条件下で酸化すると、3 段階の反応を経てウーロンテアニン類が生成する。この反応では反応点である B 環部以外の構造が反応性に影響を与えることが明らかになっている。そこで、本研究では、C 環 2 位の立体化学が異なる EGCG と GCG について塩化銅を用いて酸化反応を行い、その影響を検討することにした。

それぞれの反応液を LC-MS 分析に供したところ、EGCG の場合と同様に GCG の場合でもウーロンテアニン類の生成が確認できた。しかし、その生成量は少なかった。この反応を詳細に検討したところ、反応中間体であるデヒドロテアシネンシンの生成量が少なく、別の新たな結合をもつ化合物が生成していることが分かった。本発表ではその構造についても報告する。

Oolongtheanins are catechin dimers isolated form oolong tea. It is formed by condensation reaction between B-ring of pyrogallol type of catechins via three steps. Previously, we clarified this condensation reaction is influenced by interactions between other parts than B-ring in the molecules. The aim of this study is to clarify the effect of stereochemistry at 2-position in C-ring on this reaction. GCG was treated with CuCl2, and LC-MS analysis was performed to reaction mixture. As a result, production of the compound assumed to steric isomer of oolongtheanine was observed, although the yield is lower than the same with EGCG. This reaction was monitored by LC-MS, the formation of novel peak other than the intermediate of oolongtheanine was observed. It is presumed that this compound has different intermolecular bond from oolongtheanine intermediate.



EGCG or GCG　　Dehydrotheasinensin　　oolongtheanine

catechin, oxidation, EGCG

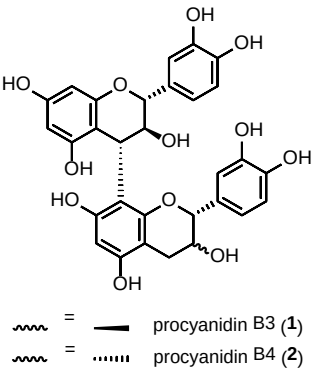
講演番号：2E05-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

プロシアニジン B4 の酸化反応における生成物の構造解析

Structural determination of procyanidin B4 oxidants

○片岡 永[1]、柳瀬 笑子[1,2] ([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生)
○Haruka KATAOKA[1], Emiko YANASE[1,2] ([1]Gifu Univ, [2]Gifu Univ.)

プロシアニジンは二次代謝成分として植物中に広く分布するポリフェノール類の一種である。カテキンやエピカテキンが多数重合した構造を有し、その結合様式や構成単位の違いによって多様な立体構造をとる。これらのプロシアニジンは、酸化されることで食品の色などを変化させる原因になると考えられる。当研究室では以前に(+)カテキン 2 量体の procyanidin B3(**1**)を酸化することで、分子内で新たに結合してスピロ構造を形成することを明らかにした。ここでは、立体の違いによる影響をみる目的で procyanidin B4(**2**)の酸化について検討することとした。



2 は(+)カテキンおよび(-)エピカテキンを原料に 7 段階の反応にて総収率 26%で合成し、これを H_2O 中で塩化銅(II)を用いて酸化させた。HPLC で反応を追跡したところ **2** の減少とともに 8 つのピーク生成が確認され、これらを単離して構造解析を行った。その結果、8 種の酸化生成物が立体異性体で **1** の場合と同様にスピロ構造を形成していることが明らかとなった。

本発表では **1** と **2** の酸化生成物について比較しながら、これらの生成機構を考察する。

Procyanidins are a type of polyphenols that are widely distributed in plants as a secondary metabolic component. They have a polymerized structure of catechin and epicatechin, and have a variety of steric structures depending on their bonding modes and constituent units. These procyanidins can be oxidized, causing changes in the color and other properties of food. In our laboratory, we have oxidated procyanidin B3 (**1**) for (+)-catechin dimer, and clarified the structure of the oxidant, which was newly formed intramolecular bonds to form a spiro ring. Here, we studied the oxidation of procyanidin B4(**2**) with the aim of clarifying the effect of stereochemistry.

The synthesis of **2** was done in a 7-step reaction with a total yield of 26% from (+)-catechin and (-)-epicatechin. When **2** was oxidized in water with copper(II) chloride, eight products were observed with a decrease in **2**. As a result of the structural analysis, it showed that the eight oxidation products were stereoisomers and formed a spiro ring structure as in the case of **1**.

Here, we will consider the mechanism of these formations while comparing the oxidation products of **1** and **2**.

procyanidin, oxidation, structure determination

講演番号：2E05-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

イネのインディカ亜種に特有のファイトアンティシピン
A flavonoid phytoanticipin in *indica* subspecies in rice
○倉田 尭直[1]、村田 晃一[1]、假谷 佳祐[2]、吉川 貴徳[3]、寺石 政義[3]、上野 琴巳[4]、石原 亨[4]([1]鳥取大院持続性社会、[2]鳥取大学院連農、[3]京都大院農、[4]鳥取大農)
○AKINAO KURATA[1], KOICHI MURATA[1], KEISUKE KARIYA[2], TAKANORI YOSHIKAWA[3], MASAYOSHI TERAISHI[3], KOTOMI UENO[4], ATSUSHI ISHIHARA[4] ([1]Grad. Sch. Sustainability Sci., Tottori Univ., [2]United. Grad. Sch. Agr., Tottori Univ., [3]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [4]Fac. Agr., Tottori Univ.)

これまでの研究で、イネのインディカ亜種に属する品種 Kasalath は、主要なファイトアレキシンを蓄積しないことが見出された。そこで、Kasalath はファイトアンティシピンを蓄積している可能性があると考え、その探索を行った。Kasalath およびインディカ亜種に属する日本晴の葉に蓄積する化合物を HPLC や LC-MS で分析・比較すると、Kasalath は日本晴に存在しない化合物 **1** を蓄積していた。この化合物を精製し、構造を解析したところ、thevetiaflavone-8-*C*-glucoside であった。化合物 **1** は 0.3 mM 以上の濃度でいもち病菌の胞子発芽を阻害したことから、**1** はファイトアンティシピンとして機能していると考えられた。

また、日本晴と Kasalath から作出された染色体断片置換系統群（CSSLs）と戻し交雑自殖系統群（BILs）を使用したマッピングにより第 2 染色体長腕に **1** の蓄積量と関連する染色体領域が見出された。さらに、世界のイネ・コアコレクションおよび日本のイネ・コアコレクションを用いて、様々な品種における **1** の蓄積量を測定したところ、**1** はインディカ亜種に特有の化合物であることがわかった。得られた結果をもとに、ゲノムワイド関連解析を行うと、**1** の蓄積量と相関する SNPs が CSSLs や BILs の解析で見出された染色体領域に存在することが明らかになった。

A rice cultivar Kasalath belonging to *indica* subspecies does not accumulate major phytoalexins. Thus, we hypothesized the presence of unique phytoanticipins in the cultivar. The HPLC and LC-MS analyses of metabolites in Kasalath and a *japonica* cultivar Nipponbare revealed that compound **1** is present only in Kasalath. This compound was identified to be thevetiaflavone-8-*C*-glucoside by spectroscopic analyses. Compound **1** exhibited antifungal activity by inhibiting the conidial germination of rice blast fungus *Pyricularia oryzae*, demonstrating that **1** plays a role of phytoanticipin. The mapping of the gene responsible for differential accumulation of **1** using chromosome segment substitution lines (CSSLs) and backcross inbred lines (BILs) showed that a chromosomal region on long arm of chr2 is associated with the accumulation of **1**. The analysis of **1** in cultivars in the world rice core collection (WRC) and Japanese rice core collection (JRC) indicated that **1** is a characteristic to the cultivars in *indica* subspecies. The genome-wide association study using WRC and JRC detected SNPs associated with the accumulation of **1** in the same region found by the mapping using CSSLs and BILs.

phytoanticipin, Secondary metabolism, flavonoid

発表責任者：石原亨（aishihara@tottori-u.ac.jp）

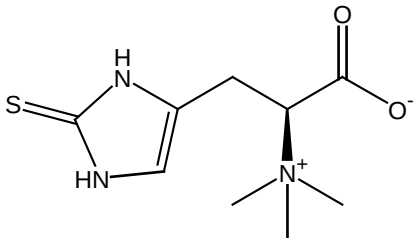
講演番号：2E05-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

たもぎ茸エルゴチオネイン高純度試薬の開発

Development of highly pure reagent of L-(+)-Ergothioneine derived from Tamogitake

○中塚 進一、森 拓哉、松本 恵実（長良サイエンス株式会社）
○shin-ichi Nakatsuka, Takuya Mori, Emi Matsumoto (Nagara Science Co., Ltd.)

【目的】L-(+)-Ergothioneine は、アミノ酸の一種で、きのこや一部の菌類しか生合成できない成分である。強力な活性酸素消去作用を持つ抗酸化成分として知られ、記憶力の向上や、認知症、アルツハイマー病の改善等の薬効が期待されている。非常に興味深い化合物であるが、その研究用試薬は海外製のみで、これまで国内製はなかった。そこで我々は、L-(+)-Ergothioneine 試薬を国内で安定的にかつ安価に供給するため、製造法を検討することにした。
【方法・結果】L-(+)-Ergothioneine は、きのこの中で、特に、たもぎ茸に多く含まれていることが報告されている。そこで、栽培品種のたもぎ茸からの精製法を検討した。たもぎ茸の乾燥粉末を溶媒抽出後、各種カラムクロマトグラフィーに供し、さらに目的物画分を結晶化法により精製することで、純度 98%(HPLC)以上の L-(+)-Ergothioneine を約 15g 得ることができた。得られた目的物の構造及び純度を NMR, HPLC 等の機器分析で確認し、他社製品と同等以上であることを確認した。以上の結果、L-(+)-Ergothioneine の大量精製法を確立して、高純度試薬の開発・量産に成功した。



L-(+)-Ergothioneine

[Purpose] L- (+)-Ergothioneine is known as an antioxidant component with a strong active oxygen scavenging effect, and is expected to have medicinal effects such as improvement of memory and improvement of dementia and Alzheimer's disease. Therefore, we decided to study the manufacturing method in order to stably and inexpensively supply the L- (+)-Ergothioneine reagent. [Method / Result] We examined a purification method from the cultivar Tamogitake. After extracting the dry powder of Tamogitake with a solvent, it was subjected to various column chromatography, and the target fraction was further purified by a crystallization method. We were able to obtain 15g of L- (+)-Ergothioneine having a purity of 98% (HPLC) or more.

Ergothioneine, antioxidant, dementia

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：2E05-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム E

コセンダングサ由来のオカダンゴムシに対する忌避物質としてのフェルラ酸メチルの同定

Identification of methyl ferulate as repellents against the pill-bug, *Armadillidium vulgare* from *Bidens pilosa* var. *pilosa*

○石田 雅司[1]、手林 慎一[1]、磯田 童奈[1]、阿部 晴希[1]、佐藤 正資[2] ([1]高知大農、[2]香川大農)
○Masashi ISHIDA[1], Shinichi Tebayashi[1], Wakana Isyoda[1], Haruki Abe[1], Masashi Sato[2] ([1]Kochi Univ., [2]Kagawa Univ.)

オカダンゴムシ *Armadillidium vulgare* は広食性の害虫として農業において防除対象とされている。一方、家庭園芸では不快害虫として嫌われているが、消費者の嗜好から合成殺虫剤の使用は敬遠されており、新たなダンゴムシ防除法の探索が求められている。本研究では野生植物からダンゴムシ忌避物質を探索しダンゴムシの忌避剤を開発することを目的とした。

高知県野生植物 43 種を採集し地上部と地下部に分けて抽出物（86 試料）を作成した。この抽出物をトレー法にてダンゴムシの忌避活性を評価した。その結果、76 試料に忌避活性を確認し、13 試料に忌避率 90%以上の高い活性が確認された。これらの中から地上部、地下部共に忌避率 90%以上の高い忌避活性を示したコセンダングサを対象にダンゴムシ忌避物質の追及を行った。まずコセンダングサの地下部（350g）を採集し MeOH 抽出物を作製した。これの忌避活性を確認後、液-液分配分画および、順相系クロマト、逆相系クロマトにて精製し活性物質 A の単離を行った。LC-MS、NMR の測定結果から忌避物質 A をフェルラ酸メチルと同定した。

フェルラ酸メチルは 500ppm まで忌避活性が確認され、フェルラ酸自体は 50ppm まで活性が確認されたものの、フェルラ酸エチルは 500ppm でも活性が確認されなかったとからエステル部が活性発現に影響を与えることが判明した。さらにメトキシ基の置換位置が 3 位であると活性が強まることや水酸基の置換位置の忌避活性への影響は小さいことが判明した。これらの結果は効果的なダンゴムシ忌避剤の開発に役立つものと考えられた。

The pill-bug, *Armadillidium vulgare*, is an agricultural pest feeding on various crops. To develop a newly pest control methods against the pill-bug, it was conducted to search for repellents from 43 species of wild plants in Kochi Prefecture. The extracts (86 samples), which were prepared from roots or shoots, were evaluated for their repellent activity against pill-bug using a tray method. As a result, 76 samples were found to have repellent activity, among these, the both of extracts from root and shoot of *Bidens pilosa* var. *pilosa* showed high repellent activity (>90%). Thus, the root of the plant (350g) was extract with MeOH and used for investigation of repellent. The extract was purified by liquid-liquid partition, silica gel chromatography, and reversed-phased chromatography to isolate the repellent A. From the results of LC-MS and NMR measurements, the compound A was identified as methyl ferulate.

methyl ferulate, repellent, *Armadillidium vulgare*

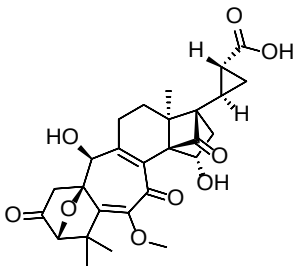
発表責任者：手林慎一（tebayasi@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2E06-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

ジャガイモシストセンチュウの孵化誘因物質

Hatching inducer of potato cyst nematodes

○渡邉 正悟、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Shogo Watanabe, Shinji Kishimoto, Kenji Watanabe (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)



solanoeclepin A (**1**)

ジャガイモシストセンチュウ（Potato Cyst Nematode, PCN）は、ナス科植物特異的に寄生して作物の減収などを招き、世界中で甚大な被害を及ぼしている害虫である。これまでに数多くの防除研究が行われきたものの、未だ有効な手段は確立されていない。その原因として、PCN の卵はシストと呼ばれる硬い殻の中で休眠状態を取り、この状態は長期間生命を維持させ、薬剤耐性も高いことが挙げられる。一方、休眠中のシストに対して宿主植物が放出する特定の化学物質が作用することで孵化が誘因される。PCN の孵化誘因物質の一つとしてジャガイモの水耕栽培液より単離された solanoeclepin A (**1**)[1] があり、これを用いる効果的な駆除法の開発が期待されている。しかしながら、天然から得られる **1** が極微量であることや、化学合成による供給では非常にコストが高くなることから農薬化実現は困難な状況である。そこで我々は、ナス科のモデル植物である Micro-Tom（トマト）を用いて、**1** の生合成遺伝子と経路を解明できれば、その生産量の制御、さらには、PCN の孵化を制御できると期待した。本研究では、PCN の孵化誘因活性があるトマト根浸出液から **1** やその類似構造を含む孵化誘因物質を単離するために、活性成分の分析、および分離精製法の確立を目指した。

Potato cyst nematodes (PCN) are parasitic nematodes on roots of Solanaceae plants such as potato, tomato, eggplant, etc., and has caused destructive damage to those host plants. Although a great deal of effort has been devoted to control PCN, no efficient methodology has been yet achieved. PCN overwinter in environmental and chemical resistant shells called cyst, which enables them to survive under harsh conditions for long periods. Solanoeclepin A (**1**), first isolated from potato hydroponic medium, has been highly anticipated as its potent hatching activity toward PCN cysts, however, limited amount isolated as natural products and high cost of chemical synthesis have prevented us from using **1** as an agrichemical material. Thus, we embarked on elucidation of biosynthetic genes and pathway of **1** in Micro-Tom, a model of Solanaceae, to control production of **1**. In this work, we analyzed hatching inducers secreted from tomato roots and tried to identify active component(s).

[1] Mulder, J. G. *et al.* PCT Int. Appl. WO 93/02, 083 (1992); *Chem. Abstr.* **1986**, *118*, 185844z.

solanoeclepin A, potato cyst nematode, hatching inducer

講演番号：2E06-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

網羅的ゲノム解析によるシストセンチュウ孵化誘因物質 solanoeclepin A 生合成機構の解明

Elucidation of the biosynthetic mechanism of solanoeclepin A exhibiting cyst nematode hatching activity by genomic analysis

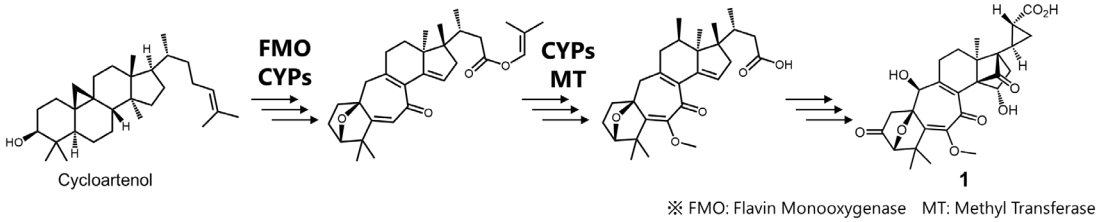
○岡本 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Takumi OKAMOTO, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. Shizuoka)

ジャガイモシストセンチュウ (Potato Cyst Nematode, PCN)はナス科植物特異的に寄生し、世界中で多大な被害を及ぼしている害虫である。対して、PCN の孵化誘因物質である solanoeclepin A (**1**)の生合成遺伝子・経路解明も試みられてきたが、未だ不明なままである。そこで我々は、ナス科植物のモデル植物である Micro-Tom を用いた網羅的なゲノム解析を行うことで、生合成遺伝子の特定と生合成経路の解明を試みた。

Micro-Tom を用いた PCN 孵化実験は報告例がないため、水耕栽培の後に得られる水耕液を用いた孵化実験系の確立を試みた。その後、確立した実験系を用いて変異誘導株を用いた孵化活性に対するスクリーニング試験を行った。その結果、野生株と同程度の孵化率を示した高孵化系統 15 系統、negative control と同程度の孵化率を示した低孵化系統 20 系統を獲得することができた。この結果を基に、各系統群に対して HiSeq X による網羅的なゲノム解析を行ったところ、154 個の候補遺伝子を含む領域を獲得することに成功した。さらに、transcriptome 解析や発現量解析によってさらなる候補遺伝子の絞り込みを行うことで、世界で初めて **1** の生合成経路を推定することができた (scheme 1)。

PCN is a Solanaceae specific parasite which causes extensive damage worldwide. On the other hands, solanoeclepin A (**1**) has a strong hatching activity for PCN, but biosynthetic genes and pathway are unknow yet. Therefore, we tried to elucidate genes and pathway of **1** by genomic analysis using Micro-Tom which is a model plant of Solanaceae.

First of all, we established the method of PCN hatching assay using Micro-Tom hydroponic fluid. Next, we performed above assays for screening mutagenesis induced Micro-Tom strains. As results, we obtained 15 strains which have high hatching activity and 20 strains which have low hatching activity. Based on these results, we could obtain 154 regions which include candidate genes, comparing genome of high and low hatching strains. Furthermore, we could illustareate proposed biosynthetic pathway of **1** by further narrowing down the candidate genes through transcriptome and gene expression analysis (scheme 1).



Scheme 1. Proposed biosynthetic pathway of **1**

solanoeclepin A, biosynthesis, NGS

発表責任者：岡本拓実（takumi@u-shizuoka-ken.ac.jp）

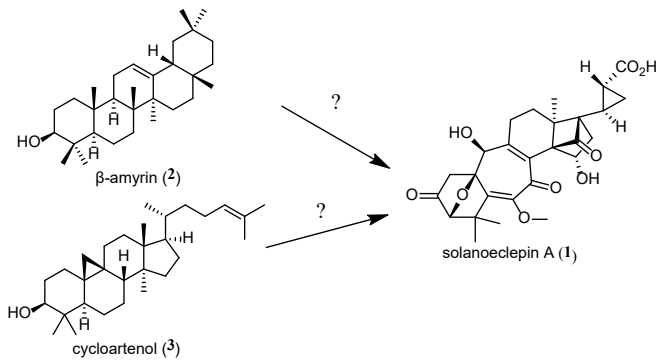
講演番号：2E06-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

シストセンチュウ孵化誘引物質 solanoeclepin A 生合成遺伝子の探索

Exploring biosynthetic genes of solanoeclepin A exhibiting cyst nematode hatching inducer

○竹島 実加、岡本 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○ Mika TAKESHIMA, Takumi OKAMOTO, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. Shizuoka)

シストセンチュウはナス科あるいはマメ科植物に寄生し深刻な被害を及ぼしているが、未だ有効な防除手段は確立されていない。そこでシストセンチュウの孵化を促進する物質である solanoeclepin A（**1**）の生合成遺伝子および経路を特定することを目的として研究に着手した。我々はナス科のモデル植物である Micro-Tom 変異体ライブラリを用いた網羅的なゲノム解析と **1** の化学構造から **1** 生合成遺伝子の候補として cytochrome P450、dioxygenase、methyltransferase などを見出している。本研究ではこれらの遺伝子の機能解析を行った。



候補とした遺伝子について Micro-Tom を用いた CRISPR/ Cas9 による遺伝子破壊を試みた。また、モデル微生物である出芽酵母を用いた生合成の再構築による生合成中間体の取得を目指した。**1** 生合成の出発物質と予想された β-amyrin（**2**）あるいは cycloartenol（**3**）の生合成遺伝子を発現させた出芽酵母を作出し、候補として挙げられている遺伝子を共発現させ培養した。培養した酵母に蓄積している代謝物を LC-MS を用いて分析することにより **1** の生産及び中間体の構造を検討した。現在、候補遺伝子の機能を検討しており、本発表ではその結果について報告する。

Cyst nematodes parasitize leguminous or solanaceae plants and cause serious damage to the hosts. Solanoeclepin A (**1**) was isolated as one of hatch-stimulating substances for potato cyst nematode, however, biosynthetic pathway and genes of **1** have not been identified. We picked up some candidates involved in biosynthesis of **1** such as cytochrome P450, dioxygenase and methyltransferase based on chemical structure of **1**, gene expression and random mutagenesis of Micro-Tom, model of Solanaceae. In this study, we analyzed the function of candidate genes to unveil biosynthesis of **1**.

Candidate genes were deleted in Micro-Tom using CRISPR/ Cas9. Meanwhile, these genes were heterologously expressed in *S. cerevisiae*, harboring β-amyrin synthase or cycloartenol synthase gene since β-amyrin (**2**) or cycloartenol (**3**) is proposed substrate of **1**. The transformants were cultured and metabolites were analyzed by LC-MS to identify newly formed substances.

biosynthesis, solanoeclepin A, heterologous expression

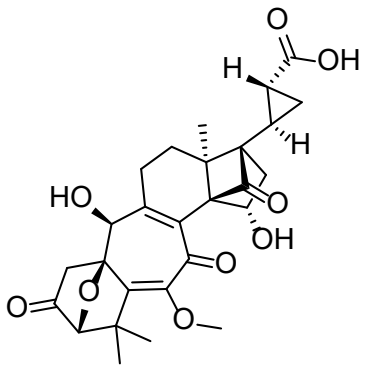
講演番号：2E06-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

Nicotiana benthamiana を宿主とする solanoeclepin A 推定生合成遺伝子の異宿主発現系の構築

Establishment of expression system of the putative biosynthetic genes of solanoeclepin A in *Nicotiana benthamiana*

○山本 泰誠[1,2]、岡本 拓実[1]、岸本 真治[1]、渡辺 賢二[1]（[1]静岡県大薬、[2]アデノプリベント）
○Taisei Yamamoto[1,2], Takumi Okamoto[1], Shinji Kishimoto[1], Kenji Watanabe[1]（[1]Dept. Pharm. Sci., University of Shizuoka, [2]Adenoprevent Co., Ltd.）

シストセンチュウはジャガイモやトマトなどのナス科の植物に寄生する線虫の一種である。シストセンチュウは植物の根に寄生し、植物の栄養を摂取するため、植物の生長弱化あるいは枯死を引き起こす。シストセンチュウの卵はシストと呼ばれる硬い殻の中で休眠状態をとり、シストが形成されると薬剤や環境変化に強い耐性をもち、宿主植物のない状態でも長期間の生存が可能となり、子孫を残す。シストセンチュウ根絶のためにはシストを孵化させない、あるいは宿主植物のない状態で孵化させるというアプローチが必要となる。我々はナス科植物の根から分泌される solanoeclepin A (**1**) がシストの孵化を誘導することに着目し、生合成を欠損させたシストセンチュウ抵抗性品種の作出を目的として研究に着手した。



solanoeclepin A (**1**)

そこで我々は **1** の生合成経路を推定し、Micro-Tom を用いた網羅的な発現解析により生合成遺伝子群を予測した。予測した生合成遺伝子群を Agroinfiltration 法及び Vacum-Agroinfiltration 法による *Nicotiana benthamiana* での一過性発現を試みることで、推定生合成経路の妥当性を検証したので報告する。

Cyst nematodes parasitize plants in the *Solanaceae* family such as potatoes and tomatoes. Cyst nematodes parasitize the roots of plants and ingest the nutrients of the plants, causing plant growth weakening or death. Eggs of them dormant in a hard shell called cysts, and they are highly resistant to drugs and environmental changes, and can survive for a long time even in the absence of host plants, leave offspring. One way to eliminate it, an approach of not hatching cysts or hatching without a host plant is required. Focused on solanoeclepin A (**1**) secreted from the roots of Solanaceae plants induces cyst hatching, we started research to knockout the biosynthesis of **1** to produce cyst nematode resistant varieties.

Therefore, we estimated the biosynthetic pathway of **1** and predicted the biosynthetic gene cluster in Micro-Tom through the comprehensive expression. We report the validity of the putative biosynthetic pathway by attempting transient expression of the predicted biosynthetic genes in *Nicotiana benthamiana* by Agroinfiltration and Vacum-Agroinfiltration methods.

Solanoeclepin, Solanaceae, Cyst

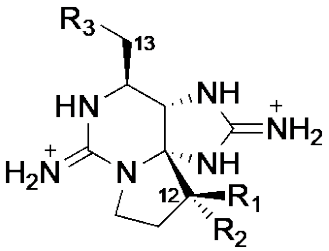
講演番号：2E06-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒淡水産藍藻における同定

Synthesis of a predicted biosynthetic intermediate of saxitoxin, and its identification in a toxic freshwater cyanobacterium

○袴田 真有[1]、東海林 千容[1]、長 由扶子[1]、安達 栞菜[2]、石塚 颯[2]、工藤 雄大[1,3]、此木 敬一[1]、大島 泰克[4]、長澤 和夫[2]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]東農工大院工、[3]東北大学際研、[4]東北大院生命)
○Mayu Hakamada[1], Chihiro Tokairin[1], Yuko Cho[1], Kanna Adachi[2], Hayate Ishizuka[2], Yuta Kudo[1,3], Keiichi Konoki[1], Yasukatsu Oshima[4], Kazuo Nagasawa[2], Mari Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ. of Agri & Tech, [3]Tohoku Univ. FRIS, [4]Tohoku Univ. Life Sci.)

[背景・目的] サキシトキシン(saxitoxin, STX, **1**)は、麻痺性貝毒(PSTs)の代表的化合物であり、強力な神経毒である。PSTs は、海産渦鞭毛藻や淡水産の藍藻によって生産され、海洋では二枚貝に蓄積し、食中毒の原因となる。その生合成経路は、有毒藍藻から発見された生合成遺伝子配列により、L-アルギニンを出発物質とした経路が推定され、一部の類似の遺伝子は、有毒渦鞭毛藻からも同定された。我々は、推定生合成中間体 4 種を化学合成し、これらの有毒藻類中に存在することや、ラベル体投与実験で前駆体であることを証明した。[1,2] Narayan らは数種の生合成遺伝子を異種発現し、基質特異性から酸化の順番を提唱したが [3]、三環形成や酸化過程には未解明な点が多い。昨年度、我々は 12,12,13-trideoxy-dcSTX (**2**)を化学合成し、有毒渦鞭毛藻 2 種に存在することを示した。本研究では、**2** の合成法を改善し、さらに有毒藍藻からも同定したので報告する。



STX (**1**) R_1, R_2=OH, R_3=$OCONH_2$
2 R_1, R_2, R_3=H

[方法]長澤らの dcSTX の合成中間体 [4]を Barton-McCombie 反応によって脱酸素化し、脱保護前に十分に精製することで、より純度の高い **2** を得た。また、オーストラリア産有毒藍藻 *Dolichospermum circinale* (TA04 株)の培養藻体粗精製物を調製し、逆相 HR-LC-MS/MS で分析した。

[結果] *D. circinale* (TA04)から逆相 HR-LC-MS/MS で、保持時間、精密質量、MS/MS パターンが、合成 **2** と一致するピークが得られた。この結果から、渦鞭毛藻のみではなく藍藻においても、三環形成後に酸化が進行する可能性が示された。

Saxitoxin (STX, **1**) is the representative toxin of paralytic shellfish toxins (PSTs). We have synthesized and identified some predicted biosynthetic intermediates of PSTs in the toxin-producing dinoflagellates and cyanobacterium to clarify the biosynthetic pathway. In this study, we improved the preparation procedure of 12,12,13-trideoxy-dcSTX (**2**), and identified **2** in the cultured cells of the toxic freshwater cyanobacterium *Dolichospermum circinale* (TA04) using reversed phase HR-LC-MS/MS. Compound **2** was also identified in toxic dinoflagellates previously. The result suggests that **2** is a possible substrate of the oxidation reaction.

[Reference] 1) Tsuchiya, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Nagasawa, K.; Oshima, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Sci. Rep*., **2016**, 6:20340. 2) Tsuchiya, S.; Cho, Y.; Yoshioka, R.; Konoki, K.; Nagasawa, K.; Oshima, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2017**, 56, 5327–5331. 3) Lukowski, A. L.; Ellinwood, D. C.; Hinze, M. E.; De Luca, R. J.; Du Bois, J.; Hall, S.; Narayan, A. R. H. *J. Am. Chem. Soc*., **2018**, 140, 11863–11869. 4) Iwamoto, O.; Nagasawa, K. *Org. Lett*. **2010**, 12, 2150–2153.

saxitoxin, paralytic shellfish toxins, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E06-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

渦鞭毛藻におけるサキシトキシン生合成酵素 SxtG の発現、局在及び活性の解析
Expression, subcellular localization and activity of saxitoxin biosynthetic enzyme, SxtG in dinoflagellates

○長 由扶子[1]、日出間 志寿[2]、大村 卓朗[3]、土屋 成輝[1]、小池 一彦[4]、此木 敬一[1]、大島 泰克[5]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]福島医大、[3]水圏科学、[4]広島大院統合生命、[5]東北大院生命)
○Yuko CHO[1], Shizu Hidema[2], Takuo Omura[3], Shigeki Tsuchiya[1], Kazuhiko Koike[4], Keiichi Konoki[1], Yasukatsu Oshima[5], Mari Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Fukushima Med. Univ, [3]LASC, [4]Hiroshima Univ. Integ. Sci. Life, [5]Tohoku Univ. Life Sci.)

渦鞭毛藻でのサキシトキシン(STX)生合成については不明な点が多く残されている。これまでに我々は STX 生合成の初発の反応を司る酵素 SxtA タンパク質発現が渦鞭毛藻株の毒生産と関連していること及び葉緑体局在であることを明らかにした。さらに有毒種から生じた有毒、無毒株の比較研究から、無毒化の鍵が *sxtA* の 3'非翻訳領域であるという仮説を提唱した[1)]。無毒株において SxtA 以外の酵素は活性を有することが推察されたため、本研究では SxtA の次の反応を触媒する酵素、SxtG に注目した。渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* （Group I）の同一細胞に由来する有毒、無毒株の *sxtG* 遺伝子発現量に差がなく、抗 SxtG ペプチド抗体による免疫染色でも有毒、無毒株ともに SxtG タンパク質の発現が見られた。さらに抗 SxtA ペプチド抗体との多重染色により局在オルガネラを推定した。アミジノトランスフェラーゼ活性を調べるために渦鞭毛藻の細胞から粗酵素液を調製し、STX 生合成中間体 Int-A'及びアルギニンと共にインキュベーションした。基質 Int-A'及びその反応生成物の Int-C'2 の標品として合成品を用いた[2)]。カラムスイッチング高分解能 HILIC-MS 法[3)]で分析し有毒、無毒株の両反応液において *in vitro* で Int-C'2 が生成することを確認した。渦鞭毛藻では無毒株でも活性を有する SxtG が発現していることが明らかとなった。

The biosynthesis of saxitoxin in dinoflagellates has not been fully elucidated. In this study, we focused on SxtG, one of STX biosynthetic enzymes that catalyzes the next reaction of SxtA, and investigated its expression, localization, and activity. There was no difference in the expression of the *sxtG* gene between toxic and non-toxic subclone strains of the dinoflagellate, *Alexandrium catenella* (Group I) isolated from the same single-cell strain (toxic), and immunostaining with anti-SxtG peptide antibody showed expression of SxtG protein in both subclones. Furthermore, multiple staining with anti-SxtA peptide antibody was used to estimate the localized organelle. To investigate the amidinotransferase activity, crude enzyme extracts were prepared from dinoflagellate cells and incubated with a STX biosynthetic intermediate, Int-A' and a precursor, arginine. Synthetic products were used as a substrate, Int-A' and its reaction product, Int-C'2. [2)] By column-switching high-resolution HILIC-MS[3)] , it was confirmed that Int-C'2 was produced *in vitro* in both reaction mixtures from the toxic and non-toxic subclones. These results indicated that non-toxic subclone expressed active SxtG.

[1)] Y. Cho, et al. *Harmful Algae*, 101, 101972 (2021). [2)] S. Tsuchiya, M. Yotsu-Yamashita, et al. *Org. Biomol. Chem.* 12, 3016–20 (2014). [3)] Y. Cho, et al. *Sci. Rep.*, 9, 3460 (2019).

saxitoxin, biosynthesis, enzyme

発表責任者：長　由扶子（yuko.cho.a4@tohoku.ac.jp）

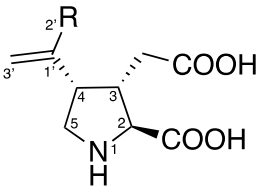
講演番号：2E06-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

異種発現環化酵素を用いた新規カイニン酸類縁体の調製

Preparation of a novel kainic acid analogue using the heterologously expressed cyclization enzyme

○山田 基生[1]、前野 優香理[1]、小瀧 裕一[2]、寺田 竜太[3]、工藤 雄大[1,4]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]福島学院大、[3]鹿児島大連合農、[4]東北大学際研)
○Motomi YAMADA[1], Yukari MAENO[1], Yuichi KOTAKI[2], Ryuta TERADA[3], Yuta KUDO[1,4], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Fukushima college, [3]Kagoshima Univ., [4]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】駆虫物質カイニン酸 (Kainic acid, KA, **1**) は神経細胞のイオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) の活性化剤である。最近、KA の生合成遺伝子が解明され、環化酵素 KabC を用いた KA の大量生産が報告された[1)]。また、前野らは[2)]ドウモイ酸 (DA) の環化酵素 DabC を用いて DA 類縁体調製に成功した。本研究では、KA 類縁体の構造活性相関研究を目的に、既報[1)]を参考に構築、最適化した KA 生産系を用いて非天然型 KA 類縁体の調製を目指した。



R = CH_3 (KA, **1**)
CH_2OH (**2**)

【方法】化学合成により活性への影響が報告されているピロリジン環の 4 位側鎖末端を変換した開環型前駆体を 4 種調製した。既報[1)]を参考に KabC を大腸菌で発現させ、その培養液中に開環型基質を添加し、数日間培養することで環化産物への変換を試みた。培養液を精製後、生成物を高分解能 (HR)-LC-MS で分析して反応を追跡し、生成物を単離、精製した。

【結果】本生産系を用いて、4 位側鎖末端が CH_2OH の開環型基質で環化が進行し、非天然型新規 KA 類縁体である **2** を得た。類縁体 **2** の構造については、各種 NMR により決定した。生物活性については今後評価する予定である。一方、4 位側鎖末端に COOH, COOMe, COOEt を持つ開環型基質は本生産系での環化は確認されず、KabC の基質特異性についても考察が得られた。

Kainic acid (KA) is an agonist of ionotropic glutamate receptors in neuron. Recently, Moore's group identified biosynthetic gene cluster of KA and reported a biotransformation methodology for efficient production of KA[1)]. In this study, we prepared an unnatural new analogue of KA for SAR study using this method. First, four linear substrates which have various C4 side chains were chemically synthesized. Next, we attempted cyclization of these substrates by adding them to the culture medium of *E. coli* which is expressing KabC. The culture condition was also optimized to improve the efficiency of this enzyme. As the result, only the C2'-CH_2OH linear substrate was successfully cyclized to **2** which was identified by NMR data. Evaluation of biological activity of **2** is now in progress. On the other hand, C2'-COOH, COOMe, COOEt linear substrates were not cyclized, suggesting substrate specificity of KabC.

1) Chekan, J. R.; Moore, B. S. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1–5.
2) Maeno, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 7894–7902.

kainic acid, biotransformation, chemo-enzymatic synthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E06-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

トウガラシ属植物に含まれるカプシエイト生成における cinnamyl alcohol dehydrogenase の関与の証明

Involvement of cinnamyl alcohol dehydrogenase in capsiate biosynthesis

○大野 翔太朗[1]、佐野 香織[2]、橋本 雅司[2]、中谷 祥恵[1]、古旗 賢二[1] ([1]城西大院薬、[2]城西大理)
○Shotaro OHNO[1], Kaori SANO[2], Masashi HASHIMOTO[2], Sachie NAKATANI[1], Kenji KOBATA[1] ([1]Josai Univ. Fharmaceutical Science, [2]Josai Univ. Science)

【目的】カプシノイドはナス科トウガラシ属持有の成分である。カプシノイドはバニリン (V) からバニリルアルコール (VOH) を経て生合成される。しかし、V から VOH への生合成メカニズムは不明である。我々は、リグニン合成を行うシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CAD) が V から VOH への代謝に関与する可能性を見出した。そこで本研究では、V の安定同位体を植物体に投与する in vivo トレーサー実験により、CAD のカプシノイド生合成への関与を明らかにすることとした。【方法】カプシノイドを主に生合成するトウガラシの緑果実にメトキシ基を重水素置換したバニリン (V[M+3]) を３回、7 日間投与した。一方、V[M+3]に加えて CAD 阻害剤を投与した。採取後、酢酸エチルで抽出し、カプシノイド類、カプサイシノイド類の[M]体、[M+3]体を LC/MSMS で測定した。【結果】V[M+3]を投与した植物体において、カプシノイドの[M+3]体 の各[M]体に対する存在比率が増加した。CAD 阻害剤の OHPAS は[M+3]のカプシノイド存在比率と低下させた。以上より、V から VOH の合成に CAD が関与していることが強く示唆された。

【Purpose】Capcinoids are a constituent of Capsicum plants (Solanaceae). Capcinoids are biosynthesized from vanillin (V) via vanillyl alcohol (VOH). However, the biosynthetic mechanism of V to VOH is not clear. We have found that cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), which is usually responsible for lignin synthesis, may be involved in the conversion of V to VOH. In this study, we attempted to clarify the involvement of CAD in capsinoid biosynthesis by in vivo tracer experiments in which stable isotopes of V were administered to plants. 【Materials and Methods】Vanillin having a deuterium substituted methoxy group (V[M+3]) was administered three times for 7 days to the green fruits of Capsicum plants, which mainly biosynthesize capsinoids. Meanwhile, CAD inhibitors were administered in addition to V[M+3]. After collection, the samples were extracted with ethyl acetate, and the [M] and [M+3] mass of capcinoids and capsaicinoids were measured by LC/MSMS. 【Results】 The ratio of [M+3] to [M] of capsinoids was increased in the fruits treated with V[M+3]. OHPAS, a CAD inhibitors decreased the ratio of [M+3] capcinoids.These results strongly suggest that CAD is involved in the synthesis of VOH from V in capsicum plants.

Capcinoids, Capsicum, cinnamyl alcohol dehydrogenase

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：2E06-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

セイヨウチャヒキにおける avenaol 生合成前駆体としての 6-*epi*-heliolactone の同定

Identification of 6-*epi*-heliolactone as a precursor of avenaol biosynthesis in black oat (*Avena strigosa* Schreb.)

○森山 太介[1]、塩谷 七洋[2]、古里 優衣[1]、矢部 広暉[1]、若林 孝俊[1]、水谷 正治[1]、滝川 浩郷[2]、杉本 幸裕[1] ([1]神大院農、[2]東大院農)

○ Daisuke MORIYAMA[1], Nanami SHIOTANI[2], Yui FURUSATO[1], Kouki YABE[1], Takatoshi WAKABAYASHI[1], Masaharu MIZUTANI[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Yukihiro SUGIMOTO[1] ([1]Kobe Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

ストリゴラクトン (SL) は地上部の枝分かれを制御する植物ホルモンの一つであり、根圏情報物質として働くアポカロテノイドである。SL はその構造から、ABC 環 (三環性のラクトン) を有する典型的 SL と、ABC 環を持たない非典型的 SL とに分類される。非典型的 SL としては methyl carlactonoate (MeCLA)、heliolactone、avenaol が知られている。ヒマワリが生産する heliolactone は MeCLA から生合成されることが報告されている。Avenaol の構造から MeCLA から生合成されると予想した。そこで avenaol 生合成経路の解明を目指すため、MeCLA 投与実験を行った。その結果、avenaol は検出されず heliolactone と類似性の高い化合物が検出された。次にラセミジアステレオマ混合物の heliolactone を投与すると avenaol が検出された。このことから avenaol は MeCLA から heliolactone を経由して生合成されることが示唆された。しかし、heliolactone と avenaol の 6 位の立体構造が異なる。そこでセイヨウチャヒキ約 7000 個体分の水耕液から heliolactone 様 SL を単離・精製し同定を試みた。^{1}H-NMR と CD スペクトルの結果から 6-*epi*-heliolactone であることが分かった。ラセミジアステレオマ混合物の heliolactone をそれぞれの立体異性体に分離し投与実験を行った。その結果、6-*epi*-heliolactone の立体異性体からは avenaol は検出されず、6-*epi*-heliolactone を投与した時のみ avenaol への変換を確認することができた。このことから avenaol の前駆体は 6-*epi*-heliolactone であることが分かった。

SLs function as a novel class of plant hormones that regulate shoot. SLs can be classified into two structurally distinct groups: canonical and non-canonical SLs. non-canonical SLs include MeCLA, heliolactone, avenaol. On the structure of avenaol, we expected that it is biosynthesized from MeCLA. We have attempted that MeCLA is converted to avenaol in feeding experiments. *Rac*-MeCLA was converted heliolactone-like SL, although was not detected to avenaol. *Rac*-heliolactone was converted to avenaol. We identified heliolactone-like SL as 6-*epi*-heliolactone. We show evidence that 6-*epi*-heliolactone is a biosynthetic precursor for avenaol in black oat.

strigolactone, biosynthesis, avenaol

講演番号：2E06-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

SlCYP722C による 18-oxo-CLA の生成と非酵素的反応による orobanchol の BC 環形成
Production of 18-oxo-CLA by SlCYP722C and BC-ring formation of orobanchol by non-enzymatic reaction

○本間 大翔[1]、若林 孝俊[1,2]、塩谷 七洋[3]、滝川 浩郷[2,3]、水谷 正治[1]、杉本 幸裕[1,2] ([1]神戸大農、[2]JST/JICA SATREPS、[3]東京大農)
○Masato HOMMA[1], Takatoshi WAKABAYASHI[1,2], Nanami SHIOTANI[3], Hirosato TAKIKAWA[2,3], Masaharu MIZUTANI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Kobe Univ., [2]JST/JICA SATREPS, [3]Tokyo Univ.)

植物ホルモンの一種であるストリゴラクトン (SL)のうち、ABC 環を有する典型的 SL は C 環の立体配置に基づき、orobanchol 型と strigol 型に分けられる。先行研究によりトマトにおいて SlCYP722C が carlactonoic acid (CLA)から orobanchol への変換に関与することが明らかとなった。しかし、CLA を基質に in vitro で酵素反応を行うと orobanchol のみならず、トマト根浸出液からは検出されないジアステレオマーである、*ent*-2′-*epi*-orobanchol (strigol 型)も生成した。本研究では、orobanchol の BC 環形成機構の全容解明を目指し、SlCYP722C の詳細な機能解析を行った。大腸菌発現系を用いて SlCYP722C の組換え酵素を発現し、精製を行った。CLA を基質に酵素反応を行った結果、CLA より分子量が 14 大きい、18-oxo-CLA と考えられるピークを検出した。酵素反応産物を TMS ジアゾメタンによりメチル化し LC-MS/MS 分析に供した結果、18-oxo-MeCLA 標品と一致するピークが検出された。よって SlCYP722C 反応産物の新規ピークを 18-oxo-CLA と同定した。先行研究において酵素反応溶液中に orobanchol と *ent*-2′-*epi*-orobanchol の両方が検出されたのは、18-oxo-CLA が非酵素的に環化した結果であるとわかった。トマト植物体において、SlCYP722C によって生成した 18-oxo-CLA を orobanchol へと立体選択的に変換する機構の存在が示唆された。

Our previous studies demonstrated that SlCYP722C is involved in the conversion of carlactonoic acid (CLA) to orobanchol; however, in vitro assay showed that the enzyme produces not only orobanchol but also its diastereomer, *ent*-2′-*epi*-orobanchol, which is not detected in tomato. In this study, we conducted a detailed biochemical analysis of SlCYP722C to elucidate the mechanism of the BC-ring formation in orobanchol. SlCYP722C was heterologously expressed in *E. coli* and then purified. Enzyme assay using the purified protein was performed and the reaction mixtures were subjected to LC–MS/MS analysis. As a result, a compound with a molecular weight 14 Da larger than that of CLA was detected, which was presumed to be 18-oxo-CLA. This compound was methylated by TMS-diazomethane. The resulting product exhibited identical chromatographic behavior and mass spectrum by LC-MS/MS analysis to those of the authentic 18-oxo-MeCLA, suggesting that reaction product of SlCYP722C is 18-oxo-CLA. Therefore, it is likely that orobanchol and its diastereomer were generated by the spontaneous cyclization of 18-oxo-CLA.

strigolactone, P450, biosynthesis

講演番号：2E06-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム E

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における MPBD 及び dictyoquinone の構造活性相関
Structure-activity Relationships of MPBD and Dictyoquinone in *Dictyostelium discoideum*
○本多 令奈[1]、ZULQAIDA Salma[2]、高谷 芳明[2]、齊藤 玉緒[1] ([1]上智大理工、[2]名城大薬)
○Reina HONDA[1], Salma ZULQAIDA[2], Yoshiaki TAKAYA[2], Tamao SAITO[1] ([1]Sophia Univ., [2]Meijo Univ.)

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は I 型ポリケタイド合成酵素(PKS)とⅢ型 PKS が融合した構造の SteelyA 酵素を持ち、4-methyl-5-pentylbennzene-1, 3-diol (MPBD)を合成する。*in vitro* で MPBD が酸化されて dictyoquinone（DQ）が合成されることが示され、MPBD が DQ の前駆物質であることが示唆された。しかし、MPBD を DQ へと酸化する酸化酵素は未だにその構造が解明されておらず、発生初期に細胞集合を制御する作用機序も不明である。本研究ではこの酸化酵素の解明への第一歩目として MPBD と DQ が持つアルキル鎖に着目し、新規合成した類似化合物を用いてその構造活性相関を調べることを目的とした。ここでは、DQ により制御されている細胞集合の回復を *stlA* 欠損株を用いて検証した。細胞性粘菌 *stlA* 欠損株の集合の回復を観察したところ、MPBD, DQ の他 DQ の末端に N_3 をつけた化合物（CN_3）と、そのアルキル鎖を 7 個に伸ばした化合物 （C7）でも野生株である Ax2 株と同様な集合が確認された。しかし、鎖長を 13 個に伸ばした化合物（C13）では集合機能の回復が見られないことから、鎖長が DQ の機能において重要であることが示唆されていると考えられた。また、DQ 類似化合物（CN_3) を加えると集合が回復するのにもかかわらず、MPBD 類似化合物（CN_3diOH）を加えた時は回復が観察されなかった。このことから、酸化酵素においても鎖長や芳香環ではない末端の構造が関わっていることが示唆された。

A polyketide synthase (PKS) SteelyA in *Dictyostelium* has distinct structure, that is a fusion of type I and type III PKSs. We found that SteelyA makes MPBD, which is oxidized in vitro to make DQ and regulates the cell aggregation. We examined the structure-activity relationships of MPBD and DQ by using derivatives that have longer alkyl chain or N_3 at the end of an alkyl chain. We used *stlA* null strain to examine cell aggregation recovery with MPBD or DQ derivatives. The results showed that the length of the alkyl chain is significant for the mechanisms of DQ because derivative that has 13C on its alkyl chain did not recover the aggregation while the derivatives that have 5C, 7C alkyl chain or even one has N_3 at the end of the chain did rescue the aggregation. Furthermore, although derivative of DQ that has N_3 at the end of chain recovered the aggregation, the derivative of MPBD with N_3 at the end couldn't recover it. This implies that the structure of the end of alkyl chain or the length of the chain affects the mechanism of oxidase enzyme.

Dictyostelium, Polyketide, Structure-activity relationships

発表責任者：齊藤玉緒（tasaito@sophia.ac.jp）

講演番号：2E08-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

ヒメグルシンの骨格構築機構に関する研究

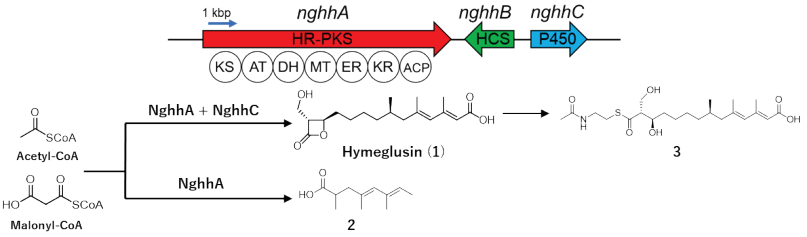
Biosynthetic study of hymeglusin skeletal formation

○廣川 瑞樹、森下 陽平、塚田 健人、菅原 章公、尾﨑 太郎、浅井 禎吾（東北大薬）
○Mizuki Hirokawa, Youhei Morishita, Kento Tsukada, Akihiro Sugawara, Taro Ozaki, Teigo Asai (Tohoku Univ.)

高還元型ポリケチド合成酵素(HR-PKS)は、多様な天然物の炭素骨格を創り出す重要な酵素である。また HR-PKS の反復回数や伸長サイクル毎の還元反応の制御機構が、アミノ酸配列にどのようにプログラムされているのかは不明である。このように HR-PKS は生合成研究において魅力的な標的である。

これまでに HR-PKS を指標としたゲノムマイニングにより、イチイの葉より分離した *Nigrospora* 属菌のドラフトゲノム上より HR-PKS (*nghhA*)、HMG-CoA 合成酵素 (HCS,*nghhB*)、P450 (*nghhC*)からなる生合成遺伝子クラスター(BGC) を見出した。このクラスターは *Fusarium* 属菌より発見された hymeglusin の BGC と高い相同性を示すことから、*nghh* クラスターについても hymeglusin を生合成すると示唆された。Hymeglusin は HCS 阻害活性を有し、また、薬剤耐性菌に対する新たな抗菌薬としても期待される有用天然物である。そこで本研究では、hymeglusin の生合成機構の解明と生物合成を目的とした。

まず、麹菌に *nghhABC* を導入し、hymeglusin の生物合成に成功した。一方で、*nghhA* のみを導入した形質転換株では、予想とは異なり、炭素鎖伸長が不完全な **2** の生産が確認された。これらの結果より、hymeglusin の生合成には、β-ラクトン環の形成をともなうリリース機構と、ポリケタイド鎖の伸長には P450 の酸化が必要という、2 つのユニークな骨格構築機構が示唆された。Hymeglusin から誘導した SNAC 化体 (**3**) について、酸性およびアルカリ性のバッファー内での反応性を調査した結果、β-ラクトン環形成は ACP ドメイン上で自発的に行われるのではなく、ドメイン等、何らかのアシストが必要であることが示唆された。また、P450 による伸長制御に関しても、基質を調製し、検討を進めている。



Highly reduced polyketide synthase (HR-PKS) is one of key enzymes for generating a diversity of fungal natural product carbon back bones. HR-PKS elongates carbon chain by iteratively using its domains and selects domains in each elongating round to reduce β-ketone, generating a diversity of carbon chain. Although these regulating systems are programmed in each HR-PKS, the mechanisms are still uncleared. In addition, each domain in HR-PKS may show cryptic functions. Thus, HR-PKS is an attractive target for genome mining to discover new natural products and new biosynthetic machinery.

During our HR-PKS guided genome mining, we found a unique biosynthetic gene cluster (BGC), named as *nghh* cluster, composed of a HR-PKS gene (*nghhA*), an HMG-CoA synthase gene (HCS, *nghhB*) and a P450 gene (*nghhC*) on the genome of *Nigrospora* sp, which isolated plant Yew. The cluster was quite similar to the hymeglusin BCG in *Fusarium* fungi that reported recently. Because hymeglusin is a pharmaceutical important natural product and its biosynthesis is uncleared, we aimed to achieve its heterologous production and elucidate its biosynthetic machinery. We reconstructed *nghh* cluster in *Aspergillus oryzae* and successfully heterologous production of hymeglusin. Unexpectedly, a *nghhA* introducing transformant produced **2** with immature polyketide backbone. This result suggests that oxidation by NghhC (P450) is required to proceed to later elongation phase of NghhA (HR-PKS). In addition, a releasing mechanism with β-lactone formation of NghhA is mystery because there are no domains and enzymes responsible for mature polyketide chain releasing. Therefore, we tested the possibility of spontaneous β-lactone formation. We prepared a substrate **3** derived from hymeglusin and exposed it in various pH buffers. Compound **3** is very stable in each condition, suggesting that something assists β-lactone formation.

Natural product, Polyketide synthase, Biosynthesis

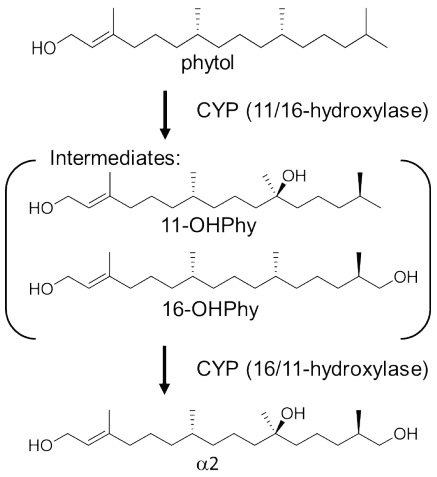
発表責任者：浅井禎吾（teigo.asai.c8@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E08-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

疫病菌交配ホルモン α2 生合成遺伝子の探索

Studies on biosynthetic genes for the *Phytophthora* mating hormone α2

○今津 佑介、有吉 俊、田中 愛子、竹本 大吾、小鹿 一 (名大院・生命農)
○ Yusuke IMAZU, Suguru ARIYOSHI, Aiko TANAKA, Daigo TAKEMOTO, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)



【背景・目的】疫病菌（*Phytophthora* 属植物病原糸状菌）は、有性生殖の際に交配ホルモンα1, α2 を利用する。このうちα2 は phytol から中間体（11-OHPhy, 16-OHPhy）を経由して生合成され[1]、生合成酵素として 2 つの cytochrome P450 (CYP) が想定されている。本研究では、RNA-Seq 解析で抽出した 3 つの候補遺伝子（*cyp-1, 2, 3*）を真菌宿主に導入・発現させ、α2 生合成能を検証した。
【方法・結果】*Epichloe* 属真菌を宿主として、恒常発現プロモーターである pTEF の制御下で候補遺伝子を異種発現した。真菌宿主の野生株、Vector 株および CYP 異種発現株を、生合成前駆体を含む PD 培地で振盪培養し、得られた上清を Sep-Pak カラムで抽出し、LC/MS に供した。その結果、phytol を投与した場合は全ての株から 16-OHPhy が、11-OHPhy を投与した場合は全ての株からα2 が検出された。異種発現株のうち *cyp-1* を導入した株は、16-OHPhy の生産量が野生株より 7.8 倍、Vector 株より 5.4 倍高く、α2 の生産量が野生株より 55 倍、Vector 株より 6.7 倍高かった。これらの結果から、*cyp-1* はα2 生合成遺伝子の 1 つ、phytol 16-hydroxylase と考えられる。
【参考文献】1) S. Ariyoshi, *et al. Biosci, Biotechnol, Biochem.* **2021**, *85*, 1802-1808.

The mating hormone α2 of the *Phytophthora* is biosynthesized by possibly 2 cytochrome P450 (CYPs) via 2 hydroxyphytol intermediates. In this study, the candidate genes derived from RNA-Seq were introduced and expressed in an *Epichloë* endophyte and the α2 biosynthetic ability was tested.
As a result, 16-OHPhy was detected in all strains treated with phytol, and α2 was detected in all strains treated with 11-OHPhy. 16-OHPhy production from phytol and α2 production from 11-OHPhy were much higher in the *cyp*-overexpressing strains than in wild and vector strains. These results suggest that the *cyp-1* gene is one of the α2 biosynthetic genes (phytol 16-hydroxylase).

Phytophthora, mating hormone, sexual reproduction

講演番号：2E08-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

マイコバクテリア由来新規 *Z,E* 混成型プレニル基還元酵素の機能解析

Functional analysis of a new type of *Z,E*-mixed prenyl reductase from mycobacteria

○阿部 透[1]、袴田 真理子[2]、西山 晃史[2]、立石 善隆[2]、松本 壮吉[2]、邊見 久[3]、上田 大次郎[1]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然、[2]新潟大院医、[3]名大院生命農)
○Tohru Abe[1], Mariko Hakamata[2], Akihito Nishiyama[2], Yoshitaka Tateishi[2], Sohkichi Matsumoto[2], Hisashi Hemmi[3], Daijiro Ueda[1], Tsutomu Sato[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Med., Niigata Univ., [3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

Z,E 混成型プレニル基の二重結合が還元されたイソプレノイドが、細菌、古細菌、糸状菌、植物、動物など幅広い生物種から見出されている。*Z,E* 混成型プレニル基を還元する酵素としてドリコール合成酵素のみが知られていたが、最近、私たちは非病原性マイコバクテリアから、ドリコール合成酵素と配列相同性のない新規の *Z,E* 混成型プレニル基還元酵素（HepR）を見出した[1]。*E* 型プレニル基還元酵素として知られるゲラニルゲラニル基還元酵素（GGR）ホモログの中に *Z,E* 混成型プレニル基還元酵素が存在していることを示した。

今回、HepR の *in vitro* での酵素反応解析や、CRISPR 干渉法による *in vivo* 発現抑制解析を行った。その結果、HepR の機能を明確に同定するとともに、HepR が関与する C_{35} イソプレノイド生合成経路の詳細を明らかにすることができた。HepR の基質特異性は古細菌由来の GGR と大きく異なっていたことから、HepR は新しい基質認識部位を持つ酵素であることが示唆された。また、プレニル基の還元順序に関する洞察が得られ、植物 GGR によるクロロフィル側鎖の還元順序とは明確に異なっていた。加えて、BLAST 検索から HepR ホモログはマイコバクテリアに広く分布していることが判明したことから、多剤耐性肺感染症の原因菌等 3 種の病原性マイコバクテリアの脂質成分を分析したところ、いずれの菌からも HepR 代謝物が検出された。HepR ホモログおよびその代謝物が病原菌にも存在することを初めて明らかにした。

[1] 阿部ら、2019 年度農芸化学会、1D2a03.

Isoprenoid with reduced *Z,E*-mixed prenyl groups have been found in a wide range of organisms. Only dolichol synthase have been identified as an enzyme that reduces *Z,E*-mixed prenyl groups, but recently we found a new type of *Z,E*-mixed prenyl reductase (HepR, geranylgeranyl reductase (GGR) homolog) that has no sequence homology with the dolichol synthase. In this study, we performed functional analysis of HepR using *in vitro* enzymatic assay and *in vivo* gene suppression analysis to clearly identify its function in C_{35}-isoprenoid biosynthetic pathway. In addition, it was revealed that HepR is different from GGRs in the substrate specificity and the reduction order of prenyl groups, suggesting that the enzyme has a new substrate recognition site. The BLAST search revealed that HepR homologs are widely distributed in mycobacterial species. Analysis of lipid components revealed for the first time that HepR metabolites are also produced in pathogens such as multidrug-resistant pathogen causing lung infection.

isoprenoid, biosynthesis, mycobacteria

発表責任者：佐藤　努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2E08-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

芳香族ポリケタイド yoropyrazone のスピロ環形成機構の *in vitro* 解析

In vitro analysis of spirocycles formation in yoropyrazone biosynthesis

○清藤 鈴奈[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Suzuna Kiyofuji[1], Yohei Katsuyama[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

yoropyrazone は放線菌 *Streptomyces* sp. IFM11307 が生産する芳香族ポリケタイドで、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド耐性のがん細胞に対し、細胞毒性を示す。yoropyrazone はスピロ環や六員環内 *N-N* 結合、芳香族アミンといった興味深い構造を持つが、これらの生合成経路については不明な点が多い。我々のグループは過去に yoropyrazone 生合成遺伝子クラスターを同定し、遺伝子破壊実験により、yoropyrazone が griseusin 誘導体を経由して生合成されることを示した。本研究では、大腸菌での異種発現で取得した酵素を用いた *in vitro* 反応により、スピロ環の形成機構の解析を試みた。まず、ketosynthase–chain length factor (KS–CLF, Yor2A–Yor2B) および acyl carrier protein (ACP, Yor1J) を用いた反応を行った結果、デカケタイド鎖が非酵素的に環化して生じる SEK15 と同様の *m/z* 385.10 を示す化合物の生産が確認された。次に、actinorhodin 生合成においてケト基を還元する ketoreductase (KR, *act*KR) およびデカケタイド鎖のケト基還元に続く環化反応を担うと予想された Yor1G を反応に加えたところ、C-7, C-12 間で環化が起こった単環性の生成物が自発的に環化して生じる SEK43 と同じ *m/z* 369.10 を示す化合物が生産された。さらに、cyclase と予想された Yor2D を添加して反応させたところ、C-7, C-12 間に加えて C-5, C-14 間で環化が起こった二環性の化合物のシャント化合物と思われる *m/z* 383.10 を示す化合物が得られた。以上の結果から、デカケタイド鎖伸長に続くケト基還元および 2 回の環化が起こった後に、さらなる還元反応と環形成によりスピロ環が形成されると予想した。

Yoropyrazone is an aromatic polyketide produced by Streptomyces sp. IFM11307 and shows cytotoxicity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant cancer cells. Yoropyrazone has interesting structures such as spirocycles. However, its biosynthetic pathway remains unclear. In this study, we attempted to analyze the formation mechanism of the spirocycles by *in vitro* reconstruction using recombinant enzymes. First, we examined polyketide synthesis by KS-CLF (Yor2A–Yor2B) and ACP (Yor1J), and observed the production of a compound with *m/z* 385.10 (presumably SEK15), which seemed to be nonenzymatically synthesized from a decaketide. When this reaction was conducted in the presence of *act*KR (from actinorhodin biosynthesis) and two putative cyclases (Yor1G and Yor2D), a shunt product (*m/z* 383.10), presumably synthesized from a bicyclic compound with C-C bonds at C-7–C-12 and C-5–C-14, was produced. From these results, we predicted that the spirocycles would be formed by further reduction and ring formation after decaketide synthesis followed by keto reduction and two cyclizations.

yoropyrazone, biosynthesis, actinomycetes

発表責任者：大西康夫（ayasuo@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2E08-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

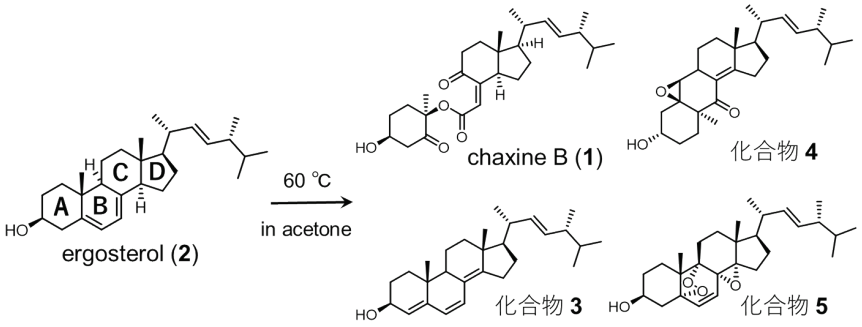
空気酸化による ergosterol の構造多様化機構の解析

Oxidative diversification of ergosterol induced by molecular oxygen

○難波 良太[1]、岸本 真治[1]、西川 俊夫[2]、及川 英秋[3]、河岸 洋和[4]、渡辺 賢二[1]([1]静岡県大薬、[2]名大院生命農、[3]北大院理、[4]静大グリーン研)
○Ryota NAMBA[1], Shinji KISHIMOTO[1], Toshio NISHIKAWA[2], Hideaki OIKAWA[3], Hirokazu KAWAGISHI[4], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Nagoya Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Shizuoka Univ.)

Agrocybe chaxingu から単離された chaxine B (**1**) は、ergosterol (**2**) の B 環が酸化・開裂し、A 環と C 環がエステル結合で連結した特異な構造を有する [1]。その構造とキノコの子実体形成促進という興味深い生物活性に着目し、我々は **1** の生合成研究に着手した。しかし近年、我々は **2** から **1** への変換が非酵素的な空気酸化で進行するという予想外な事実を見出した [2]。今回、**2** の空気酸化物から複数の化合物を単離・構造決定し、その反応機構を考察した。

2 を精製しアセトン中で加熱すると **1** を含む多くの化合物が生成することが観測された。これらについて単離・構造決定し、前大会にて報告した triene を有する化合物 **3** に加え、新たに化合物 **4** および **5** を見出した。いずれもラジカル捕捉剤である TEMPO を添加した際に生成しないことから、ラジカル反応で生成することが示唆された。そこで **2** と同様に B 環に diene を有する 7-dehydrocholesterol のラジカル反応に関する Porter らの報告 [3] を参考に、**2** からラジカルを経由する各化合物の生成機構を推定した。



Chaxine B (**1**), originally isolated from *Agrocybe chaxingu*, has a unique steroidal core: the B-ring is cleaved and the A-ring is directly connected to the C-ring by ester bond[1]. We first hypothesized that the intriguing structure is biosynthesized from ergosterol (**2**) by several oxidases, however, we found a conversion of **2** to **1** proceeds non-enzymatically under air[2]. To clarify what is happening in the solution, we isolated and determined the structure of several compounds produced by air oxidation of **2** in organic solvents.

Among them, **3** includes a conjugated triene and **4** has an epoxide by rearranged of B-ring. To our surprise **5** has endoperoxide and epoxide moieties. None of them were produced when TEMPO, a radical scavenger, was added to the solution. Based on the results, they were formed *via* radical reactions. Therefore, we proposed the reaction mechanism of these compounds *via* radical reactions from 7-dehydrocholesterol as a substrate reported by Porter.

1. Choi, J-H. *et al. Tetrahedron Lett.* **2009**, *65*, 9850. 2. 難波ら,日本農芸化学会 2021 年度大会要旨集, **2021**, 825. 3. Porter, N-A. *et al.* O*rg. Biomol. Chem ,* **2015**, *13*, 1249-1253.

ergosterol, air oxidation, chaxine B

発表責任者：難波 良太（m17091@u-shizuoka-ken.ac.jp）

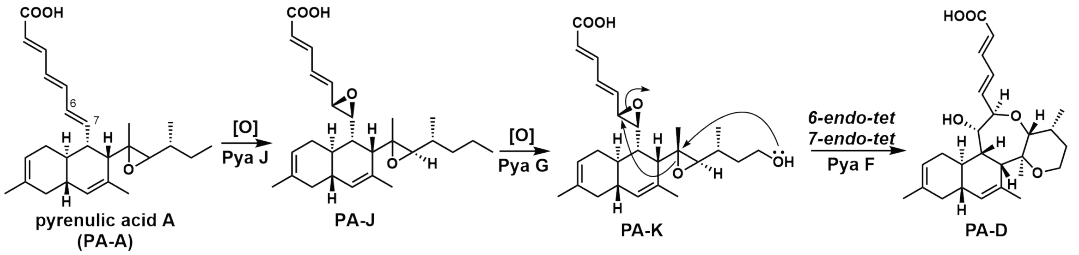
講演番号：2E08-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

共生型子嚢菌 *Pyrenula* sp. 由来の pyrenulic acid 類の生合成研究

Biosynthetic study on pyrenlic acids from lichen mycobiont *Pyrenula* sp.

○伊藤 優衣[1]、佐藤 道大[1]、石塚 碧[1]、籠浦 倫美[1]、恒松 雄太[1]、竹仲 由希子[2]、棚橋 孝雄[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県立大薬、[2]神戸薬大)
○Yui ITO[1], Michio SATO[1], Midori ISHIZUKA[1], Tomomi KAGOURA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Yukiko TAKENAKA[2], Takao TANAHASHI[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Kobe Pharm. Univ.)

ベトナム産地衣類由来の *Pyrenula* 属子嚢菌から、pyrenulic acid (PA) 類が単離された[1]。PA 類に含まれる特徴的な化学構造であるビスエーテル環構造は、ポリケタイド鎖のエポキシ化に続く *anti*-Boldwin 則に従う連続的な環化により形成されると予測されるが、その生合成は未だ解明されていない。そこで PA 生合成機構、特にエポキシドの連続開環反応によるビスエーテル環形成メカニズムの解明を目指し研究に着手した。はじめに本子嚢菌の全ゲノム情報、および遺伝子発現解析を行い、PA 生合成遺伝子クラスターを探索した。推定された生合成遺伝子クラスター内の各遺伝子を *Aspergillus nidulans* にて異種発現させ、各遺伝子の機能解析を行った。その結果、モノエポキシド(PA-A) から 2 種の P450 酵素 (PyaJ, G) によりそれぞれビスエポキシド (PA-J) およびアルキル鎖末端の水酸化体 (PA-K) の生産が確認された。さらに PA-K からビスエーテル環 (PA-D) 構築には、hydrolase (PyaF) が関与していることが示された。そこで、組換え PyaF を用いた *in vitro* 活性試験を行ったところ、エポキシドの連続的開環反応の進行が確認された。



Pyrenulic acids (PAs) were isolated from lichen mycobiont *pyrenula* sp. collected in Vietnam. PAs possess a unique bis-ether in the chemical structures. Based on the structures of PAs isolated so far, the ether ring makes us predict that these compounds are constructed by the stereoselective epoxidation in C6-C7 double bond in the polyketide chain followed by the consecutive epoxide opening reaction triggered by nucleophilic attacking from the primary alcohol installed by PyaG in the terminal alkyl chain. However, detailed reaction mechanism has been covered yet in PA biosynthetic pathway. Here we demonstrate PA biosynthetic pathway by using identified PA gene cluster coding for the biosynthetic emzymes catalyzing reactions through *in vitro* assays: 1) regio and stereoselective epoxidation by cytochrome P450 (PyaJ), 2) hydroxylation of the terminal methyl group by another P450 (PyaG), 3) consecutive epoxide ring opening by hydrolase enzyme (PyaF).

1. Tanahashi T. *et al. J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1404-1412.

Lichen, biosynthesis, ascomycetes

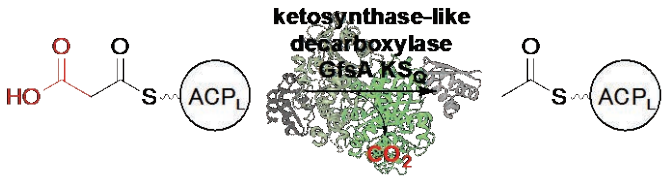
発表責任者：伊藤優衣（m17008@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E08-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

I 型ポリケチド合成酵素ローディングモジュールにおけるケト合成酵素様脱炭酸酵素の機能構造解析

Structural analysis of ketosynthase-like decarboxylase in a loading module of modular polyketide synthases

○千菅 太一、永井 瑛、宮永 顕正、工藤 史貴、江口 正（東工大理）
○Taichi CHISUGA, Akira NAGAI, Akimasa MIYANAGA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech.)



I 型ポリケチド合成酵素 (PKS) は複数の反応触媒ドメインがひとつのポリペプチド鎖に連なった巨大タンパク質であり、ポリケチド天然物の骨格構築に関わる。1 度のポリケチド鎖伸長反応に関わるドメイン群をモジュールと呼び、その先頭のローディングモジュールはポリケチド鎖生合成開始ユニットの構築を担う。

ローディングモジュールの多くは KS_Q ドメインを有している。KS_Q はケト合成酵素 (KS) とアミノ酸配列の高い同一性を有するものの、その触媒システイン残基がグルタミンへと置き換わっており、(アルキル-)マロン酸アシルキャリアタンパク質 (ACP) チオエステルの脱炭酸反応を触媒すると推定されている。しかし KS_Q の解析例はほとんどなく、その基質認識機構や反応機構は未解明であった。

そこで本研究では、*Streptomyces graminofaciens* A-8890 が生産する抗生物質 FD-891 の生合成に関わるポリケチド合成酵素 GfsA のローディングモジュール内に存在する KS_Q ドメインの機能解析を進め、GfsA KS_Q がマロン酸 ACP チオエステルの脱炭酸反応を触媒することを明らかとした。さらに X 線結晶構造解析によりその基質認識機構を明らかとすることができた。

Type I polyketide synthases (PKSs), which are huge multifunctional proteins containing several catalytic domains, are responsible for the biosynthesis of various polyketide natural products. A set of catalytic domains related to one round of polyketide chain elongation is called a “module”. The first loading module is responsible for the formation of a starter unit in polyketide biosynthesis.

The majority of loading modules contain a KS_Q domain. KS_Q domain has highly amino acid sequence identity with KS domain, however KS_Q domain lacks the catalytic cysteine residue of KS domain. KS_Q domain is presumed to catalyze the decarboxylation of an (alkyl-) malonyl-acyl carrier protein (ACP) thioester. However, its substrate recognition and reaction mechanisms remain unsolved.

In this study, we analyzed the function of KS_Q domain in a loading module of GfsA involved in the biosynthesis of antibiotic FD-891 produced by Str*eptomyces graminofaciens* A-8890. We found that GfsA KS_Q catalyzes the decarboxylation of malonyl-ACP thioester. Furthermore, we determined the crystal structure of GfsA KS_Q, providing the structural insights into the substrate recognition mechanism.

Polyketide synthase, Crystal structural analysis, Biosynthesis

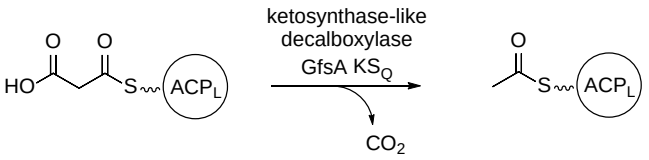
発表責任者：千菅太一（chisuga.t.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：2E08-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

I 型ポリケチド合成酵素ローディングモジュールにおけるケト合成酵素様脱炭酸酵素の変異体解析

Mutational analysis of ketosynthase-like decarboxylase in loading module of type I polyketide synthase

○永井 瑛、千菅 太一、宮永 顕正、工藤 史貴、江口 正（東工大理）
○Akira NAGAI, Taichi CHISUGA, Akimasa MIYANAGA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech.)



I 型ポリケチド合成酵素 (PKS) は複数の反応触媒ドメインがひとつのポリペプチド鎖に連なった巨大タンパク質であり、ポリケチド化合物の骨格構築に関わる。I 型 PKS の先頭にはローディングモジュールが存在し、ポリケチド鎖生合成開始ユニットの構築を担う。ローディングモジュールの多くは KS_Q ドメインを有している。KS_Q ドメインはケト合成酵素 (KS) ドメインとアミノ酸配列の高い同一性を有するものの、その触媒システイン残基がグルタミンへと置き換わっており、(アルキル-)マロン酸アシルキャリアタンパク質 (ACP) チオエステルの脱炭酸反応を触媒すると推定されている。しかし KS_Q ドメインの解析例はほとんどなく、その反応機構は未解明であった。

最近、我々は、*Streptomyces graminofaciens* A-8890 が生産する抗生物質 FD-891 の生合成に関わるポリケチド合成酵素 GfsA のローディングモジュール内の KS_Q ドメインの基質アナログとの複合体構造を得ることに成功した。そこで、本研究では、この複合体構造をもとに、反応触媒に関与すると推定されるアミノ酸残基の変異体を作製し、それぞれ野生型と活性を比較した。その結果をもとに GfsA KS_Q が触媒する脱炭酸の反応機構を推定した。

Type I polyketide synthases (PKSs), which are huge multifunctional proteins containing several catalytic domains, are responsible for the biosynthesis of various polyketide natural products. A set of catalytic domains related to one round of polyketide chain elongation is called a “module”. The first loading module is responsible for the formation of a starter unit in polyketide biosynthesis.

The majority of loading modules contain a KS_Q domain. KS_Q domain has highly amino acid sequence identity with ketosynthase (KS) domain, however the catalytic cysteine residue of KS domain is replaced by a glutamine in KS_Q. KS_Q domain is presumed to catalyze the decarboxylation of an (alkyl-) malonyl-acyl carrier protein (ACP) thioester. However, its reaction mechanism remains unsolved.

Recently, we succeeded in the structural determination of the KS_Q domain in the loading module of PKS GfsA, which is involved in the biosynthesis of the antibiotic FD-891 produced by *Streptomyces graminofaciens* A-8890. In this study, we mutated amino acid residues in the active site of GfsA KS_Q domain and evaluated their activities. Based on the results, we propose the reaction mechanism of decarboxylation catalyzed by GfsA KS_Q.

polyketide synthase, biosynthesis, decarboxylase

発表責任者：宮永 顕正（miyanaga.a.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：2E08-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素の立体選択性に関する研究

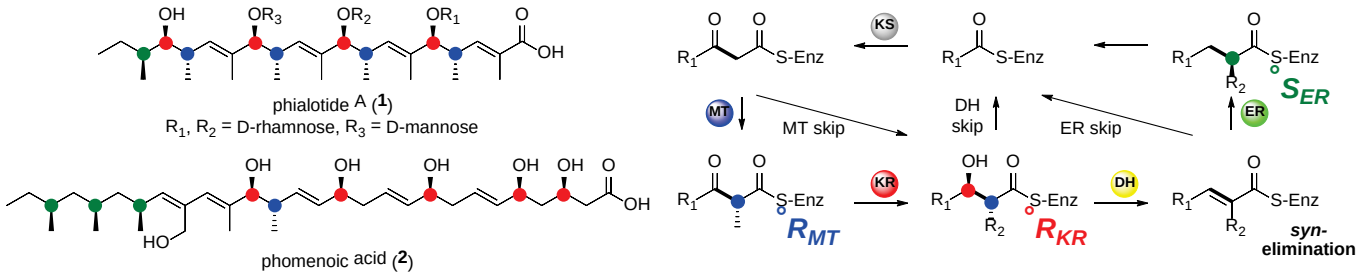
Study on stereochemistry of fungal highly reducing polyketide syntheses

○瀧野 純矢[1]、小谷 明里[1]、尾﨑 太郎[1]、Yu Jie[2]、Guo Yian[2]、Ye Tao[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1]（[1]北大院理、[2]北京大学深セン大学院）
○Junya TAKINO[1], Akari KOTANI[1], Taro OZAKI[1], Jie Yu[2], Yian Guo[2], Tao Ye[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Peking Univ. Shenzhen Graduate School)

【目的・背景】糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素（HR-PKS）は、脂肪酸合成酵素（FAS）と類似した、ドメインで構成される巨大酵素である。FAS とは異なり、HR-PKS は置換基の残ったポリケタイド鎖を生合成する。導入される立体配置は、各ドメインの立体選択性によって決まるが、その詳細は不明である。本研究では、不斉中心が数多く存在する phialotide (**1**)、phomenoic acid (**2**)に着目し、糸状菌 HR-PKS における立体化学制御則を提唱した。

【方法・結果】異種発現により取得したポリケタイド鎖に対して、オゾン分解・還元的処理を行った。得られた分解生成物と合成標品との比較によって、**1**、 **2** の絶対立体配置を決定した。HR-PKS によって導入される置換基に着目することで、MT/KR/ER の立体選択性を明らかにした。また、HR-PKS の分子系統解析を行うと、**1**、**2** を与える HR-PKS が同じクレードに属していた。そこで、クレードを代表する天然物の立体化学に着目した結果、提唱した規則が糸状菌 HR-PKS に汎用的に適用できることが示された。現在、提唱した制御則を指針とした天然物の構造決定を行っているので、その結果も報告する予定である。

Fungal highly reducing polyketide syntheses (HR-PKSs), which produce structurally diverse polyketides, are composed of a single set of catalytic domains, of which domain organization is resembled with that of fatty acid syntheses. Each domain catalyzes a stereoselective reaction, but the detail is unknown. In this report, we determined the absolute configurations of polyhydroxy polyketides, phialotide and phomenoic acid, enabling us to propose the stereochemical rule of HR-PKS. The generality of the proposed rule is supported by chemo and bioinformatics analysis. This rule allows us to revise and predict the stereochemistry of HR-PKS products.



参考文献：J. Takino, *et al, Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23403.

biosynthesis, polyketide, stereochemistry

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

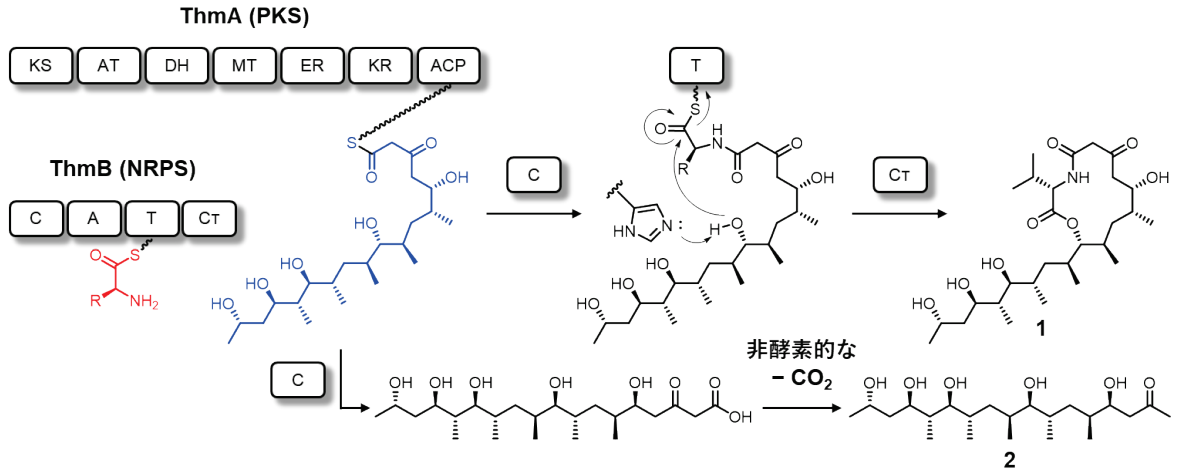
講演番号：2E08-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

糸状菌由来多機能性酵素の機能制御を目指した Thermolides の生合成研究-1-

Biosynthetic study of Thermolides for mechanistic understanding of the catalytic domains

○小谷 明里、瀧野 純矢、尾﨑 太郎、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○Akari KOTANI, Jyunya TAKINO, Taro OZAKI, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的・背景】 Thermolide は、高熱性細菌 *Talaromyces thermophilus* が生産するマクロラクトンであり、線虫に対し強力な殺虫活性を示す。その基本骨格 **1** は、ポリケタイド合成酵素 ThmA と非リボソームペプチド合成酵素 ThmB により構築されるが[1]、各ドメインの機能についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、NRPS を構成する C、A、CT ドメインの機能解明を目指して、1) 麹菌 (*Aspergillus oryzae*)での **1** の異種生産、2)変異導入実験、3) ドメイン交換実験を行った。
【結果】 *thmAB* を麹菌へ導入した結果、報告通り、バリンが連結した **1** が得られた。次いで、C ドメインの機能解析を行った。ThmA と系統学的に近縁の PhiaA では、PhiaA 上のポリケタイド (PK)鎖を C-A ドメインからなる不完全な NRPS が加水分解した[2]ことを考慮し、ThmB の T ドメインを変異導入で不活性化したところ、PK 鎖の脱炭酸体 **2** が生成した。これより、C ドメインはアミノ酸が存在しないとき、加水分解を触媒することがわかった。他のドメインの機能に対する有益な知見も得られつつあるので、その詳細についても報告する予定である。



Thermolide is a 13-membered macrolactam isolated from *Talaromyces. thermophilus*, which exhibit strong nematocidal activity. The core structure is constructed by the action of polyketide synthase, ThmA, and a non-ribosomal peptide synthase, ThmB. In this study, we conducted heterologous expression of *thmAB* in *A. oryzae* and functional analysis of the catalytic domains. Details will be discussed in the presentation.

[1] *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 1957– 1965, [2] *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 23403-23411

biosynthesis, polyketide, non-ribosomal peptide synthase

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

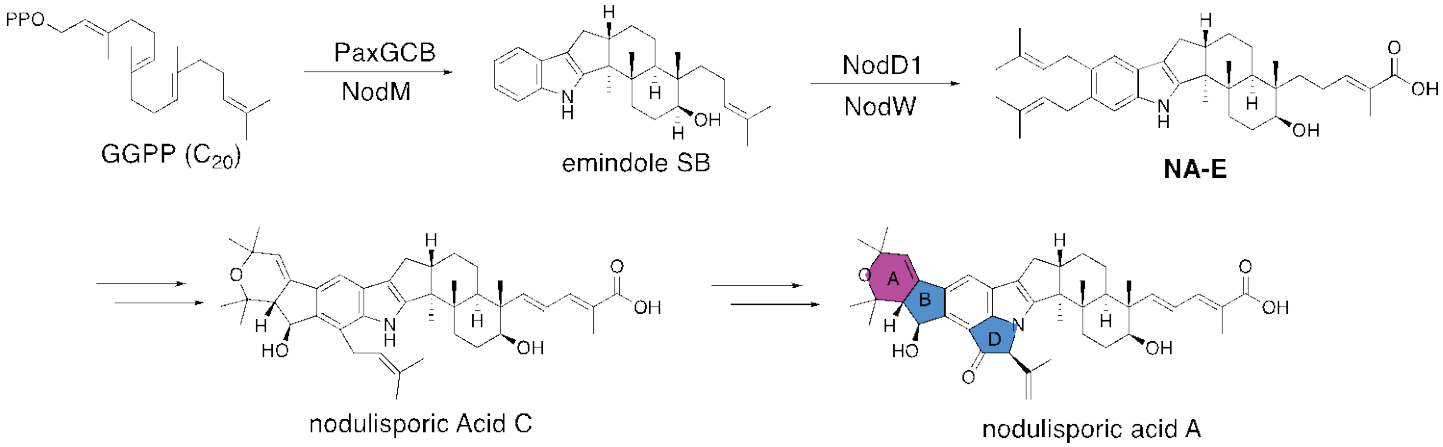
講演番号：2E08-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム E

Total biosynthesis of the highly modified indole diterpene Nudulisporic acids to generate structurally related analogs.

○Yaping Liu, Taro Ozaki, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa (Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

[Introduction] Indole-diterpenes (IDTs) are one of important class fungal secondary metabolites with various biological activities. Among them, nodulisporic acids (NAs) produced by *Hypoxylon pulicicidum* have shown a potent insecticidal activity without adverse effects in mammals. Unlike other IDTs, NAs have a characteristic A/B-bicyclic system as well as a D-ring on the indole ring. However, the biosynthetic machinery remains elusive.

[Results and discussion] Reconstitution of the biosynthetic genes in heterologous host such as *Aspergillus oryzae* is a reliable method to synthesize fungal IDTs[1-2]. In this study, we applied the recently established hot-spot knock-in method[3] to elucidate the biosynthetic pathway of NAs. Initially, we constructed four gene transformant possessing *paxGCB* and *nodM* and observed emindole SB, a key biosynthetic intermediate of NAs. Given the expected transformant, AO-*paxGCBnodM*, in hand, *nodW* (cytochrome P450) and *nodD1* (prenyltransferase) were then introduced into the transformant. The transformant produced **NA-E** as a sole product. At present, additional functional analysis of other biosynthetic genes is in progress.



Reference: (1) C. Liu, et al. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5026-5029. (2) Y. Jiang, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 17996-18002. (3) C. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**,*141,* 15519-15523.

Biosynthesis, Nodulisporic acids, Aspergillus oryzae

発表責任者：Hideaki Oikawa（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：2F02-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

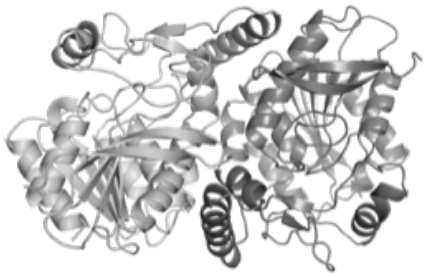
真菌 *Eupenicillium ludwigii* 由来 PKS チオエステラーゼ ElbB の基質認識機構に関する構造解析

Structural analysis of the ligand binding mechanism of the PKS thioesterase ElbB from the fungus *Eupenicillium ludwigii*

○小林 瑶平[1]、永田 隆平[1,2]、森下 陽平[3]、菅原 章公[3]、浅井 禎吾[3]、葛山 智久[1,4]([1]東大院・農生科、[2]JSPS 特別研究員 PD、[3]東北大院薬、[4]東大 CRIIM)
○Yohei KOBAYASHI[1], Ryuhei NAGATA[1,2], Yohei MORISHITA[3], Akihiro SUGAWARA[3], Teigo ASAI[3], Tomohisa KUZUYAMA[1,4] ([1]GSALS, UTokyo, [2]JSPS Research Fellow, [3]GSPS, Tohoku Univ, [4]CRIIM, UTokyo)

チオエステル加水分解酵素（TE）は、ポリケタイド化合物の生合成において環化反応を担う酵素である。最近我々は、細胞研究試薬として用いられるポリケタイド化合物ブレフェルジン A の真菌 *Eupenicillium ludwigii* における生合成経路を同定し、TE である ElbB が直鎖状の基質を認識せず、基質がシトクロム P450 によるラジカル反応を介した五員環形成と酸化を受けて初めて環化反応を行うことを明らかにした。そこで本研究では、ElbB が持つこのような特異的な基質認識機構を明らかにするため、ElbB の結晶構造解析を試みた。

ElbB の結晶化スクリーニングを行い、得られた結晶を用いて Photon Factory にて X 線回折データを収集した。そして、ElbB と 53.9%の配列相同性を示すホモログ酵素 DcsB の構造（*JACS*, 143, 80–84, 2021）を用いた分子置換法によって、ElbB の結晶構造を分解能 1.52 Å で決定した。この結晶構造とゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、ElbB は二量体を形成していることが明らかとなった。また、一般的な TE で見られる触媒三残基が保存されており、その付近には基質結合ポケットに存在している低分子由来と推定される電子密度が観察された。本発表では、結晶構造に基づいて ElbB の基質認識機構について議論する。



ElbB の全体構造

Polyketide synthase (PKS) thioesterases are responsible for the cyclization in the biosynthesis of polyketides. Recently, we identified the biosynthetic pathway of brefeldin A, which is a polyketide used as a cell research reagent, in the fungus *Eupenicillium ludwigii*. In this pathway, a thioesterase, ElbB, recognizes only the cyclized substrate produced by the oxidation and formation of a five-membered ring catalyzed by the cytochrome P450 ElbA, whereas the linear-shaped substrate was not accepted as a substrate. Thus, we determined a crystal structure of ElbB to figure out the mechanisms of the specific substrate recognition of ElbB.

We performed crystallization screening and collected an X-ray diffraction data set from the obtained crystals of ElbB. The structure of ElbB was then determined at a resolution of 1.52 Å by the molecular replacement method using the structure of the homologous enzyme DcsB (*JACS,* 143, 80–84, 2021), which shows sequence similarity of 53.9% to ElbB. The crystal structure and gel filtration chromatography demonstrated that ElbB forms a dimer in solution. The catalytic triad conserved in thioesterases was found in ElbB, and an electron density map corresponding to an unidentified small molecule was observed in the ligand-binding pocket.

Crystal structure, Polyketide, Thioesterase

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

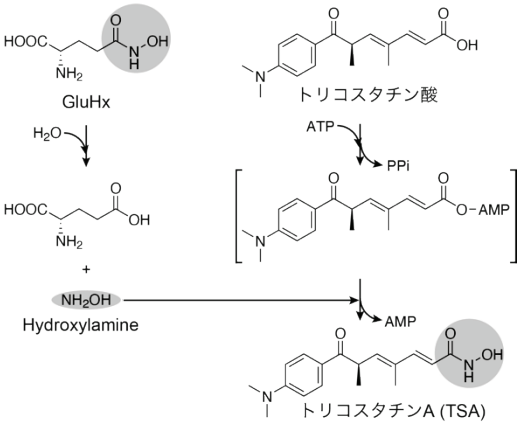
講演番号：2F02-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

ヒドロキサム酸基の生合成を担う酵素 TsnB9 の基質認識機構に関する研究

Structural study of the ligand-binding mechanism of TsnB9 that produces a hydroxamic acid group

○永田 隆平[1,2]、西山 真[1,3]、葛山 智久[1,3]（[1]東大院・農生科、[2]学振特別研究員 PD、[3]東大・CRIIM）
○Ryuhei NAGATA[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,3], Tomohisa KUZUYAMA[1,3] ([1]GSALS, UTokyo, [2]JSPS Research Fellow, [3]CRIIM, UTokyo)

ヒストンのアセチル化・脱アセチル化は、遺伝子発現調節に関わる翻訳後修飾の一つである。放線菌が生産するトリコスタチン A（TSA）は、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であり、エピジェネティックな抗がん剤のリード化合物として知られる。その阻害には TSA 末端のヒドロキサム酸基が重要な役割を果たす。最近我々は TSA の生合成経路を解明し、生合成酵素の一つ TsnB9 が TSA の前駆体トリコスタチン酸のカルボキシ基をヒドロキサム酸基へ変換することを見出した[1]（右図）。そこで、TsnB9 の基質特異性を拡張することでヒドロキサム酸基を有する様々な阻害剤を創出できると考え、TsnB9 の基質認識機構の解明に取り組んだ。



放線菌での異種発現により取得した TsnB9 を用いて結晶化を行い、得られた結晶で X 線回折データを収集した。位相決定は AlphaFold で作製した予測構造を用いた分子置換法で行い、2.72 Å 分解能で構造を決定できた。発表では、結晶構造に基づいた基質認識機構の解析結果について紹介する。

Acetylation and deacetylation of histone are post-translational modifications involved in the regulation of gene expression. Trichostatin A (TSA) produced by *Streptomyces* sp. RM72 is a potent inhibitor of histone deacetylase (HDAC) and is known as a lead compound of epigenetic cancer drugs. The hydroxamic acid group of TSA plays a crucial role in binding to HDAC. We recently revealed that TsnB9 converts the carboxyl group of trichostatic acid into the hydroxamic acid group in the TSA biosynthesis. Therefore, to produce a variety of HDAC inhibitors containing the hydroxamic acid group using engineered TsnB9, we investigated the ligand-binding mechanism of TsnB9 based on its crystal structure.

We crystallized recombinant TsnB9 produced by a heterologous expression system of *Streptomyces albus*. Diffraction data was collected from the obtained crystals, and the structure was determined at 2.72 Å resolution by the molecular replacement method using a model predicted by AlphaFold. In this presentation, we will explain the results of structural and mutational investigations of the ligand-binding mechanism of TsnB9

[1] K. Kudo, *et al. J. Am. Chem. Soc.* (2017)

crystal structure, biosynthesis, *Streptomyces*

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2F02-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

放線菌由来 1-azabicyclo[3.1.0]hexane 環含有化合物におけるアジリジン環合成機構の解明

Studies on the aziridine ring formation in 1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring biosynthesized in *Streptomyces*

○黒澤 菫[1]、長谷部 文人[1]、岡村 仁則[1]、吉田 彩子[1,2]、富田 武郎[1,2]、滝川 浩郷[1]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・農生科、[2]東大・微生物連携機構)

○Sumire KUROSAWA[1], Fumihito HASEBE[1], Hironori OKAMURA[1], Ayako YOSHIDA[1,2], Takeo TOMITA[1,2], Hirosato TAKIKAWA[1], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. & Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

アザビシクロ環含有化合物 vazabitide A はアミノ基キャリアタンパク質 (Amino group-carrier protein; AmCP) を介して生合成される。アザビシクロ環の部分構造のアジリジン環は反応性が高く、DNA をアルキル化する活性本体として有用な構造である。本研究は、vazabitide A および類似のアザビシクロ環含有化合物 azinomycin B を対象に、アジリジン環合成機構の解明を目指した。

vazabitide A と azinomycin B の生合成遺伝子クラスターはそれぞれ *vzb*、*azi* クラスターとして同定され、*amcp* を含む保存性の高い遺伝子群を含む。そのうち、両クラスターに保存される機能未知酵素 Vzb10/11 がアジリジン環合成を触媒することを昨年度大会にて報告した。当該酵素は構造・機能が既知の酵素と相同性を示さないことから、詳細な反応機構を解明するため結晶構造解析を行い、*azi* クラスターにコードされる AziU3/U2 (“Vzb10/11”) 複合体の結晶構造を分解能 1.8 Å で決定した。DALI サーバーによる解析の結果、AziU3/U2 は新規 Fold を有することが明らかとなった。さらに、基質結合型結晶構造についても分解能 1.8 Å で決定することに成功した。これら結晶構造の解析の結果、AziU3/U2 はアジリジン環形成に必要な S_N2 反応に適した角度を示すように基質のコンフォメーションを変えることで、アジリジン環合成反応を進めることが推測された。本発表では結晶構造に加えて、本反応機構を支持する改変体の機能解析も併せて報告する。

Vazabitide A was discovered as a novel 1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring-containing natural product biosynthesized via amino-group carrier protein, AmCP, from *Streptomyces* sp. SANK 60404. The aziridine ring in the structure is a key moiety to alkylate DNA for the biological activity. This study aims to elucidate the biosynthetic mechanism to form the aziridine ring.

Azinomycin B shows the similar chemical structure with vazabitide A. The biosynthetic gene clusters for azinomycin B and vazabitide A have already been determined as the *azi* and *vzb* clusters, respectively. In the previous JSBBA annual meeting, we reported that the hypothetical genes, *vzb10* and *vzb11*, are involved in the formation of the aziridine ring in vazabitide A. In this presentation, we will report the catalytic mechanism for the aziridine ring formation based on the crystal structures of AziU3/U2 (“Vzb10/11”), and the proposed mechanism was verified by *in vitro* assay of Vzb10/11 variants.

biosynthesis, amino-group carrier protein, aziridine

発表責任者：西山　真（umanis@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2F02-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

デカリン合成酵素の阻害剤同定と共結晶構造解析

Inhibitor screening and cocrystal structural analysis of decalin synthases

○加藤 直樹[1,2]、藤山 敬介[3]、永野 真吾[3]、高橋 俊二[2]（[1]摂南大農、[2]理研 CSRS、[3]鳥取大院工）
○Naoki KATO[1,2], Keisuke FUJIYAMA[3], Shingo NAGANO[3], Shunji TAKAHASHI[2]（[1]Setsunan Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Tottori Univ.）

【目的】糸状菌の生産する抗 HIV 活性物質エキセチンとその鏡像異性類縁体フォマセチンの生合成経路において，デカリン合成酵素 Fsa2 および Phm7 は立体選択的[4+2]環化付加反応を触媒する。その機能と構造の相関を明らかにすることは，立体選択的な反応メカニズムの理解とそれに基づく環化付加酵素の立体選択性の自在な制御につながる。環化付加反応を触媒する既知酵素とは相同性を示ないこと，その機能に補因子を必要としないことから、本酵素ファミリーの活性中心の特定が困難であることが予想された。そこで，酵素の結晶構造解析と並行してリガンドの探索を行った。本発表では，デカリン合成酵素の阻害剤同定、ならびに酵素との共結晶構造解析結果について報告する。
【方法と結果】Phm7 の基質および産物と類似した部分構造を有する市販の小分子化合物を対象に，マイクロスケール熱泳動アッセイによる Phm7 リガンドのスクリーニングを行った。その結果，*p*-メンタン誘導体の 1 つが親和性は低いものの Phm7 および Fsa2 に結合することを見出した。フォマセチン生産菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株に由来する *phm7* 欠失株の菌糸から細胞抽出液を用いた *in vitro* 酵素アッセイ系を用いることで，この化合物が濃度依存的に酵素活性を阻害すること，培養液に添加することでフォマセチン，エキセチンの生産を阻害することを確認した。次いで，本化合物と Phm7 との共結晶構造解析を行ったところ、酵素を構成する 2 つのβ-ドメインの間に存在するポケットの底部に化合物が結合していた。リガンドの酵素活性を阻害することと合わせて考慮すると、本化合物が結合しているそのポケットが活性中心であることが示唆された。

We performed Phm7 ligand screening using microscale thermophoresis. Commercially available small molecules possessing partial structures similar to the linear polyene substrate or cyclized product were screened, and a *p*-menthane derivative was found to bind to Phm7. It dose-dependently inhibited enzyme activity *in vitro* and decalin compound production in producer fungi. We next performed co-crystallization of Phm7 and obtained the crystal structure of the inhibitor-bound Phm7 at 1.61-Å resolution. The inhibitor was located on the lower side of a domain-interface pocket, indicating that the lower side of the pocket forms the active site of decalin synthases.

decalin synthase, inhibitor, cocrystal structural analysis

発表責任者：加藤　直樹（naoki.kato@setsunan.ac.jp）

講演番号：2F02-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

Reveromycin A 生合成酵素 RevKLM の in sillico 解析による相互作用予測と実験的検証

Prediction by in sillico analysis and experimental validation of interaction of RevKLM complex for Reveromycin A biosynthesis.

○岡村 英治[1]、佐藤（汐﨑） 裕美[1]、奥村 英夫[2]、熊坂 崇[2]、長田 裕之[1]、高橋 俊二[1]([1]理研 CSRS、[2]高輝度光科学研究センター)
○ Eiji OKAMURA[1], Yumi SHIOZAKI-SATO[1], Hideo OKUMURA[2], Takashi KUMASAKA[2], Hiroyuki OSADA[1], Shunji TAKAHASHI[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]JASRI)

[目的] リベロマイシン A（RM-A）は放線菌が生産する二次代謝産物である。RM-A 生合成における三級水酸基のサクシニル化反応は、有機合成においては超高圧条件（1.5 GPa）が必要であるが、RevK, RevL,RevM による複合酵素反応は大気圧で進行する。これまでに、RevL によりフマロイル AMP 形成後、NADH を補因子とする RevM 反応によってサクシニル AMP に変換されること、不安定なサクシニル AMP は RevL 上で保持された後、RevK によってサクシニル基が RM-T1 に転移することが示唆されている。また、RevK 及び RevL のタンパク質間相互作用が予想されているが、詳細な機構は不明である。そこで、本研究では RevK 及び RevL の相互作用領域の解明を目的とした。
[方法及び結果] 構造予測プログラム及び MD 計算を組み合わせることにより RevK と RevL のタンパク質間相互作用モデルを構築した。次に、相互作用形成に寄与すると推測されたアミノ酸残基に部位特異変異を導入し、変異酵素を用いた複合酵素反応実験を行うことにより、相互作用モデルを検証した。

[Objective] Reveromycin A (RM-A) is a secondary metabolite produced by actinomycetes. The succinylation of tertiary hydroxyl groups in RM-A biosynthesis requires ultrahigh pressure conditions (1.5 GPa) in organic synthesis, whereas the complex enzyme reaction by RevK, RevL, and RevM proceeds at atmospheric pressure.
It has been speculated that after fumaroyl-AMP formation by RevL, it is converted to succinyl-AMP by RevM using NADH as a cofactor, and that the unstable succinyl-AMP is retained on RevL, and then the succinyl group is transferred to RM-T1 by RevK. Although protein-protein interaction of RevK and RevL has been predicted, the detailed mechanism is unknown. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the interaction region between RevK and RevL.
[Method and Result] We constructed a protein-protein interaction model for RevK and RevL by combining a structure prediction program and MD calculations. The interaction model was then validated by introducing site-directed mutagenesis into the amino acid residues predicted to contribute to the formation of the interaction, and by performing complex enzyme reaction experiments using the mutant enzymes.

Reveromycin, Complex enzyme reaction, Protein-Protein interaction

発表責任者：高橋俊二（shunjitaka@riken.jp）

講演番号：2F02-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

ClassIB テルペン合成酵素の基質/マグネシウムイオン結合型立体構造を基にした変異酵素解析
Mutant analysis of Class IB terpene synthase

○岩片 奨悟[1]、金本 壮平[2]、三木 邦夫[2]、深井 周也[2]、藤橋 雅宏[3]、品田 哲郎[4]、上田 大次郎[1]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然、[2]京大院理、[3]大阪医薬大、[4]阪市大院理)
○Shogo Iwakata[1], Souhei Kanemoto[2], Kunio Miki[2], Shuya Fukai[2], Masahiro Fujihashi[3], Tetsuro Shinada[4], Daijiro Ueda[1], Tsutomu Sato[1] ([1]Niigata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka Medical and Pharmaceutical Univ., [4]Osaka City Univ.)

我々は Class IB テルペン合成酵素を見出している[1)]。よく知られている Class I テルペン合成酵素と類似した二リン酸脱離開始型の反応を触媒するにもかかわらず、一次構造や活性部位モチーフ配列が Class I のものと類似していない。Class I よりも大きな C_{20}~C_{35} プレニル二リン酸を基質とするため、新しい触媒機構の発見や天然で希少なテルペン類の創出に大きな可能性を秘めている。Class IB テルペン合成酵素の一つ BalTS について、基質非結合/結合型の立体構造を以前報告した[2,3)]。それらには触媒に必須な Mg^{2+}イオンが結合していなかったが、最近、基質と Mg^{2+}が結合した立体構造を決定できた（未発表)。それにより、以前想定していた活性部位の位置がわずかに異なっていることが判明した。本研究では、その構造を基に変異酵素解析を行った結果を報告する。

脱プロトン化する位置に水分子とそれを取り巻く 7 つのアミノ酸残基による水素結合ネットワークの存在が新たに見出された。それらをターゲットにした全ての変異体において活性が著しく減少したことから、それらの残基が活性に必須であることが明らかになった。一つの変異酵素において新規生成物 **1** が見出されたことから、単離・構造決定した。**1** は脱プロトン化の代わりに水付加によって反応終結して生成したことが示唆された。野生型 BalTS において、水素結合ネットワークによって極性化された水分子が脱プロトン化を触媒していると現在考えている。そのような触媒機構は、Class II トリテルペン環化酵素でも以前提案されている[4)]。

また、BalTS は鎖状の主生成物 **2** (約 90%)と環状の副生成物 **3** (約 10%)を生成する[3)]。天然から見い出されていないジテルペン **3** の効率的な生産を目指して、活性部位をターゲットにした酵素改変を行った。その結果、酵素活性を維持しつつ **3** の比率を約 3 倍増加させることに成功した。

1) Sato, T. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 9734-7. 2) Fujihashi, M. *et al*., *Chem. Sci.*, 2018, 9, 3754-8. 3) Stepanova, R. *et al*., *ACS Chem. Biol.*, 2020, 15, 1517-25. 4) Sato, T. *et al*., *BBB*, 2004, 68,728-38.

We have discovered a Class IB terpene synthase. The primary structure and motif sequences of Class IB are not similar to those of the well-known Class I. Recently, 3D structure of Class IB bound with both substrate analog and Mg^{2+} has been determined. In this study, we analyzed mutant enzymes targeting residues found in the 3D structure. We will also describe the structure of the novel product formed by the mutant enzyme.

isoprenoid, terpene cyclase, Bacillus

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F02-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

クラス IB テルペン合成酵素のゲノムマイニング

Genome mining of Class IB terpene synthases

○大塚 生[1]、藤橋 雅宏[2]、品田 哲郎[3]、上田 大次郎[1]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然、[2]阪医薬大、[3]阪市大院理)
○Ikiru OTSUKA[1], Masahiro FUJIHASHI[2], Tetsuro SHINADA[3], Daijiro UEDA[1], Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ., [2]Osaka Medical and Pharmaceutical Univ., [3]Osaka City Univ.)

テルペンは、炭素数 5 個のイソプレン単位を基本骨格として多種多様に環化や修飾された化合物群であり、8 万種以上が知られている。以前、我々はセスクアテルペン (C_{35} テルペン) の環化を触媒する *Bacillus subtilis* 由来の酵素 BsuTS を同定した[1)]。テルペン合成酵素には反応機構の違いにより 2 つのクラスが存在し、BsuTS はクラス I 型の反応を触媒するが既知の酵素に共通するモチーフ配列を有していないことから、新たなサブファミリーであるクラス IB に分類される[2)]。このホモログは機能未知遺伝子として様々な細菌に存在しており、これまでに我々は *Bacillus* 属細菌におけるゲノムマイニングを行い、結晶構造決定に用いた鎖状テルペン合成酵素の BalTS などを発掘してきた[2-5)]。本研究では、その他の様々な属の細菌に由来するホモログを解析することで、さらなる新規天然物の発見やクラス IB ファミリーに関する知見の拡大を目指した。

BsuTS のアミノ酸配列を用いた相同性検索により得られた配列の中から、グラム陽性菌／陰性菌や好気性菌／嫌気性菌、好熱性菌などの 8 菌種に由来する配列を選択した。各ホモログ遺伝子を人工合成により取得し、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いた *in vitro* 試験や *B. subtilis* を宿主とした *in vivo* 試験により生成物を解析した。

その結果、大半のホモログが BsuTS と同じ環状生成物を産生したことから、進化的に遠い細菌においても BsuTS が広く分布されていることが明らかになった。本研究の結果は、クラス IB テルペン合成酵素の生理的意義を明らかにする上で有用な知見であると考えている。また、一つのホモログ (CwoeTS) の生成物から新規環状セスクアテルペンを単離構造決定できた。したがって、クラス IB テルペン合成酵素のゲノムマイニングの有効性を示すことができた。

1) Sato, T. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 9734-7. 2) Fujihashi, M. *et al*., *Chem. Sci.*, 2018, 9, 3754-8.
3) Stepanova, R. *et al*., *ACS Chem. Biol.*, 2020, 15, 1517-25. 4) Sato, T. *et al*., *ChemBioChem*, 2013, 14, 822-5.
5) Ueda, D. *et al*., *ChemBioChem*, 2015, 16, 1371-7.

We have discovered a Class IB terpene synthase. We have performed genome mining of Class IB terpene synthase from *Bacillus* species and found new acyclic terpenes. In this study, Class IB homologs of various other genera of bacteria were analyzed. As a result, most homologs produced the same cyclic product as that of *Bacillus subtilis* homolog (BsuTS), demonstrating that the function of BsuTS is widely distributed in evolutionarily distant bacteria. In addition, a novel cyclic sesquarterpene could be discovered from the analysis of one homolog.

terpene, terpene synthase, isoprenoid

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F02-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

立体構造に基づくアンブレイン合成酵素の触媒機構解析と構造安定化

Catalytic mechanism and structure stabilization of ambrein synthase based on the crystal structure

○亀谷 太一[1]、久保田 智巳[2]、小山 裕彰[1]、山澤 友葉[1]、上田 大次郎[1]、品田 哲郎[3]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然、[2]産総研、[3]阪市大院理)
○ Taichi KAMEYA[1], Tomomi KUBOTA[2], Hiroaki KOYAMA[1], Tomoha YAMAZAWA[1], Daijiro UEDA[1], Tetsuro SINADA[3], Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ, [2]AIST, [3]Osaka City Univ)

我々は *Bacillus megaterium* 由来の二機能性トリテルペン（C_{30}）/セスクアテルペン（C_{35}）環化酵素（BmeTC）を発見した[1)]。C_{30} と C_{35} 基質から各々２環と４環骨格を形成する触媒機構についての詳細は明らかになっていない。また、変異（$BmeTC^{Y167A/D373C}$）を導入することによって希少天然物のアンブレイン（マッコウクジラが生産する龍涎香の主成分）を合成することに成功した[2)]。アンブレインは香料としての利用が期待できるが、合成効率が低く産業化には至っていない。触媒機構の解明と酵素構造の安定化によるアンブレイン高生産を目的として BmeTC のＸ線結晶構造解析を行った。

野生型/変異型酵素について、基質アナログ結合/非結合型の結晶構造を 2.1-2.3Å 分解能で決定した。まず、野生型酵素の結晶構造から、トリテルペン/セスクアテルペンの環化機構を推定した。特に、セスクアテルペンの環化に機能する残基は、今までに知られているトリテルペン環化酵素の活性部位とは異なるものが多かった。これらの残基の詳細な変異解析については次演者が報告する予定である[3)]。

次に、アンブレイン生合成酵素（$BmeTC^{Y167A/D373C}$）の結晶構造から、アンブレインの生成機構を推定した。D373C 変異の導入による生成物の骨格の変化（２環→単環）は、新たに形成された水素結合ネットワークを通した基質近傍の水分子の配置変化による中間体コンフォメーションの変化と、C373 残基によって分極化した隣接残基による脱プロトン化に起因することが考えられた。また、Y167A 変異の導入によって酵素活性が改善するのは、Y167 側鎖と基質の２環骨格との立体障害が、アラニンへの置換によって低下したためであると考えられた。

さらに、結晶中で大きく熱振動している領域を耐熱性ホモログと同じアミノ酸に置換することで、酵素活性を大きく改善した。これらの変異を $BmeTC^{Y167A/D373C}$ に導入することで、アンブレイン高生産系の構築を進める予定である。

1) Ueda, D. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335. 2) Yamabe, Y. *et al. Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 19643.
3) 船津ら, 本農芸化学会.

We discovered a bifunctional triterpene (C_{30}) / Sesquarterpene (C_{35}) cyclase (BmeTC), but its catalytic mechanism has not been clarified. Mutant BmeTC has the ability to synthesize the rare natural product, ambrein. However, efficient production of ambrein has not been achieved. In this study, we determined the crystal structure of BmeTC at 2.1-2.3 Å resolution and proposed its catalytic mechanism. In addition, we succeeded in improving thermal stability of BmeTC by introducing mutations based on the crystal structure data.

terpene, terpene cyclase, crystal structure

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F02-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

二機能性トリテルペン/セスクアテルペン環化酵素におけるセスクアテルペン環化に重要なアミノ酸残基の解析

Analysis of amino acid residues important for sesquarterpene cyclization in bifunctional triterpene/sesquarterpene cyclase

○船津 莉香[1]、鷹羽 優香[1]、品田 哲郎[2]、亀谷 太一[1]、久保田 智巳[3]、上田 大次郎[1]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然、[2]阪市大院理、[3]産総研)
○Rika FUNATSU[1], Yuka TAKABA[1], Tetsuro SHINADA[2], Taichi KAMEYA[1], Tomomi KUBOTA[3], Daijiro UEDA[1], Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ., [2]Osaka City Univ., [3]AIST)

我々は、*Bacillus megaterium* 由来の二機能性トリテルペン（C_{30}）/セスクアテルペン（C_{35}）環化酵素（BmeTC）を同定した[1,2]。BmeTC は C_{30} と C_{35} 基質からそれぞれ 2 環、4 環骨格を形成するが、その触媒機構の詳細は明らかになっていない。最近、BmeTC の基質アナログ結合型の結晶構造を決定し、*Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来の既知トリテルペン環化酵素（AacSHC）のものと比較することにより、セスクアテルペンの環化に特異的に機能する残基を新たに推定した[3]。本研究では、それらをターゲットにした変異酵素について解析した。

BmeTC の結晶構造において、C_{35} 基質の C/D 環周辺に位置することが推定される残基は AacSHC と異なるものが多く見られた。これらの活性部位候補残基のアラニン置換体について、C_{30} と C_{35} 基質との反応を解析した。その結果、全ての変異体において C_{35} 基質に対して著しく活性が低下し、セスクアテルペン環化において活性部位として機能していることが示唆された。また、C_{30} 基質から通常の環化生成物を与えるのに対して、C_{35} 基質からは異常環化生成物を形成する変異体を２種類見出した。１種類の変異体の異常環化生成物は単離構造決定でき、三環で反応が停止した環化物であった。ターゲットの芳香族アミノ酸残基は三環性カルボカチオンの安定化に機能していることが示唆された。現在、もう１種類の変異体の異常環化生成物の構造決定を行っており、合わせて報告する予定である。

1) Sato, T. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 17540-3. 2) Ueda, D. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335-8. 3) 亀谷ら、本農芸化学会一般講演.

We discovered a bifunctional triterpene (C_{30})/sesquarterpene (C_{35}) cyclase (BmeTC), but its catalytic mechanism has not been clarified. Recently, we determined the crystal structure of the substrate-analogue bound form of BmeTC and compared it with that of AacSHC to search for new residues that function specifically in sesquarterpene cyclization. The residues of BmeTC presumed to be located around the C/D ring of the C_{35} substrate were found to be different from that of AacSHC. In this study, we analyzed the reactions of mutated enzymes targeting for them with C_{30} and C_{35} substrates. As a result, the activities of all mutants were significantly reduced for C_{35} substrate, suggesting that they function as the active site in sesquarterpene cyclization. In addition, we found two mutants that formed aberrant cyclization products only from C_{35} substrate.

terpenoid, isoprenoid, terpene cyclase

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F02-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム F

Functional characterization of a novel bifunctional drimenol synthase of bacterial origin: A step toward the discovery of drimane sesquiterpenes in bacteria

○ Nhu Ngoc Quynh Vo[1], Yuhta Nomura[2], Kiyomi Kinugasa[1], Hiroshi Takagi[1], Yumi Shiozaki-Sato[1], Shunji Takahashi[1] ([1]RIKEN CSRS, Nat. Prod. Biosynth., [2]RIKEN CSRS, Biomol. Charact.)

[Introduction] Natural drimane-type sesquiterpenes, including drimenol, exhibit diverse biological and pharmacological properties. Although these active compounds are distributed among plants and fungi, their accumulation in bacteria remains unknown. Consequently, there are also no reports on bacterial drimane sesquiterpene synthases (STSs). Here, we discover a novel bacterial drimane STS for the first time and suggest the biosynthesis of drimane sesquiterpenes in bacteria.

[Methods] We searched bacterial protein databases for putative bacterial drimane STSs using AstC, a reported fungal drimane STS, as a query. Further, we extracted the candidates that conserve a DxDTT motif found in AstC as well as class II diterpene synthases. The final candidates were expressed as recombinant proteins for *in vitro* enzyme assays.

[Results and Discussion] The enzyme assays demonstrated that a candidate protein from *Aquimarina spongiae* is a novel bifunctional drimenol synthase (AsDMS) that catalyzes two continuous reactions: the cyclization of farnesyl pyrophosphate (FPP) into drimanyl pyrophosphate and the dephosphorylation of drimanyl pyrophosphate into drimenol. In contrast, AstC was known to catalyze only the cyclization of FPP into an isomeric drimanyl pyrophosphate, even though both of the low-similarity proteins, AstC and AsDMS, belong to the haloacid dehalogenase-like hydrolase superfamily. Interestingly, AsDMS uniquely conserves not only DxDTT motif but also DDxxE motif commonly found in class I terpene synthases. Protein structure modeling suggested that the substrate FPP is located within the interdomain created by DDxxE motif of N-domain and DxDTT motif of C-domain. Biochemical analysis revealed two essential aspartate residues of DDxxE motif that might contribute to capture the pyrophosphate moiety of FPP inside the catalytic site of AsDMS, which is important for dephosphorylation reaction. The middle aspartate residue of DxDTT motif was also critical for cyclization reaction. Hence, our results indicated that the multi-domain protein AsDMS utilizes both motifs for its bifunctional reactivity to produce the final product, drimenol. Our findings demonstrate the first example of the bacterial drimane STS, thus paving the way for future research on drimane sesquiterpenes in bacteria. We also discuss about the unique domain assembly and evolution of AsDMS.

bacterial drimenol synthase, *Aquimarina spongiae*, HAD-like hydrolase superfamily

講演番号：2F04-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

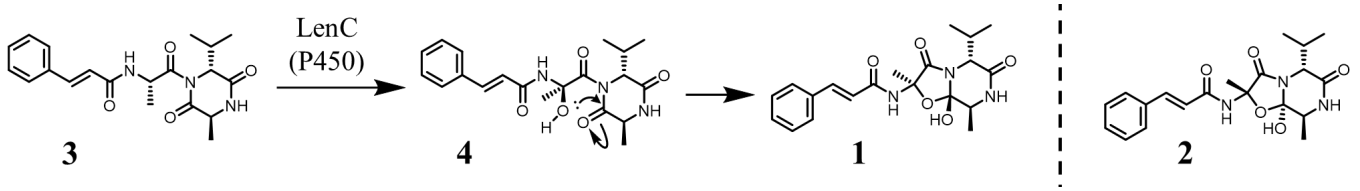
糸状菌 *Aspergillus lentulus* 由来新規化合物 lentopeptin A, B の生合成機構

Biosynthesis of lentopeptin A and B, novel compounds from *Aspergillus lentulus*

○松原 有也、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Yuya Matsubara, Shinji Kishimoto, Kenji Watanabe (Univ. of Shizuoka)

lentopeptin A (**1**), および B (**2**) は当研究室で糸状菌 *Aspergillus lentulus* より単離・構造決定された 2 つの新規化合物であり、*len* クラスター中の 3 遺伝子 *lenA* (非リボソーム性ペプチド合成酵素, NRPS), *lenB* (phenylalanine ammonia lyase, PAL), *lenC* (cytochrome P450)により生合成されることが明らかになっている。LenA 末端に存在する C_T ドメインおよび直前の T ドメインを大腸菌で発現・精製し基質と予想される鎖状ペプチドの合成疑似基質を加えたところ、*lenC* ノックアウト株より単離・構造決定された生合成中間体 **3** の生成がみとめられた。次に LenC を出芽酵母で発現させ分離したミクロソーム画分に **3** を添加したところ、推定通りの **1**, **2** に加えこれらと同一の分子量を有する化合物 **4** が生じることが明らかになった。**4** は水中、非酵素下で徐々に **1** のみを生じることから、**4** は LenC により **3** のアラニン残基のα位が水酸化を受けて生じる、**1** の前駆体であると推定された。一方で **1** のジアステレオマーである **2** は前駆体と考えられる化合物が見出されず **4** から生じることもないため、**1** とは異なる生成機構をもつことが示唆された。

Lentopeptin A (**1**), and B (**2**) are novel compounds isolated from *Aspergillus lentulus* in our previous study. We've also reported these are biosynthesized by 3 genes in *len* cluster, *lenA* (nonribosomal peptide synthetase, NRPS), *lenB* (phenylalanine ammonia lyase, PAL), and *lenC* (cytochrome P450). Herein, we report functional analysis of these enzymes. T-C_T didomain of LenA was overexpressed and purified from *E. coli*. Linear peptide substrate was converted by purified protein into **3**, a biosynthetic intermediate isolated from *lenC* knockout strain. Whereas LenC was expressed in *S. cerevisiae* and microsomal fraction containing LenC was obtained. Compound **3** was consumed under existence of LenC, generating unknown compound **4** as well as **1**, **2** as estimated. Molecular weight of **4** is correspond with that of **1**, **2**, and isolated **4** transformed nonenzymatically into only **1**, suggesting **4** is linear precursor of **1**. This result also indicates that **2**, diastereomer of **1**, is generated via another path and mechanism.



Aspergillus, NRPS, P450

発表責任者：松原有也（s21108@u-shizuoka-ken.ac.jp）

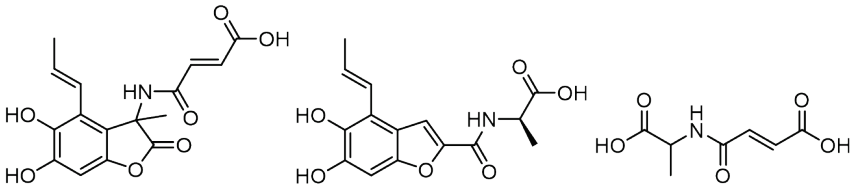
講演番号：2F04-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

ベンゾフラン骨格を有する糸状菌由来天然物 fumimycin および lentofuranine の生合成研究

Biosynthetic study of fumimycin and lentofuranine including benzofuran core structure isolated from fungus

○南 歩実、渡邉 正悟、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大)
○Ayumi MINAMI, Shogo WATANABE, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

近年我々は、ヒト病原性糸状菌である *Aspergillus lentulus* ATCC MYA-3566 株の培養液から、fumimycin（1）及び 1 に類似した構造の新規化合物 lentofuranine（2）を単離し、1 と 2 が共通する生合成遺伝子クラスターによって生合成されていることを明らかにした [1]。これらの主骨格を生合成するポリケチド合成酵素 (PKS) ALT1267 と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) ALT2306 は異なる遺伝子クラスターに属している。このことから、PKS 産物と NRPS 産物が別々に生合成されたのちに縮合し、1 と 2 が生成すると考えた。*In vitro* 試験により、ALT1267 によって生産される推定 PKS 産物に類似した化合物と ALT2306 から生産される fumarylalanine（3）が、ALT2306 存在下では fumimycin 様の縮合を起こす可能性があると示唆された。現在この縮合物の化学構造を決定することで、1 の縮合機構を明らかにすることを試みている。一方、2 と同様の縮合様式を有する化合物は *in vitro* の実験で確認できておらず、他の酵素の関与が予想された。その候補として、ノックアウトによって 2 の生産が消失する enoyl-CoA reductase と機能推定されている ALT2307 を挙げ、現在その機能解明を行っている。



1)南歩実ら, 日本農芸化学会 2021 年度大会

We found that *Aspergillus lentulus* ATCC MYA-3566 produces fumimycin (**1**) and a novel compound lentofuranine (**2**), and they could be produced by combination of two separated gene clusters. One of them containing PKS genes constructs the aromatic core, whereas the other cluster containing NRPS gene forms fumarylalanine (**3**). The biosynthetic mechanisms for the formation of two different products **1** and **2** have been covered yet in the condensation steps. In this study, we analyzed the activity of ALT2306 in the presence of 4-methoxyhydroquinone yielding to a product similar with **1** in the characteristic spectra. On the other hand, lentofuranine-like compounds were not observed thus far. Based on the results, other genes are essential for the formation of **2**. We speculated ALT2307 plausible function of enoyl-CoA reductase, of which the deletion mutant lost a production of **2**. Detailed function of the enzyme is under investigation.

biosynthesis, secondary metabolites, fungus

講演番号：2F04-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

マレイマイシン類の生合成経路の解析

Studies on the maleimycin biosynthetic pathway.

○曽根 祐輔[1]、Muhammad Prima PUTRA[1]、松田 研一[1]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構)
○Yusuke SONE[1], Muhammad Prima PUTRA[1], Kenichi MATSUDA[1], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

Amino-group carrier protein: AmCP は、好熱菌や古細菌のリジン・アルギニン生合成から見出され放線菌においても二次代謝の生合成に関与していることが明らかとなっている。我々は、C 末端の保存モチーフが「RDWGQ」となっている特異な AmCP（type II AmCP）の遺伝子を含むクラスターがマレイミド骨格を有するマレイマイシンの生合成に関与していることを発見し、その生合成系路の解析を行っている。前回の大会で、Mmy12（glutamine amidotransferase homolog）が type II AmCP の C-末端のグルタミン残基をグルタミン酸残基に翻訳後修飾した後、基質であるグルタミン酸が AmCP 上にロードされること、ロードされたグルタミン酸が新規非タンパク質性アミノ酸と思われる分子量 *m*/*z* 220.08 の化合物へと変換されることなどを報告した。今回は、type II AmCP にロードされたグルタミン酸が、リン酸化、還元を経た後、Mmy7 によって、オキサロ酢酸との縮合により脱炭酸を伴う新規な C3 増炭反応により新規非タンパク質性アミノ酸 7-amino-4-hydroxy-2-oxooctanedioic acid (AHXO)に変換されること、そして Mmy12 が再度反応することによって AHXO が AmCP より放出されることを in vitro 再構築系によって明らかにした。さらに、AHXO 以降の反応に関わると思われる複数の遺伝子の破壊株を作製し、そこで蓄積する化合物の構造決定を行った。本発表では、他の中間体や生合成遺伝子の機能も含めてマレイマイシンの生合成に関する最新の知見について報告する。

Amino-group Carrier Protein (AmCP) is involved in lysine and arginine biosynthesis in some bacteria and archaea. Furthermore, a similar AmCP-system is also used in secondary metabolite biosynthesis of some *Streptomyces* species. We found that a different-type of AmCP (type II AmCP) with a glutamine residue at the C-terminus is involved in the biosynthesis of maleimycins, which have a rare maleimide moiety. In the presentation on the last Annual meeting, we reported that a glutamate molecule was attached to the C-terminus of the AmCP after the C-terminal glutamine was hydrolyzed to glutamate by Mmy12 and converted to an unknown compound with *m*/*z* of 220.08. Here we will report that the glutamate semialdehyde moiety is converted to 7-amino-4-hydroxy-2-oxooctanedioic acid (AHXO) on the AmCP, which is then released from the AmCP by Mmy12 in *in vitro* reconstitution system using recombinant proteins. We constructed several mutants with a knockout of gene presumably involved in the later step of the maleimycin biosynthesis and analyzed the compounds accumulated in the mutants. In this presentation, we would like to share the latest findings on the biosynthesis of maleimycin, including the functions of other biosynthetic genes.

AmCP, natural product, Streptomyces

講演番号：2F04-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

放線菌において AmCP を介して生産される新規天然化合物の探索と同定

Discovery and identification of novel natural products mediated via AmCP in Actinomycetes

○宮永 寛哉[1]、曽根 祐輔[1]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2]([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構)
○Toka MIYANAGA[1], Yusuke SONE[1], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

DADH(diamino-dihydroxy-heptanoic acid)は、アミノ基キャリアタンパク質（AmCP）が関与し合成される非タンパク質性アミノ酸であり、天然には珍しいアザビシクロ環(1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring)を有する化合物 Vazabitide A の前駆体として発見された。DADH を中間体として合成される天然化合物は数例のみ知られているが、いずれもアザビシクロ環関連化合物であると予想されている。しかしながら DADH 生合成遺伝子群は多くの放線菌に保存されていることから、多様な構造を持った未知化合物の生産に関与していることが予想される。そこで、DADH 生合成遺伝子クラスターを持つ *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 株に着目し、本菌株が生産する DADH を中間体とする新たな化合物の探索を行った。野生株と DADH 生合成遺伝子破壊株（Δ*orf31*）の代謝物を比較したところ代謝物に変化は見られなかったが、本菌株の DADH 生合成遺伝子クラスターの上流に存在する正のレギュレーターSARP(*Streptomyces* antibiotic regulatory protein)の強制発現を行ったところ、DADH の産生と共に新規化合物 X の産生が確認された。ついで、化合物 X の単離・精製を行い、NMR にて構造決定を行った結果、化合物 X は新規なトリペプチドであることが明らかになった。本発表では、化合物 X 生合成経路についても報告する予定である。

DADH (diamino-dihydroxy-heptanoic acid) is a non-proteinogenic amino acid synthesized using amino-group carrier protein (AmCP) in *Streptomyces* sp. SANK 60404. DADH is an intermediate product in the biosynthesis of vazabitide A, a compound with a rare 1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring in nature. However, the DADH biosynthetic gene cluster is conserved in many actinomycetes, it may be involved in the biosynthesis of compounds with unprecedented structures. We focused on *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331, which contains a putative DADH biosynthetic gene cluster. When the SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein)-type regulator in the upstream of the DADH biosynthetic gene cluster was overexpressed in *S. flavogriseus* ATCC 33331, this strain accumulated DADH and unknown compound X. The compound X was isolated and characterized by HPLC, NMR, and MS analyses, and finally was found to be a novel tripeptide. We would like to discuss the biosynthetic pathway of the compound X.

AmCP, Secondary metabolites, Streptomyces

講演番号：2F04-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

放線菌由来β-カルボリン化合物キタセタリンの生合成機構の解明

Elucidation of the biosynthetic mechanism of kitasetaline, a microbial ß-carboline compound

○佐藤 克哉[1]、砂田 礼菜[1]、上田 祥平[1]、岡野 憲司[1,2]、本田 孝祐[1,2]、木谷 茂[1,2] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]阪大・先導学研機)
○ Katsuya SATO[1], Reina SUNADA[1], Shohei UEDA[1], Kenji OKANO[1,2], Kohsuke HONDA[1,2], Shigeru KITANI[1,2] ([1]ICBiotech, Osaka University, [2]OTRI, Osaka University)

ß-カルボリン化合物は、多彩な生理活性を示す有用物質である。天然 ß-カルボリン化合物の多くが植物に由来するが、微生物起源の ß-カルボリン化合物は極僅かである。本研究室では、ß-カルボリン化合物キタセタリンを *Kitasatospora* 属放線菌より見出し、その生合成（*ksl*）遺伝子群を同定した。本研究では、*ksl* 遺伝子群の機能を明らかにし、生合成機構の解明を試みた。

KslB の酵素機能を解析するため、大腸菌で発現させた精製 KslB タンパク質により *in vitro* 反応を実施した結果、KslB は L-トリプトファンと α-ケトグルタル酸を基質とし、キタセタリン前駆体であるキタセタリン酸をピクテ・スペングラー（PS）反応にて生成することが分かった。KslB の様にケトン体を基質とする PS 酵素は僅か 2 例であり、その基質認識性に興味が持たれる。一方、キタセタリンには *N*-アセチルシステイン構造が含まれ、その構造付加にはアミド加水分解酵素（Mca）が関わる。*ksl* 遺伝子群を *mca* 遺伝子破壊株にて異種発現させると、キタセタリン生産が欠失すると共に、複数の新規 ß-カルボリン化合物の生産が増加した。以上の結果に基づき、キタセタリンの生合成経路について考察する。

ß-Carboline compounds have various physiological activities. Most natural ß-carbolines are produced by plants, whereas there are only a few ß-carbolines of microbial origin. We previously identified a ß-carboline compound named kitasetaline from *Kitasatospora setae* as well as the *ksl* biosynthetic genes. Here, we aimed to elucidate the biosynthetic mechanism of kitasetaline in detail. To analyze an enzymatic function of KslB protein, we performed *in vitro* reaction using a purified KslB protein from *Escherichia coli*, indicating that KslB condenses L-tryptophan and α-ketoglutarate to synthesize kitasetalic acid, a tetrahydro ß-carboline compound and that KslB is a Pictet-Spengler (PS) catalyzing enzyme. Interestingly, to date, there are only two enzymes that utilize ketones as a substrate. On the other hand, the formation of the *N*-acetylcysteine moiety in the structure of kitasetaline requires the function of the mycothiol-*S*-conjugate amidase (Mca). Heterologous expression analysis using *Streptomyces avermitilis* SUKA22 Δ*mca* mutant showed that the production of several new ß-carboline compounds increased in response to the lack of the *mca* gene. Based on these results, the biosynthetic pathway of kitasetaline will be discussed.

Actinomycetes, ß-Carboline, Heterologous expression

発表責任者：佐藤 克哉（katsuya_sato@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2F04-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

Planococcus maritimus iso-3 の生産する C30 カロテノイド methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-4,4’-lycopenoate の生合成中間体(CHO 化合物)に関する研究 I
Studies on the biosynthetic intermediate (CHO compound) on C30 carotenoid methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-4,4’-lycopenoate produced by *Planpococcus maritimus* iso-3. Part I. CH_3 → CHO

○前原 千夏[1]、萩原 萌[1]、荒井 梨子[1]、竹村 美保[2]、三沢 典彦[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大・家政・食物、[2]石川県大・生資研)
○Chinatsu MAEHARA[1], Moe HAGIWARA[1], Riko ARAI[1], Miho TAKEMURA[2], Norihiko MISAWA[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women’s Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】バクテリア類が生産する C30 カロテノイドについては、いまだその生合成経路が解明されていないものが多い。本研究室では、2008 年に *Planococcus maritimus* iso-3 株が新規 C30 カロテノイド methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-apo-4,4’-lycopenoate (1)を生産することを明らかにし、これまでの研究で **1** の生合成に関わる遺伝子の同定と各生合成中間体である新規化合物の構造確認・抗酸化活性評価を並行して進めてきた。今回の報告では、**1** の最終盤に近い生合成中間体の末端 CH_3→CHO 反応に関連する遺伝子をつきとめること、得られる CHO 生合成中間体の構造確認及び生理活性（一重項酸素消去活性）を検討することを目的とした。【方法・結果】*Planococcus faecalis* で CH_3→CHO 触媒活性を有することが報告されている *crtP1* 遺伝子と相同な配列を *Planococcus maritimus* iso-3 から PCR によりクローニングした。*crtP1* と *crtM*, *crtN*, *cruF*, *crtNb* を導入した組換え大腸菌を 2YT 培地で 48～72 時間培養後、遠心処理により菌体を回収し、超音波処理による抽出→二相分配→HPLC 分取により生産される生合成中間体カロテノイドを単離した。単離したカロテノイドに対して HR-ESIMS, 各種 NMR 解析を行い、下記のように構造を決定した。本化合物は IC_{50} 9.5μM の一重項酸素消去活性を示した。また現在、*crtP1* と *crtM*, *crtN*, *cruF*, *crtNb* に加えて，グルコース配糖体化酵素である *GT* を導入した組換え大腸菌を同様に培養、遠心処理、抽出、二層分配、HPLC 分取により、1 の水酸基が glucosyl 化された生合成中間体を単離中である。

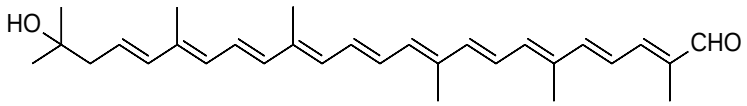


Fig.1 The structure of 5-hydroxy-5,6-dihydro-apo-4,4’-lycopenal

In 2008, we reported a new antioxidant C30 carotenoid, methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-apo-4,4'-lycopenoate (**1**) produced by *Planococcus maritimus* iso-3. In our recent study, we have identified some genes involved in the biosynthesis of **1** and produced some biosynthetic intermediates using recombinant *E. coli* carrying these genes. This time, we aimed to identify the biosynthetic genes involved in the terminal CH_3→CHO reaction. In this study, we isolated *crtP1* gene from *Planococcus maritimus* iso-3 which has the expected activity. We constructed the recombinant *E. coli* carrying *crtM*, *crtN*, *cruF*, *crtNb*, and *crtP1*, and cultured it in 2YT medium for 48~72 hours. We isolated the produced intermediate using EtOAc/H_2O partition and preparative HPLC and determined its new structure using HR-ESIMS and NMR analyses as shown in Fig. 1. Furthermore, we examined its $^1O_2$ quenching activity and proved to its excellent activity (IC_{50} 9.5μM).

Planococcus, carotenoids, antioxidant

講演番号：2F04-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

Planococcus maritimus iso-3 の生産する C30 カロテノイド methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-4,4’-lycopenoate の生合成中間体(COOH 化合物)に関する研究 II.

Studies on the biosynthetic intermediate (COOH compound) on C30 carotenoid methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-4,4’-lycopenoate produced by *Planpococcus maritimus* iso-3. Part II. CHO → COOH

○萩原 萌[1]、前原 千夏[1]、荒井 梨子[1]、竹村 美保[2]、三沢 典彦[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大・家政・食物、[2]石川県大・生資研)
○Moe HAGIWARA[1], Chinatsu MAEHARA[1], Riko ARAI[1], Miho TAKEMURA[2], Norihiko MISAWA[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women’s Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】バクテリア類が生産する C30 カロテノイドについては、いまだその生合成経路が解明されていないものが多い。本研究室では 2008 年に *Planococcus maritimus* iso-3 株が新規 C30 カロテノイド methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-apo-4,4’-lycopenoate(**1**)を生産することを明らかにし、これまでの研究で **1** の生合成に関わる遺伝子の同定と各生合成中間体である新規化合物の構造確認・抗酸化活性評価を並行して進めてきた。今回の報告では、前発表者の生合成中間体である末端 CHO 化合物の CHO→COOH に関連する遺伝子をつきとめること、得られる COOH 生合成中間体の構造確認及び生理活性（一重項酸素消去活性）を検討することを目的とした。【方法・結果】*Planococcus faecalis* で CHO→COOH 触媒活性を有することが報告されている *aldH* 遺伝子と相同な配列を *Planococcus maritimus* iso-3 株から PCR によりクローニングした。*aldH* と *crtM*, *crtN*, *cruF*, *crtNb*, *crtP1* を導入した組換え大腸菌を 2YT 培地で 48～72 時間培養後、遠心処理により菌体を回収し、超音波処理による抽出→二相分配→HPLC 分取により生産される生合成中間体カロテノイドを単離した。単離したカロテノイドに対して HR-ESIMS, 各種 NMR 解析を行い、下記のように構造を決定した（新規化合物）。本化合物は IC_{50} 7.6 μM の一重項酸素消去活性を示した。

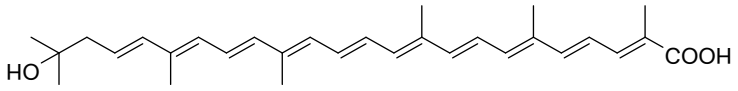


Fig.1 The structure of 5-hydroxy-5,6-dihydro-apo-4,4’-lycopenoic acid

In 2008, we reported the chemical structure and antioxidant activity of methyl 5-glucosyl-5,6-dihydro-apo-4,4’-lycopenoate (**1**) produced by *Planococcus maritimus* strain iso-3. In our recent study, we have identified some genes involved in the biosynthesis of compound **1** and produced some biosynthetic intermediates using recombinant *E. coli* carrying these genes. These results were published this year (Microbial Cell Factories volume 20, Article number: 194 (2021)).

In this study, we isolated *aldH* gene which has the activity to convert aldehyde into carboxylic acids from *Planococcus maritimus* iso-3 strain. We constructed the recombinant *E. coli* carrying *crtM*, *crtN*, *cruF*, *crtNb*, *crtP1*, and *aldH*, and cultured in 2YT medium for 48~72 hours. We isolated the produced intermediate through some chromatographic methods and determined its new structure using HR-ESIMS and NMR analyses as shown in Fig. 1. Furthermore, we evaluated its $^1O_2$ quenching activity of this new carotenoid and proved its singlet oxygen-quenching activity (IC_{50} 7.6 μM).

Planococcus, carotenoids, antioxidant

講演番号：2F04-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

新規リポランチンの単離同定

Isolation and identification of novel Lipolanthine

○趙 ハンセム、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院・農）
○HANSAEM JO, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka (The Univ. of tokyo)

微生物が生産する天然リポペプチド群は MRSA などに対する抗菌活性を有することから、新たな抗生物質シードとして期待される。最近、新しいリポペプチド系抗生物質として、リボソーム翻訳後修飾型ペプチド [Montalbán-López et al. Nat Prod Rep. 2021] と、脂肪酸合成酵素及び I 型ポリケチド合成酵素（PKS）によって合成された超長鎖脂肪酸アシル基が縮合した goadvionin を放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 から発見した。[Kozakai et al. Nat Chem. 12(9):869-877. 2020] 同様な系統の化合物として、*Microbacterium arborescens* 由来 microvionin などがリポランチン類として知られている。[Wieback et al. Nat Chem Biol. 2018] これらの化合物は脂肪酸アシル基の末端が塩基性のトリメチルアミン基またはグアニジノ基である特徴がある。本研究では、脂肪酸アシル基の末端にアルギニン由来のグアニジノ基を有する新規リポランチン系天然物を微生物から探索することを目的に行った。脂肪酸アシル基末端にアミノ酸を取り込むための酵素として ThDP 依存性酵素である *mic* 生合成遺伝子群由来の MicJ をクエリとしてゲノムマイニングを行ったところ *Streptomyces lydicus* NBRC13058 に相同性を有する遺伝子を見出だした。生合成産物は脂肪酸アシル基の末端にリシン由来由来のグアニジノ基を有することが推定されたことから $^{13}C_6$,$^{15}N_4$-Arg の取り込み実験を行った。同位体の添加培養物の LC/QTOFMS 比較解析を行い、代謝産物の同定を行ったところ 9 Da のマスシフトを示す化合物を多変量解析により同定した。現在、*S. lydicus* の 3 L の培養液から各種カラム精製により 47 mg を単一に精製した。大会では本化合物の各種機器分析を用いた化学構造決定、生物活性について報告する。

A number of lipopeptide natural products with antibacterial activity including against MRSA have been found in bacteria and considered to be potential seeds for the development of pharmaceutical agents. Recently, the lipopeptide-class antibiotics goadvionins were discovered from *Streptomyces* sp. TP-A0584. Similar class of compounds, e.g. microvionin is also found from *Microbacterium arborescens*. Fatty acyl group of these natural products possess basic terminal derived from trimethyl-lysine or arginine. Dehydrogenase and ThDP-dependent enzyme were required for the incorporation of the amino acids. In this study, we used ThDP-dependent enzyme homolog as query for the genome mining for the producing strain and used $^{13}C_6$,$^{15}N_4$-Arg as probe to identified the novel lipolanthine-class natural products using comparative metabolomics.

Streptomyces, secondary metabolites, antibiotics

発表責任者：趙ハンセム（gkstoawh@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2F04-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

アゾキシアルケン化合物を生産する *Streptomyces rochei* に見出された新規 N-N 化合物の構造解析・生合成・生物活性

Isolation, biosynthetic investigation, and biological activity of novel N-N compound from azoxyalkene-producing *Streptomyces rochei*.

○長野 遥[1]、田中 悠[2]、岸本 拓也[3]、達川 綾香[3]、國武 博文[3]、福本 敦[4]、安齊 洋次郎[4]、荒川 賢治[1,2,3] ([1]広島大・工、[2]広島大院・統合生命、[3]広島大院・先端研、[4]東邦大・薬)
○Haruka NAGANO[1], Yu TANAKA[2], Takuya KISHIMOTO[3], Ayaka TATSUKAWA[3], Hirofumi KUNITAKE[3], Atsushi FUKUMOTO[4], Yojiro ANZAI[4], Kenji ARAKAWA[1,2,3] ([1]Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [4]Toho Univ.)

【目的】

放線菌は抗生物質を含む多種多様な二次代謝産物を生産する土壌細菌である。放線菌ゲノム上には 1 株あたり 20 種類以上の二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在するが、通常生産されるものはその内の２割程度であり、約８割はゲノム中に「休眠」しているといえる。

当研究室では *Streptomyces rochei* の休眠二次代謝覚醒を目指し、主要二次代謝産物である lankacidin 及び lankamycin の生合成遺伝子及び転写リプレッサー遺伝子 *srrB* に変異を加えた三重破壊株 KA57 株を構築した。この株は親株非生産のアゾキシアルケン化合物 KA57-A を蓄積した。

今回、我々は KA57 株の微量二次代謝産物の解析を報告する。

【方法・結果】

KA57 株の二次代謝産物を酢酸エチルで抽出、精製したところ、いくつかの親株非生産の化合物を蓄積していることが示唆された。これら化合物に対して、MS、NMR での構造解析を行い、それら化合物を KA57-B, C,および D と命名した。また、KA57-D については N-N 結合を有する新規化合物であることが示唆された。現在は KA57-D 生合成経路のより詳細な解析および生物活性試験を行っており、本発表ではその経緯について報告する。

Actinomycetes are soil bacteria that produce various secondary metabolites, including antibiotics. *Streptomyces* genome harbors over 20 secondary metabolites biosynthetic gene clusters, but most of them are not produced. We obtained azoxyalkene compound KA57-A from mutant KA57 that carries triple mutations on a repressor gene and two major secondary metabolites genes.

Extensive secondary metabolite analysis indicated that strain KA57 accumulates some compounds (termed as KA57-B, KA57-C, and KA57-D) that could not be detected in the parent strain.

Furthermore, MS spectrum and NMR analysis suggested that KA57-D is a novel compound containing N-N bond linkage. In this paper, we will report its biosynthetic investigation and biological activity.

Streptomyces, azoxyalkene, biosynthesis

講演番号：2F04-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム F

ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする糸状菌デプシペプチドの探索研究

Discovery of fungal depsipeptide based on genome mining and heterologous expression

○本間 悠人、菅原 章公、森下 陽平、塚田 健人、尾﨑 太郎、浅井 禎吾（東北大院薬）
○Yuto HOMMA, Akihiro SUGAWARA, Yohei MORISHITA, Kento TSUKADA, Taro OZAKI, Teigo ASAI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】糸状菌ゲノム上には膨大な天然物の生合成遺伝子クラスターが存在し、多様な生合成経路がコードされている。また、その多くは天然物とリンクしていない未開拓な経路であり、多様な新規天然物の存在が示唆される。本研究では、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法を用いて、これら遺伝子資源から新規天然物を合理的に獲得することを目的とした。
【方法・結果】本研究では、デプシペプチドもしくはリポペプチドを標的として、ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子を含むクラスターをゲノムマイニング により探索した。その結果、*Chaetomium mollipilium* c00338 株上に HR-PKS (*cmlpA*)、NRPS (*cmlpD*)、AMP-ligase (*cmlpB*)、acyltransferase (*cmlpC*) からなる Cmlp クラスターを見出した。CmlpA のドメイン構造とこれまでに報告されている天然物の構造情報を比較した結果、本クラスターは新規デプシペプチドを生合成することが予想された。麹菌異種発現系を用いることで、新規環状デプシペプチド **1a** とシクロール型 **1b** の単離・構造決定に成功した。また、本化合物の生合成についても明らかにした。

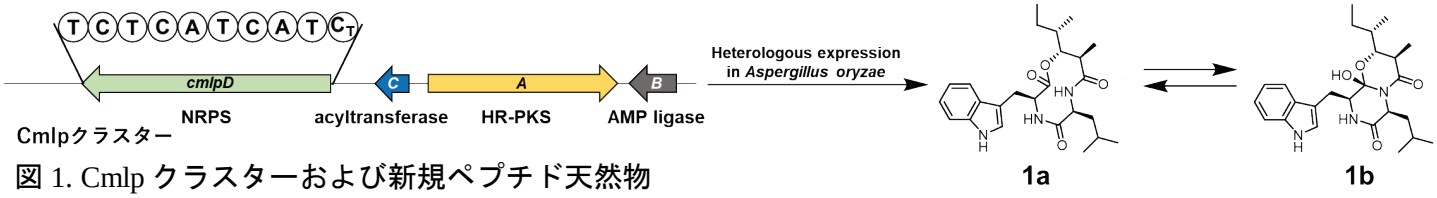


図 1. Cmlp クラスターおよび新規ペプチド天然物

A synthetic biology method based on genome mining and heterologous expression is a powerful tool to rationally discover natural products from gene resources.

Depsipeptide and lipopeptide natural products are attractive source for drug discovery because of their biological activity. We focused them as target in this study, we carried genome mining to find biosynthetic gene clusters that contained HR-PKS and NRPS genes. As the result, we found a unique cluster that composed of a NRPS gene (*cmlpD*), a HR-PKS gene (*cmlpA*), an AMP-ligase gene (*cmlpB*) and an acyltransferase gene (*cmlpC*). Bioinformatic analysis suggested that the cluster encoded a new peptide natural product. Reconstruction of the cluster in a model fungous, *Aspergillus oryzae*, gave us a new depsipeptide and its cycrol form. We elucidated their structures including absolute configurations by spectral analysis and chemical conversion method. In addition, we investigated the biosynthetic machinery.

natural products, genome mining, depsipeptide

発表責任者：浅井　禎吾（teigo.asai.c8@tohoku.ac.jp）

講演番号：2F07-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

製パン性に及ぼすエキソプロテアーゼの影響解析

Analysis of the effects of exo-proteases on bread-making properties

○若木 拓実[1]、辻井 良政[2]、伊賀 大八[3]、野口 智弘[4] ([1]東農大院農化、[2]東農大農化、[3]日本パン技研、[4]東農大応生、食加技セ)
○Takumi Wakagi[1], Yoshimasa Tujii[2], Daihachi Iga[3], Tomohiro Noguchi[4] ([1]Agri. Chem., Grad. Sch., Tokyo Univ. of Agri., [2]Agri. Chem., Tokyo Univ. of Agri., [3]JIB, [4]Food Proc., Tokyo Univ. of Agri.)

製パンにプロテアーゼを用いるとグルテン構成タンパク質を過度に分解することにより、生地形成が不良となる。このため製パンへのプロテアーゼの利用は少ないが、軽度な分解では製パン性が改善するとの報告がある。そこで本研究ではエキソプロテアーゼを製パンに用い、過度な分解を抑制した条件で検討を行った。製パンは、小麦粉に春よ恋を用い、酵素添加量 0～5000(ppm/小麦粉）にてストレート法で行った。酵素添加量に従い生地混捏時の物性が向上し、5000ppm 添加で生地形成時間が短縮した。また、混捏後およびホイロ後の生地と焼成パンクラムの遊離アミノ酸を LC/MS にて解析した結果、酵素添加により数種のアミノ酸の増加が確認された。そこで、小麦粉と酵素のみのモデル生地を作成し､各種溶媒にて抽出した分画タンパク質を SDS-PAGE にて解析した結果､0.1M 酢酸画分にて、24kDa 付近のバンドが酵素添加で消失し、低分子側にスメアなバンドとして現れた。これはペプチド鎖末端より分解を行うエキソプロテアーゼが作用した結果と推察され、この分子量変化によるタンパク質の性状変化が生地形成性に変化をもたらしているものと考えられた。

When proteases are used in bread making, they excessively degrade the gluten component proteins, resulting in poor dough formation. For this reason, proteases are rarely used in bread making, but it has been reported that mild degradation can improve bread making. In this study, exo-protease was used in bread making under conditions where excessive degradation was suppressed. For the baking tests, Haruyokoi was used as the flour. The bread was made with Pullman-type white bread, and exo-protease was added at 0-5000 (ppm/flour) in a straight method. The physical properties of the dough during mixing improved with the amount of enzyme added, and the addition of 5,000 ppm shortened the dough developing time. LC/MS analysis of the free amino acids in the dough immediately after mixing and after proofing, as well as in the baked bread crumb, showed the increase in amino acids by the addition of the enzyme. In the 0.1 M acetic acid fraction, the band around 24 kDa disappeared with the addition of the enzyme and appeared as a smear band on the low molecular weight side on model dough with flour and enzyme. This is thought to be the result of the action of exo-protease which degrades proteins from the ends of peptide chains. The degradation of flour proteins into smaller molecular weight is thought to have caused the changes in dough forming properties.

protease, bread, gluten

講演番号：2F07-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

豆乳の凍結融解分画に対する pH および塩濃度の条件検討

Examination of pH and salt concentration conditions for freeze-thaw fractionation of soymilk

○松野 正幸[1,2]、守田 和弘[3]、村上 和弥[2]、下山田 真[2]([1]静岡工技研、[2]静岡県大院・食栄、[3]実践女子大)
○Masayuki MATSUNO[1,2], Kazuhiro MORITA[3], Kazuya MURAKAMI[2], Makoto SHIMOYAMADA[2]
([1]Industrial Research Institute of Shizuoka Pref., [2]Univ. of Shizuoka, [3]Jissen Women's Univ.)

【背景・目的】豆乳は一般に広く普及した飲料・食品素材であり、非加熱の状態で凍結融解処理を行うことで豆乳タンパク質を簡易に分画することができる[1)]。我々は、このメカニズムに関して解明を進めるため、pH または塩濃度を変更した生豆乳について凍結融解を行うことで、分画可否の境界線を調べるとともに、主に上清の物性を測定した。
【方法】大豆（国産フクユタカ）を搾汁した生豆乳で pH 調整群および NaCl 添加群を調製し、−30°C で凍結後、融解した生豆乳を 3,000 × g で遠心分離し、上清と沈殿を分離した。レーザ回折／散乱式粒度分布測定装置（堀場製作所製 LA-950V2）により粒子径変化を、SDS-PAGE によりタンパク質の分子量分布変化を調べ、Malvern Panalytical 製 Zetasizer Ultra により液中粒子のゼータ電位を測定した。
【結果】NaCl 添加群(添加濃度 2.2 mM～0.67 M)については、NaCl 添加濃度が 0.22 M 以上になると上清と沈殿の境界が確認できなくなった。一般的に、タンパク質水溶液の塩濃度が非常に高くなるとタンパク質の沈殿を生じるが、高 NaCl 濃度の豆乳では凍結融解後も沈殿が生じない現象は非常に興味深い。上清または上液層の粒度分布は、NaCl 添加なしでは 1 μm 付近に見られたピークが、NaCl 添加濃度 0.31 M 以上になると 0.2 μm 付近へシフトした。この他の結果については、当日報告する。

【Introduction】Soymilk is very popular as a drink or a food material. Proteins in unheated soymilk are easily fractionated using the freeze-thaw processing[1)]. To elucidate the mechanism of the fractionation, we investigated the critical values of pH and salt concentration in which soymilk wasn't fractionated by freeze-thaw treatment.
【Methods】Soymilk was made from *Glycine max* cv. Fukuyutaka, and pH or NaCl concentration was adjusted to each value. After the samples were frozen at −30°C, they were thawed and centrifuged at 3,000 × g to separate the supernatant and the precipitate. The particle sizes, the molecular weights of the proteins, and the zeta potentials of them were measured.
【Results】The soymilk was not divided into two layers when NaCl was 0.22 M or higher. When the salt concentration of the aqueous protein solution becomes quite high, precipitation usually occurs, but it's so interesting that no precipitation occurs after freezing and thawing. The peak of the particle size distribution was moved from 1 μm (no NaCl addition) to 0.2 μm when the NaCl concentration was 0.31 M or higher. Other results will be reported on the day.

1）K. Morita & M. Shimoyamada (2013), *Food Chemistry,* **140**, 39−43

soymilk, freeze-thaw fractionation, salt concentration

発表責任者：松野正幸（masayuki1_matsuno@pref.shizuoka.lg.jp）

講演番号：2F07-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

グルコース修飾大豆 11S グロブリンの抗酸化能と乳化特性について

Antioxidant and emulsifying properties of glucose-conjugated soybean 11S globulin

○長谷川 京加[1]、佐伯 宏樹[2]、松村 康生[3]、谷 史人[4]、松宮 健太郎[4]、西村 公雄[1]([1]同女大、[2]北大院水産、[3]京大生存圏研、[4]京大院農)
○ Kyoka HASEGAWA[1], Hiroki SAEKI[2], Yasuki MATSUMURA[3], Fumito TANI[4], Kentaro MATSUMIYA[4], Kimio NISHIMURA[1] ([1]Doshisha women's Col., [2]Hokkaido Univ., [3]RISH Kyoto Univ., [4]Kyoto Univ.)

 ランダムセントロイド最適化法を用いて，ヒドロキシラジカル(･OH)消去能を最大限に発揮するグルコース修飾（糖化）大豆 11S グロブリンの調製条件を検索した。その結果, 70°C, 相対湿度 45%, 反応時間 47.92 h, グルコース/大豆 11S グロブリンの重量比 10.66 (w/w) の調製条件を得た。この時の･OH 消去活性能は 63.4 ± 4.8μmol 没食子酸当量/g of protein (n=3)を示した。この糖化大豆 11S グロブリンを用いて O/W 型エマルションを調製したところ，その平均粒子径は 1.7 ± 0.1μm (n=3)となり，大豆 11S グロブリンの 2.4 ± 0.4μm (n=3)に比べて有意に小さくなった(p<0.05)。さらに, これらのエマルションの変化を 4℃下で経時的に観察したところ，糖化大豆 11S グロブリンは 4 週間後も離水は見られなかったのに対し, 大豆 11S グロブリンは 1 週間で離水した。このことは, 糖化により大豆 11S グロブリンの乳化特性が向上したことを示唆していた。また, Tween20 を用いて調製した 5%のリノール酸メチルエマルションに約 17 倍量の 0.3%大豆タンパク質溶液を加え，50℃で放置した。3 日目のチオバルビツール酸反応物質（TBARS）量は，大豆 11S グロブリン，糖化および糖未修飾大豆 11S グロブリンでそれぞれ，9.2 ± 0.5 , 4.9 ± 1.1 , 8.6 ± 0.7 μM (n=3)を示し，糖化大豆 11S グロブリンは他の 2 試料より有意に油の酸化を抑制した(p<0.01)。 本研究の一部は学術研究助成基金助成金（基盤研究(C) 18K02195）により行われた。

The optimal preparatory conditions for glucose-conjugated soybean 11S globulin were determined using the random centroid optimization program. The strongest hydroxyl radical scavenging ability was obtained at 70℃, 45% relative humidity, 47.92 h reaction time, and 10.66 (w/w) glucose to soybean 11S globulin mixing ratio, resulting in 63.4 ± 4.8 μmol gallic acid equivalent/g of protein (n=3). When O/W emulsions were prepared using this glycated soybean 11S globulin, the average particle size was 1.7 ± 0.1 μm (n=3), which was significantly smaller than that of the native soybean 11S globulin (2.4 ± 0.4 μm (n=3); p<0.05). Furthermore, the glycated soybean 11S globulin exhibited higher emulsifying stability than native soybean 11S globulin. In the 5% methyl linoleic acid emulsion prepared using Tween 20, the 0.3% glycated soybean 11S globulin significantly suppressed the generation of thiobarbituric acid reactants after 3 d (p<0.01). This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) 18K02195.

glycation, soybean 11S globulin, emulsifying property

発表責任者：西村公雄（knishimu@dwc.doshisha.ac.jp）

講演番号：2F07-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

プラントベースヨーグルトへの酵素の応用

Application of enzymes to plant-based yogurt

馬場 将弘、品田 敦子、篠田 美咲、平間 岳史、○小笠原 早織（合同酒精）
Masahiro Baba, Atsuko Shinada, Misaki Sinoda, Takeshi Hirama, ○SAORI OGASAWARA (GODO SHUSEI)

近年、思想や健康上の理由に加え、環境負荷低減等の目的からプラントベースフードが世界的に注目されるようになり、代替肉を初め多くの食品のプラントベース化が進んでいる。牛乳の代替としては、大豆やオーツ、アーモンドなどをベースとするミルク、ヨーグルトを選択する人々が増加しており、そのような食生活に合わせ、世界中で製品開発が進んでいる。本研究では *Bacillus polymyxa* により生産されるプロテアーゼ製剤「ADMIL」 や *Trichoderma reesei* により生産される複合セルラーゼ製剤「GODO セルラーゼ F」を用い、プラントベースヨーグルト製造における応用検討を行った。

市販の豆乳、アーモンドミルク、オーツミルクに対し、乳酸菌、ビフィズス菌および各酵素を添加し、発酵後、酵素無添加の場合と比較した結果、プラントベースミルクの種類によって差異はあるが、酵素添加区において、①滑らかさの付与 ②テクスチャー改善 ③発酵促進 ④離水抑制 ⑤乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進 ⑥大豆臭低減、等の効果を見出し、プラントベースヨーグルトに新たな価値を付与できる可能性を見出した。（特許出願済み）

In recent years, plant-based foods have been attracting worldwide attention for the purpose of reducing environmental load in addition to ideological and health reasons and many foods including meat substitutes are becoming plant-based. An increasing number of people are choosing milk and yogurt based on soybeans, almonds, oats, etc. as alternatives to milk, and product development is progressing around the world to suit such diets.In this study, we investigated the application of the protease preparation “ADMIL” and the complex cellulose preparation “GODO Cellulase F” in the production of plant-based yogurt.

As a result of adding lactic acid bacteria, bifidobacteria and each enzyme to commercially available soymilk, almond milk, and oats milk, and comparing with the case where no enzyme was added after fermentation, there are differences depending on the type of plant-based milk, but the enzyme-added group We found the effects of (1)Add smoothness (2)Improving texture (3)Promoting fermentation (4)Suppressing water separation (5)Promoting the growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria (6)Reducing soybean odor, etc., and found the possibility of adding new value to plant-based yogurt. (Patent pending)

plant-based yogurt, protease preparation, complex cellulose preparation

発表責任者：馬場　将弘（m-baba@oenon.jp）

講演番号：2F07-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

様々な魚種を使用したさつま砂糖漬け製造－味噌漬け工程が真菌叢に及ぼす影響－

Fungal floras of various fish meats made by *Satsuma satozuke*

○福田 翼、小林 聡子、辰野 竜平、古下 学（水産機構・水大校）
○Tsubasa FUKUDA, Satoko KOBAYASHI, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA (National Fisheries Univ.)

江戸時代の料理集「鯛百珍料理秘密箱」（1785 年）に記載されているさつま砂糖漬け製造法は、味噌漬け工程と砂糖漬け工程によって製造される。これまでの研究成果より、タイを用いたさつま砂糖漬けの味噌漬け工程では、味噌製造に関与する酵母として知られる *Zygosaccharomyces* 属が優占となった。また、味噌漬け工程を行わなかった場合よりも細菌増殖を抑制し、においが強くなる事が明らかとなった。そこで、江戸時代の薩摩地方で漁獲されていたスズキ、ブリおよびカツオを用いたさつま砂糖漬け（以下、味噌漬けと表記）および味噌漬け工程を省いたさつま砂糖漬け（以下、未処理と表記）を製造し、さつま砂糖漬けの味噌漬け工程が真菌叢へ及ぼす影響を調査した。

発酵期間中のスズキを用いたさつま砂糖漬けの酵母数は、タイと同様、味噌漬けと未処理では差は見られなかった。発酵 2 ヶ月目のスズキを用いたさつま砂糖漬けの真菌叢は、味噌漬けは *Zygosaccharomyces* 属が優占であったが、未処理は *Candida* 属および *Debaryomyces* 属が優占していた。一方、ブリおよびカツオの酵母数は、未処理よりも味噌漬けの方が高かった。発酵 2 ヶ月目のブリおよびカツオを用いたさつま砂糖漬けの真菌叢は、いずれの味噌漬けも *Zygosaccharomyces* 属が優占であった。一方、未処理については、増幅産物が得られず解析出来なかった。発酵期間中のスズキ、ブリおよびカツオの細菌数は、未処理よりも味噌漬けの方が低かった。また、発酵期間中のスズキ、ブリおよびカツオのにおいは、未処理よりも味噌漬けの方が強かった。以上の結果より，さつま砂糖漬けは，味噌漬け工程により *Zygosaccharomyces* 属が優占となり，細菌増殖の抑制およびにおいが強くなる，すなわち，保存性と品質を向上させる製造法である事が示唆された。

Satsuma satozuke was a preserved food of red sea bream in Japan at Edo period. *Satsuma satozuke* was produced by two-steps preserving in miso and sugar. Our previous study revealed that the effect of preserving in miso improved the quality of fish meat of red sea bream under *Satsuma satozuke* processing. Attritionary, *Zygosaccharomyces* sp. predominated in the fungal flora of this fish meat. This study investigated the fungal floras of various fish meats with and without preserving in miso under *Satsuma satozuke* processing.

Fish meats of red sea bream, Japanese seaperch, oceanic bonito, and yellowtail were used because these fishes were caught in Satsuma district at Edo period. In case of all the fish meats with preserving in miso, the fungal flora were predominated by *Zygosaccharomyces* sp.. In addition, the bacterial counts were lower and the smell was stronger than without preserving in miso.

preserved food, fermentation, yeast

講演番号：2F07-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

清酒中の 5-アミノレブリン酸濃度に影響する製造要因に関する研究

A Study of sake-preparation conditions Affecting the Concentration of 5-Aminolevulinic Acid in Sake

○佐々木 慧（広島国際学院大）
○Kei SASAKI (Hiroshima Kokusai Gakuin Uni.)

5-アミノレブリン酸（ALA）とはアミノ酸の一種であり、様々な健康効果が報告されている。ALA は清酒を含む様々な食品に含まれているが、どのような製要因が清酒中の ALA に影響するかは明らかでない。そこで市販の清酒から ALA 濃度を目的変数とし、各種分析項目を説明変数とした重回帰分析を行った。その結果、ALA 濃度に関連の深い項目の候補として、OD_{430}、精米歩合、アミノ酸度の 3 つの変数が抽出された。精米歩合に着目し、蒸し米の精米歩合を変えた清酒の小仕込み試験を行った。その結果、精米歩合 40%、60%、70%の小仕込み試験では ALA 濃度はそれぞれ 2.17 mg/L、2.41 mg/L、2.37 mg/L となり、ALA 濃度が精米歩合に依存する結果は見られなかった。一方で、着色度の指標である OD_{430} や酵母内容物漏出の指標である OD_{260} との相関係数それぞれ 0.805、0.616 と高く、着色反応や酵母内容物の漏出が清酒中の ALA 濃度に影響している可能性が示唆された。加えてこの仕込みで回収した酵母を破砕した抽出液の ALA 濃度を測定した結果、酵母 1×10^8cell 当たりの ALA は 20.93 mg となり、かつ各仕込み間の差は小さかった。以上の結果から精米歩合、酵母内容物の漏出が清酒中の ALA 濃度に影響することを確認したが、それ以外の要因も影響していると考えられた。

5-Aminolevulinic acid (ALA) is an amino acid that reported to have various health benefits. ALA is found in a variety of foods including sake, but it is not clear what preparation conditions affect ALA in sake. A multiple regression analysis was performed using commercial sake with ALA concentration as the objective variable and various analysis items as explanatory variables. As a result, OD_{430}, rice milling ratio, and amino acidity were extracted as candidates closely related to ALA concentration. Focused on the rice milling ratio, we performed small scale brewing tests using rice with various milling ratios. The results showed that ALA concentration was 2.17 mg/L, 2.41 mg/L, and 2.37 mg/L at 40%, 60%, and 70% of rice milling ratio, respectively, and ALA concentration did not depend on the rice milling ratio. On the other hand, the correlation coefficients with OD_{430} and OD_{260} were 0.805 and 0.616, respectively, suggesting that the coloration reaction and yeast content leakage may affect the ALA concentration in sake. In addition, we collected yeast cells and measured the ALA concentration in the crushed extracts. The results showed 20.93 mg of ALA in 1×10^8 cells of yeast, and the difference between the brewing was small. These results showed that rice polishing ratio and yeast cell contents affected ALA concentration in sake, but other factors were also considered.

5-Aminolevulinic Acid, sake-preparation conditions, statistical analysis

発表責任者：佐々木慧（keirinko24@gmail.com）

講演番号：2F07-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

バイオ・食品用途向け耐熱分離膜モジュール技術の開発

Research and Development of Heat-sterilizable membrane module

○竹内 康作、小林 憲太郎、畠平 智子、小林 敦、武内 紀浩、花川 正行、高橋 弘造（東レ）
○ Kosaku TAKEUCHI, Kentaro KOBAYASHI, Satoko HATAHIRA, Atsushi KOBAYASHI, Norihiro TAKEUCHI, Masayuki HANAKAWA, Kozo TAKAHASHI (Toray)

［背景・目的］当社は長年培ってきた水処理用の逆浸透（RO）膜、ナノろ過（NF）膜、限外ろ過（UF）膜、精密ろ過（MF）膜を用いて、①細胞や微生物の分離・除去、あるいは②タンパク質や多糖類の分離・精製などのバイオ・食品用途への展開を進めている。これらの用途では、モジュール内の清浄性を確保するために定期的に殺菌・滅菌したり、あるいは原液の低粘度化のために高温条件でろ過したりする場合があることから、蒸気滅菌可能な耐熱分離膜モジュールを開発した。
［性能評価・実証］PVDF 製中空糸膜からなる耐熱分離膜モジュールを試作し、外圧クロスフローろ過方式にて連続発酵試験を実施した。連続発酵試験では、$1m^3$ の培養タンクに複数の耐熱分離膜モジュールを接続した連続 D-乳酸発酵プロセスを組み、培地を連続添加しながら発酵しつつ、分離膜で高濃度酵母培養液の連続ろ過を行うことで生産物の D-乳酸を含む透過液を得た。
［結果と考察］高濁度の乳酸原液に対しても運転 600 時間に渡って目詰まりせず安定にろ過運転できることを明らかにした。また、光学純度がほぼ 100%を維持し、運転中の微生物コンタミが抑制されたことから、分離膜モジュールの蒸気滅菌効果を確認した。発表では食品用途における運転例として、液糖のろ過についても紹介する。
[Introduction] Toray has developed various kinds of membranes for water treatment, and we also have developed steam sterilizable (heat-resistant) membrane module. The membrane module would be also applied to bio-processes and food & beverage manufacturing processes.
[Performance evaluation at pilot test] PVDF hollow fiber membrane module was demonstrated to membrane integrated continuous D-lactate fermentation process in order to separate yeast and D-lactate continuously. The module was steam sterilizable and was employed to outside-in cross-flow filtration mode.
[Results and discussion] We obtained long term stable operation up to 600 h for highly turbid crude liquid. That means low fouling properties of the membranes. Furthermore, optical purity for D-lactate in permeate was almost 100%e.e. The results indicate that steam sterilized membrane module could achieve contamination-free during fermentation process. We will also introduce the example for food engineering process such as syrup purification.

membrane, bio-process, filtration

発表責任者：畠平智子（satoko.hatahira.b5@mail.toray）

講演番号：2F07-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

ビールの気泡界面近傍の成分がヘルムホルツ共鳴に及ぼす影響

Effects of components distributed near bubble-liquid interface in beer foam layer on Helmholtz resonance

○犬飼 一貴[1]、磯江 晃[2]、乾 隆子[2]、畑中 一成[2]、勝野 那嘉子[1]、今泉 鉄平[1]、西津 貴久[1]([1]岐阜大院自然、[2]サントリービール（株））
○Kazutaka INUKAI[1], Akira ISOE[2], Takako INUI[2], Kazushige HATANAKA[2], Nakako KATSUNO[1], Teppei IMAIZUMI[1], Takahisa NISHIZU[1] ([1]Gifu Univ., [2]SUNTORY Ltd.)

【目的】ビールの泡のきめ細かさや持ちはビールの評価項目の一つである．演者らは，ヘルムホルツ共鳴現象を利用したポリトロープ指数 n を用いた新しい泡物性の評価法を提案し，ポリトロープ指数 n と泡のサイズと量から求められた音響エネルギーの損失量 E には負の相関があることを報告した[1)]．本報では，ビールの泡界面近傍に存在してビールの泡持ちに影響を与えるイソ-α酸とβ-グルカンが n に及ぼす影響について検証した結果を報告する．
【実験方法】泡持ちの異なる 2 種類の市販ビール系製品（350 mL）に，1.0 w/w%大麦由来β-グルカン水溶液を添加した試料と純水 20 g を添加した対照試料， 1.075 g / mL イソ-α酸水溶液を 30 μL 添加した試料と無添加の対照試料を供試した．グラス底面から液位 13 cm までビール液を入れ，液面から 5 cm の高さになるように超音波装置で作成した泡を重層した．泡作成直後から泡層が消滅するまで共鳴周波数を連続測定し，定義式に従って n を算出した[1)]．動的フォームアナライザー（KRÜSS 製，DFA100）を用い，泡径 0 mm から 2 mm までの気泡の総泡体積，気泡数，気泡径分布の経時変化を測定し，既報[1)]の方法で E を決定した．
【結果・考察】泡層がなくなるまでのみかけの n と，気泡径分布と総泡体積から算出した E の間には，いずれの条件でも負の相関が認められた．同じ E でも，β-グルカンやイソ-α酸を添加した試料の n は無添加の場合よりも小さい傾向にあった．これは，β-グルカンやイソ-α酸のように界面近傍に存在する成分があると，共鳴振動に合わせて振動する気泡界面の質量が増し，その結果，エネルギー損失量が増加することによるものだと考える．このことから，n は泡層の構造的特性に加えて，イソ-α酸やβ-グルカンなど，泡層中の界面成分量にも影響される可能性があると考える．
1）犬飼ら，日本食品科学工学会第 68 回大会プログラム集，3Ep08 (2021).

In this study, we examined the effects of the components of iso-α acids or β-glucan that are distributed near the bubble-liquid interface in the beer foam layer on the polytropic index *n*. There was a negative correlation between *n* determined from resonant frequencies and *E* determined from bubble size distribution and total volume of bubble for any sample. A polytropic index *n* for sample with iso-α acids or β-glucan was smaller than without any additives, even though *E* was the same. Therefore, *n* might be affected by bubble size distribution and total volume of bubble as well as amount of interface components in the beer foam.

beer foam, Helmholtz resonant, bubble-liquid interface

講演番号：2F07-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

HTST（High Temperature Short Time）製麦によるビール香味耐久性向上

Improvements in flavor stability of beer by HTST (High Temperature Short Time) malting

○時園 佳朗[1]、森田 真梨子[1,2]、七森 理仁[1,2]、梅村 威一郎[3]、飯牟禮 隆[4]、保木 健宏[1]、須田 成志[1]([1]サッポロビール株式会社　原料開発研究所、[2]サッポロビール株式会社　群馬工場　製麦部、[3]サッポロビール株式会社　北海道工場　醸造部、[4] サッポロビール株式会社　価値創造フロンティア研究所)

○ YOSHIRO TOKIZONO[1], MARIKO MORITA[1,2], MASAHITO NANAMORI[1,2], IITIRO UMEMURA[3], TAKASHI IIMURE[4], TAKEHIRO HOKI[1], NARUSHI SUDA[1] ([1]Crop Research Laboratories, Sapporo Breweries LTD., [2]Malting Department Gunma Plant, Sapporo Breweries LTD., [3]Brewing Department Hokkaido Brewery, Sapporo Breweries LTD., [4]Value Creation Frontier Laboratories, Sapporo Breweries LTD.)

ビール原料となる麦芽を製造する製麦において、焙燥工程における最終温度（焙焦温度）を通常よりも高くし、時間を短くする HTST（High Temperature Short Time）製麦法を適用し、かつ焙燥工程初期で空気循環をせず温度を下げることで、リポキシゲナーゼ（LOX）活性やビールの不快臭の原因となるジメチルサルファイド（DMS）前駆体（DMSP）を低減できることが知られている。しかし、実際の製麦工場における適用にあたっては、麦芽水分や色度の上昇などの課題も考えられた。今般、自社設備に適した新たな HTST 製麦法を開発し、全体の焙燥時間を約 10%削減しつつ、焙燥工程初期では温度を下げず焙燥工程後期で 90℃以上 5 時間の焙焦温度・時間を確保することで、水分や色度の課題を解決し、さらに LOX 活性や DMSP を低減し、CO_2 排出量削減による環境負荷低減を実現できた。また、HTST 製麦により得られた麦芽を用いた 5 kL スケール醸造試験を実施し、30℃1 か月保存品の官能検査にて老化的香味の低減が認められた。今後は、本技術を適用した麦芽をビール製品に活用するとともに、品質面や環境面でより高い効果を得るべく、焙燥工程の温度・時間等の条件検討を継続したい。

HTST (High Temperature Short Time) malting is a kilning method with higher temperature and shorter time than standard program at curing phase. It is known that HTST malting combined with lower temperature and non-air circulation at drying phase decrease DMSP (Dimethyl sulfide precursors) in malt. However, it may cause malt quality degradation, that is increase of malt moisture and malt color. To solve these problems, we developed new HTST malting method which reduces 10% of total kilning time, does not lower the temperature at drying phase and applies the specific curing conditions (90℃ or above and 5 hours) at curing phase. As a result, moderate moisture and color, reduction of LOX activity and DMSP in malt and reduction of CO_2 emission from malting process were achieved. In addition, we conducted 5 kl plant scale brewing trials using HTST malt and revealed that the test beers had less stale flavor than those of control beers in the sensory evaluations of preserved beers at 30℃ for 1 month. Malt produced with the newly developed HTST malting method will be used for our products and we will explore more optimal conditions of kilning temperature and time for further improvement in the aspects of malt and beer quality and environment.

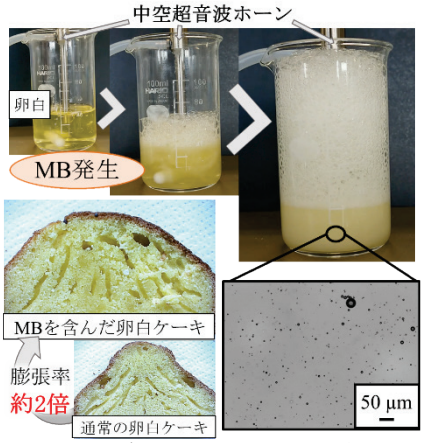
Malting, Lipoxygenase, Dimethyl sulfide

講演番号：2F07-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム F

超音波マイクロバブル発生装置を用いた食品加工

Food processing using ultrasonically generated microbubbles

○滝田 壮志[1]、長谷沼 大成[2]、幕田 寿典[1] ([1]山形大院・理工、[2]山形大・工)
○ Takeshi TAKITA[1], Taisei HASENUMA[2], Toshinori MAKUTA[1] ([1]Grad. Yamagata Univ., [2]Yamagata Univ.)



近年，マイクロバブル(以下 MB)の様々な活用が進んでいる．食品分野でも MB を発生させることで新たな味覚，食感，風味などの様々な効果を添加できると考えられるが，食品の多くは高温高粘度液体であり，従来の MB 発生装置の適用が困難であった．一方，Makuta らは内部に気体が通過可能な流路を有する中空超音波ホーンを液中に挿入し，気体を供給しながら超音波振動を印加することで MB を発生させる技術を開発しており，この方法によって高温高粘度流体への MB 発生が可能となった．そこで本研究では MB の食品分野への応用を目的とし，その例として卵白の加工を検討した．その結果，卵白に MB を発生させることが可能であり，MB 発生後にはメレンゲや液中に MB を含む白濁した液体卵白の生成を確認した．また，MB を含んだ液体卵白は 3 日以上 MB を保持し，膨張剤の効果や食感を変更する効果などの機能性を有していることも明らかになった．今回は，本手法の概要及び MB を含んだ卵白の評価，またそれをスポンジケーキやプリンへ応用した際の影響を報告する．

Recently, microbubbles (MB) have been utilized in various fields. In food industry, the generation of MB is expected to add various effects, such as a new taste, texture, and flavor to foods. However, generating MB in food is difficult because most liquid foods and ingredients are high-temperature and high-viscosity fluids. Therefore, Makuta et al. developed the novel technique of generating MB by ultrasonic pressure oscillation, which enables to generate MB in high-temperature and high-viscosity fluids. Thus, this study's purpose is to demonstrate the application of MB in the food industry, and as an example, we generate MB in egg white. As a result, we confirmed that the ultrasonic MB generator can generate MB even in a highly viscous liquid such as egg white, and foam like a meringue and cloudy liquid egg white containing MB is generated after generating MB. In addition, we confirmed that the egg white containing MB keep the opaque state over 3days and has various functionalities such as the effect of an expansive agent and the effect of changing the texture. In this presentation, we report the summary of this method and the evaluation of egg whites containing MB, and the effect of its application to sponge cakes and puddings.

Microbubbles, Ultrasonic wave, Egg White

発表責任者：滝田壮志（trx58511@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2F09-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

ハッサク果実の異なる部位から調製したアルコール不溶性固形物(AIS)の化学的特性とポリガラクツロナーゼ活性を含む酵素剤による分解性

Chemical properties of alcohol-insoluble solids (AIS) prepared from different tissues of hassaku fruit and their degradability by fungal polygalacturonase preparation

○辻岡 梓沙、堀西 朝子、尾崎 嘉彦（近大生物理工）
○AZUSA TSUJIOKA, Asako HORINISHI, Yoshihiko OZAKI (Kindai Univ.)

【背景・目的】ポリガラクツロナーゼ（PGase）を含む酵素剤によるかんきつ果実の分解性は、部位による差があることが知られている。本研究では、ハッサクにおいて、アルベド、維管束、内皮、果肉の各部位に酵素剤による分解性の差が生じるメカニズムを明らかにすることを目指した。
【方法・結果】ハッサクのアルベド、維管束、内皮、果肉の凍結乾燥粉末からアルコール不溶性固形物（AIS）を調製した。酵素分解により遊離した多糖の中性糖/酸性糖比、分子量分布の変化および固形物重量の減少により AIS の分解性を評価した。また、AIS の酸加水分解物の糖組成とメチルエステル化率を評価した。酵素分解物の分子量分布では、いずれの部位においても 171-215kDa の範囲に主要なピークが確認された。その面積値の変化率は部位により異なり、内皮が果肉より高い分解性を示した。酸加水分解物の糖組成から、果肉では、内皮よりもラムノガラクツロナン領域の割合が高く、内皮では果肉よりもホモガラクツロナン領域の割合が高いことが示唆された。一方、メチルエステル化率は内皮 85.2%、果肉 84.6%と大きな差はなかったことから、分解性は、組織中のホモガラクツロナン領域とラムノガラクツロナン領域の比率に依存すると考えられる。

Differences in degradability depending on fruit tissues have been reported when citrus fruit treated with enzyme preparation containing polygalacturonase (PGase). In this study, we aimed to clarify the cause of the differences in the degradability of the albedo, vascular bundle, endocarp, and pulp of hassaku (*Citrus hassaku*) fruit.

Alcohol-insoluble solids (AIS) were prepared from freeze-dried powders of hassaku. The degradability was evaluated by ratio of neutral sugar / uronic acid, changes in the molecular weight distribution of released polysaccharides and the decrease in solid weight caused by Protopectinase-IGA. Also, sugar composition and degree of methoxylation were measured for acid hydrolysates of AISs. Major peaks in the range of 171-215 kDa were observed in all the samples. The degradability of the endocarp was higher than that of the pulp. The quantitative analysis of sugar suggested that the ratio of the rhamnogalacturonan I in the pulp was higher than that in the endocarp and the ratio of the homogalacturonan in the endocarp was higher than that in the pulp, where significant difference was not shown in the degree of methoxylation. The degradability possibly depends on the ratio of homogalacturonan and rhamnogalacturonan in the tissue.

pectin, degradability, polygalacturonase

発表責任者：尾崎嘉彦（ozaki@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2F09-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

生鮮野菜中のβ-ニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）及びニコチンアミドリボシド（NR）とその関連代謝物分析の検討

Examination of analysis of ß-nicotinamide mononucleotide (NMN) , nicotinamide riboside (NR) and their related metabolites in fresh vegetables.

○高橋 洋武、佐野 勇気、平松 幸之助、橘田 規、照井 善光（一般財団法人日本食品検査）
○HIROTAKE TAKAHASHI, YUKI SANO, KOUNOSUKE HIRAMATSU, TADASHI KITTA, YOSHIMITSU TERUI (Japan Foods Inspection Corporation)

β-ニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）及びニコチンアミドリボシドクロライドは、2020 年 3 月 31 日に厚労省から通知された「食薬区分における成分本質（原材料）の取り扱いの例示」において、「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）リスト」に規定された。NMN は、生体内での NAD 合成 [1] やコーヒー中のトリゴネリン合成 [2] など重要な役割を担っている。しかし、生鮮野菜中の NMN 等の含量が加熱や保管によって、どの程度変化するかはあまり報告されていない。そこで、今回 LC-MS を用いた NMN 及びニコチンアミドリボシド（NR）とその関連代謝物の一斉分析法の検討を行い、生鮮野菜に含まれる NMN 及び NR とその関連代謝物の含量及び加熱処理と冷蔵保管による含量の変化について調査したので報告する。

対象成分は、NMN、NR、ニコチン酸（NA）、ニコチンアミド（NAM）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）及びトリプトファン（TRP）とした。対象サンプルは、トマト、アボカド及びブロッコリーの 3 種類とし、未処理サンプルをコントロールとして、加熱処理又は冷蔵保管した後に分析した。本発表では、3 種類の野菜を測定した結果及び、各前処理を実施して得られた含有量の変化について報告する予定である。

1)夜久圭介, 中川　崇：基礎老化研究, **41**(1), 23-27 (2017).
2)H. ASHIHARA：*Braz. J. Plant Physiol*, **18**(1), 1-8 (2006).

β-nicotinamide mononucleotide (NMN) and nicotinamide riboside chloride had been added to the list of "Ingredients that are not deemed to be pharmaceuticals unless they are labelled as having pharmaceutical efficacies". NMN plays an important role such as NAD synthesis [1] in vivo and trigonelline synthesis [2] in coffee. However, it has not been reported how much the content of NMN and other ingredients in fresh vegetables changes due to heating and storage. Therefore, we investigated a simultaneous analysis method of NMN, nicotinamide riboside (NR) and their related metabolites using LC-MS, and examined the content of NMN, NR and their related metabolites contained in fresh vegetables and the change in content due to heat treatment or refrigerated storage.

The target components were NMN, NR, nicotinic acid (NA), nicotinamide (NAM), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and tryptophan (TRP). The target samples were tomato, avocado, and broccoli. The three vegetables were analyzed after heat treatment or refrigeration with the untreated sample as a control.

NMN, LC-MS, vegetables

講演番号：2F09-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

HACCP 導入に向けた食品危害因子の簡便・高感度検出システムの開発

Simple and highly sensitive detection system of food hazards for HACCP implementation

○笹村 雄斗[1]、渡邉 颯人[1]、齋藤 七海[1]、藤澤 怜香[1]、中川 東紀[1]、小林 愛奈[1]、黒田 俊一[2]、中山 勉[1]、飯嶋 益巳[1] ([1]東農大・応生・健康、[2]阪大・産研)

○ Yuto SASAMURA[1], Hayato WATANABE[1], Nanami SAITO[1], Reika FUJISAWA[1], Toki NAKAGAWA[1], Aina KOBAYASHI[1], Shun'ichi KURODA[2], Tsutomu NAKAYAMA[1], Masumi IIJIMA[1] ([1]Dept. Nutr. Sci. Food. Saf., Fac. Appl. Bioci., Tokyo Univ. Agric., [2]ISIR, Osaka Univ.)

Hazard Analysis and Critical Control Point（HACCP）制度化に伴い、食品の安全性検査が改めて重要視され、食品製造現場等では簡便に感度良く、さらに食品検査機関等では定量的に感度良く測定する技術が求められている。食物アレルゲンや化学物質等の食品危害因子を検出する主要な検査技術として酵素免疫測定法（ELISA）が挙げられるが、一般的に抗体は希少で高価なものも多いため、可能な限り使用量を減らして高感度化を達成する技術開発が必要である。我々は、IgG の Fc 領域を固定して Fv 領域を放射状に整列提示できる ZZ ドメイン提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC）足場分子を開発し、各種免疫測定法の検出感度を著しく上昇できることを報告してきた[1,2]。本研究は、食品の安全性検査に ZZ-BNC を応用し、まず食品製造現場等で危害因子を簡便なイムノスティック法で感度良く定性的にスクリーニングし、さらに食品検査機関等で定量的に評価する ELISA の高感度検出技術の開発を目指した。固相上の甲殻類アレルゲンのトロポミオシンを、一次抗体と酵素標識二次抗体で検出する方法に ZZ-BNC を用いたところ、イムノスティック法では発色強度が増強し、さらに ELISA では検出感度が約 5 倍上昇することを見出した。食品表示法に基づくアレルギーの表示義務 7 品目中、少なくとも 4 品目の免疫検出法で ZZ-BNC の感度上昇効果が示されており、今後も様々な危害因子等への応用が期待できることから、本技術の HACCP 導入に向けた実用化を図っていきたい。

Food safety inspections are becoming increasingly important with the implementation of the HACCP system. There is a need for inspection techniques especially using enzyme immunoassays that enable simple and sensitive methods in food factory, and quantitative and sensitive methods in food inspection agency. We have previously developed bio-nanocapsule displaying IgG Fc-binding Z domain (ZZ-BNC) as a scaffold for oriented immobilization of IgGs, which could enhance the sensitivity of various immunoassays[1,2]. The aim of this study is to develop highly sensitive system of food safety inspections by applying ZZ-BNC, first qualitatively screening for hazards using a simple immunostick method in food factory, and then quantitatively evaluating the hazards in food inspection agency. When ZZ-BNC was used to detect Crustacean-derived allergens, tropomyosin on the solid phase with primary and secondary antibodies, we found that the color intensity was amplified by the immunostick and the detection sensitivity was increased ~5-fold by ELISA. Thus, ZZ-BNC is expected to improve the food safety inspection system through simple and highly sensitive detection of various food hazards.

1. Iijima, M. et al., Biosens. Bioelectron. 89, 810, (2017); 2. 飯嶋ら, 化学と生物, 56, 591, (2018).

HACCP, Food safety inspection, Bio-nanocapsule

発表責任者：飯嶋 益巳（mi206786@nodai.ac.jp）

講演番号：2F09-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

二次元膜足場分子を用いたフードバイオセンサーの高感度化技術の開発

Two-dimensional scaffold for highly sensitive food biosensors

○濱砂 佑奈[1]、田村 侑子[1]、伊佐 太郎[1]、小林 加奈子[1]、黒田 俊一[2]、中山 勉[1]、飯嶋 益巳[1]([1]東農大・応生・健康、[2]阪大・産研)
○Yuna HAMASUNA[1], Yuko TAMURA[1], Taro ISA[1], Kanako KOBAYASHI[1], Shun’ichi KURODA[2], Tsutomu NAKAYAMA[1], Masumi IIJIMA[1] ([1]Dept. Nutr. Sci. Food. Saf., Fac. Appl. Bioci., Tokyo Univ. Agric., [2]ISIR, Osaka Univ.)

バイオセンサーの検出感度を高めるには、センサー表面で IgG 等のバイオセンシング分子の配向性や提示密度を精密に制御することが重要である[1)]。最近我々は、IgG を整列提示できる ZZ タグ提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC）足場分子の粒子構造を、平面膜状に展開した ZZ-L 膜を作製し、水晶発振子微量天秤（QCM）のセンサーチップ上に ZZ-L 膜を介して抗アクチン IgG を固定したところ（ZZ-L 膜法）、IgG を直接（直接法）または等量の ZZ-BNC を介して IgG を固定した方法（ZZ-BNC 法）と比べて、IgG 単位量当たりのアクチン結合量はそれぞれ約 70 倍または約 6 倍上昇することを見出した[2)]。ZZ-L 膜は、様々な形状のセンサー表面に IgG を任意の密度で精密に整列提示可能で、さらに ZZ-BNC の使用量を低減できる、より理想的な足場分子であることが判明した。本研究は、食品の安全性検査で特に重要な食物アレルゲン等の検出用フードバイオセンサーに ZZ-L 膜を応用し、高感度化を目指した。QCM センサーチップ上に抗小麦グリアジン IgG を、直接法、ZZ-BNC 法、ZZ-L 膜法により固定し、小麦グルテン中のグリアジン結合量を測定したところ、ZZ-L 膜法は、直接法の約 40 倍、ZZ-BNC 法の約 10 倍上昇することを見出した。さらに本 ZZ-L 膜法は、食物アレルギー表示の特定原材料 7 品目のうち、少なくとも 3 品目の抗原の高感度検出に応用可能なことが判明した。今後は、広範な食品危害因子の検出や、さらに QCM 以外の各種フードバイオセンサーの高感度化を図りたい。

For improving the sensitivity of biosensors, it is crucial to precisely control the orientation and density of biosensing molecules on the sensor surface[1)]. We have recently developed ZZ-L membranes in which the particle structure of ZZ tag-displaying bio-nanocapsule (ZZ-BNC) scaffolds, capable of immobilizing IgG in an oriented manner, was modified to a planar membrane[2)]. The ZZ-L membrane was found to be a more ideal scaffold that could precisely orient and display IgG at any density on the sensor surface of various shapes, and reduce the amount of ZZ-BNC used, thus increasing the sensitivity of antigen detection of biosensors. In this study, we applied ZZ-L membranes to the detection of food allergens, which are particularly important in food safety testing, and aimed to increase the sensitivity of food biosensors. We found that the ZZ-L membrane method was applicable to the highly sensitive detection of antigens of at least three of the seven specified raw materials for food allergen labeling. ZZ-L membranes are promising scaffolds for the detection of a wide range of hazardous materials in food and for improving the sensitivity of various food biosensors.

1) 飯嶋ら，化学と生物, 56, 591, (2018); 2) Iijima, M. et al., Biosens. Bioelectron. 150, 111860, (2020).

Food biosensors, Food allergens, QCM

発表責任者：飯嶋 益巳（mi206786@nodai.ac.jp）

講演番号：2F09-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

渋味ポリフェノールにおける生物活性と化学構造間の数理モデルの構築

Mathematical model of biological activity and chemical structure in astringent polyphenols

○伏見 太希[1]、小川 未来[2]、藤井 靖之[1]、越阪部 奈緒美[1,2]（[1]芝浦工大理工学、[2]芝浦工大シス理工）
○Taiki FUSHIMI[1], Mirai OGAWA[2], Yasuyuki FUJII[1], Naomi OSAKABE[1,2] ([1]Shibaura Inst. of Tech., [2]Shibaura Inst. of Tech. Syst. Engr. and Sci.)

ポリフェノールは苦味・渋味を呈する化合物群であり、植物の二次代謝物としては最大の多様性を示す。我々はこれまでに、渋味を呈するポリフェノール類が、強い交感神経活動亢進作用を示すことを見出した。一方、8000 種超のポリフェノールの生物活性の全てを明らかにすることは現実的ではない。そこで本研究では、ポリフェノール亜分類に属する代表的な化合物の生物活性を測定し、物理化学的な性質との相関関係について数理モデルを構築することを目的とした。生物活性については、挙睾筋細動脈血流量を指標にポリフェノールの交感神経活動亢進作用を比較した。フラボノイド（8 種）、単純フェノール（2 種）、テアフラビン類（4 種）、プロシアニジン類（9 種）をラットに投与し、レーザードップラー式血流計で細動脈血流量を 60 分間測定した。これらのデータをシミュレーションソフト Molecular Operating Environment (MOE;version:2020.09)にアプライし、定量的構造活性相関(QSAR)解析を行った。フラボノイド類では、最大投与量である 10mg/kg でも血流量の上昇は見られなかったが、プロシアニジン類では、全ての化合物において低用量（10-100μg/kg）で有意な血流量の上昇が確認され、これらの違いが水素結合供与体などによって説明できることが示唆された。

Polyphenols are bitter or astringent taste compounds and are shown maximum diversity as a secondary metabolite of plants. We previously found that a single oral dose of astringent polyphenols enhanced sympathetic nervous activity. Whereas it is difficult to clear the biological action of all polyphenols over 8000 varieties. In present study, to construct the mathematical model between the biological activity and chemical structure of polyphenols, we examined the sympathetic hyperactivity of representative compounds of each subgroup, flavonoids, simple phenols, theaflavins, and procyanidins. First, we compared the impact of them on sympathetic nervous activity using the alteration of cremasteric arterial blood flow. A part of anthocyanidins and all procyanidins increased blood flow but not the other polyphenols. Using these results, we carried out quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis using simulation software Molecular Operating Environment (MOE; version 2020.09). It was suggested that the difference of biological activity between polyphenols explained H-bond donor capacity descriptors

quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis, astringent polyphenols, hemodynamics

講演番号：2F09-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

ラマン分光法によるアシル修飾シリカゲルとクロロゲン酸との相互作用の解析

Analysis of the interaction between acyl-modified silica gel and chlorogenic acid by Raman spectroscopy

○蟹江 善美[1]、藤原 真[2]、奥田 結帆[2]、大島 海人[2]、蟹江 治[2] ([1]東海大 技共、[2]東海大工)
○Yoshimi KANIE[1], Makoto FUJIWARA[2], Yuuho OKUDA[2], Kaito OHSHIMA[2], Osamu KANIE[2] ([1]Tokai Univ. Thec., [2]Tokai Univ.)

食品の安全性や品質管理の面から、味やにおいに関わる分子のセンシング技術の開発が盛んである。生物の味覚や嗅覚を模倣したセンシングは高選択、高感度であり、非常に魅力的である反面、タンパク質は熱や pH に対する安定性やコストの問題などがある。一方、多孔性シリカは、比表面積が大きく官能基を導入すると多価効果も期待でき、センサーへの応用の足がかりとなる。そこで本研究では多孔性シリカ表面に鎖長の異なるアルキル鎖などを導入して、クロロゲン酸との相互作用をラマン顕微鏡で調べることとした。多孔性シリカにアミノプロピル基を導入した後、DIC 法により直鎖飽和アシル基(C3, C6, C9,C18)、D-/L-ラクチル基を導入した。シリカゲルに修飾したアシル基の修飾率は元素分析によって決定した。残存アミノ基をアセチル基でキャッピングしたのちクロロゲン酸との相互作用を調べた。異なる濃度のクロロゲン酸水溶液を修飾率の異なるシリカゲルに浸漬してラマンスペクトルを測定した結果、疎水性の効果が顕著にみられた。しかし、修飾率が高くなるにつれステアリル基やノナノイル基は水を反発するため、相互作用は低下、あるいは検出できなくなった。一方、ラクチル修飾の効果はほとんど認められなかったが、シリカゲル表面にプロピオニル基とラクチル基あるいはステアリル基とラクチル基を混合修飾して、クロロゲン酸との相互作用を検証したところ、単独修飾より高い相互作用が認められた。このことは水素結合能を有する官能基の近傍に疎水的環境をつくることで高感度のセンサー素子となることを示唆している。詳細は本講演にて発表したい。

In view of food quality and safety, a rapid detection system related to taste and odor has to be developed. The mimicry of the animal sensing system might be a shortcut to creating a highly selective and sensitive sensor, however, proteins inevitably hold stability issues due to denaturing. The porous silica has been recognized as useful solid support because of the large surface area. In this study, we prepared the surface modified porous silica and investigated the interaction with chlorogenic acid using a confocal Raman microscope. The acyl modifications were carried out based on amide coupling after introduction of aminopropyl groups. The modification rate was determined by elemental analysis. In the experiment of interaction against chlorogenic acid, the hydrophobic effect was remarkably observed. Furthermore, the mixed modifications (C3+lactyl, C18+lactyl) of silica were found to have higher interactions than the single component modifications.

Raman spectroscopy, chlorogenic acid, modified silica

発表責任者：蟹江　善美（yoskanie@tsc.u-tokai.ac.jp）

講演番号：2F09-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

光分光法および画像解析を組合わせた食品の非破壊分析

Nondestructive analysis of food products using a combination of optical spectroscopy and image analysis

○鈴木 絢子[1]、納谷 友希[2]、金村 洋平[2]、髙成 広起[2]、井上 高教[1] ([1]大分大理工、[2]徳島大医)
○Ayako SUZUKI[1], YUKI NAYA[2], YOHEI KANEMURA[2], HIROKI TAKANARI[2], TAKANORI INOUE[1] ([1]Oita Univ., [2]Tokushima Univ.)

光分光法は，非破壊での分析が可能であるため，様々な分野で利用されている．食品では，味や鮮度などの情報を非破壊で取得できることに価値が高く，特に光分光法による分析手法に期待されている．本研究では，ラマン散乱，吸収，蛍光の分光法を用いて，野菜，果物，肉などの食品のスペクトル測定を行った．ラマン測定には反射法を用いた．吸収・蛍光測定では，液体試料の場合は透過法を用い，固体試料の場合は反射法を用いてスペクトルを得た．同時に撮影した写真から画像解析を行い RGB の値を得た．これらの値を比較するため，各サンプルの信号強度のみを多変量解析し，マッピングを行った．ネギの主な成分はケンフェロールであるが，その量に対応したラマン信号が得られ，根に近い部分から先端までの量の変化が認められた．牛肉に含まれるオレイン酸は，脂身部分と赤身部分で明らかなラマン信号の差異が認められた．特異的な成分に対する特異ピークが認められる一方，特徴が見いだせないスペクトルやノイズに埋もれたスペクトルも数多くあったため主成分分析を行った．白菜，玉ねぎなどの野菜類，みかん，バナナなどの果実類は，異なる位置にプロットが得られた．

Optical spectroscopy is used in a variety of fields because it enables nondestructive analysis. In the case of food products, the ability to obtain information on taste and freshness in a nondestructive manner is of great value, and analytical methods based on optical spectroscopy are particularly promising. In this study, Raman scattering, absorption, and fluorescence spectroscopy were used to measure the spectra of vegetables, fruits, and meat. In order to compare these values, only the signal intensity of each sample was mapped by multivariate analysis. The Raman signal was obtained corresponding to the amount of kaempferol, which is the main component of leeks, and the amount varied from the part near the root to the tip. The Raman signal of oleic acid in beef showed a clear difference between fatty and lean parts. While there were specific peaks for specific components, there were also many spectra for which no characteristics could be found or which were buried in noise, so principal component analysis was conducted. The plots of vegetables and fruits were obtained at different positions.

Raman, Principal component analysis, Spectroscopy

講演番号：2F09-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた食品メタボローム分析におけるデータ解析の効率化

Improvement of data analysis efficiency for food metabolome study using a gas chromatograph mass spectrometer

○谷口 百優[1,2]、川北 祥人[1,2]、尾島 典行[1,2]、飯田 順子[1,2]、福崎 英一郎[2,3,4]([1]株式会社島津製作所、[2]大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所、[3]大阪大学、[4]大阪大学先導的学際研究機構)
○ Moyu TANIGUCHI[1,2], Yoshito KAWAKITA[1,2], Noriyuki OJIMA[1,2], Junko IIDA[1,2], Eiichiro FUKUSAKI[2,3,4] ([1]Shimadzu Corporation, [2]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, [3]Osaka Univ., [4]Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives)

代謝物の網羅的解析技術であるメタボロミクスは、医療分野においてはバイオマーカー探索を目的として血液、細胞などへ応用されており、食品分野においては新規機能性食品開発や食品官能性能解析を目的として種々の食材や食品へ応用されている。島津製作所が開発した GC/MS、GC-MS/MS 用のデータベースソフトウェア「Smart Metabolites Database」は、先述のような多岐にわたるバイオロジカルサンプルから検出される代謝物 475 成分の MRM (Multiple Reaction Monitoring：多重反応モニタリング）による一斉分析が可能でメタボロミクス研究に有用である。しかしながら、試料素材により含有成分は異なっており，特定食品サンプルを分析した場合に検出される成分数は、本製品の測定対象成分数に対して 20%程度である。そのため、擬陽性が多くなり目的とする成分が検出できているかを結果から判断するには高い分析スキルと長時間のデータ解析が必要となる。本発表ではこの課題を解決するため Smart Metabolites Database を基にしてより効率よく、対象成分が特定の試料素材で検出できるかどうか判断できる方法を検討し、種々の食品に適用検証した結果を報告する。

Metabolomics, which is a comprehensive analysis for metabolites, has been applied to blood and cells for biomarker research, and various foodstuffs and foods for developing novel functional foods and evaluating the sensory quality. The database software ″Smart Metabolites Database″ for GC / MS and GC-MS / MS developed by Shimadzu Corporation enables a simultaneous analysis by MRM (Multiple Reaction Monitoring) for 475 metabolite components detected from a wide variety of biological samples as previously described, and it has been used for metabolomics research. However, the metabolite components differ depending on the sample material, so that the number of components detected from a food sample is about 20% of the total number of components can be measured by this database. Therefore, to reduce the false positive rate, high analytical skill and long-term data analysis are required to obtain the effective information from the huge data. In order to resolve this problem, we examined a method that can determine whether the target component can be detected in a specific sample material more efficiently based on the Smart Metabolites Database. In this presentation, we report the result of application verification to various foods.

Metabolome analysis, Food component analysis, gas chromatograph mass spectrometer

発表責任者：尾島典行（n_ojima@shimadzu.co.jp）

講演番号：2F09-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

振動分光法による塩水溶液中の水の状態解析

Analysis on water structure in ion solution by vibration spectroscopy

○篠原 凜[1]、楊 嘉敏[1]、石川 大太郎[2]、藤井 智幸[1] ([1]東北大農、[2]福島大農)
○Rin SHINOHARA[1], Jiamin YANG[1], Daitaro ISHIKAWA[2], Tomoyuki FUJII[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Fukushima Univ.)

水は食品中の最大成分であり、食品の品質維持において重要な役割を果たしている。水分子の水素結合にイオンの存在が影響を与え、水の構造化にも関与することは古くから知られているが、未だに水の構造化に関する知見は充分ではない。本研究では、4000-3000 cm^{-1}(OH 伸縮振動に由来)及び 1600cm^{-1} 付近(HOH 変角振動に由来)のバンドに着目し、塩水溶液中でのイオン共存による水の状態変化を、赤外分光スペクトルを用いて実験的に検討した。

塩水溶液試料として 0–22%の濃度の NaCl、KCl、CsCl、$BaCl_2$ を選んだ。4000–10cm^{-1} の領域の赤外/遠赤外分光スペクトルは、FT/IR6300(Jasco.Co)を用いて ATR 法で測定した。測定データは ATR 補正を行った後 二次微分処理を施した。食品中の水は、自由に分子運動する自由水と、食品中の構成成分と結合し運動が束縛される結合水からなると考えられていることから二状態と仮定して解析した。NaCl 溶液の OH 伸縮振動領域の赤外スペクトルにおいては、濃度が増加しても 3370 cm^{-1} の波数位置は変わらなかった。一方、3210cm^{-1} 付近のシグナルは濃度依存的に高波数シフトした。HOH 変角振動においても 2 つのバンドが観測され一方には波数位置の変化が認められた。他の塩溶液においても類似の挙動が認められた。以上から塩水溶液中の水分子においては、その基準振動に 2 つ以上の成分が見出され、主要な 2 つの成分に着目すると、1 つはイオン濃度が高くなっても変化しなかったことから、水素結合ネットワークの存在が示唆された。

The aim of the present study was to evaluate the effect of ion to water structure through the specific bands of infrared spectra in the 4000-3000cm^{-1} due to OH stretching mode, and in the 1600cm^{-1} due to HOH bending mode. Different concentrations of Na, K, Cs and Ba chloride solutions were prepared and their infrared spectra in the 4000-10cm^{-1} region were measured by attenuated total reflection method. In the Infrared spectra in the 4000-3000cm^{-1} region of NaCl solution, a band at 3370 cm^{-1} did not change corresponding to ion concentration but a band at 3210cm^{-1} shifted to higher wavenumber. Two bands were observed in the region due to bending mode and libration mode, and a change in the wavenumber was observed in one of the bands, and the behavior was similar in other ionic solutions.These results suggest the existence of hydrogen bond network in ionic solutions.

water structure, hydrogen bond, vibration spectra

発表責任者：藤井智幸（atom@tohoku.ac.jp）

講演番号：2F09-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム F

ウイルス膜モデルを用いた紅茶の抗ウイルス活性のナノレベル可視化

Nano-visualization of antiviral activity of black tea using liposome-based virus membrane model

○飯嶋 益巳、吉本 遼太郎、金田 萌美、原野 菜々子、鈴木 悠介、山田 亜希、解良 康太、中山 勉 (東農大・応生・健康)
○Masumi IIJIMA, Ryotaro YOSHIMOTO, Moemi KANEDA, Nanako HARANO, Yusuke SUZUKI, Aki YAMADA, Kota KERA, Tsutomu NAKAYAMA (Dept. Nutr. Sci. Food. Saf., Fac. Appl. Bioci., Tokyo Univ. Agric.)

近年、*in vitro* における紅茶抽出エキスの抗インフルエンザウイルス活性が見出され、特に紅茶成分のテアフラビン類がウイルス表面の hemagglutinin (HA)に結合し、宿主細胞への感染を阻害すると報告された [1]。また、その活性強度は紅茶の産地により異なるが、詳細は未解明である。我々はこれまでに、茶ポリフェノール類とリン脂質との直接的な相互作用を報告してきた [2]。本研究では、リポソームを用いたウイルス膜モデルと各種紅茶との分子間相互作用の形状変化を atomic force microscope (AFM)を用いてナノレベルで可視化し、紅茶の抗ウイルス活性の機能解明を目指した。4 種類の紅茶(アッサム、スリランカ、ケニア、ダージリン)抽出エキスとリポソームを反応させ、凝集強度をナノレベルで解析したところ、何れの紅茶抽出エキスも濃度依存的にリン脂質と相互作用した。さらに、凝集強度はアッサム、スリランカ、ケニアが高く、ダージリンが低いことから、既報の細胞レベルでの抗インフルエンザウイルス活性 [1] と相関することを見出した。以上より、紅茶成分は HA だけでなく、ウイルス膜のリン脂質に結合して抗ウイルス効果を示し、さらに産地によりその効果が異なることが示唆された。今後、各種紅茶成分の関与を検討し、より詳細な機能解明を図りたい。

The black tea extracts have been found to have anti-influenza virus activity *in vitro*[1]. In particular, theaflavins, components of black tea, are known to bind to hemagglutinin (HA) on the virus surfaces and inhibit their adsorption to host cells[1]. Furthermore, the anti-viral activity was differ depending on the producing area of black tea, however, the mechanisms are still unclear. We have previously reported that tea catechins and theaflavins interact directly with phospholipids[2]. In the present study, to elucidate the function of antiviral activity of black tea, we utilized turbidimetric analysis with spectrophotometer (SP) and surface morphology analysis with atomic force microscopy (AFM) to visualize the molecular interactions between liposome-based cell membrane models and various black teas. Four kinds of black tea extracts (Assam, Sri Lanka, Kenya, and Darjeeling) were reacted with liposomes and analyzed the aggregation levels by both SP and AFM. We found that all black teas interacted with phospholipids in a concentration-dependent manner, with the degree of change being higher in Assam, Sri Lanka, and Kenya and lower in Darjeeling, and correlated with the anti-influenza virus activity[1]. These results suggest that black tea components bind not only to HA but also to phospholipids of viral membranes and exhibit antiviral effects, and that these effects may differ depending on the producing area of black tea.

1. 中山幹男, CMC 出版, 201 (2019); 2. Narai-Kanayama ら, Biosci Biotechnol Biochem, 82, 466 (2018).

Black tea, Antiviral activity, Nano-visualization

講演番号：2G01-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

柿果実由来縮合タンニンによる LDL コレステロール低減効果

Effects of condensed tannin from persimmon fruit on reduction of LDL cholesterol in humans

○鈴木 利雄[1,2]、森口 仁文[3]、尾﨑 嘉彦[4]、米谷 俊[5,6]([1]大阪市大院工、[2]フジッコ株式会社、[3]JA 和歌山県農、[4]近大生物理工、[5]近大農、[6]株式会社ファーマフーズ)
○Toshio Suzuki[1,2], Yoshifumi Moriguchi[3], Yoshihiko Ozaki[4], Takashi Kometani[5,6] ([1]Graduate School of Engineering, Osaka City University, [2]Fujicco Co., Ltd., [3]Wakayama Prefectural Federation of Agricultural Cooperatives, [4]Faculty of Biology-oriented Science and Technology, Kindai University, [5]Faculty of Agriculture, Kindai University, [6]Pharma Foods International Co., Ltd.)

（背景と目的）小腸での胆汁酸の再吸収を妨げることで、血清コレステロール値を下げられることが知られている。ペクチンや縮合タンニンなどの植物性高分子は、胆汁酸の吸着能を持つことが知られており、これらを含む食品の摂取により、LDL コレステロールをコントロールし、動脈硬化のリスクを低下させることが期待されている。本研究では、縮合タンニンと食物繊維を含む柿果実粉末を用いて、ヒトでの LDL コレステロール低減効果を評価した。
（方法と結果）60 名のボランティア被験者を対象にランダム化二重盲検プラセボ対照平行群間比較試験を実施した。試験食群の被験者には柿果実粉末を配合した試験食（縮合タンニンとして 0.7 g を含む）を毎食時に摂取させた。摂取開始時、摂取後 4、8、12 週間後に血液検査（LDL および HDL コレステロール、中性脂肪、血糖など）を実施した。なお、本試験は、UMIN000044129 として登録している。試験食群の LDL コレステロール値は、プラセボ群に比べて、4、8、12 週間後に、共に有意に（$p<0.01$）減少した。一方、HDL コレステロール値は、群間に有意差はなかった。結論として、柿由来縮合タンニン 2.1g/日の摂取は 4 週間で LDL コレステロール値を有意に低減させる効果を示した。
Preventing the reabsorption of bile acids in the small intestine can lower the serum cholesterol levels. Plant polymers such as pectin and condensed tannin are known to bind with bile acids, and the intake of foods containing these polymers is expected to control serum LDL cholesterol levels and reduce the risk of atherosclerosis. In this study, we evaluated the effect of persimmon fruit powder, which contains condensed tannins and dietary fiber, on reducing LDL cholesterol in humans. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study was conducted on 60 volunteer subjects. The subjects in the test diet group received the test diet containing persimmon fruit powder (0.7 g as condensed tannin) with each meal. Blood tests (LDL and HDL cholesterol, triglycerides, blood glucose, etc.) were conducted before, 4th, 8th, and 12th weeks after ingestion. The study was registered as UMIN000044129. The LDL cholesterol levels in the test diet group were significantly ($p<0.01$) lower than those in the placebo group at 4th, 8th, and 12th weeks. On the other hand, there was no significant difference in HDL cholesterol levels between the groups. The consumption of 2.1 g/day of condensed tannin from persimmon fruit significantly reduced serum LDL cholesterol levels in 4 weeks.

persimmon, condensed tannin, LDL cholesterol

発表責任者：鈴木利雄（t-suzuki@fujicco.co.jp）

講演番号：2G01-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

スサビノリ脂質成分の摂食は *db/db* 肝臓のアラキドン酸／リノール酸代謝を抑制する

The diet of Susabinori lipid component down-regulated the arachidonic acid and linoleic acid metabolisms in liver of *db/db* mice

○飯笹 さやか[1]、永尾 晃治[2]、柘植 圭介[3]、永野 幸生[4]、柳田 晃良[2,5,6]（[1]鹿児島大医歯研・泌尿器科、[2]佐賀大農・生命機能、[3]佐賀工技セ、[4]佐賀大・総分セ、[5]西九州大・健康栄養、[6]佐賀産イノベセ）

○Sayaka IIZASA[1], Koji NAGAO[2], Keisuke TSUGE[3], Yukio NAGANO[4], Teruyoshi YANAGITA[2,5,6]（[1]Dept. Urol., Grad. Sch. Med. and Dent. Sci., Kagoshima Univ., [2]Dept. Biol. Resource Sci., Saga Univ., [3]Indus. Technol. Ctr. of Saga, [4]Anal. Res. Ctr. for Exp. Sci., Saga Univ., [5]Dept. Health and Nutr. Sci., Nishikyushu Univ., [6]Saga Reg. Ind. Support Ctr.）

日本食に欠かせない海苔には、多くの機能性成分が含まれている。我々は、養殖ノリであるアマノリ属スサビノリから抽出した脂質成分（Susabinori lipid; SNL）に注目し、その生理機能を明らかにしてきた。これまでの研究で、SNL を摂食した 2 型糖尿病モデルマウス（*db*/*db*）において、肝臓脂質の減少、肝臓中の脂質合成酵素の発現低下等が確認され、SNL による脂肪肝の改善が証明されてきた[1]。本研究では、RNA-Seq による網羅的な遺伝子発現解析を行い、肝臓における SNL の影響や作用点の解明を目指した。

通常マウスと比較すると、*db*/*db* の肝臓では 745 遺伝子の発現レベルが有意に低下していた。その内、SNL 摂食依存的に発現が上昇（回復）する 15 の遺伝子を特定した。パスウェイ解析により、15 の遺伝子は不飽和脂肪酸であるアラキドン酸（AA）とリノール酸（LA）の代謝経路に関わることが分かった。一部の AA は LA から合成されるが、肝臓では、モノアシルグリセロリパーゼ（MAGL）を介した 2-アラキドノイルグリセロール（2-AG）からの AA 合成も報告されている[2]（下図）。そこで、肝臓の含有脂肪酸量を測定すると、通常マウスに比べ、*db*/*db* で増加していた LA、γ-LA（GLA）、dihomo-GLA（DGLA）量が SNL 摂食依存的に減少していた。また、*db*/*db* で上昇した *Magl* 発現も SNL 摂食依存的に低下していた。本研究により、SNL 摂食による *db*/*db* の脂肪肝改善には、AA/LA 代謝（*Magl* 発現）の抑制が密接に関わることが示唆された。

A Susabinori (*Neopyropia yezoensis*), one of the most famous edible red algae, contains several bioactive components. Especially, we have focused Susabinori lipid component (SNL), and revealed the potentials of SNL diet as a food supplement to improve the hepatic steatosis caused by type2-diabetes [1]. In this study, we investigated the effects and possible targets of SNL in the liver of obese *db*/*db* mice by analysis of transcriptional changes using RNA-Seq.

We identified the 15 SNL-dependent up-regulated genes and showed a significant relationship between them and metabolisms of arachidonic acid (AA) and linoleic acid (LA). In fact, high levels of LA, γ-LA (GLA), and dihomo-GLA (DGLA) contents in the liver of *db*/*db* mice could be decreased by SNL diet (Fig.). In addition, SNL-fed *db*/*db* mice showed a significant restoration of the expression levels of monoacylglycerol lipase (*Magl*), a main enzyme which dissociates 2-arachidonoylglycerol (2-AG) into AA and glycerol [2] (Fig.). These results suggested that the down-regulation of AA/LA metabolic pathway and *Magl* expression by SNL closely related to the improvement of hepatic steatosis in *db*/*db* mice.



Fig. The pathway of AA biosynthesis

[1] Yanagita, T., *et al*. (2020), Arch Biochem Biophys. 691: 108486.

[2] Nomura, DK., *et al*. (2008), Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 5875.

type2-diabetes, arachidonic acid, linoleic acid

発表責任者：飯笹さやか（k8930172@kadai.jp）

講演番号：2G01-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

脂質代謝関連遺伝子を制御する化合物の探索と分子機構解析

Exploration of compounds that control lipid metabolism related genes

○松永 優輝[1]、小高 愛未[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]([1]東農大 院・応生科・農化、[2]東農大・応生科・農化)
○ Yuki MATSUNAGA[1], Manami KODAKA[2], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., Grad. Sch. of Agric. Chem.,, [2]Tokyo Univ. of Agric.,)

【目的】肥満はⅡ型糖尿病、高血圧、脂質異常症など生活習慣病の危険因子として知られており、体内の過剰な脂肪蓄積と脂質代謝の調節不全が関係している。Fatty acid synthase(FAS)は脂肪酸の de novo 合成を触媒する酵素であり、肝臓及び脂肪組織における脂質蓄積を調節する因子であることが知られている。我々は FAS の発現を低下させる化合物を新たに見出し、その効果を検証するとともに、分子レベルでの詳細なメカニズムの解明を目的とした。

【方法】まず初めに、理化学研究所から供与していただいた約 400 種類の化合物の中から、FAS の発現を低下させる化合物を選別するためスクリーニングを行った。そこで、FAS のプロモーター領域を挿入したルシフェラーゼレポーターベクターを Huh-7 細胞に導入し、これを安定発現する細胞株を樹立した。この細胞に化合物を添加し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイにより活性を評価した。次に、FAS は SREBP-1 の標的遺伝子であることから、SREBP-1、SREBP-2 の標的遺伝子および SREBP-1c の内因性遺伝子発現にこれらの化合物が影響を与えるか解析した。

【結果】約 400 種類の化合物の中から、FAS のプロモーター活性を低下させる化合物として 5 種類を同定した。さらにこの 5 種類の化合物のうち、SREBP-1 と SREBP-2 の標的遺伝子及び SREBP-1c の内因性遺伝子発現をおしなべて低下させた化合物は 2 つであった。今後は各化合物がどのように作用して SREBP 活性を低下させるのか解析する予定である。

Obesity is a well-known risk factor for a variety of lifestyle disorders, such as type 2 diabetes, high blood pressure, and dyslipidemia. Fatty acid synthase (FAS) catalyzes the de novo synthesis of fatty acids and regulates net accumulation of lipid in liver and adipose tissue. To identify compounds that suppress FAS gene mRNA level, we have screened compound library using a luciferase reporter gene assay with the FAS gene promoter region. Since the expression of the FAS gene is under the control of SREBP-1, we performed Q-PCR to determine whether these compounds affect the expression of the SREBP target genes.

We have identified two compounds that have potential activities for regulating SREBP pathway. The molecular mechanism by which the two compounds regulate SREBP activity is currently under investigation.

FAS, SREBP, Lipid metabolism

発表責任者：井上 順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：2G01-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

小腸胆汁酸組成の変動に起因する小腸 FXR シグナルの減弱を介するタウリンのコレステロール低下作用

Cholesterol-lowering effects of taurine through the reduction of ileal FXR signaling due to the alteration of ileal bile acid composition

○宮田 昌明、田中 知幸、高橋 一帆、舩木 萌浩、杉浦 義正（水産機構水大校）
○Masaaki MIYATA, Tomoyuki TANAKA, Kazuho TAKAHASHI, Akihiro FUNAKI, Yoshimasa SUGIURA (National Fisheries Univ.)

タウリンがコレステロール(Ch)レベルを低下させることは知られているが、その機序については不明な点が多い。特にタウリンによる作用発現に胆汁酸/farnesoid X receptor (FXR)シグナルが関与するのかどうかについては不明である。そこで本研究では Fxr 欠損とその野生型マウスに通常飼料あるいは 1% Ch 添加飼料を 10 日間与え、2%タウリン水の飲水の効果を解析した。通常飼料を与えた場合、両マウスともにタウリン処置による肝臓、血清中 CT レベルと肝臓と消化管管腔内の胆汁酸組成に有意な変化が認められなかったが、1%Ch 添加食の場合、タウリン処置により野生型マウスでは肝臓、血清の Ch レベルが有意に低下したが、Fxr 欠損マウスでは肝臓のみ有意に低下した。またタウリン処置により野生型マウスでは消化管管腔内の胆汁酸組成に有意な変化が認められ、FXR シグナルのアンタゴニストとなる胆汁酸の有意な増加が認められ、小腸の FXR 標的遺伝子である fibroblast growth factor 15(Fgf15)や small heterodimer partner (Shp) mRNA レベルの有意な発現低下と肝臓の cholesterol 7α-hydroxylase (Cyp7a1) mRNA レベルの有意な発現上昇が認められたが、Fxr 欠損マウスではそのような変化は認められなかった。これらの結果からタウリンは FXR 存在下、消化管の胆汁酸組成を変化させ、消化管の FXR シグナルを減弱させることで、Ch レベルの低下に作用していることが示唆された。

Studies using animal models of hypercholesterolemia have established that taurine reduces cholesterol levels; however, the precise mechanism underlying this cholesterol-lowering effect is unclear. This study addressed this issue by investigating whether bile acid/FXR signaling is involved in taurine-mediated cholesterol-lowering effect. Mice were administered 2% (w/v) taurine in their drinking water and fed with a control diet or control diet supplemented with 1% (w/w) cholesterol (cholesterol diet) for 10 d. Taurine intake did not significantly alter hepatic and serum total cholesterol levels and bile acid compositions of the liver and intestinal lumen in *Fxr*-null and wild-type mice fed with the control diet. By changing to a cholesterol diet, taurine intake significantly decreased hepatic and serum cholesterol levels in wild-type mice. In contrast, it significantly decreased hepatic, not serum, cholesterol levels in *Fxr*-null mice. Taurine intake significantly altered the bile acid composition of the intestinal lumen in wild-type mice fed with a cholesterol diet, but not in *Fxr*-null mice. An increase in FXR antagonistic bile acids was detected in the intestinal lumen of taurine-treated wild-type mice fed with a cholesterol diet. Taurine intake reduced the ileal expression of FXR target genes *Fgf15* and *Shp*. In contrast, it enhanced the hepatic expression of *Cyp7a1* in wild-type mice fed with a cholesterol diet, but not in *Fxr*-null mice. These results suggest that taurine is partially involved in cholesterol-lowering by reducing the ileal FXR signaling due to the alteration of ileal bile acid composition.

taurine, cholesterol, FXR

発表責任者：宮田昌明（mmiyata@fish-u.ac.jp）

講演番号：2G01-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

東播磨地域産ネギ属野菜の糖質・脂質分解酵素阻害活性

The inhibitory activity of allium vegetables against carbohydrate hydrolyzing enzymes and lipolytic enzyme

○栗山 磯子、山崎 一諒、細川 敬三（兵庫大・健康科学）
○Isoko KURIYAMA, Kazuaki YAMASAKI, Keizo HOSOKAWA (Hyogo Univ.)

【背景と目的】近年、肥満や糖尿病などの生活習慣病の増加が問題となっている。そこで本研究では、日々の食生活による肥満や糖尿病の予防・改善を目的とし、東播磨地域産ネギ属野菜 5 種類のα-アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼ、リパーゼに対する阻害活性を評価した。
【方法】市販の東播磨地域産のたまねぎ、葉たまねぎ、にんにく、葉にんにく、黒にんにくについて実施した。部位別に凍結乾燥粉末とし、3 種類の抽出溶媒（メタノール、50%メタノール、水）で抽出した。抽出液を減圧濃縮、凍結乾燥により得られた粗抽出物を各酵素阻害活性試験に供した。ブタ膵臓由来α-アミラーゼ、ラット小腸アセトンパウダー由来α-グルコシダーゼ、ブタ膵臓由来リパーゼを粗酵素溶液として用い、それぞれ可溶性でんぷん、マルトース、スクロース、トリオレインを基質として酵素反応を行った。各酵素反応により生成した生成物を定量し、酵素阻害活性（%）を算出した。
【結果と考察】スクラーゼ阻害活性を最も強く示したのは、葉たまねぎのメタノール抽出物であった（61.0%）。この他にもたまねぎ（りん茎）のメタノール抽出物で高い阻害活性を示した（50.5%）。マルターゼ阻害活性は、葉たまねぎの 50%メタノール抽出物など 3 種類のサンプルで穏やかな阻害活性が認められた。葉たまねぎはたまねぎを極早取りしたものである。たまねぎ（りん茎）もスクラーゼ阻害活性が高かったことから共通の活性成分が寄与している可能性が考えられる。本研究により、葉たまねぎによる効果的な血糖値管理の有用性が示唆された。

In recent years, the increase in lifestyle diseases such as obesity and diabetes has become a problem. In this study, we investigated the α-amylase, maltase, sucrase and lipase inhibitory activities in 8 parts from 5 allium vegetables grown in the Higashi Harima area. The results showed that the strongest sucrase inhibition was observed in the methanol extract of leaf onion. On the other hand, Onion (blub) was found to have high sucrase inhibitory activity. Methanol and 50% methanol extract of leaf onion and methanol extract of leaf garlic showed moderate inhibitory activity against maltase. The present study suggested that the leaf onion grown in the Higashi Harima area have the potential to moderate the rise in postprandial hyperglycemia.

sucrase, inhibitor, leaf onion

講演番号：2G01-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

8R-HEPE による動脈硬化抑制作用

The effect to prevent arteriosclerosis by 8R-HEPE

○山田 秀俊[1]、植村 亜衣子[2]、齋藤 麻希[3]、石田 奈々恵[3]、揖斐 実歩[3]、弘瀬 雅教[3] ([1]帝科大・生命環境、[2]岩手生工研、[3]岩手医大・薬)
○Hidetoshi YAMADA[1], Aiko Uemura[2], Maki Saito[3], Nanae Ishida[3], Miho Ibi[3], Masamichi Hirose[3] ([1]Teikyo Univ. of Sci., [2]IBRC, [3]Iwate Medical Univ.)

8*R*-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（HEPE）は、リポキシゲナーゼによって EPA より代謝される機能性脂質である。これまでに我々は、8*R*-HEPE がペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）リガンドとして作用し、抗肥満効果を示すことを見出してきた。本研究では、8R-HEPE のコレステロール代謝に対する作用について、in vivo および in vitro 試験にて検討した。

高コレステロール血症モデルマウスにおいては、8R-HEPE 摂取によって血漿 LDL コレステロール抑制と HDL コレステロール増加、大動脈のアテローム形成の抑制が観察された。マクロファージ細胞株（J774.1）での解析は、8R-HEPE によって Abca1 遺伝子と Abcg1 遺伝子発現の増加が促進された。対象として用いた 8S-HEPE では、Abca1 および Abcg1 遺伝子発現促進は観察されなかった。また、EPA は Abca1 および Abcg1 遺伝子発現を抑制した。

これらの結果から、8R-HEPE は、EPA や 8S-HEPE では観察されない、コレステロール逆輸送経路の活性化に働き、高コレステロール血症による動脈硬化を抑制する効果を有していることが示唆された。

8*R*-hydroxyeicosaenoic acid (8*R*-HEPE) is a functional lipid which is produced by lipoxygenase from eicosapentaenoic acid. We had showed that 8R-HEPE acted as a peroxisome proliferate activated receptor (PPAR) ligand and 8*R*-HEPE had anti-obesity effect on high-fat diet induced obesity mice. In this study, we examined the effect of 8R-HEPE on cholesterol metabolism in in vivo and in vitro examination.

8*R*-HEPE reduced plasma LDL-cholesterol and increased plasma HDL-cholesterol in LDL receptor knockout mice. And 8*R*-HEPE suppressed aorta atheroma formation induced by western diet in ApoE receptor knockout mice. In the experiments using J774.1 cell line, 8*R*-HEPE induced the mRNA expression of Abca1 and Abcg1, but 8*S*-HEPE did not induced. In contrast, EPA reduced he mRNA expression of Abca1 and Abcg1.

These results suggest that 8*R*-HEPE can activate reverse cholesterol transport system, which activity was not observed in EPA and 8*S*-HEPE, and has effect to prevent arteriosclerosis.

8R-HEPE, arteriosclerosis, reverse cholesterol transport system

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ntu.ac.jp）

講演番号：2G01-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

カヌカエキスの胆汁酸ミセル崩壊活性に関する研究

Studies of the bile acid micelle disintegration activity of Kanuka-extract

○山口 紗那花[1]、野崎 勉[2]、福士 江里[3]、矢野 善久[1]、藤田 裕之[1]([1]京都先端大バイオ環境、[2]ビーエイチエヌ(株)素材開発、[3]北大院農)
○ Sanaka YAMAGUCHI[1], Tsutomu NOZAKI[2], Eri FUKUSHI[3], Yoshihisa YANO[1], Hiroyuki FUJITA[1] ([1]Kyoto University of Advanced Science, [2]BHN Co.,Ltd., [3]Hokkaido Univ.)

（目的）胆汁酸は、食餌性の脂肪やコレステロールをミセル化し、腸管から体内に再吸収されると言う腸肝循環を行っている。従って、この胆汁酸ミセルを崩壊すれば、胆汁酸のみならず食餌性の脂肪やコレステロールの吸収を抑制できることから、血中コレステロールの低下や抗肥満作用が期待できる。そこで、この胆汁酸崩壊活性について種々の食品について検討した結果、カヌカ（*Kunzea ericoides*）の熱水抽出物（カヌカエキス）が強力な崩壊活性を示したことから、このカヌカエキスに含まれる活性成分の単離・同定を目的に研究を行った。
(方法)胆汁酸ミセルは、コレステロール、卵黄レシチン、およびタウロコール酸ナトリウムを混合後、15 ㎜ リン酸緩衝液を加えて超音波処理により調製した。崩壊活性の測定には、このミセル溶液に各種サンプルを添加し、ミセル崩壊後に残存しているコレステロール量を定量し検討した。活性成分の精製には、まず ODS オープンカラムを用い MeOH による段階溶出後、次に逆相 HPLC（ODS、5-Ph）を用いて分画し、得られた活性画分を LC-MS および NMR により活性成分の構造解析を行った。
(結果及び考察) ODS オープンカラムによる分画では、20、30、40%MeOH 溶出画分に強力な阻害活性を示した。そのうち、最も活性の強かった 20%溶出画分を HPLC-ODS カラムにより分析・分取した結果、27 本のピークに分離された。そのうち最も活性の強かった画分を、5-Ph カラムにより活性画分を分取し構造解析を行った結果、Isotrictinin と推定した。さらに、他のピークについても同様に分画、分析した結果、その構造異性体の Strictinin と推定した。一方、30%MeOH 溶出画分からは、活性成分として Kunzeachromon F と言う大変興味深いことに極まれな C グルコシド配糖体を見いだし、結果が得られた。いずれの物質も、既知化合物ではあったが、今回初めて胆汁酸ミセル崩壊活性を示すことを見出した。

The Kanuka extract strongly exhibits the bile acid micelle disintegration activity. Therefore, we tried to isolate and determine the structure of the active compounds. Using by ODS open column, 20, 30, and 40% MeOH elution fractions showed strong inhibitory activity. The 20% elution fraction with was further analyzed by HPLC-ODS column and separated into 27 peaks, of which the most active fraction was fractionated by 5-Ph column. This active fraction was analyzed by LC/MS and NMR, identified to be Isotrictinin. The other active peaks were also fractionated and separated in the same way, identified to be Strictinin, it’s isomer. In addition, a C-glucoside glycoside, Kunzeachromon F, was estimated as the active compound from the 30% MeOH-eluting fraction.

Kanuka-extract, bile acid micelle disintegration activity, anti-obesity

講演番号：2G01-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

脂質代謝改善及び長寿に寄与する腸アルカリフォスファターゼと配列特異的な直接的相互作用をするコレステロール代謝改善ペプチド IIAEK（ラクトスタチン）

Cholesterol-lowing pentapeptide IIAEK (lactostatin) that directly interacts with intestinal alkaline phosphatase in a sequence-specific manner that contributes to the amelioration of lipid metabolism and longevity.

○竹内 朝陽[1]、久松 賢太郎[1]、奥村 菜月[1]、杉光 祐紀[1]、中野 綾音[1]、柳瀬 笑子[2]、上野 義仁[2]、長岡 利[1] ([1]岐阜大応生食品分子機能学、[2]岐阜大応生生物有機化学)
○Asahi TAKEUCHI[1], Kentaro HISAMATSU[1], Natsuki OKUMURA[1], Yuki SUGIMITSU[1], Ayane NAKANO[1], Emiko YANASE[2], Yoshihito UENO[2], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu Univ. Applied Life Science Molecular Function of Food, [2]Gifu Univ. Applied Life Science Bio-organic Chemistry)

我々は、牛乳乳清 β-ラクトグロブリンより新規血清コレステロール（CHOL）低減化ペプチド IIAEK を発見した。小腸で IIAEK と相互作用する標的分子を同定するために、光親和性標識した IIAEK を蛍光物質導入により可視化する新規分子プローブ IIXEK を化学合成した。ラット小腸粘膜及び Caco-2 細胞（ヒト小腸モデル）の脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験及び MS 解析により、IIAEK と相互作用する標的分子として脂質代謝改善・長寿に寄与する腸アルカリフォスファターゼ（IAP）を同定し、IAP の IIAEK 共通結合配列として GFYLFVEGGR を特定した。驚くべきことに、IIAEK は IAP の生体内基質（ビタミン B_6）よりも 2.63 倍強く IAP と直接的相互作用し、IIAEK-IAP 間の直接的相互作用は、IIAEK の IAEK 構造のアラニン置換により消失することを表面プラズモン共鳴により明らかにした。興味深いことに、8 時間培養 Caco-2 細胞への IAP siRNA 導入により、IIAEK が誘導する ABCA1 mRNA レベルの有意な低下は消失した。以上より、IIAEK は IAP を標的とし、IIAEK-IAP の直接的相互作用を介して、IAP の特異的な活性化及び ABCA1 mRNA レベルの下方調節を伴って、CHOL 代謝を改善する新規情報伝達系を発見した（1）。

IIAEK (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys, lactostatin) is a novel cholesterol-lowering pentapeptide derived from bovine milk β-lactoglobulin. However, molecular mechanisms underlying the IIAEK-mediated suppression of intestinal cholesterol absorption are unknown. Therefore, we chemically synthesized a novel molecular probe, IIXEK, which can visualize a complex of target proteins interacting with photoaffinity-labeled IIAEK by fluorescent substances. Through photoaffinity labeling and MS analysis with IIXEK for rat small intestinal mucosae and lipid raft fractions of Caco-2 cells, we identified intestinal alkaline phosphatase (IAP) as a specific molecule interacting with IIAEK and discovered the common IIAEK-binding amino acid sequence, GFYLFVEGGR. Surprisingly, studies using surface plasmon resonance showed the direct interaction of IIAEK with human IAP was 2.63 times stronger than that of *in vivo* substrate of IAP (vitamin B_6). Using the alanine mutant of IIAEK also showed the structure of IAEK was important for the direct interaction of IIAEK with IAP. Interestingly, transfection with IAP siRNA counteracted the IIAEK-induced decrease in ABCA1 mRNA levels in Caco-2 cells. In conclusion, we found IIAEK targeted IAP to improve cholesterol metabolism via a novel signaling pathway (1).

（1）Takeuchi, A. *et al. Nutrients* 12, 2859 (2020).

IIAEK, alkaline phosphatase, surface plasmon resonance

発表責任者：長岡　利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2G01-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

奇数鎖脂肪酸が結合している微生物由来プラスマローゲンのラット小腸におけるリンパ吸収動態

Lymphatic absorption of microbial plasmalogen that has odd chain fatty acids in the small intestine of rats

○佐藤 奈々[1]、柏木 明子[2]、山田 美和[3]、西向 めぐみ[3] ([1]岩手大院・総合科学、[2]弘前大・農学生命、[3]岩手大・農)
○Nana SATO[1], Akiko KASHIWAGI[2], Miwa YAMADA[3], Megumi NISHIMUKAI[3] ([1]Iwate Univ. Grad. Sch., [2]Hirosaki Univ., [3]Iwate Univ.)

【目的】プラスマローゲン (Pls) は、ビニルエーテル結合を有するエーテル型リン脂質であり、動物体内に広く存在している。また、Pls は抗酸化作用を示すため、酸化ストレスが関与する人間の疾病との関連が示唆されている (M. Nishimukai et al., Clin Chim Acta. 2014)。しかし、Pls に結合している脂肪酸の違いが Pls の生理機能に影響を及ぼすかどうかといった構造･機能間の情報は少ない。そこで我々は、*Selenomonas ruminantium* の Pls には、動物由来 Pls よりも短鎖の偶数鎖脂肪酸が結合していることに着目し (T. Watanabe et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 1982)、ラットへの経腸投与試験によって、微生物由来 Pls がラット小腸に吸収されることを確認した (日本農芸化学会 2021 年度大会にて発表)。さらに本研究では、動物由来 Pls よりも短鎖の奇数鎖脂肪酸 (炭素数 13、15、17) が結合している微生物由来 Pls のラット小腸における吸収動態について検討した。
【方法】9～10 週齢の Wistar/ST 系の雄ラットを、AIN93-G に準拠した基本食で 3 日間予備飼育後、胸管リンパ管 (リンパ液採取用) と十二指腸 (経腸投与用) にカテーテルを留置した。一晩回復後、微生物由来 Pls 含有脂質エマルジョン 1 ml を経腸投与し、経時的にリンパ液を全量採取した。脂質投与前および投与後の各リンパ液は、脂質抽出を行なった後に、LC-MS/MS を用いてリンパ液中の Pls の分子種分析を行った。
【結果と考察】脂質投与後、リンパ液中の PlsEtn 量は投与後 2 時間で最大となり、リンパ液に放出された PlsEtn の *sn*-1 位には、微生物由来 Pls に特異的な奇数の炭化水素鎖が、PlsEtn の *sn*-2 位には、短鎖の偶数鎖脂肪酸が結合している微生物由来 Pls を投与した際と同様に、20:4 の脂肪酸が主に結合していた。しかし、*sn*-1 位に炭素数 15 の炭化水素鎖が結合している PlsEtn では、*sn*-2 位に 22:6 の脂肪酸が主に結合していた。以上より、奇数鎖脂肪酸が結合している微生物由来 Pls は、(i) 特徴的な構造である *sn*-1 位の奇数の炭化水素鎖を維持して体内へ吸収されること、(ii) *sn*-1 位に結合している炭化水素鎖の種類によって *sn*-2 位に結合する主な脂肪酸が異なることが示唆された。
We carried out duodenal infusion of emulsion including the lipid extracted from *Selenomonas ruminantium* in the lymph duct-cannulated rats. Analysis of lymphatic plasmalogens (Pls) of rat after lipid injection suggested that *sn*-1 position was reflected by specific species in the microbial Pls but *sn*-2 position was resynthesized as main species in lymphatic Pls of rats. These results indicated that part of microbial Pls administered to rats was absorbed in the small intestine while maintaining odd hydrocarbon chains at the *sn*-1 position.

plasmalogen, *Selenomonas ruminantium*, lymphatic absorption

発表責任者：西向　めぐみ（nmegumi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2G01-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

アスコルビン酸酸化に起因するタンパク質ピロール化

Protein *N*-pyrrolation resulting from the autoxidation of ascorbic acid

○吉武 淳[1]、柴田 貴広[2]、近澤 未歩[3]、内田 浩二[4]([1]名大未来社会、[2]名大農、[3]名城大農、[4]東大農)
○Jun YOSHITAKE[1], Takahiro SHIBATA[2], Miho CHIKAZAWA[3], Koji UCHIDA[4] ([1]Nagoya Univ., Inst. of Innov. for Fut. Soc., [2]Nagoya Univ., [3]Meijo Univ., [4]Tokyo Univ.)

リジン残基にピロール環を形成する非酵素的な翻訳後修飾であるタンパク質ピロール化は、DNA インターカーレーターとの結合能の獲得など、タンパク質に DNA 様の性質を付与することが報告されている。また、自己免疫疾患モデルマウス血清に対して抗原性を示すことから自己免疫疾患への関与が示唆されるなど、タンパク質ピロール化の生理学的意義は解明されつつある。近年、銅と過酸化水素による多価不飽和脂肪酸の過酸化物とリジンとの反応によってピロール化リジン（pyrK）が形成されたことから、グリコールアルデヒド（GA）とその酸化体であるグリオキサール（GO）がピロール化の内因性物質として同定された。本研究において、鉄・アスコルビン酸（AsA）酸化による不飽和脂肪酸（PUFA）過酸化物からの pyrK 形成を確認したところ、PUFA 非存在化であるにもかかわらず、AsA 濃度依存的な pyrK 形成と SYBR Green I（SG, DNA インターカーレーター）結合性のタンパク質形成が認められた。AsA の鉄処理によって形成されたアルデヒド類をアミノ安息香酸（ABA）で誘導体化して質量分析に供したところ、GA の ABA 誘導体（GA-ABA）が検出された。鉄キレート剤である DTPA を添加することで GA-ABA の形成が抑制されたことから、AsA の鉄触媒による酸化によって GA が形成され、ピロール化が惹起されたことが示唆された。さらに GA と鉄の反応生成物を質量分析により解析したところ GA の酸化体であるグリオキサール(GO)の形成が認められた。これら AsA の鉄触媒酸化によって GA と GO が形成される観察結果は、脂質過酸化と同様に還元糖の自己酸化もリジンピロール化に関与することを示唆することから、タンパク質ピロール化は生体内において普遍的に惹起されている現象である可能性が示唆された。

Protein *N*-pyrrolation, converting lysine to N^{ε}-pyrrole-*L*-lysine (pyrK), is a naturally occurring covalent modification, which converts proteins to SYBR Green I (SG)-binding DNA mimic proteins. Short-chain aldehydes derived from lipid peroxidation are thought to be a source of pyrK formation. We report here that sources of pyrrolation are also formed during Fe^{2+}-catalyzed autoxidation of ascorbic acid (AsA). When docosahexaenoic acid was treated with Fe^{2+}/AsA followed by additional incubation with human serum albumin, the SG-binding proteins were formed even without the docosahexaenoic acid. Moreover, we demonstrated that the formation of DNA mimetic proteins was accompanied by the formation of pyrK. These results and the observation that a metal-catalyzed oxidation of AsA generated both glycolaldehyde and glyoxal, the sources of pyrK, suggest that the autoxidation of reducing sugars can also be involved in lysine *N*-pyrrolation.

posttranslational modification, ascorbic acid, autoxidation

講演番号：2G01-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

Renalase Deficiency Is Associated with Impaired Glucose Metabolism and Disturbed Gut Microbiota in Mice

○Hui Fang, Kazuhiro Takekoshi (University of Tsukuba)

Renalase is a soluble flavoprotein dependent monoamine oxidase discovered in 2005. It is mainly expressed in the kidney, but has been found to be expressed in the heart, liver, lungs, and skeletal muscle. Initially, it was reported that its main function was to metabolize circulating catecholamine and to be involved in the control of cardiac function and systemic blood pressure. Besides, as a cytokine, it's able to anti-oxidative stress and signaling activation to exert cell protection functions. Significantly, with the development of subsequent research, they found that RNLS (renalase gene) as a common polymorphism gene, has been linked to increased risk of type 2 diabetes and complicated. As we all known, type 2 diabetes is characterized by hyperglycemia. Therefore, it's particularly important to understand the relationship between renalase and hyperglycemia to explain the pathogenesis of diabetes. The controlling of glucose level is inseparable from the regulation of hormone-GLP-1. Lcells, as the GLP-1 productive system were raised a lot of concern. Existing studies found that GLP-1 release is regulated by the microbiota. Thus, we aimed to compare glucose metabolic parameters, gut microbiota composition and L cell functions between renalase knockout mice and wild-type mice. Our results suggested that the renalase knockout mice exhibited impaired glucose tolerance under high fat diet, accelerated diet-induced microbial dysbiosis and caused loss of L cells function through MAPK signaling in the early stages of diabetes progression. This is the first report on the regulatory mechanism of renalase on glucose metabolism. In the future, I hope it's helpful for contributing to the theoretical foundation on the potential relationship between renalase and the development of glucose metabolism.

renalase, gut microbiota, glucose metabolism

発表責任者：Fang Hui（s2030470@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2G01-12
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム G

異なる年齢層における果糖ぶどう糖液糖飲料過剰摂取の耐糖能に及ぼす影響

Effects of excessive intake of high-fructose corn syrup drinks on glucose tolerance in different age groups

○日髙 芽衣、花井 悠真、大島 佑人、江藤 望、服部 秀美（宮崎大農）
○Mei Hidaka, Yuma Hanai, Yuto Oshima, Nozomu Eto, Hidemi Hattori (Miyazaki Univ.)

果糖ぶどう糖液糖（HFCS）飲料の過剰摂取は、2 型糖尿病発症の原因の一つと考えられている。しかし、HFCS が 2 型糖尿病や肥満にどのように関与しているかは不明な点が多い。そこで本研究では、エネルギー摂取量制限下での HFCS 過剰摂取の耐糖能と肥満に対する影響を、異なる年齢層において比較検討した。3 週齢（成長期）と 28 週齢（壮年期）のマウスを 2 つの群に分け、コントロール群に脱イオン水を HFCS 群に 10%HFCS 水を自由に摂取できるようにし、エネルギー摂取量は両群で同じになるように通常飼料で調整した。その結果、3 週齢及び 28 週齢マウス共に肥満にはならず、耐糖能異常を引き起こした。また、3 週齢マウスでは、膵臓のグルコキナーゼ（*Gck*）やケトヘキソキナーゼ（*Khk*）の mRNA の発現低下がみられ、インスリン分泌不全を引き起こした。28 週齢マウスでは、膵臓のインスリンの mRNA の発現低下がみられたが、*Gck* 及び *Khk* の mRNA の発現低下はみられなかった。このことから、エネルギー制限下での HFCS 過剰摂取は耐糖能異常を引き起こすが、年齢層の違いにより、その発症メカニズムが異なることが示唆された。

Excessive intake of high-fructose corn syrup (HFCS) drinks is considered to be one of the causes of type 2 diabetes (T2D). However, the details of the effects of HFCS on T2D and obesity remain unclear. In the present study, we examined the effects of excess intake of HFCS under conditions of controlled caloric intake on glucose tolerance and obesity in different age groups. ICR mice of 3-week-old (young age) and 28-week-old (middle age) were randomly divided into two groups. The control group was given free access to deionized water and the other group was given free access to10% HFCS–water. The caloric intake in both groups was adjusted to be the same using a normal diet. As a result, excessive intake of HFCS caused impaired glucose tolerance (IGT) without obesity in both 3-week-old and 28-week-old mice. In addition, the mRNA expressions of glucokinase and ketohexokinase were decreased in pancreas of 3-week-old mice, resulting in defective insulin secretion. On the other hand, with the 28-week-old mice, their mRNA expressions were not decreased, however the mRNA expression of insulin was decreased. These results suggest that excessive intake of HFCS drinks under conditions of controlled caloric intake cause IGT, and different age groups have pathogenic mechanisms.

High-fructose corn syrup (HFCS), Type 2 diabetes, Defective insulin secretion

発表責任者：服部　秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2G03-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

グミ咀嚼が唾液分泌に与える効果に関する探索的研究

Exploratory Study on the Effect of Gummy candy Mastication on Salivation

○北川 哲[1]、高宮 隆一[1]、小嶋 禎[1]、辻本 義憲[1]、和田 哲也[1]、大久保 幸三[1]、斎藤 一郎[2]([1]株式会社明治、[2]鶴見大学歯学部)
○ SATOSHI KITAGAWA[1], RYUICHI TAKAMIYA[1], TADASHI KOJIMA[1], YOSHINORI TSUJIMOTO[1], TETSUYA WADA[1], KOUZOU OHKUBO[1], ICHIRO SAITO[2] ([1]Meiji Co.,Ltd., [2]Tsurumi Univ.)

【背景および目的】
超高齢社会の進行に伴い口腔機能の低下が深刻化している中、口腔内が乾燥する悩みを抱える生活者は多い。口腔の乾燥は唾液の自浄作用低下等から細菌の増殖を促し、う蝕、歯周病だけでなく口臭の悪化、感染症のリスクが増大することから、我々はこの対処法についてグミおよびガム咀嚼の唾液分泌量および唾液分泌速度に与える効果について検討した。
【方法】
被験者はサクソンテスト（刺激時唾液試験）にて唾液量が 2-6g の健常な 50 歳以上 65 歳以下の女性（N=22）を対象とし、咀嚼開始から 2 分後までの唾液分泌量、および唾液分泌速度を評価した。
【結果および考察】
試験開始から終点（0-2 分）までの累積唾液分泌量はガム群と比較しグミ群が高値であった（p=0.00314）。また、唾液分泌速度においてもグミ群が高い値を示した（p=0.00157）。経時的に観察すると、0-1 分の唾液分泌量ではグミ群が高い値を示したのに対し（p=0.0000228）、1-2 分においてはガム群が高値となった（p=0.00372）。これらのことから、グミでは強い弾力に起因した咀嚼刺激に加え、味覚刺激が伴って素早い唾液分泌を可能にしており、ガムでは持続的な咀嚼刺激によって安定した唾液分泌が促進される可能性が推察された。

Since people suffering from oral dryness are at increased risk of microbial infections, we surveyed the effect of masticating gummy candy or chewing gum on salivation. The clinical trial was targeted on women between the ages of 55 and 65 years old who had a salivary weight of 2-6 grams by the Saxon test.
As a result, gummy candy was significantly higher than chewing gum in terms of cumulative saliva volume and saliva secretion rate from the beginning of masticating to 2 minutes (0-2 minutes). In addition, chronological observation showed that salivation was higher in gummy candy from 0 to 1 minute, and higher in chewing gum from 1 to 2 minutes. These results suggest that the strong masticating stimulation and gustatory stimulation of gummy candy enable rapid salivation.

salivation, mastication, gummy candy

発表責任者：北川　哲（satoshi.kitagawa@meiji.com）

講演番号：2G03-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

UPLC-MS/MS システムを用いたマウス脳内カテコールアミンおよび代謝物解析メソッドの開発

A novel method for quantification of catecholamines and their metabolites in mice brain by using UPLC-MS/MS

○藤井 靖之、手島 知洋、牟田 織江、伏見 太希、越阪部 奈緒美（芝浦工大院）
○Yasuyuki Fujii, Tomohiro Teshima, Orie Muta, Taiki Fushimi, Naomi Osakabe (Shibaura Inst. of Tech.)

【目的】本研究では、UPLC-MS/MS システムを用いて脳内カテコールアミン(dopamine・noradrenaline・adrenaline)およびその代謝物(3MT・NMET・HVA・MHPG・sulfate・VMA)を短時間で高精度に同時定量するメソッドを開発することとした。【方法】UPLC および QTRAP 5500(AB SCIEX)を用いた。マウス脳サンプルを超音波破砕後、Bligh & Dyer 法を用いて脂質を除去し、カテコールアミンを測定するために上清の一部を固相(Monospin PBA, GL サイエンス)を用いて精製した。代謝物の測定には、上清をフィルター濾過して用いた。移動相は 0.1%ギ酸水溶液と 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液を用いた。質量分析はエレクトロスプレーイオン化法による多重反応モニタリング法を採用した。【結果・考察】カテコールアミンとその代謝物は 4 分以内に感度よく検出され、内部標準法を用いて作成した検量線はアドレナリンでは 6.25~、HVA では 3.125~、MHPG sulfate では 1.5625~、その他の化合物では 0.78125~100ng/ml の範囲で良好な直線性を示した(R^2>0.995)。本法を用いてカプサイシンを C57BL/6J マウスに経口投与後に脳内カテコールアミンを測定したところ、投与 15 分後に dopamine と noradrenaline の増加傾向がみられ、MHPG sulfate の有意な増加が認められたことから、本法はストレス研究や臨床研究領域など様々な領域における応用が期待できる。

Objectives: In this study, we developed a simultaneous quantifying method for catecholamines and their metabolites characterized by a short period and high accuracy using a UPLC-MS/MS system. **Methods:** We used UPLC (Shimadzu Corporation) equipped with QTRAP 5500 (AB SCIEX) were used for analysis. A portion of the supernatant was purified by using a solid-phase extraction method (Monospin PBA, GL Science) to measure catecholamines. To determine metabolites, the rest of the supernatant was filtered and used. We used 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid acetonitrile solution for mobile phases. For mass spectrometry, a multiple reaction monitoring method using electrospray ionization was employed. **Results and Discussion:** Catecholamines and their metabolites were sensitively detected within 4 min. The quantification limit of each chemical determined by the internal standard method was shown below; adrenaline; 6.25, HVA; 3.125, MHPG; 1.5625; sulfates or the other chemicals;0.78125 ng/ml. Developed calibration curves showed high linearity in the range from detection limit to 100 ng/ml (R2>0.995). This method can be applied to urine and blood samples as well for rapid and sensitive analysis.

catecholamine, UPLC-MS/MS, capsaicin

講演番号：2G03-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

成長期における慢性的な活動期前半欠食の脳機能への影響

The effect of chronically fasting in the first half of the active period on brain function of growing mice

○佐々木 海帆、石島 智子、岡田 晋治（東大農）
○Miho SASAKI, Tomoko ISHIJIMA, Shinji OKADA (Tokyo Univ.)

成長期における朝食欠食が近年問題視されており、心身の発達に悪影響を与えることが危惧されている。朝食摂食頻度と学力の相関が知られる一方、成長期の朝食欠食が脳機能へ与える影響は明確に示されていない。そこで本研究では活動期、つまり暗期の前半 6 時間欠食を朝食欠食として定義し、成長期マウスを用いて慢性的な朝食欠食の脳機能への影響について評価を行った。5 週齢の C57BL/6 マウスを用い、前述の条件下で 3 週間飼育したマウスを朝食欠食群とした。対照群として、自由摂食群と暗期後半 6 時間欠食させた夕食欠食群を置いた。朝食欠食による記憶機能への影響を調査するため、各種行動試験を行った。海馬の関与が知られる Y 字迷路試験や短期位置認識試験では、朝食欠食群において記憶能力の低下がみられた一方、嗅周皮質の関与が知られる短期新奇物体認識試験では、各群の記憶能力に差は見られなかった。つまり、慢性的な朝食欠食が海馬依存的な記憶能力の低下を引き起こすことが示唆された。そこで、その作用機序を明らかにするため、海馬について RNA シーケンスによる網羅的遺伝子解析を行った。抽出された発現変動遺伝子について Gene Ontology 解析を行った結果、自由摂食群と朝食欠食群の比較では細胞増殖、細胞死に関連するタームが抽出された。以上より記憶能力の低下は、海馬における細胞代謝の異常によることが示唆された。今後は海馬神経細胞数やそのアポトーシス率などについて解析を進める予定である。

Skipping breakfast in adolescents is a well-known social problem. Skipping breakfast is thought to decrease cognitive performance. However, the effects of skipping breakfast upon the brain function of a child are still unclear. We aimed to evaluate the effect of chronically skipping breakfast on brain function by using five-week-old mice deprived of food in the first half of the active period for three weeks. Behavioral tests were performed to investigate the effects of skipping breakfast on memory function and showed that hippocampal-dependent memory function was declined by skipping breakfast group. Then, we examined the gene expression profiles of their hippocampus by RNA sequencing. After the determination of differentially expressed genes (DEGs) among groups, we performed Gene Ontology analysis for DEGs, and found that the terms related to cell proliferation, cell death were over-represented for DEGs between skipping breakfast and control groups. Therefore, we are going to analyze the number of hippocampal neurons and their apoptosis rate.

skipping breakfast, memory, hippocampus

発表責任者：佐々木海帆（lameretlavoile0220@gmail.com）

講演番号：2G03-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

ダイゼイン摂取は卵巣摘出ラットの胃排出を遅延させ、食欲を抑制する

Dietary daidzein decreases food intake by delaying gastric emptying in ovariectomized rats

○藤谷 美菜、鈴木 遥、石田 彩華、林 真理、吉良 真結、屋敷 哲良、阿部 恭大、小林 拓広、岸田 太郎（愛媛大院農）
○ Mina FUJITANI, Haruka SUZUKI, Ayaka ISHIDA, Mari HAYASHI, Mayu KIRA, Akira YASHIKI, Yasuhiro Abe, Takuhiro KOBAYASHI, Taro KISHIDA (Ehime Univ.)

先の研究により、大豆イソフラボン・ダイゼインをラットに摂取させると、その腸内細菌代謝物エコールにより雌特異的に食欲が抑制されることが明らかとなった。我々はダイゼイン摂取による食欲抑制作用は胃内容排出の遅延に起因するという仮説を立て、過食性肥満モデルの卵巣摘出ラットを用いて検討した。卵巣摘出ラット（SD 系、7 週齢）にダイゼインを摂取させると、胃内容排出が遅延することが明らかとなった。2 食制（各 1 時間、食間 2 時間）で飼育したラットでは、胃内容物が残留していない状態で飼料を摂取させた場合（1 食目）ではダイゼイン摂取による飼料摂取量の減少は見られなかったが、胃に内容物が残留している状態で飼料を摂取させた場合（2 食目）ではダイゼイン摂取により有意な飼料摂取量の減少が見られた。この際、2 食目食中において食欲抑制および胃排出遅延作用を持つ視床下部ウロコルチンの遺伝子発現がダイゼイン摂取により有意に増加していた。さらに、スリーブ状胃摘出により胃内容物貯留能を失ったラットではエコール摂取による飼料摂取量の減少はみられなかった。これらのことから、エコールによる食欲抑制作用は、視床下部ウロコルチン遺伝子発現増加を介した胃排出の遅延に起因することが示唆された。

We previously found that equol, which is metabolized from soy isoflavone daidzein by intestinal bacteria, has female-specific anorectic effects. In this study, we used seven-week-old female ovariectomized (OVX) Sprague Dawley rats to test the hypothesis that the anorectic effect of dietary daidzein may be attributed to delayed gastric emptying. Results suggest that dietary daidzein delays gastric emptying, and that it has an anorectic effect with residual gastric contents, but not without gastric contents. Concomitantly with the suppression of food intake, dietary daidzein increased the expression of *Ucn*/urocortin gene expression in the hypothalamus. Dietary equol significantly decreased daily food intake in the OVX rats without sleeve gastrectomy, but not in those with sleeve gastrectomy, suggesting that the accumulation of food in the stomach is required for the anorectic effect of equol to occur. These results suggest that the anorectic effect of dietary daidzein is attributed to delayed gastric emptying via an increase in *Ucn* gene expression in the hypothalamus.

equol, anorectic effect, gastric emptying

発表責任者：藤谷　美菜、岸田　太郎（fujitani.mina.uu@ehime-u.ac.jp, kishida@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：2G03-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

食物価値に基づく食物選択マウスモデルの開発

Development of a mouse model of food preference based on food valence

○好田 歩、喜田 聡（東大農）
○AYUMU YOSHIDA, SATOSHI KIDA (Tokyo Univ.)

ヒトでは高嗜好性の食物であろうとも同じ食物を食べ続けると、その食物に対する食欲が低下することがある。ヒトにおける感性満腹感（sensory specific satiety）は食物摂取後にその食物に対する食欲を低下させる食行動抑制現象の一つであり、この背景として、摂取した食物選択的にその価値が低下することが考えられる。本研究では、食物の摂取状況に応じた食物価値の変化により食行動が決定される神経メカニズムの解明を目的として、直前に摂取した食物の価値低下を検出するマウス行動解析系の確立を試みた。マウスが同等の嗜好性を示す食餌を 2 種類準備し、摂食制限を行った雄成熟マウスに片方の食餌（試験食餌）を提示して 1 時間自由に摂食させた。続いて、同じエサ、あるいは、もう片方の食餌(対照食餌)を 10 分間自由摂取させて、各エサの摂食量を計測した結果、試験食餌の摂取量は対照食餌に比較して有意に少なかった。また、同様のタイムコースで、試験食餌を 1 時間自由摂食させた後に両方の食餌を同時に自由摂食させた場合にも、試験食餌の摂取量は対照食餌に比較して有意に少なかった。従って、本研究で用いた行動解析系において直前に摂取した食餌の価値が選択的に低下することが示唆され、マウスにおいてもヒト感性満腹感と類似した食行動制御が行われている可能性が考えられた。

Sensory Specific Satiety is one of the systems proposed based on research in humans that leads to the termination of eating behavior, and characterized by a decrease in the value specific to the food ingested. In this study, we attempted to design a behavioral analysis system to observe the "value decrease specific to the food ingested immediately before" in mice in order to understand the neural mechanism that controls the value of food depending on its sensory characteristics. Food-restricted adult mice were allowed to freely consume food for 1 hour, and then presented with the same food or another food with equivalent preference for 10 minutes. We measured the amount of each food consumed during that 10-minute period, and found that the amount of food consumed by the same food as that of the food fed freely for 1 hour beforehand was significantly lower than that of the different food. Assuming that the food value in mice can be approximated by the amount of food ingested, these results indicate that "a specific decrease in the value of the food ingested immediately before" can be observed by the behavioral analysis system used in this study, and suggest the possibility that a food value control mechanism similar to that of sensory satiety exists in mice.

food preference, sensory specific satiety, mouse

講演番号：2G03-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

高嗜好性食物の期待により誘導される摂食抑制マウスモデルの開発

Feeding suppression mouse model induced by the expectation of feeding highly palatable food

○鶴山 和人、喜田 聡（東大農）
○Kazuto TSURUYAMA, Satoshi KIDA (Tokyo Univ.)

ヒトでは好物を食べることがわかっていれば直前の摂食量を少なくすることが見受けられる。この現象は食物の嗜好性、すなわち、食物の価値に基づいた食行動制御の存在を示している。本研究では、食嗜好性に応じた摂食行動制御基盤の神経科学的解明を目指して、マウスを用いて「低嗜好性食物を摂食直後に高嗜好性食物の摂食させる試行を繰り返すと、高嗜好性食物を期待して低嗜好性食物の摂食を抑制する」課題を確立し、この摂食行動変化を制御する認知プロセス機構の解析を目指した。まず、雄マウスに 1 日に 2 時間のみ通常飼料を与える摂食制限を習慣付けした。(5 日間)。その後、22 時間の絶食後に通常飼料を 30 分間給餌し、その後高嗜好食物であるチーズを 30 分間摂食させて、この操作を計 5 日間繰り返し（トレーニング 1～5 日)、各日通常飼料とチーズの摂食量をそれぞれ測定した。その結果、トレーニング 1 日目に比較して日数の経過に伴い通常飼料の摂食量が有意に減少し、一方、チーズの摂食量が有意に増加することが観察された。従って、マウスは高嗜好食物が後に与えられることを学習すると、高嗜好性食物を期待して摂食抑制が起こることが示唆された。以上のように、マウスにおいてもヒトと同様に食嗜好性に基づいた食行動制御が行われていることが明らかとなった。現在、トレーニング過程で摂食抑制が誘導される機構を記憶制御の観点から解析している。

Recent reports are revealing mice's cognitive control processes that affect change of feeding behavior through feeding experience. However, the cognitive control process related to the change of feeding behavior by feeding experience, which is "mice stop feeding of low-preferred food to anticipate high-preferred food after the experience of eating high-preferred food," has not been clarified. In this study, we hypothesized that there is a memory created when mice recognize high-preference food, and we aimed to reveal the cognitive control processes that induce changes of feeding behavior between high-preference and low-preference food. First, male mice were fasted for 22 hours, and then fed 2.0-2.5 g of normal diet per day for 2 days. After that, the mice were fed a normal diet freely for 2 hours, and then fasted for 22 hours, for 2 days. After this fasting process for 5 days, the mice were fed a normal diet freely for 30 minutes, followed by a high preference diet of cheese for 30 minutes, and the amount of food consumed by the normal diet and the high preference diet were measured. As a result of repeating this measurement for 5 days, it was confirmed that the amount of normal food intake decreased and the amount of cheese intake increased with each passing day, suggesting that the mice expected the high preference food to cause food intake suppression.

preference, eating suppression, mice

発表責任者：鶴山和人（tsuruyama-kazuto690@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G03-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

ラットはリック回数を調節することで一定量のビタミン C を選択摂取する

Rats consume a certain amount of VC by controlling the number of licks.

○沼上 真佑[1]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院、[2]明治大)
○Mayu Numagami[1], Asako Takenaka[2] ([1]Grad. Sch., Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景・目的】我々は、ビタミン C（VC）合成能欠如モデルである ODS ラットに VC 含有水と水を同時に呈示すると、VC 含有水の濃度に関わらず、一定量の VC を選択摂取することを報告した。本研究では、この選択摂取行動をさらに詳細に解析する目的で、ODS ラットの野生型である Wistar ラットを用いてリック解析によるビタミン C 選択摂取行動の経時的観察を行った。
【方法・結果】5 週齢の雄性 Wistar ラットを、4 群（2 g/L VC 含有水のみを二瓶呈示、2 g/L VC 含有水と水を二瓶呈示、0.5 g/L VC 含有水と水を 2 瓶呈示、水のみを二瓶呈示）に分けて 14 日間の二瓶選択試験を行った。VC 含有水と水を二瓶呈示する群は飼育 10 日目の二瓶選択試験をリック解析装置内で行い、暗期の活動時間帯における VC 摂取行動を観察した。その結果、Wistar ラットにおいても呈示した VC 含有水の濃度にかかわらず一定量の VC を選択摂取することが確認された。また、VC 含有水および水へのアクセス回数は同程度であるものの、各アクセス時の VC 含有水のリック回数が水と比較して低値であることが確認された。
【結論】ラットはいずれの濃度の VC 含有水にも水と同等の頻度で継続的にアクセスするが、VC 水の濃度に応じてリック回数を調節することで、一定量の VC を選択摂取することが示された。

We have reported that ODS rats that lacks the ability to synthesize vitamin C (VC), selectively consumed a certain amount of VC in two-bottle choice tests of water and VC solution, regardless of the concentration of VC. In this study, we examined this ingestive behavior in more detail by analyzing licking behavior in Wistar rats, the wild type of ODS rats.
Five-week-old male Wistar rats were divided into four groups and used for a two-bottle choice tests (two bottles of 2 g/L VC solution, 2 g/L VC solution and water, 0.5 g/L VC solution and water, and two bottles of water) for 14 days. For the rats presented with VC solution and water, the two-bottle choice tests were performed in the lick analyzer on the 10th day of the test period, and VC ingestive behavior was analyzed during the active/dark period.
The results showed that rats continuously accessed any concentration of the VC solution at the same frequency as water, but consumed a certain amount of VC by controlling the number of licks according to the concentration of the VC solution.

vitamin C, ingestive behavior, licking

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：2G03-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

2-アラキドノイルグリセロールはマウスにおいて CB1-CCK シグナル経路を介して胃排出を抑制する
2-Arachidonoyl glycerol suppresses gastric emptying via the cannabinoid receptor 1-cholecystokinin signaling pathway in mice

○落合 啓太、比良 徹（北大院・農）
○Keita OCHIAI, Tohru HIRA (Hokkaido Univ.)

2-モノアシルグリセロールは食事脂質の消化産物の一つである。これまでの研究で、アラキドン酸がグリセロール骨格の *sn*-2 位に結合した 2-アラキドノイルグリセロール（2-AG）がマウス小腸由来の消化管内分泌細胞株である STC-1 細胞において、カンナビノイド受容体 1 （CB1）を介してコレシストキニン（CCK）分泌を誘導することを見出した。CCK は小腸上部に散在する消化管内分泌細胞から分泌される消化管ホルモンであり、生理作用の一つに胃排出の抑制が知られている。本研究では、胃排出速度を評価する代表的な試験であるアセトアミノフェンおよびフェノールレッド試験により、マウスにおける 2-AG の胃排出抑制作用およびその作用機構を検討した。一晩絶食させたマウスに 2-AG を経口投与したところ、投与 15 分後の尾静脈血中アセトアミノフェン濃度および胃排出率が未投与群に比べて有意に低下し、胃排出の抑制が観察された。この 2-AG の胃排出抑制作用は CCK-A 受容体アンタゴニストの腹腔内投与処理、CB1 アンタゴニストの経口または腹腔内投与処理、いずれの処理によっても解除された。さらに、経口投与同様に 2-AG の腹腔内投与は胃排出を抑制した。これらの結果から、マウスにおいて経口摂取した 2-AG は 1）CCK 産生消化管内分泌細胞に発現する CB1 を活性化し CCK 分泌を促進、2）直接迷走神経に発現する CB1 に作用、の 2 つの経路を介して胃排出を抑制することが示された。

2-Monoacylglycerol (2-MAG) is one of the digestive products of dietary lipids. We previously demonstrated that a 2-MAG, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) potently stimulated cholecystokinin (CCK) secretion via cannabinoid receptor 1 (CB1) in a murine CCK-producing cell line, STC-1. CCK is a gastrointestinal hormone secreted by enteroendocrine cells in the upper small intestine and suppresses gastric emptying. In this study, we investigated the effect of 2-AG on gastric emptying and its mechanism of action in mice by acetaminophen and phenol red test. Orally administered 2-AG suppressed the gastric emptying rate in fasted mice. The inhibitory effect of 2-AG on gastric emptying was counteracted by either intraperitoneal administration of CCK-A receptor antagonist or oral or intraperitoneal administration of CB1 antagonist. Furthermore, intraperitoneal administration of 2-AG inhibited gastric emptying. These results indicate that 2-AG exhibits an inhibitory effect on gastric emptying in mice, possibly mediated by stimulating both CCK secretion via CB1 expressed in CCK-producing cells and acting on CB1 expressed in the peripheral nerves.

2-arachidonoyl glycerol, cholecystokinin, gastric emptying

発表責任者：比良 徹（hira@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2G03-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

出芽酵母での過剰なトリプトファンによるロイシンの相対的欠乏

Relative deficiency of leucine due to excess tryptophan in *Saccharomyces cerevisiae*

○大橋 一登（群大生調研）
○Kazuto Ohashi (Gunma Univ. IMCR)

タンパク質構成アミノ酸は一般に 20 種類で、これらは生体に必須の化合物である。生体内で必要量を生合成できないアミノ酸は、外部から摂取する必要がある。その一方で、必要最低限のアミノ酸を摂取しても、摂取するアミノ酸に極端な偏りがあると生育が抑制されるアミノ酸インバランスという現象が知られている。しかし、その詳細は不明である。これまでに真核生物のモデル細胞である出芽酵母の BY4741 株は、最小完全培地においてトリプトファン（Trp）を過剰に与えると生育が抑制されることを見出した。さらに、過剰な Trp に加えて、トリプトン（タンパク質分解物）やロイシン（Leu）を添加することで、生育が回復することも明らかにした。これらの結果から、高濃度 Trp による生育抑制はアミノ酸インバランスに相当し、過剰量の Trp は Leu の相対的な欠乏を引き起こすと推測された。実際、Leu が少ない培地では、中程度の Trp 濃度でも生育遅延を引き起こすことが示された。さらに、細胞内に Trp が蓄積する傾向が認められた Aro9 遺伝子欠損株は、Leu 要求性を示すことが明らかになった。なお、Aro9 は過剰な Trp の分解に重要と考えられる酵素である。これらのことから、細胞内で Leu と Trp のバランスを感知し、生育を制御する仕組みの存在が推測された。

Proteinogenic amino acids are essential for living organisms and must be intake from outside depending on auxotrophy of amino acid. On the other hand, adding excess amino acid to the balanced amino acid nutrient causes adverse effect on the organisms, which is known as amino acid imbalance, indicating the relative deficiency of amino acids. However, the details are still unknown. So far, we have found that the BY4741 strain of *Saccharomyces cerevisiae*, which is a model organism for the eukaryote cells, show growth defect on the minimum complete medium with excessive Tryptophan (Trp). Further study revealed that the growth was restored by adding tryptone (proteolytic product) or Leucine (Leu) in addition to the excess Trp. These results indicated that the growth deficiency by excess Trp corresponds to amino acid imbalance, and that excess Trp causes a relative deficiency of Leu. In fact, the growth was suppressed even by moderate levels of Trp with low levels of Leu. Furthermore, deletion mutant of Aro9, which is suggested to be an important enzyme for degradation of excess Trp, tended to accumulate Trp in the cell and showed Leu auxotrophic phenotype. These data suggested the presence of the mechanism for the growth control by sensing the balance between Leu and Trp in the cell.

Tryptophan, Leucine, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：大橋一登（ohashi@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2G03-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

非ストレス下マウスのうつ関連行動と脳内分子発現は標準飼料の種類やタンパク質源によって影響を受ける

Depression-related behavior and brain molecular expression in unstressed mice are affected by different types of standard diets and its protein source.

○山本 咲希[1]、小崎 寛明[1]、安田 時生[1]、瀬々 航紀[1]、藤原 和人[1]、古屋 茂樹[1,2,3] ([1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]イノベ・バイオアーキ)
○Saki YAMAMOTO[1], Hiroaki KOZAKI[1], Tokio YASUDA[1], Koki ZEZE[1], Kazuto FUJIHARA[1], Shigeki FURUYA[1,2,3] ([1]Grad. Biores. Bioenv. Kyushu Univ., [2]Fac. Agric. Kyushu Univ., [3]iBAC)

マウスのストレス条件下でのうつ様行動に標準飼料の違いが影響することが報告されている。しかし、飼料成分が脳内分子発現に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。本研究では、食事成分が気分障害関連行動と脳内分子発現に及ぼす影響を評価することを目的に、1）精製飼料と未精製飼料の給餌が非ストレス条件でのうつ様行動と脳内分子発現に及ぼす違い、2）大豆成分の作用について評価した。精製飼料（AIN-93M）と市販未精製飼料(CE-2)を非ストレス下２週間の自由摂食による飼育後、うつ様行動の指標であるアンヘドニアをショ糖嗜好性試験で評価すると両群間で有意に異なり、同時にモノアミン代謝と遺伝子発現も変化していた。今回用いた CE-2 には大豆粕が含まれるため、我々は大豆由来タンパク質の作用に着目した。AIN-93M 含有タンパク質の半量を大豆ペプチドに置換したものを給餌し AIN-93M 摂食群と比較すると、アンヘドニアおよび大脳皮質での遺伝子の発現に顕著な差異が認められた。よって、大豆由来タンパク質/ペプチド類は、上記脳機能変化の一端を担う可能性が示唆された。

It has been reported that different standard diets affect depression-like behaviors in mice under stress conditions. However, the effects of dietary components on the molecular expression in the brain remains largely clarified. The present study aimed to evaluate the effects of dietary ingredients on mood disorder-related behaviors and brain molecule expression by 1) evaluating the effects of feeding semi-purified and non-purified diets on depressive-like behaviors and brain molecule expression under non-stress conditions, and 2) evaluating the effects of soy-derived ingredient. After 2 weeks of feeding a semi-purified diet (AIN-93M) and a commercial non-purified diet (CE-2) under non-stress conditions, anhedonia, an indicator of depressive-like behavior, was evaluated by the sucrose preference test and was significantly different between the two groups, which was accompanied by altered monoamine metabolism and gene expression in the cerebral cortex. Since CE-2 contains soybean cake, we focused on the effect of soy-derived proteins and compared the AIN-93M group with the AIN-93M group fed with soy peptides replacing half of the protein in AIN-93M. As a result, we observed significant differences in anhedonia and gene expression in the cerebral cortex. Thus, soy-derived proteins/peptides may play a role in the above behavioral and molecular changes.

Soy, Depression, Brain

講演番号：2G03-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム G

肥満ラットの肝オートファジーに対するカロテノイド摂取の効果

Effect of Carotenoids Intake On Hepatic Autophagy in Obese Rats

○金沢 匠、細山田 康恵（千葉県立保健医療大・栄養）
○Takumi KANAZAWA, Yasue HOSOYAMADA (Chiba Prefectural University of Health Sciences.)

【目的】オートファジーは、たんぱく質やオルガネラなどを分解することで細胞の恒常性維持に寄与している。本研究では、カロテノイド（β-カロテン：βCA、ゼアキサンチン：ZEA）の肥満ラットの肝オートファジーに対する効果を検討した。【方法】6 週齢の Zucker ラットを基準食（N）、0.05%βCA 食（C）、0.05%ZEA 食（Z）で 2 週間飼育し、野生型ラットは基準食（W）で飼育した。肝臓におけるオートファジー関連たんぱく質（LC3、ATG5、p62）、シャペロン介在性オートファジー（CMA）関連たんぱく質（HSC70、LAMP2A）、脂肪滴たんぱく質（PLIN2）はウェスタンブロットで分析した。また血清インスリン（INS）及びグルカゴン（GLN）濃度と血糖値（GLU）についても分析した。【結果・考察】N 群では W 群に比べて総 LC3（LC3-Ⅰ及びⅡ）量が低下し、PLIN2 量が増加した。また、ミトコンドリア/リソソーム画分中の HSC70 量が低下した。Z 群では N 群に比べて総 LC3 量、ATG5 量及び HSC70 量が増加し、PLIN2 量が減少した。この結果から、ZEA は肥満ラットの肝臓で見られるオートファジー及び CMA の低下を改善し、PLIN2 分解を促進することが示された。また ZEA は肥満ラットで増加した INS、GLN、GLU の改善作用も示した。

Autophagy is essential to the maintenance of cellular homeostasis through the degradation of cellular components. This study aims to investigate the effect of carotenoids (β-carotene: βCA, zeaxanthin: ZEA) on hepatic autophagy in obese rats. Six-week-old Zucker rats were fed a normal diet (N), 0.05%βCA diet (C), and 0.05%ZEA diet (Z) for 2 weeks. Wild-type rats were fed a normal diet (W). Autophagy indicators (LC3, ATG5, p62), chaperone-mediated autophagy (CMA) indicators (HSC70, LAMP2A), and lipid droplet protein (PLIN2) in the liver were detected using western blot. Serum insulin (INS), glucagon (GLN), and blood glucose levels (GLU) were analyzed. In group N, the levels of total-LC3 (LC3-Ⅰ and Ⅱ) decreased, and that of PLIN2 increased compared with group W. The level of HSC70 in mitochondria/lysosome fraction decreased. In group Z, the levels of total-LC3, ATG5, and HSC70 increased, and that of PLIN2 decreased compared with group N. These results indicate that ZEA improves the decreased hepatic autophagy and CMA and facilitates PLIN2 degradation in obese rats. Additionally, ZEA regulates the increased levels of INS, GLN, and GLU in obese rats.

Autophagy, Carotenoid, Obese rats

発表責任者：金沢匠（takumi.kanazawa@cpuhs.ac.jp）

講演番号：2G05-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

Lactiplantibacillus plantarum FL-664 培地中のグルタミン酸はマウス脾臓細胞における IL-12(p40) 産生誘導能へ影響する

Glutamate in the medium of *Lactiplantibacillus plantarum* FL-664 affects the production of IL-12(p40) on murine spleen cells

○川本（宮本） 乃理子[1]、細田 浩司[2]、三吉 和之[1]、野本 康二[2]([1]大洋香料株式会社、[2]東農大・生命)
○Noriko KAWAMOTO-MIYAMOTO[1], Hiroshi HOSODA[2], Kazuyuki MIYOSHI[1], Koji NOMOTO[2] ([1]Taiyo Corp., [2]Tokyo Univ Agri.)

【背景・目的】近年、乳酸菌を含む食品は嗜好品としてだけでなく、免疫調節などの機能性をもつ食品として注目されている。研究段階では一般的に、乳酸菌の要求栄養分を豊富に含んだ試薬グレード培地（MRS）で培養した乳酸菌が使用されるが、MRS 培地には国内で食品利用できない原料も含まれている。そのため、乳酸菌の商業利用にあたっては、食品原料を組み合わせた培地を設計する必要があるが、効率よく増殖させること、機能性を維持・増進することも同時に求められる。
【方法】パインアップル由来乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* FL-664（FL-664）をオリジナルの食品グレード培地（FG）と MRS 培地で培養して、増殖性と機能性を比較した。
【結果・考察】FG 培地で培養した FL-664 は MRS 培地で培養した FL-664 より、細胞サイズが小さく、収量が多く、かつ in vitro のマウス脾臓細胞による IL-12(p40)産生の誘導能が高かった。さらに、FG 培地の一部を改変して要因を探索したところ、グルタミン酸（Glu）の濃度が高いほど上記の FL-664 の性質の違いがより明確であった。

Lactic acid bacteria (LAB) have been attracting attention for their effects on innate immunity, and therefore, it is required to develop an efficient culturing method while maintaining their functionality. In this study, first, we compared the growth and functionality of LAB cultured on food grade medium (FG) with those on standard LAB medium (MRS), and found that LAB cultured in the FG medium were smaller in cell size with high yield and had a higher ability to induce IL-12(p40) production by murine spleen cells in vitro. Moreover, the higher the glutamate concentration in the medium, the smaller the cell size, the higher the yield and the higher the ability to induce IL-12 production. Addition of glutamate to the culture medium changes the size of LAB and affects their ability to induce IL-12(p40) production. In conclusion, regulating the concentration of glutamate would be important in the efficient culturing of functional LAB.

lactic acid bacteria, bacterial count, innate immunity

発表責任者：川本（宮本）乃理子（n.kawamoto@taiyo-koryo.co.jp）

講演番号：2G05-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

Apilactobacillus 属乳酸菌由来リポテイコ酸による特異な粘膜免疫誘導能

The role of lipoteichoic acid from lactic acid bacteria belonging to the genus *Apilactobacillus* to induce strong IgA response

○田中 美羽[1]、白石 宗[2]、中島 由香里[1]、東村 泰希[3]、山本 憲二[4]、横田 伸一[2]、邱 泰瑛[5]、松崎 千秋[1]、高橋 知也[6] ([1]石川県大・資源研、[2]札幌医大、[3]石川県大・生資環、[4]和歌山大、[5]北見工大、[6]（株）アルソア慧央グループ)

○Miu TANAKA[1], Tsukasa SHIRAISHI[2], Yukari NAKASHIMA[1], Yasuki HIGASHIMURA[3], Kenji YAMAMOTO[4], Shin-ichi YOKOTA[2], Tai-Ying CHIOU[5], Chiaki MATSUZAKI[1], Tomoya TAKAHASHI[6] ([1]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Sapporo Med. Univ., [3]Fac. Bioresour. Environ., Ishikawa Pref. Univ., [4]Wakayama Univ., [5]Kitami Inst. Technol., [6]Arsoa Keioh Group Corp.)

発酵食品中の乳酸菌は発酵を担う微生物であるとともに、発酵食品の機能性向上に寄与している。野菜や糖分を主原料として自然発酵させた野菜発酵液は日本の伝統発酵食品のひとつであり、健康増進効果が期待されて各地で愛飲されているが、健康増進に寄与する成分に関しては未だ不明な点が多い。我々は発酵液中の菌叢の 50%以上を占める乳酸菌 *Apilactobacillus kosoi* が免疫増進効果を与えていると考え、マウスのパイエル板細胞を用いて、イムノグロブリン A (IgA)産生を誘導する活性を 30 種の乳酸菌基準株と比較して調べたところ、*Apilactobacillus* 属に高い増強活性があることを見出した。そこで自然免疫を誘導する乳酸菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸(LTA)を、*Apilactobacillus* 属の 3 菌種（*A. kosoi* 10H^T, *A. apinorum* JCM30765^T, *A. kunkeei* JCM16173^T)、*Lactiplantibacillus plantarum* JCM1149^{T}および *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG の計 5 菌種より抽出精製し、IgA の産生誘導活性を比較したところ、*Apilactobacillus* 属菌の LTA にのみ高い増強活性を見出し、本属特異的な IgA 誘導活性が示唆された。さらに、*Apilactobacillus* 属乳酸菌の LTA の構造を初めて解析し、他の乳酸菌由来の LTA と比較した。

Lactic acid bacteria-containing fermentates provide beneficial health effects by regulating immune responses. A naturally fermented vegetable beverage is one of the traditional foods and is regarded as exerting health benefits, but the beneficial function of bacteria has not been clarified. *Apilactobacillus kosoi* is a predominant lactic acid bacterium in the fermented beverage. Using murine Peyer's patch cells, we compared the immunoglobulin A (IgA)-inducing ability of *A. kosoi* 10H^T to those of 30 other species of lactic acid bacteria. The result revealed that three species belonging to the genus *Apilactobacillus* (*A. kosoi* 10H^T, *A. apinorum* JCM30765^T, and *A. kunkeei* JCM16173^T) induced significantly higher IgA production than the species of other genera. Then, lipoteichoic acid (LTA), an important immunostimulatory molecule which is the cell wall component of Gram-positive bacteria, was purified from the three species of the *Apilactobacillus*, and from *Lactiplantibacillus plantarum* JCM1149^T and a probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. We compared their IgA-inducing activities and found that LTAs from the three species of *Apilactobacillus* possessed significantly higher IgA-inducing activity than the others. We also compared LTA structures of *A. kosoi* 10H^T, *L. plantarum* JCM1149^T, and *L. rhamnosus* GG.

lipoteichoic acid, *Apilactobacillus*, IgA

発表責任者：松崎千秋（chiaki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2G05-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

玄米中に含まれる成分の免疫力活性化機構の解析

Analysis of the immune-activation mechanism by a component in brown rice.

○萩原 真[1]、永野 忠聖[1]、松下 健二[2] ([1]新潟県大、[2]国立長寿研)
○Makoto HAGIWARA[1], Tadasato Nagano[1], Kenji Matsushita[2] ([1]Univ. of Niigata Pref., [2]NCGG)

玄米のぬかには、グラム陰性菌由来の LPS が多量に含まれており、玄米食は、免疫力を活性化すると言われている。実験的に、LPS をマウスなどに多量に静脈投与すると炎症が惹起されるが、LPS を、食事で摂取する場合は、体内への吸収は少量で炎症は起こらないとされている。一方、自然免疫に重要なマクロファージには細菌などを取り込み分解する機構であるファゴサイトーシス（エンドサイトーシスの一種）が発達している。ファゴサイトーシスには低分子量 G タンパク質 Rab5 が重要な役割を担っていることが知られている。そこで、本研究では、玄米中に含まれる LPS の細胞内でのファゴサイトーシス活性化機構について、培養細胞を用いて解析したので報告する。まず、稲より同定されていることが報告されている E. asburiae よりホットフェノール水抽出法で *E. asburiae* 由来 LPS(E.a.LPS)を精製し、SDS-PAGE 法と銀染色法で解析した。次に、E.a.LPS をマクロファージ様細胞である U937 細胞に添加すると、Rab5 の発現が上昇することや活性型 Rab5 の総量も上昇するとともに、FM4-64 を用いたエンドサイトーシスアッセイにおいて、エンドサイトーシスが上昇した。これらのことより、E.a.LPS がエンドサイトーシスを活性化することが明かとなった。現在、E.a.LPS がファゴサイトーシスを活性化させるか検討を行っているところである。

Bran in brown rice contains a large amount of LPS and brown rice diet is said to activate immunity. By intravenous administration of large amounts of LPS to experimental animal such as mice trigger inflammation. On the other hands, dietary LPS do not trigger inflammation, because its absorption into the body is small amount. In macrophages, which are important for natural immunity, phagocytosis, a type of endocytosis, has developed. Rab5, a small GTP-binding protein is known to play an important role in phagocytosis. In the present study, we analyzed the mechanism of activation of phagocytosis in LPS using a cultured cell. First, we purified *E. asburiae* LPS (E.a.LPS) by hot phenol water extraction method from *E. asburiae*, which has been identified from rice. By adding purified E.a.LPS to macrophage-like U937 cells, we made it clear that E.a.LPS increased Rab5 expression, Rab5 activity and endocytosis. These data indicate E.a.LPS activates endocytosis. We are currently analyzing whether E.a.LPS activates phagocytosis.

macrophage, phagocytosis, LPS

発表責任者：萩原真（hagimako@unii.ac.jp）

講演番号：2G05-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

野沢菜由来多糖による抗腫瘍効果のメカニズム

Anti-tumor activity of a polysaccharide from *Brassica rapa* L.

○田中 沙智[1]、遠藤 勝紀[1]、沈 輝棟[2]、王 向東[2]、北村 秀光[2] ([1]信州大農、[2]北大遺制研)
○ Sachi TANAKA[1], Katsunori ENDO[1], Weidong SHEN[2], Xiangdong WANG[2], Hidemitsu KITAMURA[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Hokkaido Univ.)

信州の伝統野菜である「野沢菜」は、葉と茎を塩漬けにした野沢菜漬けとして食されている。当研究室では、野沢菜由来多糖（NPS）がマクロファージを活性化させ、免疫賦活効果を示すことを明らかにしている。一方、植物の葉や茎、果実、海藻に含まれる多糖には免疫賦活作用を介した抗腫瘍効果を示すものが存在する。そこで本研究では、NPS のマクロファージを介した抗腫瘍効果を検証し、その作用メカニズムの解明を目的とした。野沢菜の熱水抽出物からエタノール沈殿法を用いて NPS を調製した。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に NPS を添加し、24 時間培養したところ、培養上清中の TNF-α、IL-6、一酸化窒素（NO）の産生レベルが増加した。また、この培養上清をマウス乳がん細胞株である 4T1 細胞に添加したところ、4T1 細胞のアポトーシスが誘導された。加えて、TNF-α の中和抗体で処理したところ、NPS によるアポトーシスの誘導が抑制されたことから、NPS による抗腫瘍効果は TNF-α を介していることが示された。さらに、BALB/c マウスに 4T1 細胞を担癌し、その後、NPS を腫瘍内投与したところ、腫瘍体積および腫瘍重量が NPS の投与により有意に低下した。以上のことから、野沢菜由来の多糖はマクロファージから産生される TNF-α を介して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

Brassica rapa L. is processed mainly into pickled products called Nozawana-zuke, which are local specialties in Nagano area. We have previously shown the immunostimulatory effects by the polysaccharides from *B. rapa* L (Nozawana polysaccharide: NPS). Polysaccharides from plants, fruits, and seaweeds have been shown the anti-tumor activity mediated by immunostimulatory effects. In the present study, we evaluated the anti-tumor activity of NPS mediated by macrophage activation. NPS was isolated from the hot water extract of *B. rapa* L. by ethanol precipitation method. Treatment of RAW264 murine macrophage cell line with NPS increased TNF-α, IL-6, and nitric oxide (NO) production. In addition, NPS induced apoptosis significantly against 4T1 murine breast cancer cells cultured in conditioned medium from NPS-treated macrophages. This anti-tumor activity of NPS decreased by the treatment of anti-TNF-α mAb, suggesting that TNF-α produced by RAW264 cells stimulated with NPS induced apoptosis of 4T1 cells. In tumor-bearing mouse model, tumor growth was significantly reduced in NPS-treated mice compared with control mice. Taken together, our results indicate that the anti-tumor activity of NPS on 4T1 cells is mediated by TNF-α from NPS-stimulated macrophages.

Polysaccharide, Anti-tumor activity, *Brassica rapa* L.

発表責任者：田中 沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2G05-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

漬物由来乳酸菌 SSL-1 による IL-12 発現亢進の作用機序解析

Analysis of regulatory mechanism of IL-12 enhancement by SSL-1 strain.

○柴田 奈那[1]、村田 美樹[2]、浅見 進也[2]、日浦 月穂[1]、林 秀謙[3]、薩 秀夫[3] ([1]前橋工大院工、[2](株)新進・総合研究所、[3]前工大工)
○Nana SHIBATA[1], Miki Murata[2], Shinya Asami[2], Tsukiho Hiura[1], Hidenori Hayashi[3], Hideo Satsu[3] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Shin-Shin Foods Co.,Ltd., [3]Maebashi Inst. Technol.)

【目的】サイトカインの一種であるインターロイキン 12（IL-12）は、生体防御において主要な免疫細胞であるナチュラルキラー（NK）細胞を活性化することが報告されている。IL-12 はある種の乳酸菌などを認識したマクロファージや樹状細胞から分泌されるが、本研究グループではこれまでに、漬物由来乳酸菌である SSL-1 株がマクロファージモデル細胞における IL-12 発現・分泌を亢進することを見出した。本研究では、SSL-1 株による IL-12 亢進の特性・作用機序についてさらに検討を進めた。
【方法・結果】マクロファージモデル J774.1 細胞に SSL-1 株を添加し、3 時間インキュベート後、細胞より RNA を抽出し real-time PCR 法を用いて IL-12 の mRNA 発現量を測定した。まず SSL-1 株について生菌または死菌で比較したところ、死菌の方が強く IL-12 の mRNA 発現を亢進した。次に、SSL-1 株の培養条件について検討したところ、35℃で 48 時間培養した場合に比べて 30℃で 24 時間培養したほうが強く IL-12 の mRNA 発現を亢進した。また本菌株を RNase 処理することによって IL-12 の mRNA 発現亢進は有意に抑制されたことから、SSL-1 株より RNA を抽出し添加したところ、IL-12 の mRNA 発現量は有意に増加した。さらに SSL-1 株による IL-12 発現誘導には、RNA を認識する TLR である TLR8 に加えて、MyD88 が関与することが示された。一方で転写因子 IRF5 は関与しないことが示唆され、現在、他の転写因子の関与について解析を進めている。
【Objectives】Interleukin-12 (IL-12) has been reported to activate natural killer (NK) cells that are initial immune cells in the biophylatic mechanism. IL-12 is secreted from macrophages or dendritic cells exposed to certain types of lactic acid bacteria (LAB). We have found that SSL-1, a lactic acid bacteria derived from pickles, enhances IL-12 expression and secretion in macrophage model cells. In this study, we further investigated the characteristics and mechanism of IL-12 enhancement by SSL-1 strain.
【Methods and Results】Macrophage model J774.1 cells were incubated with SSL-1 strain for 3 hours, and RNA was extracted from the cells. mRNA expression of IL-12 was measured using real-time PCR. We compared live and heat-killed SSL-1, and found that the heat-killed strains strongly increased IL-12 mRNA expression. Further, RNA extracted from SSL-1 increased IL-12 expression, suggesting that RNA is one of the active factor in SSL-1. TLR8 and MyD88 was shown to be involved in the induction of IL-12 expression by the SSL-1 strain, while IRF5 was not involved.

IL-12, Lactic acid bacteria, Macrophage

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2G05-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

微細藻類ユーグレナとパラミロンの免疫制御の機序についての検討

An immune regulatory mechanism mediated by *Euglena gracilis* and paramylon

○中島 綾香[1]、安田 光佑[1]、鈴木 健吾[1]、安達 貴弘[2]([1]株式会社ユーグレナ、[2]東京医科歯科大学)
○ayaka NAKASHIMA[1], Kosuke YASUDA[1], Kengo SUZUKI[1], Takahiro ADACHI[2] ([1]Euglena Co.,Ltd., [2]Tokyo Medical and Dental University)

微細藻類ユーグレナは、ビタミン類、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸など幅広い栄養素、また貯蔵多糖としてのパラミロン（β-1,3-グルカン）を含んでおり、食品やサプリメントとして活用されている。これまでに、ユーグレナ粉末もしくはパラミロン粉末の摂取によって、インフルエンザ感染症状の緩和、アトピー性皮膚炎症状緩和等、免疫が関わる諸症状の緩和が確認されている。また、2020 年大会では、樹状細胞特異的に YC3.60 を発現させた YC3.60^{flox}/ CD11c-Cre マウスを用いて、ユーグレナ粉末および、パラミロン粉末を腹腔内投与後に、小腸パイエル板に局在する樹状細胞の Ca^{2+}シグナルが上昇していることを発表した。本実験では、マウス脾臓由来細胞にユーグレナ粉末またはパラミロン粉末を添加し培養した細胞を用いた解析を行い、免疫系への機能の機序解明を目的とした。マウス脾臓由来細胞へユーグレナ粉末またはパラミロン粉末を添加し、48 時間培養後のサンプルの RNA sequence 結果を行い、変動遺伝子についてエンリッチメント解析をしたところ、ユーグレナ粉末でもパラミロン粉末でも発現を増していたが、パラミロン粉末添加でより強く regulation of inflammatory response（炎症反応の制御）、leukocyte differentiation（白血球の分化）などに関わっていることが示唆された。また、パラミロン添加で、濃度依存的に CD4 陽性 T 細胞の CD69 の発現上昇、および B 細胞の CD86 の発現上昇が見られ、T 細胞及び B 細胞を活性化させることが示唆された。これらの結果は、ユーグレナ粉末およびパラミロン粉末が免疫系に影響を及ぼす作用機序を解明するための一助となることが期待される。

Euglena gracilis Z (Euglena) is a single-celled microalga with characteristics of both plants and animals. It is abundant in nutrients such as paramylon (β-1, 3-glucan), vitamins, minerals, amino acids, and fatty acids, and is used as a food supplement and/or nutritional supplement. The aim of this study was to clarify the immune regulatory mechanism mediated by Euglena and/or paramylon. Transcriptome analysis was performed on the variable genes of cells to which either Euglena powder or paramylon powder was added. Then, it was suggested that the addition of paramylon was involved in the regulation of inflammatory response and leukocyte differentiation. It was also suggested that the addition of paramylon activated T cells and B cells in a concentration-dependent manner. These findings support the mechanism of action by which Euglena powder and Paramylon powder affect the immune system.

Euglena, paramylon, Immunity

講演番号：2G05-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 によるパイエル板 IgA 産生増強作用
The effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 on IgA production in Peyer's patch cells

○溝渕 響子[1]、中川 稜悟[1]、塩原 幸[1]、WANG YIMEI[1]、藤岡 郁美[2]、内田 健治[2]、元島 英雅[2]、薩 秀夫[3]、足立(中嶋) はるよ[1]、八村 敏志[1]([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]よつ葉乳業・中央研、[3]前橋工大・生物工)
○ Hibine MIZOBUCHI[1], Ryogo NAKAGAWA[1], Miyuki SHIOBARA[1], Yimei WANG[1], Ikumi FUJIOKA[2], Kenji UCHIDA[2], Hidemasa MOTOJIMA[2], Hideo SATSU[3], Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]R&D Cent., Yotsuba Milk Products, [3]Dept. Biotechnology, Maebashi Inst. Tech.)

【目的】発酵乳ケフィア由来乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 株は抗アレルギー作用が期待される乳酸菌であり、シラカバ花粉症における二重盲検試験において症状緩和効果が示されている。制御性 T 細胞（Treg）がアレルギー炎症を抑制することが示唆されている。これに関し、我々は本株がマウス腸間膜リンパ節（MLN）樹状細胞（DC）へ作用し、レチノイン酸の生成に関わる RALDH2、TGF-β 活性化機能を有するインテグリン αvβ8 等の遺伝子発現を増強させ、Treg を誘導することを明らかにしている。一方で、IgA 抗体についても、アレルゲンの侵入を防ぎアレルギーを抑制する可能性が示されている。そこで本研究では、パイエル板（PP）細胞における IgA 産生に対する本株の作用について検討した。
【方法】BALB/c マウスの PP 細胞を調製し、*L. cremoris* YRC3780 菌体を添加し培養を行い、3 日後の IgA 抗体量とサイトカイン産生量を ELISA 法により定量した。
【結果】PP 培養系において *L. cremoris* YRC3780 菌体の添加により、IgA 抗体産生量、IL-6 産生量が濃度依存的に有意に増加した。また、非活性型の TGF-β (latent TGF-β)、活性型の TGF-β (active TGF-β) を測定したところ、どちらも乳酸菌添加による有意な変化は見られなかった。これらの結果から、本株が PP 細胞における IgA 抗体産生を促進する効果があることが明らかになり、その作用機序に IL-6 産生促進が関与している可能性が示された。
[Background] *L. cremoris* YRC3780, derived from fermented milk kefir, is suggested to be effective in alleviating symptoms in a double-blind study of birch pollen allergy. We have shown that this strain acts on mouse mesenteric lymph node dendritic cells and induces regulatory T cells, which may be related to its anti-allergic effects. IgA antibody is considered to alleviate allergy by preventing invasion of antigens. In this study, we investigated the effects of this strain on IgA production in Peyer's patch (PP) cells. **[Methods]** PP cells of BALB/c mice were cultured in the presence of the bacteria, and IgA and cytokine concentrations (IL-6 and TGF-β) in supernatants were measured by ELISA. **[Results]** The productions of IgA and IL-6 from PP cells were significantly increased by the addition of *L. cremoris* YRC3780. The production of either latent (inactive) TGF-β or active TGF-β was not changed. Our results demonstrate that this strain can increase the production of IgA and imply that this was mediated by enhancing IL-6 production.

Lactococcus lactis, Peyer's patch, IgA

発表責任者：八村敏志（ahachi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G05-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

水溶性米ぬか抽出物の免疫賦活化能の解析

The analysis for immunostimulatory effect of soluble components from rice bran

○野沢 里緒[1]、樋口 央紀[2]、戸田 雅子[1] ([1]東北大農、[2]東北大 NICHe)
○Rio Nozawa[1], Oki Higuchi[2], Masako Toda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ. NICHe)

米糠には多くの三次機能が期待されており、そのうちの一つに免疫機能性があげられる。本研究は米糠の免疫賦活能についての解析を目的としている。我々はこれまでに、米糠の水溶性画分には樹状細胞に対する賦活化成分が含まれていることを見いだしている。本研究では米糠成分の T 細胞応答に対する効果を解析するために、骨髄由来マウス樹状細胞（bone-marrow derived murine dendritic cells : BMDC）と CD4 陽性 T 細胞の共培養試験を行った。その結果、米糠成分存在下での培養上清中にＴ細胞由来サイトカイン IL-2、IFN-γ、IL-17A が検出された。この T 細胞によるサイトカイン産生は BMDC 非存在下では極めて弱かった。次に樹状細胞賦活化に関与する受容体を同定するため各種受容体阻害剤を用いたところ、トル様受容体（Toll like receptor :TLR）4 の阻害剤 Tak242 が BMDC 賦活化を顕著に阻害した。TLR4 は共役分子 MD-2 と複合体を形成することで、リポ多糖類（LPS）に結合する。BMDC を LPS あるいは米糠サンプルの存在下で培養した場合、LPS は TLR4/MD2 複合体に対するモノクローナル抗体の結合を阻害したが、米糠サンプルは阻害しなかった。また、米糠サンプルを protease K 処理したところ、BMDC 賦活化能が減少した。以上より、米糠の免疫機能性成分にはタンパク質が含まれていること、この成分は LPS とは異なる形で TLR4 と結合して樹状細胞を賦活化し、さらに T 細胞応答を惹起できることが示唆された。

The aim of our study was to investigate immunological function of rice bran. We previously found that rice bran contains soluble components to induce dendritic cell activation. To see whether the rice bran-derived components also induce T-cell activation, we co-cultured BMDC and $CD4^+$ T-cells in the presence of the components. ELISA analysis detected a certain amount of T-cell derived cytokines IL-2、IFN-γ and IL-17A in the supernatant of co-culture system, whereas only marginal levels of T-cell cytokines were detected in the absence of BMDC. Using inhibitors of putative receptors, we found that TLR4 inhibitor, TAK242 suppressed the effect of rice bran-derived components on BMDC activation significantly. TLR4 is known to bind LPS as a form of complex with co-receptor MD2. Importantly, LPS, but not rice bran-derived components inhibits the binding of monoclonal antibody to TLR4/MD2 complex expressed in BMDC. Protease K treatment reduced the activation effect of the components on the cells but only moderately. The results suggest that functional components in rice bran contain proteins, trigger DC by interact with TLR4 but not via LPS-binding site, and thereby induce T-cell activation.

Rice bran, Innate immunity, Dendritic cells

講演番号：2G05-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

米糀甘酒の免疫賦活効果

The immunostimulatory effect of Koji Amazake

○山田 南実、北川 学、倉石 徹、伊藤 成輝（マルコメ）
○Minami YAMADA, Manabu KITAGAWA, Tooru KURAISHI, Seiki ITOU (Marukome Co., Ltd.)

【目的】近年、免疫力を高めるとして発酵食品への関心が高まっている。「糀甘酒」は、米と米糀を糖化したもの、「糀みつ」は、糀甘酒を濃縮したもので、共に発酵食品であるが、経口摂取による免疫賦活効果については明らかではない。そこで本研究では、免疫賦活効果の検証を目的とした。自然免疫の指標として NK 細胞活性、獲得免疫の指標として、s-IgA 濃度の測定を行った。
【方法】BALB/c マウス（9 週齢,雌）に、糀甘酒または糀みつを 28 日間自由摂取または強制経口投与した後、脾臓 NK 細胞活性、糞便中 s-IgA 濃度の測定を実施した。
【結果】NK 細胞活性について、対照群（水自由摂取）と比較して、糀みつ摂取群で有意に増加した。糞便中 s-IgA 濃度について、対照群（砂糖強制経口投与）と比較して、糀甘酒摂取群、糀みつ摂取群で、摂取 14 日目において有意に高値となり、その後同程度となった。
【考察】糀甘酒及び糀みつは、免疫賦活効果を持つ可能性が示唆された。

【INTRODUCTION】Recently, there has been growing interest in fermented foods as a way to enhance immunity. "Koji Amazake" is made by saccharifying rice and rice malt, and "Koji Mitsu" is concentration of Koji Amazake. Although these are fermented foods, the immunostimulatory effect of ingestion is not clear. Therefore, the aim of this study was to verify the immunostimulatory effect. NK cell activity was measured as an index of innate immunity, and s-IgA concentration was measured as an index of acquired immunity.
【METHODS】We measured NK cell activity in spleen and s-IgA concentration in feces of BALB/c mice (9-week-old, female) after they were ingested Koji Amazake or Koji Mitsu for 28 days by free or forcedly.
【RESALTS】The NK cell activity was significantly increased in the Koji Mitsu group compared to the control group (free ingestion of water). The concentration of s-IgA in feces in the Koji Amazake group and the Koji Mitsu group was higher 14th day after oral administration, compared with the control group (sugar) and then it became the same level.
【 DISCUSSION 】 These results suggested that Koji Amazake and Koji Mitsu have immunostimulatory effects.

koji, amazake, immunostimulatory effect

発表責任者：山田南実（minami_yamada@marukome.co.jp）

講演番号：2G05-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

食品コウジカビの経口投与により誘導された Th1 応答増強効果の持続性

Persistence of Enhancement Effects on Th1 Responses of NOD Mice by Oral Administration of Koji Fungi

○石塚 悠有[1]、吉澤 昂史[1]、西村 遼[1]、内田 妃音[1]、関口 昭博[2]、榎本 淳[1,3]([1]群大院理工、[2]群馬産技セ、[3]群大食健康セ)
○ Yu ISHIZUKA[1], Takashi YOSHIZAWA[1], Ryo NISHIMURA[1], Hinari UCHIDA[1], Akihiro SEKIGUCHI[2], Atsushi ENOMOTO[1,3] ([1]Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Science and Engineering, Gunma University, [2]Gunma Industrial Technology Center, [3]Gunma University Center for Food Science and Wellness)

【目的】演者らはこれまで、食品コウジカビ（黄コウジカビ）を 2 週間に 6 回、NOD マウスに経口投与したところ、マウスの週齢に関わらず Th1 応答が高められること、さらにはそのような効果を得るためには、200～500 μg/匹/回が最適投与量であることなどを見出してきた。本研究では、このような黄コウジカビの Th1 応答増強効果がどれだけ持続するのか検討することを目的とした。
【方法】あらかじめ加熱滅菌処理した黄コウジカビを 8 週齢のメスの NOD マウスに、200 μg/匹/回の投与量で 2 週間に合計 6 回経口投与した。最終投与 3、10、17、45 日後、これらのマウスの脾臓細胞に抗 CD3 抗体を添加して培養し、その際に産生される IFN-γ 量を ELISA により測定した。
【結果および考察】黄コウジカビ投与群と未投与群の普段の様子や体重の変化、脾臓細胞数を比較したところ、両群間で有意差はなく、黄コウジカビの経口投与は NOD マウスに健康上の悪影響を与えないと考えられた。Th1 系の代表的なサイトカインである IFN-γ は抗 CD3 抗体刺激時には強く産生された。その産生量を黄コウジカビ投与群および未投与群で比較したところ、最終投与 3 日後では前者で高くなることが明らかとなったものの、最終投与 10 日後以上経過した場合は、そのような Th1 応答増強効果は観察されなかった。さらに、黄コウジカビを 600 μg/匹/回で 2 週間に 2 回経口投与した場合においても、Th1 応答増強効果は認められなかった。これらの結果から、黄コウジカビが Th1 応答増強効果を発揮するためには、その継続的な経口投与が必要であると考えられた。

We here describe persistence of Th1-potentiating effects on NOD mice by oral administration of yellow koji. Healthy and prediabetic female NOD mice at 8 weeks-old were orally given heat-sterilized yellow koji at the doses of 200 μg 6 times for 2 weeks. After 3 days, the splenocytes were cultured with anti-CD3 antibody, and the culture supernatants were collected and tested for production of IFN-γ by ELISA. Both weights and splenocyte numbers of the NOD mice were almost the same between yellow koji-treated and control mice. High production of IFN-γ was usually observed when the splenocytes were cultured with anti-CD3 antibody. The splenocytes of the yellow koji-treated mice were secreted significantly larger amounts of IFN-γ compared with those of the control mice, but more than 10 days after the final oral administration, such Th1-potentiating effects of yellow koji were disappeared. These results suggested that continuous oral administration of yellow koji may be necessary to obtain significant Th1-potentiating effects on the NOD mice.

Koji fungi, Th1 response, Oral administration
発表責任者：榎本淳（enomoto@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2G05-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム G

フラクトオリゴ糖の経口摂取は盲腸リンパ節を介して IgA 産生を誘導する

Oral intake of fructooligosaccharides induces IgA production via cecal lymph nodes

○古川 凱斗[1]、津田 真人[1]、宇野 直哉[1]、岡田 開[1]、大川 真由[1]、田代 桃佳[1]、八村 敏志[2]、細野 朗[1] ([1]日大農獣医、[2]東大農)

○Kaito FURUKAWA[1], Masato Tsuda[1], Naoya Uno[1], Hiraku Okada[1], Mayu Okawa[1], Momoka Tashiro[1], Satoshi Hachimura[2], Akira Hosono[1] ([1]Nihon Univ., [2]Tokyo Univ.)

フラクトオリゴ糖（FOS）は腸内細菌叢の変化を介して宿主の感染防御の向上や抗アレルギー作用をもたらすことが期待されている。これまでの研究で FOS を経口摂取することで血中及び腸管中の IgA 産生が増加することが示されている。しかし、その詳細な作用機序は解明されていない。本研究では、IgA 産生の誘導部位で T 細胞依存的な細胞応答が特徴的な腸管関連リンパ組織（GALT）に注目し、FOS が IgA 産生に与える影響を解析した。

まず、抗 CD4 抗体処理して $CD4^+$T 細胞を除去した BALB/c マウスに FOS を 2 週間摂取させた際の血清および腸管中の IgA 量を ELISA 法にて測定した。アイソタイプコントロール抗体を投与した対照群でみられた IgA 量の増加が $CD4^+$T 細胞除去群では見られなかった。このことから、FOS の作用は $CD4^+$T 細胞を介した反応に大きく依存することが示唆された。さらに、FOS を 2 週間摂取したマウスの各 GALT の細胞画分中の細胞応答をフローサイトメトリーにて解析した。FOS 摂取によって盲腸リンパ節（CeP）における濾胞性ヘルパーT (Tfh)細胞、活性化 B 細胞の割合が増加した。また、Total RNA を調製し、定量 PCR により遺伝子発現解析を行ったところ、CeP において TGF-β、TGF-βRI、TGF-βRII 発現が増加する傾向がみられた。

FOS は GALT の中でも特に CeP で Tfh 細胞を介して B 細胞の活性化することで IgA 産生を誘導していると考えられた。

Fructo-oligosaccharides (FOS) modulate host immune responses against infection and inflammation through altering gut microbiota. In previous report, it is shown that oral administration of FOS increased immunoglobulin (Ig)A level in sera and intestinal mucosal tissue. However, the detail mechanism is unclear. In this study, we investigated the effect of FOS on cellar immune responses in gut-associated lymphoid tissue (GALT) which is representative inductive site for T cell-dependent IgA production. At first, we evaluated the effect of FOS using $CD4^+$ T cell-depleted mice. Administration of FOS containing diet for 2 weeks increased IgA in the serum and cecal tissue of the mice treated with control antibody. However, the mice treated with anti-CD4 antibody didn’t increase the amount of IgA in serum and intestinal tissues after FOS feeding, suggesting strong dependence on $CD4^+$ T cells. Next, we analyzed the cellular responses in GALT using flow cytometry. We found the administration of FOS increased the frequency of Tfh cells and activated B cells in cecal patch (CeP) but not Peyer’s patches. In addition, quantitative RT-PCR analysis showed the increased expression of TGF-B, TGF-BRI, and TGF-BRII in CeP of FOS-fed mice. Our data indicate that FOS induce IgA production activating B cells via Tfh cells especially in CeP.

Fructooligosaccharides, IgA, Tfh cell

発表責任者：古川凱斗（brka20015@g.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2G06-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

Lactococcus cremoris subsp. *cremoris* FC 株の継続摂取が健常者の便通および免疫賦活作用に及ぼす影響

Effect of the intake of *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* FC strain on bowel movement and immunostimulatory effect in healthy subjects

○渡辺 真通、丸尾 俊也、鈴木 利雄（フジッコ（株））
○Masamichi WATANABE, Toshinari MARUO, Toshio SUZUKI (FUJICCO Co., Ltd.)

Lactococcus cremoris subsp. *cremoris* FC 株（以下、*L. cremoris* FC 株）は、凍結乾燥菌体や牛乳発酵物の形態として健常者に摂取した試験により整腸作用が報告されている。加えて FC 株には免疫賦活作用も確認されており、FC 株菌体のマウスへの経口摂取により NK 細胞や T 細胞から IFN-γ産生が増強されること、FC 株を含む牛乳発酵物摂取後のアンケート調査により摂取頻度が高いほど風邪が重症化しにくいことが示唆されている。本研究では FC 株菌体の排便改善効果および免疫機能賦活作用の有効量を検討するため、便秘気味の被験者 88 名を対象にプラセボ群、50 mg/day（低用量群）、75 mg/day（中用量群）、100 mg/day（高用量群）の FC 群の 4 群を設け（各群 22 名）、4 週間の無作為化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施した。その結果、FC 群すべてで排便日数、排便回数の有意な改善が認められた。プラセボ群と比べて中用量群で乳酸菌群数が、低用量群でビフィズス菌数の変化量がそれぞれ有意に増加したことから、整腸作用を介して排便状況が改善することが示唆された。一方で免疫機能への影響に関して、中用量群でのナイーブ T 細胞数が有意に増加したものの、免疫評価項目や体感アンケートの有意な改善は認められなかった。そこで、加齢に伴い低下する $CD8^+CD28^+$ T 細胞数が低値の被験者でサブグループ解析を行ったところ、プラセボ群と比べて中用量群で免疫力スコア、ナイーブ T 細胞数および $CD8^+CD28^+$ T 細胞数が有意に増加し、FC 株摂取による免疫賦活作用が示唆された。今後 $CD8^+CD28^+$ T 細胞数が低い被験者を検討することで FC 株の免疫賦活作用や作用機序の詳細な検討ができると考えられる。*Lactococcus cremoris*. subsp. *cremoris* FC (*L. cremoris* FC strain) has been reported to have immunostimulating effects in addition to intestinal regulation. In this study, 88 constipated subjects were randomized to placebo, 50 mg/day (low-dose group), 75 mg/day (medium-dose group), or 100 mg/day (high-dose group) FC (22 subjects in each group) for 4 weeks to evaluate the effective quantity of FC strains on defecation and immune function. A double-blind, placebo-controlled, parallel-group study was conducted. The results showed significant improvement in the number of days of defecation and the frequency of defecation in all FC groups. In addition, we conducted a subgroup analysis of subjects with low $CD8^+CD28^+$ T-cell counts, which decline with age, and found that immunity scores, naïve T-cell counts, and $CD8^+CD28^+$ T-cell counts increased significantly in the medium-dose group compared with the placebo group, suggesting an immunostimulatory effect of FC strain intake.

Lactococcus cremoris subsp. *cremoris* FC, bowel movement and immunostimulatory effect, $CD8^+CD28^+$ T cells

発表責任者：鈴木利雄（t-suzuki@fujicco.co.jp）

講演番号：2G06-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

Lacticaseibacillus paracasei K71 摂取による健常者の体調維持と免疫指標への影響

Effect of *Lacticaseibacillus paracasei* K71 Intake on Maintenance of Physical Condition and Immune Parameters of Healthy Subjects

○杉本 淑惠、三原 敏敬、山本 佳奈、内山 公子、髙橋 肇（亀田製菓）
○Yoshie SENDA-SUGIMOTO, Toshihiro MIHARA, Kana YAMAMOTO, Kimiko UCHIYAMA, Hajime TAKAHASHI (Kameda Seika Co., Ltd.)

Lacticaseibacillus paracasei K71（LpK71、旧分類：*Lactobacillus paracasei* K71）は酒粕由来の植物性乳酸菌であり、先行研究により免疫賦活作用やスギ花粉症の緩和作用を有することが報告されている。本研究では、LpK71 の経口摂取による体調と免疫指標への影響をランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験にて検討した。59 名の被験者をプラセボ群と LpK71 群に無作為に割り付け、プラセボ食品又は LpK71 含有食品（加熱殺菌粉末 LpK71 100 mg/day）を 1 日 1 回 8 週間摂取させた。被験者には摂取期間中毎日、風邪様症状に関するアンケート（全身症状 4 項目、部分症状 5 項目）を 5 段階で記入させた。また、摂取前、摂取 4 週目、摂取 8 週目で免疫指標（NK 活性、pDC 活性、INF-γ濃度、IL-12 濃度、唾液中 sIgA 濃度、唾液中 sIgA 分泌速度）を評価した。その結果、風邪様症状全項目の累積発症日数はプラセボ群と比較して LpK71 群で有意に低値を示したが、免疫指標は群間に有意な差は認められなかった。そこでサブグループ解析を行った結果、摂取 8 週目において、NK 活性低値のサブグループでは LpK71 群で IL-12 濃度と NK 活性が有意に高値、30 歳以上のサブグループでは LpK71 群で NK 活性が有意に高値だった。以上より、LpK71 の継続摂取は IL-12 産生と NK 細胞の応答を高めることで風邪様症状を抑制し、健康の維持に貢献すると考えられた。

LpK71 has been reported by previous studies to have immunostimulatory effects. In this study, we investigated the effects of oral intake LpK71 on the physical condition and immune parameters. 59 subjects were randomly assigned to the placebo group or the LpK71 group and consumed placebo food or LpK71-containing food once a day for 8 weeks. The subjects answered a questionnaire about their cold-like symptoms every day during the intake period. Immune parameters were also evaluated before the intake and at 4th and 8th week of intake. The results showed that the cumulative number of days with all cold-like symptoms was significantly lower in the LpK71 group than in the placebo group, but there was no significant difference in immune parameters between the groups. As a result of subgroup analysis, IL-12 and NK activity were significantly higher in the LpK71 group in the subgroup with low NK activity, and NK activity was significantly higher in the LpK71 group in the subgroup over 30 years old at week 8 of intake. These results suggest that the intake of LpK71 suppresses cold-like symptoms by enhancing IL-12 production and NK cell responses, thereby contributing to the maintenance of health.

Lacticaseibacillus paracasei K71, Physical condition, Immune parameters

発表責任者：杉本淑惠（y_sugimoto@sk.kameda.co.jp）

講演番号：2G06-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

OVA 特異的 T 細胞クローンマウスにおける経口抗原に対する応答と TCR 遺伝子使用の解析

Analysis of the response to oral antigen and TCR usage of cloned mice generated from OVA-specific T cells

○塩原 幸[1]、五島 直樹[1]、佐伯 祐輔[1]、WANG YIMEI[1]、中川 稜悟[1]、曽我 皓平[1]、王 蓉[1]、神沼 修[2]、足立（中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1] ([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]広大・原医研)
○Miyuki SHIOBARA[1], Naoki GOTO[1], Yusuke SAEKI[1], Yimei WANG[1], Ryogo NAKAGAWA[1], Kohei SOGA[1], Rong WANG[1], Osamu KAMINUMA[2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Res. Inst. Rad. Biol. Med., Hiroshima Univ.)

【目的】卵白アルブミン（OVA）特異的 T 細胞クローンマウスは、OVA 特異的な $CD4^+$T 細胞をドナーとし、核移植によって作出された。本マウスの $CD4^+$T 細胞は、再構成されたドナーT 細胞由来 T 細胞レセプター（TCR）α 鎖遺伝子（TRA）、および β 鎖遺伝子（TRB）由来の抗原特異的 TCR を発現する。本マウス（およびその子孫）は経口摂取抗原に対する $CD4^+$T 細胞応答を解析できるモデルとなる可能性がある。このような背景から、本マウスの抗原に対する応答性を $CD4^+$T 細胞の TCR 遺伝子使用を含め解析した。【方法】BALB/c 背景のドナー由来再構成 TCR αβ あるいは β 遺伝子を有するマウス（以下それぞれ αβ、β クローンマウス）を用いた。BALB/c マウス腸間膜リンパ節（MLN）より樹状細胞（DC）として $CD11c^+$細胞、クローンマウスの脾臓より $CD4^+$ T 細胞をそれぞれ MACS 法により精製し、OVA 抗原ペプチド（pep）と共培養した。培養細胞より抽出した RNA から cDNA を合成し、PCR にて TRA V 領域を増幅し電気泳動を行った。また、β クローンマウスに卵白食（EW）または対照食を 12 日間摂取させ、MLN 細胞を OVA または pep と培養した。培養上清中のサイトカイン産生を ELISA により定量した。【結果】MLN DC との共培養系にて、再構成 TRB を有する $CD4^+$T 細胞では pep 添加により特定の 2 種類の TRA の増幅が確認された。また、対照群と比較し、EW 群の β クローンマウスの MLN 細胞での IL-4 産生が pep 添加により増加した。これまでの結果と合わせて、OVA 特異的 T 細胞クローンマウスにおける経口摂取 OVA に対する応答では、再構成 TRB の発現が重要であり、特定の TRA を発現した $CD4^+$ T 細胞の優勢な反応が示唆された。

[Background] Cloned mice generated by nuclear transfer of ovalbumin (OVA)-specific T cells express OVA-specific TCR. We investigated responses to oral antigen and usage of TCR V region of these cloned mice. **[Methods]** MLN DCs of BALB/c mice and $CD4^+$ T cells from splenocytes of these cloned mice were cocultured in the presence of antigen. Genotyping of rearranged TRA was performed by PCR. Cloned mice were fed egg-white diet (EW) or control diet for 12 days. MLN cells were cultured with antigen, and IL-4 production was measured by ELISA. **[Results]** $CD4^+$ T cells with specific TRA was increased by antigenic stimulation in cloned mice harboring rearranged TRB. Furthermore, IL-4 production from MLN of EW fed β cloned mice was increased. Our data suggested that in the response to oral antigen of these cloned mice, the expression of rearranged TRB was important and $CD4^+$ T cells with specific TRA became dominant.

cloned mouse, intestinal immunity, T cells

発表責任者：八村敏志（ahachi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G06-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

赤シソ由来新規フラバノンは Th17 細胞機能を阻害しコラーゲン誘発性関節炎を抑制する

A newly found methoxyflavanone from *Perilla frutescens* inhibits Th17 cell function and suppresses collagen-induced arthritis

○平野 皓大[1]、藤村 孝志[2]、前田 俊介[1]、奥泉 文菜[2]、前田 陽[2]、平川 規子[3]、馬場 堅治[3]、河本正次[2] ([1]広島大工、[2]広島大院・統合生命科学、[3]三島食品株式会社)

○ Kouki HIRANO[1], Takashi FUJIMURA[2], Shunsuke MAEDA[1], Ayana OKUIZUMI[2], Akira MAEDA[2], Noriko HIRAKAWA[3], Kenji BABA[3], Seiji KAWAMOTO[2] ([1]Fac. Eng., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Mishima Foods Co., Ltd.)

関節リウマチ (RA) は不可逆的な骨破壊を伴う慢性自己免疫疾患であり、この病態進展には IL-17 産生型ヘルパーT 細胞 (Th17 細胞) が重要な役割を果たしている。今回我々は赤シソ (*Perilla frutescens*) より新たに単離されたフラバノン誘導体 (*Perilla*-derived methoxyflavanone, PDMF) が Th17 細胞機能を阻害するとともに RA モデルであるコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) を抑制することを見出したので報告する。PDMF は $CD4^+CD62L^+$ ナイーブ T 細胞からの Th17 細胞分化を抑制するのみならず、コミットされた Th17 細胞からの IL-17 産生も阻害することが判明した。また PDMF の投与は CIA モデルの関節炎病態進展を緩和させると共に、全身性の IL-17 ならびに IL-6 産生、および関節所属リンパ節からの IL-17 産生をいずれも抑制することが明らかとなった。

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease associated with irreversible bone destruction, and IL-17-producing helper T cells (Th17 cells) play an important role in the progression of the disease. In this study, we found that *Perilla*-derived methoxyflavanone (PDMF), a flavanone derivative newly isolated from *Perilla frutescens*, inhibits Th17 cell function and suppresses collagen-induced arthritis (CIA), a model of RA. We found that PDMF not only inhibited Th17 cell differentiation from $CD4^+CD62L^+$ naïve T cells, but also inhibited IL-17 production from committed Th17 cells. In addition, PDMF treatment alleviated the pathological progression of arthritis in the CIA model and suppressed both systemic IL-17 and IL-6 production as well as local IL-17 production from joint draining lymph nodes.

flavanone, *Perilla frutescens*, rheumatoid arthritis

発表責任者：河本正次（skawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2G06-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

ガレート型プロシアニジンが T 細胞のアミノ酸代謝に及ぼす影響

The effect of gallate-type procyanidin on amino acid metabolism in T cells

○遠藤 勝紀、澤 陶有子、小林 周平、真壁 秀文、田中 沙智（信州大 農）
○Katsunori ENDO, Touko SAWA, Shuhei KOBAYASHI, Hidefumi MAKABE, Sachi TANAKA (Shinshu Univ.)

免疫細胞の一つである T 細胞は、サイトカインを産生することで免疫反応を調節するが、過剰なサイトカインの産生は炎症性疾患や自己免疫疾患の原因となることから、適切に制御することが重要である。先行研究では、ポリフェノールの 1 つであるガレート型プロシアニジンが、細胞代謝に関わる mTOR を制御することで、T 細胞の過剰なサイトカイン産生を顕著に抑制することを見出した。そこで、アミノ酸の一種であるグルタミンが mTOR の活性を制御し、T 細胞機能を調節することが知られていることから、本研究では、ガレート型プロシアニジンがアミノ酸代謝に及ぼす影響を解析した。マウス脾臓から T 細胞を単離し、抗 CD3/28 抗体刺激下でガレート型プロシアニジンを添加すると、活性化に伴って増加する細胞内のグルタミンがガレート型プロシアニジンにより低下した。また、細胞内アミノ酸濃度の低下により誘導される遺伝子（Asns、Gpt2、Eif4ebp1）の発現がガレート型プロシアニジンにより上昇した。したがって、ガレート型プロシアニジンはアミノ酸代謝を制御することが示唆された。今後は、ガレート型プロシアニジンによるアミノ酸代謝を介した免疫調節作用の詳細なメカニズムを解明したいと考えている。

T cells are one of the immune cells and have an important role in immune responses by producing cytokines. However, the abnormal T cell response is key mediator of the onset of inflammatory and autoimmune diseases. We previously reported that gallate-type procyanidin that was a one of the polyphenols significantly suppressed the excessive cytokine production from T cells. In addition, the immunosuppressive effect of gallate-type procyanidin was mediated by the inhibition of mTOR, which was involved in the regulation of cell metabolism. Because glutamine which is a type of amino acids is known to be involved in the regulation of T cell function via mTOR activity, we analyzed the effects of gallate-type procyanidin on amino acid metabolism. Gallate-type procyanidin reduced intracellular glutamine level in T cells activated with anti-CD3/28 antibodies. Previous study showed that amino acid starvation could induce the expression of specific genes such as *Asns, Gpt2* and *Eif4ebp1*. The expression levels of these genes increased in T cells treated with gallate-type procyanidin. These results suggest that gallate-type procyanidin regulates amino acid metabolism. In future studies, we will investigate the further mechanism of immunomodulatory effects via amino acid metabolism by gallate-type procyanidin.

Gallate-type procyanidin, T cell, Amino acid metabolism

発表責任者：遠藤勝紀（21hs501a@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2G06-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

FTY720 は経口免疫寛容の誘導を部分的に阻害した
FTY720 partly inhibited the induction of oral tolerance

○平塚 弘樹、服部 誠、好田 正（東農工大農）
○Koki HIRATSUKA, Makoto HATTORI, Tadashi YOSIDA (Noko Univ.)

経口免疫寛容は経口的に摂取した抗原に対し特異的に免疫寛容が誘導される現象であるが、その具体的な誘導部位については未だ不明瞭である。我々は BALB/c マウスに対し卵白アルブミン(OVA)を経口摂取させることで経口免疫寛容を誘導し、その際に免疫抑制剤である FTY720 を投与することでリンパ球の遊走を阻害して、その影響を解析することで経口免疫寛容の誘導が起こる部位を特定することを試みた。その結果、経口免疫寛容の誘導中に FTY720 を投与した群において、抗体産生を指標にすると経口免疫寛容の誘導が部分的に抑制されていたことから、食品抗原による寛容の誘導にはいずれかのリンパ節から T 細胞が全身に移行することが必要な何らかのメカニズムが関与していることが示唆された。また、現在は経口免疫寛容の誘導中に FTY720 を投与し、マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の T 細胞のサイトカイン産生及び制御性 T 細胞の頻度を指標としてその影響を解析しているため、本講演ではその結果についても紹介する。
Oral tolerance is a phenomenon in which immune tolerance is specifically induced to orally ingested antigens, but where the induction of oral tolerance occurs is still unclear. We induced oral tolerance in BALB/c mice by orally ingesting ovalbumin (OVA), and inhibited lymphocyte migration by administering FTY720, an immunosuppressive agent, during the induction of oral tolerance. By analyzing the effect of FTY720, we attempted to identify where the induction of oral tolerance occurs. The results showed that the induction of systemic tolerance was partly inhibited in the group treated with FTY720 during the induction of oral tolerance, as measured by antibody production, suggesting that the systemic migration of T cells from certain lymph nodes is involved in the induction of systemic tolerance by food antigens. The experiments to confirm the cytokine production of T cells and frequency of regulatory T cells in spleen, mesenteric lymph nodes and Peyer's patch in the mice that had been induced oral tolerance with/without FTY720 treatment are now in progress. We will also present the result of experiment in this presentation.

oral tolerance, FTY720

発表責任者：平塚弘樹（koki_hira_0220@icloud.com）

講演番号：2G06-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

糖尿病モデルマウスを用いた疾患が抗体産生に及ぼす影響の解析

Analysis of the effect of diabetes on antibody production

○近澤 未歩、湊 健一郎（名城大農）
○Miho CHIKAZAWA, Ken-ichiro MINATO (Meijo Univ.)

外来異物や内因性抗原などの抗原に加え、食事や腸内環境は免疫系に大きな影響を与えると考えられる。腸管免疫系には食品成分が直接作用する事が報告されており、食品成分による免疫系の活性化が全身の免疫系に作用し、生体保護的に作用する可能性も示唆される。糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病においては、食習慣の変化が免疫系に影響を与えることで、疾患の発症にも関与する事が予想される。これまでに、食習慣や食品成分が抗体産生や抗体の特異性に及ぼす影響について明らかにするべく研究を行なってきた。今回、食餌性糖尿病モデルマウスである高脂肪食摂食マウス、遺伝性糖尿病モデルマウスである KK-A^y マウスの２種類の糖尿病マウスを使用し、糖尿病に伴う腸管内、血清中における抗体量などの変化を解析した。その結果、腸管、血清ともに糖尿病モデルマウスにおいて特定のアイソタイプの抗体産生が大きく増加する事が確認された。特に尿糖が検出されるなど重症度の高い KK-A^y マウスで抗体量の顕著な増加が見られた。以上より、食事の変化や糖尿病発症に伴う生体の変化が免疫系に作用し、抗体産生にも影響を与えることが予想された。今後、抗体の特異性の変化についてレパトア解析を用いて詳細に明らかにするとともに、抗体産生が変化するメカニズムについて解析を行う。

Diet and intestinal environment are thought to have a significant impact on the immune system. It has been reported that food factors have a direct effect on the intestinal immune system, and it is also suggested that activation of the immune system by food factors may have a protective effect on the systemic immune system. In the case of lifestyle-related diseases such as diabetes and dyslipidemia, changes in dietary habits are thought to act on the immune system and contribute to the development of the disease.

In this study, we analyzed antibody levels in the intestinal tract and serum associated with diabetes using two types of diabetic mice: high-fat-fed mice and KK-A^y mice. As a result, it was confirmed that the production of specific isotypes of antibodies was greatly increased in the diabetic model mice in both intestine and serum. In particular, a marked increase in antibody levels was observed in KK-A^y mice, which have a high severity of the diabetes. These results suggest that dietary changes and the onset or development of diabetes affect the immune system, which in turn affects the production of antibodies.

gut immunity, diabetes, IgA

発表責任者：近澤未歩（mchika@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2G06-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

ApoE 欠損マウスを用いた多重交差性 IgM-BCR レパトア形成におけるピロール化タンパク質の機能解明

The role of pyrrolated protein in shaping multi-specific IgM-BCR repertoire in apoE deficient mice

○林 世映[1]、山口 公輔[1]、板倉 正典[1]、近澤 未歩[3]、松田 知成[2]、内田 浩二[1] ([1]東大農、[2]京大、[3]名城大)
○SeiYoung LIM[1], Kosuke Yamaguchi[1], Masanori Itakura[1], Miho Chikazawa[3], Tomonari Matsuda[2], Koji Uchida[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ., [3]Meijo Univ.)

過酸化脂質由来のアルデヒド類により修飾されたタンパク質は酸化特異的エピトープと称される免疫反応を誘導する構造を形成する。当研究室の先行研究により γ-ketoaldehyde 類によるリジン残基の修飾により形成される構造として同定されたピロールエピトープは (Miyashita et al., *Sci. Rep.*, 2014)、抗 DNA 抗体に認識されるなど DNA 様の性質を持つことが明らかとなっている。また動脈硬化モデルである apolipoprotein E (apoE)欠損マウスの血中タンパク質において、このエピトープ量の上昇が認められた(Hirose et al., *JBC*, 2019)。本研究では apoE 欠損マウスを研究対象とし、ピロールエピトープに対する自然抗体産生機構及び抗体の結合特性についての解明を試みた。
ELISA による血中抗体価の解析により、野生型マウスと比較して apoE 欠損マウスにおける抗ピロール及び抗 DNA IgM 抗体価の週齢依存的な上昇が確認された。フローサイトメトリーを用いたリンパ球画分の解析結果、apoE 欠損マウスの腹腔において IgM 抗体産生を担う B-1a 細胞の割合が野生型マウスと比較しより拡大していることが確認された。さらにピロール化タンパク質に結合する B-1a 細胞の抗体産生に関する解析から B 細胞受容体 (BCR)依存的なピロール結合細胞画分が同定された。野生型及び apoE 欠損マウスからこの B-1a 細胞画分を単離し、それらが持つ抗体配列を次世代シーケンサー(NGS)で解析を行った。また、NGS 解析結果と apoE 欠損マウスから作製された pyrP/DNA 両方を認識する IgM 抗体の配列を比較することにより、ピロールエピトープの増加による多重交差性 IgM 抗体レパトア形成への影響を考察している。Covalent modification of protein has been reported in numerous diseases including atherosclerosis and autoimmune disease. An epitope is a structure formed on a modified protein, which could be recognized by antibodies. Lysine *N*-pyrrolation is a recently identified epitope mimicking DNA in terms of electrical and structural properties (Miyashita et al., *Sci. Rep.*, 2014). In addition, pyrrolated protein (pyrP) is accumulated in apolipoprotein E-deficient hyperlipidemic mice (Hirose et al., *JBC*, 2019). In the present study, we examined the mechanism of IgM antibody production and the binding property of antibodies against pyrrolated epitope in apoE deficient ($apoE^{-/-}$) mice. We confirmed an age-dependent increase in anti-pyrP/DNA IgM response in $apoE^{-/-}$ mice as compared to WT mice. In addition, we identified pyrP-binding B-1a cells potentially capable of producing bispecific IgM antibodies against pyrP/DNA. Subsequently, by using next-generation sequencing technology, we confirmed the impact of pyrP accumulation in shaping IgM-BCR repertoire in $apoE^{-/-}$ mice.

apolipoprotein E deficiency, Nε-pyrrole-L-lysine, B-cell receptor (BCR)

発表責任者：林世映（sylim@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G06-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

ポリフェノールによるタンパク質修飾を介した自然免疫調節機構の解明

Mechanism of innate immune regulation through protein modification by polyphenols

山口 公輔、○畠山 千晴、下宮 豪介、林 世映、板倉 正典、内田 浩二 (東大農)
Kosuke YAMAGUCHI, ○ Chiharu HATAKEYAMA, Gosuke SHIMOMIYA, Seiyoung LIM, Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (Univ. of Tokyo)

ポリフェノールは人の健康増進に貢献する食品成分として知られている。先行研究において、ポリフェノールがタンパク質修飾を介して自然抗体エピトープを産生することが分かっており、自然免疫におけるポリフェノール修飾タンパク質の機能解明を本研究の目的とした。

ポリフェノールのモデルとしてエピガロカテキンガレート(EGCG)を、血中タンパク質のモデルとしてアルブミンを用い、両者を反応させることで EGCG 修飾アルブミンを作製した。まず、フローサイトメーターを用いて EGCG 修飾アルブミンとマウス B 細胞の結合を評価した。その結果、マウス腹腔中に EGCG 修飾アルブミン結合性 B-1a 細胞が存在し、それらの B-1a 細胞は EGCG 修飾アルブミンを認識する IgM 産生能を有することが分かった。従って、EGCG 修飾タンパク質による B 細胞受容体 (BCR) を介した自然免疫調節機構が存在する可能性が示唆された。また、EGCG 修飾アルブミンを認識するモノクローナル抗体を作製しその配列を解析した結果、当研究室にて作製されたテアフラビンモデル (GACa) 修飾タンパク質を認識する抗体と類似した相補性決定領域 (CDR) を有することが分かった。従って、これら類似した CDR がポリフェノール修飾タンパク質の認識に関与する可能性が示唆された。

以上の結果より、ポリフェノール修飾タンパク質は BCR 結合を介して自然免疫応答を調節する可能性が示唆された。

Polyphenols are well known as food components that contribute to the improvement of human health. Previous studies have shown that polyphenols produce innate epitopes via non-enzymatic protein modification. This study aimed to elucidate the function of polyphenol-modified proteins in innate immunity. Using epigallocatechin gallate (EGCG) and albumin as models, we prepared EGCG-modified albumin. First, we evaluated the binding of EGCG-modified albumin to mouse-derived B cells using a flow cytometer. The results showed that there were EGCG-modified albumin-binding B-1a cells in the mouse abdominal cavity, and these B-1a cells produced IgM that could recognize EGCG-modified albumin. In addition, monoclonal antibodies that recognize EGCG-modified albumin were produced and sequenced, and were found to have similar complementarity determining regions (CDR) to those of antibodies, which recognize theaflavin model compound (GACa)-modified proteins. These results suggest that polyphenol-modified proteins may modulate the innate immune response through BCR binding.

Polyphenol, Innate immunity, Non-enzymatic protein modification

講演番号：2G06-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

酸化型ビタミン C 由来 AGEs による炎症応答制御メカニズムの解明

The regulatory mechanisms of inflammatory responses mediated by oxidized vitamin C-derived AGEs

○板倉 正典、内田 浩二（東大農）
○Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (Univ. of Tokyo)

酸化型ビタミン C (oxVC) は非酵素的にタンパク質を修飾し、最終糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) と総称される不均一なタンパク質修飾体を形成する。これまでの研究結果から、oxVC によって修飾されたアルブミン (AGEs) がヒストンタンパク質への結合能を獲得し、細胞膜上にプラスミノーゲン受容体として発現するヒストン H2B に結合することで、マクロファージ浸潤を抑制することが示唆されているが、その分子メカニズムの詳細は未だ明らかでない。本研究は oxVC 由来 AGEs による炎症応答制御メカニズムの解明を目的として、AGEs によるマクロファージ浸潤制御における H2B およびプラスミノーゲン活性化の関与を検討した。マクロファージへの AGEs 結合性は抗ヒストン抗体の処置により抑制され、H2B 過剰発現によって増強されることが明らかとなり、マクロファージの AGEs 認識には既知の AGEs 受容体に加え、H2B が関与することが明らかとなった。また 3 次元培養法を用いた in vitro 細胞浸潤アッセイの結果、AGEs 処置によるマクロファージの浸潤能低下は、抗 H2B 抗体の処置によって抑制されることが明らかとなった。さらにマウス無菌性腹膜炎モデルを用いた検討の結果、AGEs 投与により、プラスミノーゲン下流因子であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 の活性化抑制および腹腔浸潤単球・マクロファージ数の減少が認められた。以上の結果より、oxVC 由来 AGEs はマクロファージ上 H2B への結合を介し、プラスミノーゲン活性化を抑制することで、単球・マクロファージ浸潤および炎症応答を制御することが示唆された。

Oxidized vitamin C (oxVC) can covalently react with proteins to generate a heterogenous group of compounds called advanced glycation end products (AGEs). We have previously shown that oxVC-derived AGEs could bind to histones and suggested that AGEs inhibit macrophages infiltration via the binding to histone H2B expressing on plasma membrane as a plasminogen receptor. However, the detailed molecular mechanisms have not been clarified. In this study, we aimed to elucidate the involvement of H2B and plasminogen activation in the regulation of inflammatory response by AGEs. The treatment of macrophages with anti-H2B antibody significantly reduced the AGEs binding to macrophages and inhibited AGEs-dependent suppression of macrophage infiltration in vitro invasion assay. Further, in vivo invasion assay revealed that AGEs could suppress the activation of matrix metalloprotease (MMP)-9, a downstream factor of plasminogen, and reduce the number of infiltrated macrophages. These results indicate that oxVC-derived AGEs bind to membrane-localized H2B on macrophages and inhibit plasminogen activation, and thereby results in the regulation of inflammatory response.

vitamin C, AGEs, histone

講演番号：2G06-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム G

酸化コレステロールが樹状細胞の分化や活性化に与える影響の解析

Molecular Mechanisms Underlying the Differentiation and Activation of Dendritic Cells in Response to Oxysterols

○柳沢 林太郎[1]、戸田 雅子[1]、浅井 明[2]([1]東北大農、[2]日本医科大)
○Rintaro YANAGISAWA[1], Masako TODA[1], Akira ASAI[2] ([1]Tohoku Univ, [2]Nippon Medical School)

酸化コレステロールは多様な生理活性を有するが、各種免疫細胞に与える影響についての知見は限られている。自然免疫系において、樹状細胞はイニシエータとして機能する。本研究は、酸化コレステロールが樹状細胞の分化と活性化に与える影響についての解析を目的とした。樹状細胞モデルとしてマウス骨髄由来樹状細胞（Bone marrow-derived mouse dendritic cells；BMDC）を rGM-CSF を用いて調製した。BMDC を酸化コレステロールで刺激し、樹状細胞の分化マーカーCD11c と活性化マーカーである共刺激分子 CD40、CD80、CD86 や MHC classⅡ分子の発現強度を FACS 解析した。その結果、25-hydroxycholesterol や 7β-hydroxycholesterol などの水酸基修飾型の酸化コレステロールは、BMDC の分化や活性化マーカーの発現を顕著に増大させた。非酸化型コレステロールではそのような作用は観察されなかった。酸化コレステロールの作用機序について代謝経路阻害剤や核内受容体インバースアゴニストを用いて探索した結果、(a)コレステロール代謝経路が BMDC の分化と活性化に関与すること、（b）酸化コレステロールは RAR-related orphan receptor γ（RORγ）依存的に BMDC の分化を誘導する一方で、活性化には関与しないことが示唆された。本研究は、樹状細胞の分化と活性化機構について新たな知見をもたらすものである。

Oxysterols have physiological activities in various types of cells including those in the immune system. The aim of this study was to elucidate the impact of oxysterols on differentiation and activation of dendritic cells (DC), a central player in the innate immunity. To this end, we prepared bone marrow-derived murine dendritic cells (BMDC) in the presence of rGM-CSF and treated them with oxysterols. FACS analysis showed that oxysterols with hydroxyl groups such as 25-hydroxycholesterol and 7β-hydroxycholesterol upregulated the expression of DC marker, CD11c, and activation markers, CD40, CD80, CD86, and MHC class II molecule on the cell surface of BMDCs. Such effect could not be observed when BMDCs were treated with cholesterol. Using inhibitors of metabolic pathways and inverse agonists of nuclear receptors, we found that (a) cholesterol pathway is involved in the differentiation and activation of BMDCs, and (b) RAR-related orphan receptor γ（RORγ）play an important role in the BMDC differentiation, but not activation. Our results advance knowledge how oxysterols are engaged in DC biology.

dendritic cell, oxysterol, RORγ

発表責任者：戸田雅子（masako.toda.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：2G08-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

植物発酵物（FBP）のスギ花粉症抑制効果

Suppressive effect of fermented botanical product (FBP) on Japanese cedar pollinosis

○鳥居 英人[1]、藤村 孝志[2]、堀 采音[2]、北條 綾乃[1]、藤岡 耕太郎[1]、児玉 智基[3]、西岡 祐起[2]、前田 陽[2]、岸田 晋輔[1]、河本 正次[2] ([1]万田発酵株式会社、[2]広島大院・統合生命科学、[3]広島大・工)
○Hideto Torii[1], Takashi Fujimura[2], Ayane Hori[2], Ayano Hojo[1], Kotaro Fujioka[1], Tomoki Kodama[3], Yuki Nishioka[2], Akira Maeda[2], Shinsuke kishida[1], Seiji Kawamoto[2] ([1]Manda Fermentation Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Fac. Eng., Hiroshima Univ.)

植物性発酵食品は多様な健康効果を示すと広く認識されているが、作用機序に不明な点が多い。植物発酵物（FBP:Fermented Botanical Product、万田発酵株式会社製）は黒糖をベースに５３種類以上の果実類、海藻類、穀類、野菜類を３年３カ月以上の長期発酵・熟成させた製品で、動物や臨床研究において腸管から免疫賦活機能を有する可能性が見いだされてきた。そこで、本研究では FBP のスギ花粉症に対する効果検証と、その作用機序の解明を目的に研究を実施した。

スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 および Cry j 2 からなるスギ塩基性タンパク質の腹腔内投与と経鼻感作を基調としたスギ花粉症モデルマウスに対して FBP を共に経口投与した。その結果、花粉症症状（くしゃみ行動）の進展が有意に抑制された。さらに、FBP の経口投与はアレルゲン特異的な IgE、IgG、IgA 抗体価へ影響を及ぼさず、ヘルパーT 細胞サイトカイン産生プロファイルに対しても有意な差異はなかった。そこで、血中の mouse mast cell protease（MMCP1）を調査したところ、FPB 投与群において抑制傾向を示した。以上のことから、獲得免疫系への影響ではなく肥満細胞を作用点とした I 型アレルギー反応抑制によって FBP はスギ花粉症の病態進展を抑制すると推察された。

Fermented plant based products are known for various health benefits, but the mechanism of action remains unclear. Fermented Botanical Product (FBP, produced by Manda Fermentation Co., Ltd.) is a product made by fermenting and maturing more than 53 kinds of fruits, seaweeds, grains, and vegetables for more than 3 years and 3 months. Mice and clinical studies suggest that FBP may be involved in the immune function in the gut. In this study, the effect and the mode of action of FBP on cedar pollinosis (CP) were examined. FBP was orally administered to CP model mice treated with the major cedar pollen allergens Cry j 1 and Cry j 2. As a result, the development of CP symptoms (sneezing) was significantly suppressed, but FBP did not affect allergen-specific IgE, IgG, and IgA antibodies and helper T cell cytokine production. Therefore, we investigated mouse mast cell protease (MMCP1) in the blood and found that it was significantly suppressed in the FBP group. These results suggest that FBP suppresses the development of CP without affecting the acquired immune system, but through type I allergic reactions at the mast cell site.

Allergy, Fermented botanical product, Japanese cedar pollinosis

発表責任者：鳥居英人（hideto_torii@manda-kohso.co.jp）

講演番号：2G08-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

植物発酵物（FBP）は肥満細胞を作用点として I 型アレルギー反応を抑制する

Fermented botanical product (FBP) acts directly on mast cells to suppress type I allergic reactions

○児玉 智基[1]、西岡 祐起[2]、前田 陽[2]、北條 綾乃[3]、鳥居 英人[3]、藤岡 耕太郎[3]、岸田 晋輔[3]、藤村 孝志[2]、河本 正次[2] ([1]広島大工、[2]広島大院・統合生命科学、[3]万田発酵株式会社)
○Tomoki KODAMA[1], Yuki NISHIOKA[2], Akira MAEDA[2], Ayano HOJO[3], Hideto TORII[3], Kotaro FUJIOKA[3], Shinsuke KISHIDA[3], Takashi FUJIMURA[2], Seiji KAWAMOTO[2] ([1]Fac. Eng., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Manda Fermentation Co., Ltd.)

植物発酵物（FBP）は果樹類・野菜類・穀類・海藻類の長期発酵・熟成によって得られた発酵食品である。これまでに FBP の経口投与がスギ花粉症モデルの病態進展を抑制すること、またその奏功機序として、FBP が獲得免疫系に全く影響を及ぼすことなく肥満細胞を作用点として IgE 抗体依存的な I型アレルギー反応を抑制する可能性が示唆されている。本研究にて我々は、FBP の肥満細胞に対する脱顆粒抑制効果、ならびにその作用機序を明らかにしたので報告する。

ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 の脱顆粒反応に対する FBP 共刺激の影響を調べた結果、本品が IgE 抗体依存的な脱顆粒反応を有意に抑制することが判明した。また、本品の経口摂食は *in vivo* においても IgE 抗体依存的な I 型アレルギー反応（受動皮膚アナフィラキシー反応）を抑制した。さらに我々は、FBP の共刺激が高親和性 IgE 受容体（FcεRI）架橋に伴う細胞内への Ca^{2+}流入を著明に抑制することを見出した。現在 FBP 共刺激が FcεRI シグナル伝達経路に及ぼす影響を詳細に調べており、その結果も合わせて報告したい。

Fermented Botanical Product (FBP) is a fermented food obtained by long-term fermentation and maturation of fruits, vegetables, cereals, and seaweeds. It has been suggested that oral administration of FBP suppresses the pathological development of cedar pollinosis in mice, and that FBP may act on mast cells to suppress IgE-dependent type I allergic reactions without affecting adaptive immune response. In the present study, we have clarified the degranulation inhibitory effect of FBP on mast cells and its mechanism of action. We examined the effect of FBP co-stimulation on the degranulation of a rat basophil-like cell line RBL-2H3 and found that FBP significantly suppressed the IgE-dependent degranulation response. Oral feeding of FBP also suppressed passive cutaneous anaphylactic reactions (*in vivo* IgE-dependent type I allergic reactions). We also found that FBP co-stimulation markedly suppressed intracellular Ca^{2+} influx upon high-affinity IgE receptor (FcεRI) cross-linking. We are now investigating the effect of FBP co-stimulation on the FcεRI signaling pathway in detail and will report the results as well.

allergy, fermented botanical product (FBP), mast cells

発表責任者：河本正次（skawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2G08-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

褐藻類ノコギリモクの抗アレルギー活性

Anti-allergic activity in the brown alga, Sargassum macrocarpum

○垣田 浩孝[1]、有本 清也[1]、田中 守[2] ([1]日大院総合基、[2]中部大院応用生物)
○Hirotaka KAKITA[1], Seiya ARIMOTO[1], Mamoru TANAKA[2] ([1]Nihon Univ. Graduate School, [2]Chubu Univ. Graduate School)

現在は国民のおよそ半分が何らかのアレルギーに罹患している。近年、アレルギーを抑制する食品由来物質が注目されている。柑橘由来ポリフェノール等がその例であり、サプリメントとしてすでに市販されている。一方、海藻の抗アレルギー成分に関しては陸上植物由来成分に比して実用化の例は少ない。一方、褐藻類ノコギリモクは未利用な海藻である。そこで本研究では褐藻類大型海藻ノコギリモク由来ポリフェノールの抗アレルギー活性を評価することを目的とした。ノコギリモクは瀬戸内海で採取して、洗浄後、凍結乾燥し使用するまで保管した。凍結乾燥した海藻を液体窒素で冷却しながら細かくすりつぶして海藻粉末を得た。海藻のエタノール抽出のヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した。タンニンを養成コントロールとして用いた。ポリフェノール量はフォーリン・チオカルト法に従って定量した。標準物質として没食子酸を用いた。固相抽出カラム画分のヒアルロニダーゼ阻害活性測定の結果は、ノコギリモクのエタノール抽出物には２種類のヒアルロニダーゼ阻害活性成分が含まれていることを示唆した。細胞生存率は 62.5 μg/mL 以上の濃度で低下した。今後さらに分画を進めていく予定である。

Currently, about half of the population has some kind of allergy. In recent years, anti-allergic ingredients in food have been attracting attention. An example is a citrus-derived polyphenol, which are already on the market as a supplement. The anti-allergic ingredients derived from seaweed are few application examples compared to that derived from terrestrial plants. On the other hand, the brown alga, *Sargassum macrocarpum*, is an unused seaweed. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the anti-allergic activity of polyphenols derived from *S. macrocarpum*. Algal specimens were collected in the Seto Inland Sea, washed, freeze-dried, and stored until use. Freeze-dried seaweeds were finely ground while cooling with liquid nitrogen to obtain seaweed powder. The hyaluronidase inhibitory activity in ethanol extraction derived from *S. macrocarpum* was measured. Tannin was used as a positive control. Polyphenol was determined according to the foreign thiocult method. Gallic acid was used as a standard polyphenol substance. Results of hyaluronidase activity measurement in eluents from a solid-phase extraction column suggested that the ethanol extract of *S. macrocarpum* contained two kinds of hyaluronidase inhibitory active ingredients. Cell viability decreased at concentrations above 62.5 μg / mL. We plan to further promote fractionation in the future.

Seaweed, Anti-allergic, Food

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2G08-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

経皮感作による食物アレルギーの皮膚への影響

Effects of food allergy by epicutaneous sensitization on skin

○黒木 穣、西本 沙弥香、鳥屋尾 千佳、江藤 望、服部 秀美（宮崎大農）
○Yutaka Kuroki, Sayaka Nishimoto, Chika Toyao, Nozomu Eto, Hidemi Hattori (Miyazaki Univ.)

食物アレルギーの既往歴がないにもかかわらず、突然食物アレルギーを発症する事例が報告されている。この原因の一つとして経皮感作が挙げられているが、発症メカニズムについて不明な点は多い。そこで本研究では皮膚に注目し、食物アレルギーにおける皮膚の組織学的変化を調べ、新規発症メカニズムについて検討した。マウスのバリア機能を脆弱にした背部皮膚へ卵白アルブミン(OVA)水溶液を塗布し経皮感作を行った(OVA 群)。Control として PBS を塗布した(control 群)。塗布開始から 21 日後に OVA の経口負荷を行い、血液及び皮膚を採取した。ELISA により、血中 OVA 特異的 IgE、IgG およびヒスタミンの測定を行った結果、OVA 群でそれら全ての量が増加し、経皮感作の成立が確認できた。皮膚の HE 染色により、表皮の肥厚の程度を比較したところ、control 群と OVA 群の差はなかった。しかし、皮膚の特殊染色を行ったところ、OVA 群において肥満細胞、好酸球、ペルオキシダーゼ陽性細胞の浸潤が確認された。以上のことから、皮膚の外観に変化はなくても経皮感作は成立し、皮膚組織では炎症が誘発されることが示唆された。

Cases of a sudden onset of a food allergy have been reported despite on history of food allergy in the patient. One of the causes is epicutaneous sensitization. However, the pathogenic mechanism remains unclear. To investigate a novel mechanism for food allergy, we focused on the skin and examined the histological changes. Epicutaneous sensitization was performed on mouse's backs with weak skin barrier function, using egg white albumin (OVA) solution (OVA group). PBS was applied in control group. Twenty-one days after the start of the sensitization, an oral OVA challenge was performed, and blood and skin were collected. As a result of measuring OVA-specific IgE, IgG, and histamine in blood by ELISA, all of them increased in the OVA group, confirming the establishment of epicutaneous sensitization. HE staining showed no difference in the degree of epidermal thickening between the control and OVA group. However, special staining showed that mast cells, eosinophils, and peroxidase-positive cells infiltrated in the OVA group. These results suggest that epicutaneous sensitization is established even if no change in skin appearance and inflammation is induced in the skin.

Epicutaneous sensitization, Inflammation, Food allergy

発表責任者：服部秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2G08-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

食品アレルギーの増悪化に関わる皮膚感作のメカニズム解析

Analysis of the involvement of lymphocyte migration in the establishment of skin sensitization

○小柴 莉沙、服部 誠、好田 正（東農工大農）
○Risa Koshiba, Makoto Hattori, Tadashi Yoshida (Noko Univ.)

近年，皮膚を介した抗原の接触（皮膚感作）と食物アレルギーの発症との関係が注目されている。しかしながら，皮膚における局所的な抗原感作がどのようにして腸管における食品アレルゲンに対する応答に影響を与えるのかに関する詳細なメカニズムは未解明である。

本研究では，リンパ球の二次リンパ節からの遊走を阻害する薬剤である FTY720 を用いて，皮膚感作が食品アレルギーに与える影響におけるリンパ球の移動の役割について検討した。T 細胞の多くがオボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体を発現している DO11.10 マウスに対し，背部皮膚への OVA の塗布と FTY720 の腹腔内投与を行ったあと，OVA を含む食餌を与えて食品アレルギーを誘発した。食品アレルギーの指標として，血清中の OVA 特異的 IgE 産生量を測定した。

その結果、皮膚感作後の食品アレルギー誘導時における IgE 産生量は遊走阻害剤の投与によって抑制されたことから，皮膚で活性化されたリンパ球の遊走が，皮膚感作の成立において重要な役割を担うことが示唆された。

Recently, the relationship between antigen contact via skin (skin sensitization) and the development of food allergies has gained increasing attention. However, the mechanisms regarding how local antigen sensitization in the skin influences the response to food allergens in the intestinal tract remain unresolved.

In this study, we investigated the involvement of lymphocytes migration in skin sensitization and its influence on food allergy using FTY720, a drug that inhibits the migration of lymphocytes from secondary lymph nodes. Ovalbumin (OVA) -specific TCR transgenic mice (DO11.10) were treated with OVA on the back skin and FTY720 intraperitoneally, and then fed a diet containing OVA to induce food allergy. The OVA-specific IgE production in serum was measured as indicators of food allergy.

The results showed that the administration of a migration inhibitor suppressed IgE production during induction of food allergy after skin sensitization, suggesting that the migration of lymphocytes activated at the skin played an important role in the establishment of skin sensitization.

skin sensitization, food allergy, lymphocyte migration

講演番号：2G08-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

成人アトピー性皮膚炎患者におけるイチジク茶摂取の有効性について

Efficacy of Fig Tea Ingestion in Adult Patients with Atopic Dermatitis

○阿部 竜也、小山 ゆかり、西村 耕作（東洋食品研究所）
○Tatsuya ABE, Yukari KOYAMA, Kousaku NISHIMURA (Toyo Institute of Food Technology)

【背景と目的】当研究所の所在地である兵庫県川西市は、イチジク（*Ficus carica* L.）の産地である。果実の生産過程において、多量の葉が未利用資源として廃棄されている。未利用資源の有効活用として葉を加工したイチジク茶の機能性を調査したところ、アレルギー緩和効果を動物で見出した。そこで本研究では、アトピー性皮膚炎（AD）に対するイチジク茶の効果をヒト介入試験で評価した。
【方法と結果】軽度 AD 患者を対象に二重盲検無作為化対照試験（RCT）を実施した。試験群にはイチジク茶、プラセボ群には着色水を 8 週間摂取させ、AD 症状の推移を評価した。皮膚炎指標である EASI スコアは、イチジク茶を継続的に摂取することでプラセボ群と比較して有意に低下した。また、その効果は摂取終了後 4 週間で弱まったことから、継続的な摂取が効果的であることが示唆された。さらに、イチジク茶摂取群では、肝機能指標である AST（OGT）や LDH で有意な減少、ALT(GPT)や ALP で減少傾向が確認され、イチジク茶の AD 緩和効果には肝機能の改善が関与することが示唆された。

[Objectives] The location of our institute is in the production area of fig (*Ficus carica* L.). During the cultivation of the fruit, a large amount of leaves are discarded as an unused resource. Through animal experiments, we found that fig tea prepared from the leaves of fig has an allergy-relieving effect. In the present study, we evaluated the effect of fig tea on atopic dermatitis (AD) in a human intervention study.
[Methods and Results] A double-blind randomized controlled trial was conducted in patients with mild AD. The test group was ingested fig tea and the placebo group was ingested water for 8 weeks, and the changes in AD symptoms were evaluated. The EASI score, a dermatitis index, was significantly lower in the fig tea group than in the placebo group. Four weeks after the end of intake, the effect weakened, suggesting that continuous intake is effective. Furthermore, the fig tea group showed a significant decrease in AST (OGT) and LDH, and a decreasing trend in ALT (GPT) and ALP in blood. Therefore, the improvement in liver function may be involved in the AD-alleviating effect of fig tea.

atopic dermatitis, functional food, unused natural resources

発表責任者：阿部竜也（tatsuya_abe@shokuken.or.jp）

講演番号：2G08-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

腸内細菌由来アマニリグナン代謝物によるマスト細胞脱顆粒抑制

Microbial metabolite of flaxseed lignan regulates mast cell degranulation

○澤根 健人[1,2]、長竹 貴広[2]、細見 晃司[2]、宮下 留美子[1]、間 和彦[1]、國澤 純[2,3,4] ([1]株式会社ニップン、[2]医薬健栄研、[3]阪大薬、[4]東大医科研)
○Kento Sawane[1,2], Takahiro Nagatake[2], Koji Hosomi[2], Rumiko Miyashita[1], Kazuhiko Aida[1], Jun Kunisawa[2,3,4] ([1]Nippn Corporation, [2]NIBIOHN, [3]Osaka Univ., [4]University of Tokyo)

セコイソラリシレシノールジグルコシド(SDG)は亜麻などに含まれる植物エストロゲンの一種で、Ⅱ型糖尿病症状を改善することなどが報告されている。SDG は摂取後腸内細菌によって代謝物に変換され、吸収後血中では主に抱合体として存在する。しかし、各抱合体の生理活性は十分には明らかになっていない。また、血液中 SDG 代謝物濃度がアレルギー疾患の発症率と逆相関することが報告されているが、アレルギー疾患に対する作用は不明である。本研究は、SDG 代謝物であるエンテロジオール（ED）および ED グルクロン酸抱合体（EDGlu）について、IgE 誘導性脱顆粒に対する影響を評価した。

RBL-2H3 細胞に ED もしくは EDGlu を添加したところ、EDGlu と比較して ED で強い脱顆粒抑制作用を示した。また、その作用は GPR30 を介していた。EDGlu 添加時の培養上清を調べたところ、脱顆粒に伴い放出されるβ-グルクロニダーゼが、一部の EDGlu を ED（アグリコン型）へ脱抱合していることが示された。

以上のことから、SDG 代謝物抱合体の EDGlu がβ-グルクロニダーゼの作用により ED アグリコンへ脱抱合されることで、脱顆粒抑制活性を発揮している可能性が示唆された。今後、SDG のアレルギー疾患への有効性も期待できる。

Secoisolariciresinol diglucoside (SDG) is a kind of phytoestrogen that shows beneficial effects in the control of metabolic disorders such as diabetic symptoms. However, the role of SDG in allergic diseases remains to be investigated. Here we found anti-allergic activity of intestinal microbial metabolite of SDG, enterodiol (ED). Indeed, ED inhibited IgE-induced degranulation via GPR30 in RBL-2H3 mast cell/basophil cell line. We further revealed that ED inhibited the degranulation more efficiently than ED-glucuronide conjugates (EDGlu), a circulating form of ED. As mechanism underlying metabolism of EDGlu, RBL-2H3 cells showed β-glucuronidase activity when they were activated through FcεRI-mediated signaling. These results demonstrate that metabolic conversion of phytoestrogen and the de-conjugation of SDG metabolite are key events to exert their anti-allergic properties.

Secoisolariciresinol diglucoside, allergy, glucuronidase

講演番号：2G08-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

α-ラクトアルブミンによるアレルギー性小腸炎の抑制作用

The inhibitory effect of α-lactalbumin on allergic enteropathy

○中村 翔太朗、曽我 皓平、玉井 雅人、八村 敏志、足立（中嶋） はるよ（東大院農生科・食の安全研セ）
○ Shotaro NAKAMURA, Kohei SOGA, Masato TAMAI, Satoshi HACHIMURA, Haruyo NAKAJIMA-ADACHI (Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

α-ラクトアルブミン(α-LA)は抗酸化作用、腸管バリア維持機能など様々な生理活性を持つ乳清タンパク質である。本研究では、卵白食(EW)の自由摂食により腸間膜リンパ節(MLN)の IL-4 産生依存的にアレルギー性小腸炎を発症する食物アレルギーモデルマウス:OVA23-3 マウスを用い、α-LA による小腸炎抑制効果を検討した。実験群として、EW を 28 日間自由摂食させた EW 群、EW に加え滅菌水に溶解した α-LA を 300 ㎎/㎏ 体重の条件でゾンデにより毎日経口投与した LA 群、コントロールとしてカゼイン食を摂食させた CN 群の 3 群を設定した。EW 群と CN 群には α-LA の代わりに滅菌水を経口投与した。実験の結果、EW 群で観察された体重減少は、LA 群で有意に抑制された。EW 群に生じた小腸炎は、LA 群では全体的に回復傾向にあり、特に体重が回復した個体は CN 群に近い状態まで回復した。フローサイトメトリー解析から、α-LA 投与によって MLN および脾臓の $CD4^+$T 細胞中における $CD25^+$細胞の割合が減少する傾向が確認された。$Foxp3^+CD4^+$制御性 T 細胞の割合については、α-LA 投与による増加が確認されなかった。mRNA 発現解析の結果、LA 群における MLN 細胞の *Il4* 発現は減少した。以上から、α-LA は OVA23-3 マウスの小腸炎を抑制することが示唆された。その機構として $CD4^+$T 細胞の活性化抑制作用が想定され、その結果 MLN での IL-4 産生が抑制され小腸炎が軽快する可能性が示唆された。α-lactalbumin (α-LA) is a whey protein with various physiological activities. In this study, we investigated the effect of α-LA on food-allergic enteropathy in OVA23-3 mice, a food allergic mouse model. They develop the enteropathy dependently on IL-4 by feeding an egg-white diet (EW). In this experiment, OVA23-3 mice were divided into 3 experimental groups; casein diet-fed group (CNG) as a control, EW-fed group (EWG), or EW-fed plus α-LA-administered group (LAG). α-LA was orally administered with feeding needle daily. The weight loss observed in EWG was significantly suppressed in LAG. The enteropathy developed in EWG tended to be improved in LAG; especially the improvement was marked in the mice showing recovery from the severe weight loss. Flow cytometric analysis indicated that compared with EWG, α-LA treatment tended to decrease the rate of activated $CD4^+$ T cells and did not increase that of $Foxp3^+$ regulatory T cells in both mesenteric lymph nodes (mLN) and spleen cells. mRNA expression analysis showed that the expression of *Il4* in mLN was decreased in LAG. These results suggest that the inhibitory effect of α-LA on the activation of $CD4^+$ T cells leads to suppression of IL-4 production in mLN cells, which may ameliorate the enteropathy observed in EW-fed OVA23-3 mice.

α-lactalbumin, food-allergic enteropathy, activated T cells

発表責任者：足立（中嶋）はるよ（haruyona@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G08-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

Effect of polyphenols on mast cells cultured at atmospheric CO_2 level
○Hirofumi Nishikawa, Sumire Koizumi, Naoto Tanimoto (DaltonTokyo JSHS.)

Mast cells are well known to play a critical role in allergic disease and neutralization of toxins by release various mediators via activation of Fcε receptors, G-protein coupled receptors and Fcγ receptors. Since high school students learn basic concepts about allergic disease including physiological function of mast cells and their intracellular signal transduction, mast cell line can be useful for educational material to cover these learning contents. We have tried to culture mast cell line CMMC (Canine cutaneous Mastocytoma derived Mast Cell) in home electric portable warmer under atomospheric CO_2 level by using HEPES buffered RPMI-1640. We are currently culturing these cells in a stable manner and have confirmed degranulation by wasp venom Mastoparan and neuropeptide Substance P, basic secretagogue Compound 48/80.

Plant-derived polyphenols are known to relieve allergic symptoms, and there are studies dealing with mice and cells. Cultured mast cell lines RBL-2H3, PT-18, MC/9, and MCP-5 are used as the primary screening to evaluate the inhibitory effect of polyphenols. These cells are cultured in a normal CO_2 incubator. Degranulation of CMMC cultured in a CO_2 incubator is inhibited by green tea catechins. However, the effect of polyphenols on the degranulation of CMMC cultured in different methods has not been investigated. Therefore, in this study, we investigated whether degranulation of CMMC cultured in HEPES-RPMI1640 was similarly inhibited. As a result, green tea catechin EGCG strongly suppressed CMMC degranulation. We also report the effects of quercetin and hesperidin. This culture methods will make it easy to perform the experiment using mast cells in not only high schools but also research laboratories. Also, since few mast cell lines can degranulate via G protein pathway, CMMC will be a unique cell material.

Acknowledgments
This work was supported by Science Education Promotion Subsidy for Junior and Senior High School 2021 of Takeda Science Foundation.

mast cell, HEPES, polyphenol

発表責任者：西川洋史（cassiopea_ornata@live.jp）

講演番号：2G08-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

リン酸修飾がソバ主要抗原 Fag e 2 の好塩基球脱顆粒に及ぼす影響

Effects of phosphorylation on basophil degranulation of buckwheat major antigen, Fag e 2

○川端 洋基[1]、日比野 佑香[1]、鄭 屹峰[2]、片山 茂[1,2] ([1]信州大農、[2]信州大バイオ研)
○ Hiroki Kawabata[1], Yuka Hibino[1], Yifeng Zheng[2], Shigeru Katayama[1,2] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. Biomed.)

ソバ主要抗原 Fag e 2 は消化抵抗性を有し、アレルギー症状の重篤化に関与する。我々はこれまでに、患者血清 IgE に対する Fag e 2 の抗体結合能がリン酸修飾により低下すること、リン酸修飾 Fag e 2（P-Fag e 2）の経口摂取が Fag e 2 感作マウスのアレルギー症状を軽減させることを明らかにした。本手法でのアレルギー症状改善には、リン酸修飾によるエピトープ部位のマスキング効果が関与することが示唆された。そこで本研究では、ラット好塩基球様 RBL-2H3 細胞株を用いて、リン酸修飾が好塩基球の脱顆粒反応に及ぼす影響について検討した。Fag e 2 は酵母発現系を用いて調製し、P-Fag e 2 はピロリン酸ナトリウム存在下でのドライヒーティング法により調製した。Fag e 2 感作マウス血清から得た IgE 抗体で感作させた RBL-2H3 細胞に抗原を刺激し、細胞から放出されるβ-hexosaminidase（β-HEX）量を指標に脱顆粒活性を評価した。Fag e 2 刺激によりβ-HEX 放出量は抗原濃度依存的に増加した。加熱処理した Fag e 2 では、β-HEX 放出量の低下が見られたことから、高次構造によるエピトープの存在が示された。一方、P-Fag e 2 刺激下でのβ-HEX 放出量は Fag e 2 刺激下と比較して有意に低下したが、完全な抑制には至らなかった。そこで加熱処理した P-Fag e 2 を用いたところ、β-HEX 放出量は抗原未刺激と同程度まで低下した。以上より、Fag e 2 の脱顆粒反応はリン酸修飾により低下するが、リン酸修飾は Fag e 2 の構造的エピトープには顕著な影響を及ぼさないことが示された。

Fag e 2 is a major buckwheat allergen that is highly resistant to enzymatic digestion. We demonstrated that the IgE binding ability of Fag e 2 with patient sera was decreased by phosphorylation, and the oral administration of phosphorylated Fag e 2 (P-Fag e 2) attenuated the IgE-mediated allergic reactions in Fag e 2-sensitized mice. These effects might be due to the masking of epitopes by phosphorylation. In this study, we investigated the effect of P-Fag e 2 on degranulation of RBL-2H3 cells. Recombinant Fag e 2, obtained using the *Pichia* expression system, was phosphorylated prepared via dry-heating in the presence of pyrophosphate. Fag e 2 stimulation dose-dependently increased the IgE-induced β-hexosaminidase (β-HEX) release from RBL-2H3 cells. The stimulation of heat-treated Fag e 2 resulted in a low level of β-HEX release, suggesting that Fag e 2 has structural epitopes. P-Fag e 2 decreased the β-HEX release, and heat-treated P-Fag e 2 showed the almost same level as that of non-stimulated cells, indicating that phosphorylation of Fag e 2 could inhibit degranulation of basophils without affecting the structural epitopes.

food allergy, phosphorylation, epitope

講演番号：2G08-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム G

高温高圧水処理抗原を用いた食品アレルギーの予防法の開発

Application of high-temperature water treated antigen for preventing food allergy

○尾近 和信[1]、長田 光正[2]、後藤 真生[3]、石川（高野） 祐子[3]、服部 誠[1]、好田 正[1]([1]東農工大農、[2]信大繊維、[3]農研機構・食品研究部門)
○Kazunobu OKON[1], Mitsumasa OSADA[2], Masao GOTO[3], Yuko TAKANO-ISHIKAWA[3], Makoto HATTORI[1], Tadashi YOSHIDA[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. Tech., [2]Shinshu Univ., [3]National Food Research Institute, NARO)

食品アレルギーは食品に免疫系が不応答になる経口免疫寛容機構の破綻によって起きると考えられている。近年、食品アレルギーの治療法として経口免疫寛容の再誘導を企図した経口免疫療法（Oral immunotherapy:OIT）が注目されるが、その効果には個人差も多く、患者に抗原を摂取させる手法であるためアナフィラキシーなどの副作用のリスクがある。そのため、より安定した効果が得られ、かつ副作用のリスクも低い手法が望まれている。食品アレルギーモデルマウスを用いた我々のこれまでの研究でも OIT の上記課題が確認された一方で、食品アレルギーの感作前に酸加水分解によってペプチド化した抗原で経口免疫寛容を誘導すれば、その後の抗原摂取による食品アレルギーの発症を予防できることが示唆された。そこで本研究では卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原とし、酸処理よりコストダウンが期待できる高温高圧水処理によってペプチド化した抗原を予防的に摂取させる手法の有用性を確認することとした。OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現するトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスに未処理 OVA 含有飼料を摂取させることで食品アレルギーを誘導した。その際、アレルギーの誘導前に高温高圧水処理した OVA を事前摂取させることで食品アレルギーの誘導を予防できるかを確認した。予防効果は実験期間中の血清の OVA 特異的 IgE 抗体価と実験終了時に OVA の腹腔内投与で誘導したアナフィラキシー反応に伴う体温低下で評価した。その結果、高温高圧水処理 OVA を投与したマウスではその後の未処理 OVA 投与による IgE 抗体産生は抑制されなかったが、アナフィラキシー反応が抑制された。

Food allergy is considered to be the disease caused by the breakdown of oral tolerance, a phenomenon in which the local and systemic immune responses are inhibited, that is induced by oral administration of innocuous antigens such as food proteins. Recently, oral immunotherapy (OIT) has drawn attention as a therapy with the possibility of curative treatment for food allergy. However, it is not as effective as expected at the moment and side effects such as anaphylaxis frequently occur due to the ingestion of antigens. Therefore, more effective and safer treatment is desired. We previously showed that oral immunotherapy was not effective treatment using food allergy model mice, while it was suggested that food allergy can be prevented by inducing oral tolerance with a degradated antigen before the onset of food allergy. In this study, we aimed to obtain a practically useful hypoallergenic antigen to prevent food allergy by high-temperature water treatment.

food allergy, high-temperature water treatment, oral tolerance

講演番号：2H02-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

褐藻類ナガコンブのアルギン酸含有量と M/G への生育時期の影響

Effects of growing time on alginic acid content and M / G of the brown alga, Saccharina longissima

○川又 澄人[1]、黒須 泰行[1]、本間 悠里[1]、四ッ倉 典滋[2]、垣田 浩孝[1]([1]日大院・総合基、[2]北大院・北方生物圏)
○Sumito KAWAMATA[1], Yasuyuki KUROSU[1], Yuuri HONMA[1], Norisige YOTUKURA[2], Hirotaka KAKITA[1] ([1]NihonUniv. Graduate School of Integrated basic Sciences, [2]Hokkaido Univ. Field Science Center for Northern Biosphere)

アルギン酸は褐藻類及び微生物が産生する多糖である。アルギン酸はマンヌロン酸（M）とグルロン酸（G）という 2 種類のウロン酸から構成される直鎖状のポリマーである。アルギン酸は 2 価の金属イオンと反応しゲルを生成する。ゲルの強度は M/G が小さいほど強い。用途により M/G の異なったアルギン酸が必要である。しかしながらアルギン酸の海藻藻体中での分布はいまだに不明な点が多い。そこで本研究ではナガコンブのアルギン酸含有量及び M/G への生育時期の影響を明らかにすることを目的とした。ナガコンブは北海道厚岸で採取した。生育時期 1 年目、1.5 年目、2 年目のナガコンブを使用した。ナガコンブを 50 cm ごとに切断して断片を得た。コンブ断片から粗アルギン酸をアルカリ溶液で抽出した。粗アルギン酸をエタノールで再沈殿して精製アルギン酸を得た。ウロン酸含有量はカルバゾール硫酸法にしたがって決定した。M/G は精製アルギン酸を硫酸加水分解後に HPLC を行って決定した。生育 2 年目と生育 1 年目のナガコンブにおいて M/G は付着器側が高く、先端側が低かった。生育 1.5 年目は海藻部位による M/G 変動は小さかった。このことからさらに短い断片を作成してアルギン酸含有量、M/G を現在調査している。

Alginic acid is a polysaccharide produced by brown algae and microorganisms. Alginic acid is a linear polymer composed of two types of uronic acid, mannuronic acid (M) and gluronic acid (G). Alginic acid reacts with divalent metal ions to form a gel. The gel strength is stronger as the M / G is smaller. Alginic acid with different M / G is required depending on the industrial application. However, the distribution of alginic acid in seaweeds remains unclear. Therefore, the purpose of this study was to clarify the effects of growing time of Saccharina longissima on the alginic acid content and M / G. Algal specimens were collected in Akkeshi, Hokkaido, washed, froze, and stored at -20ºC until use. Second year growing algae, one and half year growing algae and one year growing algae were used. Frozen seaweeds were washed and cut into small pieces (50 cm long). An alkaline solution was used to extract crude alginic acid from algal small pieces. The crude alginic acid was subjected to ethanol precipitation treatment to obtain purified alginic acid. Uronic acids were determined according to Carbazole sulfuric acid method. The values of M/G of purified alginic acids were determined HPLC, after hydrolysis treatment with sulfuric acid. In second year and one year algae, M/G decreased toward the tip of the algae. But M/G hardly changed in one and half year algae. For this reason, we have prepared finer fragments and are currently investigating their M / G.

Seaweed, Alginic acid, Uronic acid

講演番号：2H02-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

α-グルコシダーゼおよびブランチングエンザイムの添加による炊飯米の老化抑制効果の粒内分布

Suppression degree distributions of starch retrogradation in the cross-section of cooked rice grain depending on addition of α-glucosidase and branching enzyme

○田口 拓実[1]、大西 未紗[1]、大元 智絵[2]、山口 秀幸[2]、勝野 那嘉子[1]、今泉 鉄平[1]、西津 貴久[1]([1]岐阜大院自然、[2]味の素（株））
○ Takumi TAGUCHI[1], Misa ONISHI[1], Chie OOMOTO[2], Hideyuki YAMAGUCHI[2], Nakako KATSUNO[1], Teppei IMAIZUMI[1], Takahisa NISHIZU[1] ([1]Gifu Univ., [2]AJINOMOTO CO., INC.)

【目的】演者らはこれまで，X 線回折を用いた加水法を用いてα-グルコシダーゼ（AG）とブランチングエンザイム（BE）の炊飯米の澱粉老化抑制効果について検討してきた。今回は，炊飯米を部位別に XRD 測定（*In situ* XRD）し，これら酵素の澱粉老化抑制効果の米粒内分布について検討した。
【方法】本研究では，令和元年度宮城県産ひとめぼれを用いた。酵素は炊飯直前に添加し，炊飯後，チャック付きポリ袋に密封し，15℃で 4 日間（D+4）保存した。米粒の長径の中心付近を，長軸に対して垂直に切断し，1 ㎜厚のディスク状に切り出したものを試料とした。表面からの水分蒸発抑制の目的で，シアノアクリレート系接着剤を試料表面に塗布した。高エネルギー加速器研究機構の BL-5A にて，ビームサイズ 100 μｍ x 100 μｍの放射光を試料切断面の周辺部から芯部に向かって 250 μm 間隔で照射し，各点で X 線回折測定を行った。得られた X 線回折図より，4a 環ピーク面積を用いて澱粉老化度を算出した。
【結果】同一米粒内で比較した場合，米粒の周辺部から 600 μm までの範囲では芯部に近づくにつれて澱粉老化度が大きくなった。600 μm からは，芯部に近づくにつれて澱粉老化度が小さくなったが，周辺部の澱粉老化度は下回らなかった。すべての測定部位で，AG および BE 添加区の澱粉老化度は D+2 と D+4 で無添加区より小さく，AG および BE 添加による澱粉老化の抑制効果が認められた。米粒内を部位ごとに比較した場合，AG および BE 添加による澱粉老化の抑制効果は，米粒の周辺部の方が芯部より大きかった。以上の結果より，炊飯米粒の表面近傍の澱粉老化度は内部より小さく，AG および BE の老化抑制効果は，米粒の表面近傍の澱粉に特に顕著であることが明らかとなった。

In this study, we investigated the suppression degree distribution (D_d) of starch retrogradation in the cross-section of cooked rice grain depending on addition of α-Glucosidase (AG) and Branching Enzyme (BE). In each rice grain, D_d increased with the depth from the grain surface to 600 μm depth. Meanwhile, D_d decreased from 600 μm depth to the center. However, D_d near the center was not smaller than near the surface. Addition of AG/BE has an effect on suppression of starch retrogradation in all areas. This effect near the surface was greater than near the center. Therefore, it was clarified that near the surface, D_d was smaller and the effect on the suppression of starch retrogradation by addition of AG/BE was greater than near the center.

starch retrogradation, cooked rice grain, cross-section

講演番号：2H02-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

新規育成した超多収低アミロース米系統品種の米胚乳酵素活性量について

About the rice endosperm enzyme activity of newly cultivated ultra-high-yield and low amylose rice varieties

○辻井 良政[1]、菱川 美千代[1]、小舘 琢磨[2] ([1]東農大農化、[2]岩手農研セ)
○Yoshimasa TSUJII[1], Michiyo HISHIKAWA[1], Takuma ODATE[2] ([1]Agri. Chem., Tokyo Univ. of Agri., [2]Iwate Agri. Rese. Cen.)

チルド米飯に適する超多収低アミロース米系統の育成を目的とする交配集団から、草姿が良好で耐倒伏性に優れた超多収の個体を圃場選抜した。それらと比較品種とを合わせた 122 品種系統について、米胚乳酵素活性量（α-amylase, β-amylase, α-glucosidase, β-glucanase, α-galactosidase, β-galactosidase, α-mannosidase, β-xylanase および Pullulanase ）により、品種系統による酵素活性の質的量的な差違、産地間差及び栽培条件に関する測定データと食味値や理化学的特性値を統計処理等の計量化学手法を用いて解析する。この解析により、低アミロース米の米飯の硬さと粘りに関する特性を明らかにし、米胚乳酵素活性量による品種のグループ化を出来るようにするとともに、米胚乳酵素の多少が低アミロース米の食感や「べたつき」等の炊飯物理性に及ぼす品種系統間差異を見出すことを目的とした。酵素活性量を変数とした主成分分析により、中アミロースと低アミロースのうるち米が大まかに識別でき、さらに *Wx-mq* 型の低アミロース米の中でも「きらほ」と育成中の後代系統との識別ができた。本研究は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業(02008B)」の支援を受けています。

We are cultivating ultra-high-yield, low amylose rice strains suitable for chilled cooked rice. From these mating populations, ultra-high-yielding individuals with good grass appearance and excellent lodging resistance were selected in the field. For 122 varieties of strains including those and comparative varieties, the rice endosperm enzyme activity (α-amylase, β-amylase, α-glucosidase, β-glucanase, α-galactosidase, β-galactosidase, α-mannosidase, β-xylanase) And Pullulanase) were measured. Principal component analysis with the rice endosperm enzyme activity as a variable could roughly distinguish between medium amylose and low amylose glutinous rice. Furthermore, among the Wx-mq type low amylose rice, ″Kiraho″ could be distinguished from the progeny line. This research is supported by the Bio-Oriented Technology Research Advancement Center ″Innovation Creation Enhancement Research Promotion Project (02008B)″.

Low amylose, rice endosperm enzyme activity, ultra-high-yield

発表責任者：辻井良政（96tsujii@nodai.ac.jp）

講演番号：2H02-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

玄米γ-オリザノール高含有品種の探索ならびに含量関連遺伝子の研究

Researches on exploring the rice varieties with high content of gamma-oryzanol and on their amount-associated genes

○高橋 正和[1]、定永 麻里[1]、柴田 莉奈[1]、吉田 英樹[2]、松岡 信[2]、森中 洋一[1]、三浦 孝太郎[1]([1]福井県大生物資源、[2]福島大食農学類)
○Masakazu TAKAHASHI[1], Mari SADANAGA[1], Rina SHIBATA[1], Hideki YOSHIDA[2], Makoto MATSUOKA[2], Yoichi MORINAKA[1], Kotaro MIURA[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukushima Univ.)

イネ玄米に含まれるγ-オリザノール（OZ）は、脂質代謝改善作用などを示す健康機能成分である。しかし玄米中の OZ 量は品種ごとに異なり、その制御遺伝子の全貌は明らかになっていない。本研究では OZ 含量が高い玄米を開発することを狙いとして、イネ品種ライブラリーについて玄米粉末中の OZ 含量を解析し、高含有品種を探索した。またこのイネ品種ライブラリーは多様な遺伝的背景を持つ約 700 系統の品種群からなり、ゲノム配列解析を終えていることから、測定結果をゲノムワイドアソシエーション解析（GWAS）に供し、OZ 含量に関与する遺伝子について調べた。

イネ玄米粉のメタノール抽出液を逆相 HPLC 分析に供して OZ を解析し、標準試薬をもとに主要な 4 つの分子種を含む OZ 総量を算出したところ、約 120～400 ng/mg-玄米粉（平均 226 ng/mg-玄米粉）と品種間で大きな幅があり、300 ng/mg-玄米粉を超える高含有品種が約 30 種類（平均 319 ng/mg-玄米粉末）、350 ng/mg を超える品種が 5 種類確認された。また GWAS の結果、OZ 含量に関連する遺伝子座を 3 つ検出することに成功した。現在はさらに OZ 量の制御遺伝子について究明を進めるとともに OZ 高含有品種の開発に取組んでいる。

Rice bran-derived γ-oryzanol (OZ) is beneficial for human health because of its health-promoting activities such as lipid metabolism improvement effect. But the OZ content in the brown rice is different among varieties of rice (*Oryza sativa* L.), and the whole regulatory profile of the OZ production has not be clarified. To develop a novel OZ rich brown rice, the OZ content was investigated concerning the brown rice powder of a cultivar collection consisted of about 700 rice varieties in Japan. A genome-wide association study (GWAS) of the OZ amount was then performed to search candidate genes involved in the production of OZ.

When the total OZ content was measured by the reversed-phase HPLC analysis of the methanol extract of the brown rice powder, the OZ contents of the rice varieties were ranged from 120 to 400 ng/mg-powder (226 ng/mg in average), and those of five cultivars were larger than 350 ng/mg. Moreover, GWAS of the OZ content demonstrated three OZ content-related gene loci.

gamma-oryzanol, genome-wide association study, brown rice

発表責任者：高橋正和（mastak@fpu.ac.jp）

講演番号：2H02-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

LC-MS/MS による油脂の酸化感受性の評価：とくに脂肪酸鎖長の影響の解明に向けて

Evaluation of the effect of the fatty acid chain length on lipid oxidation

○楠本 惟吹[1]、加藤 俊治[1]、泉井 亮太[2]、田中 礼央[2]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]雪印メグミルク（株））
○Ibuki KUSUMOTO[1], Shunji KATO[1], Ryota WAKUI[2], Leo TANAKA[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1]
([1]Tohoku Univ., [2]MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd.)

【背景】食用油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TG）は 3 つの脂肪酸から構成され、製造や保存の過程で TG の脂肪酸は酸化され、TG ヒドロペルオキシド（TGOOH）となる。生じた TGOOH は油脂の品質低下を引き起こすほか、その摂取は様々な疾病の要因となることも示唆され、故に TG の酸化感受性を理解し適切に対策をすることが広く求められている。この TG の酸化感受性については、構成脂肪酸の不飽和度や炭素鎖長により特徴づけられると言われ、実際に POV 法（OOH 量を測定できる比色法）により不飽和度が高いものは酸化安定性が低くなることが示されてきた。しかしながら、POV では酸化した脂肪酸の特徴を見分けることは難しく、とくに構成脂肪酸の鎖長と酸化の関係解明はあまり進んでいない。最近、当研究室では液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた選択的な TGOOH 分析法を構築し、本法により TG の構成脂肪酸ごとに酸化の程度の評価が可能となったため、構成脂肪酸の鎖長と酸化の関係を明らかにできると期待される。そこで、こうした評価にむけて、本研究においては、鎖長が異なる脂肪酸を有する TG 分子種を幾つか合成し、LC-MS/MS による鎖長の影響評価に繋げようとした。
【方法・結果】Dipalmitin に鎖長の異なる 5 種の脂肪酸（C16:1n-7, C18:1n-9, C20:1n-9, C22:1n-9, C24:1n-9）をそれぞれエステル縮合させた。その後、飛行時間型 MS により構造を確認し、ガスクロマトグラフィーを用いて濃度を決定した。次いで、合成した 5 種の TG を 60℃で強制酸化させ、生じた TGOOH を LC-MS/MS（プロダクトイオンスキャン）で分析した。保持時間を X 軸、質量電荷比を Y 軸として 2D map を作成したところ、TG と同様に TGOOH も理論通り不飽和度と炭素鎖長に応じて規則的に配列され、さらに当研究室でこれまでに見出した原理（測定系の Na^+が OOH 基の結合位置特異的な開裂を誘導する）に基づいて TG の構成脂肪酸の OOH 基の結合位置を特定することが可能であった。
【考察】以上のように、鎖長の異なる 5 種の TG を合成し、これらの構成脂肪酸の酸化の程度の評価を LC-MS/MS で行えることが示された。そこで現在、5 種の TG の酸化安定性が、実際にどの程度異なるのかの評価を進めている。

Triacylglycerol (TG) is oxidized during production and storage; the oxidative stability of TG is attributed to each constituent fatty acid (FA) character. However, little is known about the relationship between the chain length of FA and the oxidative stability of TG due to the limitation of evaluation methods for lipid oxidation of FA. In this study, we synthesized five TG with different FA chain lengths and tried to evaluate their oxidative stability by liquid chromatography-mass spectrometry.

lipid oxidation, fatty acid, liquid chromatography-mass spectrometry

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2H02-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

超臨界流体クロマトグラフィーを用いた食用油脂酸化の評価
Evaluation of edible oil oxidation using supercritical fluid chromatography
○境野 眞善[1,2]、加藤 俊治[2,3]、伊藤 隼哉[2]、清水 直紀[2]、西村 紗希[1]、竹内 茂雄[1]、今義 潤[1,3]、仲川 清隆[2,3] ([1]J-オイルミルズ、[2]東北大院農・機能分子解析学、[3]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座)
○Masayoshi SAKAINO[1,2], Shunji Kato[2,3], Junya Ito[2], Naoki Shimizu[2], Saki Nishimura[1], Shigeo Takeuchi[1], Jun Imagi[1,3], kiyotaka Nakagawa[2,3] ([1]J-OIL MILLS, INC., [2]Food Biodyn. Chem. Lab., Tohoku Univ., [3]J-Oil Innov. Lab., Tohoku Univ.)

【目的】油脂（トリアシルグリセロール, TG）のフライ調理時には TG の加水分解によって遊離脂肪酸が生じるため、こうした油脂の酸化の評価を行う場合は、TG とともに遊離脂肪酸のヒドロペルオキシドも解析することが望まれる。TG のヒドロペルオキシドの解析については、これを脂肪酸エチルエステルへ変換し、超臨界クロマトグラフィー（SFC）で解析する方法を、先に我々は構築した。本研究では、脂肪酸エチルエステルのヒドロペルオキシドとともに、遊離脂肪酸のヒドロペルオキシドも異性体別に同時分析できる SFC 法の構築を目指した。
【方法】リノール酸のヒドロペルオキシド（LAOOH）とリノール酸エチルエステルのヒドロペルオキシド（EtLAOOH）の標準品を調製し、SFC-MS/MS で分析を行った。分析カラムは Inertsil ODS-EP（5um, 4.6mmID×250mm）を使用した。
【結果】LAOOH 標準品をスキャンモードで分析すると、LAOOH は H 付加体と Na 付加体として検出され、$[LAOOH+Na]^+$のプロダクトイオンスキャン分析により、ヒドロペルオキシ基の結合位置に特異的なフラグメントイオンの検出が可能であった。このフラグメントイオンを活用して Multiple Reaction Monitoring モードで分析すると、9-LAOOH、10-LAOOH、12-LAOOH および 13-LAOOH を分離でき、SFC を用いた遊離脂肪酸のヒドロペルオキシドの異性体分析を達成した。さらに分離条件を精査し、LAOOH と EtLAOOH を同時分析できる条件を見出すことができた。ヒドロペルオキシドの異性体組成は油脂の酸化の原因（加熱や光）と密接に関係することから、本 SFC 法により食用油脂の酸化原因（例えば、フライ調理時やフライ食品中の TG の酸化要因）の推定が可能と考えられ、この実証を現在進めている。また、SFC の特長を生かした分析の短時間化も行っている。

It has been reported that different lipid hydroperoxide isomers are formed by photo-oxidation and auto-oxidation. Based on this fact, analysis of hydroperoxide isomers is beneficial to understand the cause of lipid oxidation. In this study, we tried to develop an analytical method to simultaneously analyze the regio isomers of linoleic acid hydroperoxide and linoleic acid ethyl ester hydroperoxide using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry.

[1] 境野眞善, 伊藤隼哉, 日本食品科学工学会第 68 回大会 (2021)
[2] Ito, J., et al., Sci. Rep., 9, 7387 (2019)

oil, oxidation, supercritical fluid chromatography

発表責任者：境野眞善（masayoshi.sakaino@j-oil.com）

講演番号：2H02-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

小麦リポキシゲナーゼアイソザイムの生化学解析

Biochemical analysis of wheat lipoxygenase isozymes

○小菅 拓海[1]、積田 悠平[1]、加藤 雄己[2]、椎葉 究[3]、夏目 亮[1,2]([1]東電大院・工、[2]東電大・工、[3]東電大・理工)
○TAKUMI KOSUGE[1], YUHEI TSUMITA[1], YUKI KATO[2], KIWAMU SHIIBA[3], RYO NATSUME[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [3]Sch. of Sci. and Eng., Tokyo Denki Univ.)

小麦 Lypoxigenase (LOX)には基質特異性などが異なる 3 種類のアイソザイムが存在している。小麦細胞では、LOX はジャスモン酸生合成経路の初発反応を触媒することで小麦の耐病性に関与している。小麦 LOX は小麦粉中にも少量ではあるが存在し、小麦粉生地における化学的変化に関与して小麦粉生地の製パン性に影響を与えるが、その分子機構については未解明である。我々は、小麦 LOX のどのアイソザイムが小麦粉生地の製パン性に影響を与えるのかを突き止め、その LOX アイソザイムによって引き起こされる小麦粉生地中の化学変化を明らかにすることを目的として研究を開始した。これを明らかにできれば、特定の小麦 LOX 高発現性を小麦に付与することによって、小麦粉生地の製パン性を高めることや、耐病性の強化も期待できる。これまでの研究で、小麦 LOX アイソザイムI, II については、大腸菌を宿主とした組換え発現および精製に成功したため、精製酵素を用いて生化学解析を行った。LOX IIIについては、大腸菌を宿主とした組換え発現では発現量が著しく低かったため、当研究室で開発中のコリネ型細菌を宿主とした組換え発現を試みている。

In wheat genome, there are three genes coding Lypoxigenase (LOX) isozymes those differ in substrate specificities and other properties. In wheat cells, LOXs are involved in disease resistance by catalyzing the first committed step of biosynthesizing pathway of jasmonic acid. Wheat LOXs also present in wheat flour in small amounts, and are involved in chemical changes in the flour dough that affect the bread-making properties of the dough. However, their molecular mechanism is still unknown. In order to find out which isozymes of wheat LOX affect the bread-making properties of flour dough, and to elucidate the chemical changes in flour dough caused by the LOX isozymes, we initiated biochemical analysis of recombinant LOX isozymes. If these questions could be clarified, the bread-making properties of flour dough and disease resistance of wheat could be improved by giving specific LOX high expression to wheat. In this study, recombinant wheat LOX isozymes I and II were expressed in *E. coli* and purified, and their biochemical properties were examined. Since the expression level of LOX III was remarkably low in *E. coli*, attempts are being made to express LOX III using a novel *Corynebacterium* expression system, which is being developed in our laboratory.

Lypoxigenase, Isozyme, Wheat flour dough

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2H02-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

フェノール酸焙煎反応物の化学構造・キサンチンオキシダーゼ阻害活性

The chemical structures and xanthine oxidase inhibitory activity of roasting reaction products from phenolic acids

○新道 雪乃、谷口 明日香、増田 俊哉（大阪市大院生活）
○Yukino SHINDO, Asuka TANIGUCHI, Toshiya MASUDA (Osaka City Univ.)

【目的】食品の加工調理において加熱は最も一般的な方法であり，その過程で食材成分の熱化学反応が起きる。ところで，コーヒーの痛風発症予防効果はよく知られるようになったが，我々は，焙煎加工したコーヒー豆中の成分が，痛風の原因物質である尿酸を産生する酵素・キサンチンオキシダーゼ(XO)の働きを阻害することを見いだしている。これまでの研究で，焙煎により生成する活性成分として，クロロゲン酸ラクトンやピロガロールなどを特定したが，非極性画分については，強い活性を示すものの構成成分が非常に複雑であり，物質特定が困難であった。コーヒー豆はカフェ酸などのフェノール酸系のポリフェノールを多量に含み，豆の高い焙煎温度ではポリフェノールの分解反応も起こる。そこで，コーヒー豆に含まれている 3 種のフェノール酸（カフェ酸，フェルラ酸，シナピン酸）に着目し，その焙煎反応物の化学構造と XO 阻害活性について検討した[1)]。今回，シナピン酸の焙煎反応物の化学構造を明らかにし，フェルラ酸の反応物とともに XO 阻害活性を測定した。
【方法と結果】焙煎反応は，pH 6 相当リン酸塩とフェノール酸（フェルラ酸・シナピン酸）を混合し 170℃に加熱することにより行った。生成物を酢酸エチル抽出し，HPLC 等で精製したところ，いずれのフェノール酸からも，主生成物としてフェノール酸のビニル体，およびそれが直鎖状に重合化したと考えられるものを特定した。これらの XO 阻害活性を測定した結果，フェルラ酸反応物は未加熱のものと比べ XO 阻害活性が向上した一方，シナピン酸反応物はフェルラ酸反応物と同様の構造にもかかわらず XO 阻害活性を示さなかった。なお，フェルラ酸は，焙煎加工することの多い穀物類の主要ポリフェノールでもあるため，焙煎穀物にコーヒー同様の機能性が期待される。

1) 新道ら 日本農芸化学会 2021 年度大会（仙台）要旨集 p. 340

Roasting is one of major cooking methods. During roasting, food components including polyphenols react and are converted into other compounds. We especially focused on the roasting reaction of phenolic acids and have been investigated the structure and activities of the roasting reaction products. We have reported the main reaction products of ferulic acid to be liner oligomeric compounds.[1)] The reaction products from sinapic acid also afforded structurally similar products to those from ferulic acid. The xanthine oxidase inhibitory activity of the reaction products both from ferulic and sinapic acid was measured. The reaction products from ferulic acid showed stronger inhibitory activity than the of ferulic acid, while the products from sinapic acid showed almost no activity.

phenolic acid, roasting reaction, xanthine oxidase inhibition

発表責任者：新道　雪乃（m20ha008@hj.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：2H02-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:30～ ミーティングルーム H

新規後発酵茶の製造方法の開発

Method for production of a novel post-fermented tea

○永嶺 海夕[1]、宮澤 知暉[2]、椎葉 究[1,2]、安部 智子[1,2]([1]東京電機大院・理工研、[2]東京電機大・理工)
○Myu NAGAMINE[1], Tomoki MIYAZAWA[2], Kiwamu SHIIBA[1,2], Tomoko ABE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Science and Engineering, Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

後発酵茶は茶葉の酵素を不活性化後に微生物を用いて発酵させ製造した茶で、苦みの少ない健康飲料として茶離れが進んでいる若年層にも今後普及する可能性がある。後発酵により新規の機能性成分が生成されることが報告され、その効能が注目されている。しかしながら、日本国内において後発酵茶の生産量は少なく、国内ではほとんど流通していない。我々は、新たな後発酵茶を安定に製造する方法を開発するため、発酵食品中の微生物を単離して条件を検討し、その中からいくつかの微生物を選抜した。また、本研究では、国内の低価格な二・三番茶を原料として使用することを検討した。

市販の微生物を用いて作製した微生物後発酵茶では、マウスの飲用試験において、高脂肪食を摂取させたマウスに対して体重増加抑制効果および血中コレステロール濃度の増加抑制効果が見られた。我々はさらに後発酵茶製造に有用な微生物を単離するため、糠床や味噌などの発酵食品を単離源として、いくつかの微生物を単離した。単離した菌を前培養して集菌し、乾燥した茶葉と混ぜ合わせ発酵条件を検討した。発酵させた茶葉から抽出した溶液を後発酵茶抽出液 1 とした。また、熱水抽出した茶葉の抽出液に前培養した単離菌を加え、発酵条件を検討した溶液を後発酵茶抽出液 2 とした。発酵開始から経時的に発酵液を採取して菌数や pH 等を測定した。測定値に大きな変化が見られた試料において成分解析を行った結果、カテキン類の含有量の減少が確認された。また、後発酵茶抽出液 1 と比較して後発酵茶抽出液 2 においてより大きな減少が確認された。

Post-fermented teas have been produced from tea leaves by fermentation of several microorganisms which has been almost unidentified. In this study, some strains selected from Japanese fermented food were investigated for a new post-fermented tea production. These some components and physiological functions were investigated. In these HPLC studies, a decrease in the amount of some catechins in the new post-fermented tea was detected. Furthermore, antioxidative activities and inhibitory activities against angiotensin-converting enzyme of the fermented tea were also detected.

Post-fermented tea, Catechin

講演番号：2H04-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

低メトキシペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変

Functional improvements in β-lactoglobulin by conjugation with low methoxyl pectin

○米谷 礼、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Rei YONETANI, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. Agric. Tech.)

β−ラクトグロブリン(BLG)は乳化性、ゲル化性、気泡性に優れている有用な食品タンパク質であるが、酸性条件下における乳化性の低下やアレルゲン性などの欠点を持つ。そこで本研究では、BLG を酸性多糖である低メトキシペクチン(LMP)と水溶性カルボジイミド(EDC)により結合させ複合体化することで欠点の克服を目指した。BLG と LMP を 2:9 (重量比)として蒸留水に溶解し pH を 4.5 とした後、EDC を加え室温で 3 時間反応させた。この複合体を硫安塩析とゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、タンパク含量と糖含量を測定した上で、後の実験に使用した。複合体の乳化性について濁度法により評価したところ、BLG と比較して乳化活性および乳化安定性の有意な改善が認められた。複合体の免疫原性について、BLG と複合体をそれぞれ免疫したマウスの特異的抗体産生量を ELISA 法により評価したところ、BLG 特異抗体産生量は BLG で免疫した場合と同程度であった。

β-lactoglobulin (BLG) is widely used as a food ingredient due to its excellent emulsifying, gelling, and foaming properties, but it has disadvantages such as decreased emulsifying property under acidic conditions and high allergenicity. We aimed to overcome the shortcomings by conjugating with low methoxy pectin (LMP) by using water-soluble carbodiimide (EDC). BLG and LMP were dissolved in distilled water at 2:9 (weight ratio) and adjusted to pH 4.5. EDC was added and the reaction was carried out for 3 hours at room temperature. The conjugate was purified by ammonium sulfate salting out and gel filtration chromatography, and the saccharide and protein contents were determined before being used in later experiments. Emulsifying property of BLG and the conjugate was evaluated by turbidity method. Emulsifying activity and emulsion stability of the conjugate were significant improved in the conjugate. Immunogenicity of the conjugate was evaluated by measuring antibody production in BALB/c mice immunized with the conjugate. The conjugate showed a no significant reduction in BLG-specific antibody production.

β-lactoglobulin, protein conjugation, functional improvements

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2H04-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

ペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変

Functional improvements in ß-lactoglobulin by conjugation with pectin.

○大野 雄一郎、柴田 航矢、好田 正、服部 誠（東農工大）
○Yuichiro ONO, Koya SHIBATA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. Agric. Tech.)

β-ラクトグロブリン(BLG)は乳化性などの機能特性を有している有用な食品タンパク質であるが、アレルゲン性などの欠点から利用が制限されている。そこで、本研究では BLG に対してメイラード反応を用いて Low Methoxy Pectin(LMP)、 High Methoxy Pectin(HMP)を修飾し、複合体化することで機能特性やアレルゲン性の改善を目指した。BLG と LMP または HMP を重量比でそれぞれ 1:8.3 または 1:4.15 になるように蒸留水に溶解、混合した後に凍結乾燥し混合物を 60℃、相対湿度 79%の条件下で 5 日間加熱することでペクチンと BLG の複合体を調製した。この複合体を透析、DEAE-クロマトグラフィーにより精製した。複合体生成の確認は SDS-PAGE により行った。複合体のタンパク質含量、糖含量を調べた結果、BLG-LMP 複合体はタンパク含量 16.4%、糖含量 47.3%、また BLG-HMP はタンパク含量 31.6%、糖含量 34.4%となりメイラード反応による BLG-ペクチン複合体の生成を認めた。この精製した複合体の抗 BLG 抗体に対する反応性(抗原性)、および抗 BLG 抗体産生性（免疫原性）を測定し、免疫学的性質を評価した。その結果複合体の抗原性は還元カルボキシメチル化 BLG より低く、免疫原性は BLG より低い結果となった。また複合体の乳化性についても併せて報告する。

β-lactoglobulin (BLG) is a useful food protein with functional properties such as emulsifying property, but its use is limited due to its disadvantages such as allergenicity. Therefore, we aimed to improve the functional properties and allergenicity by conjugating with Low methoxy pectin (LMP) and high methoxy Pectin (HMP) by the Maillard reaction at 60℃ at RH 79% for 5 days. Conjugation between BLG and pectin was confirmed by SDS-PAGE. Purification was carried out by dialysis and DEAE-chromatography. Protein concentration and saccharide concentration of the purified conjugate was measured. The BLG-LMP conjugate had a protein content of 16.4%, a saccharide content of 47.3%. The BLG-HMP conjugate had protein content of 31.6% and the saccharide content was 34.4%. Antigenicity of the conjugates in BALB/c mice was lower than that of reduced carboxy methylated BLG, and immunogenicity was lower than that of BLG. We also report on the emulsifying property of the conjugates.

β-lactoglobulin, protein conjugation, functional improvement

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2H04-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

カルボキシメチルセルロースとの複合体化によるβ-ラクトグロブリンの機能改変

Functional improvements in β-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl cellulose

○新井 達也、尾野 萌子、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Tatsuya ARAI, Moeko ONO, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. Agric. Tech.)

β−ラクトグロブリン(BLG)は乳化性などの機能特性を有している有用な食品タンパク質であるが、アレルゲン性などの欠点から利用が制限されている。そこで、BLG とカルボキシメチルセルロース(CMC)を水溶性カルボジイミド(EDC)により複合体化することで、機能特性やアレルゲン性の欠点の改善を目指した。特に、糖の含量や分子量の異なる複合体の特性を比較した。BLG 200 mg と必要量の CMC を蒸留水に溶解し、pH を 4.75 に調整した後、EDC を加え 3 時間反応させた。その際に BLG の-NH_2：CMC (982.4 Da)の-COOH を 1:3.5, 1:7(モル比)とした複合体、および高分子 CMC(HMW CMC, 700 kDa)を用いて 1:3.5 とした複合体を調製し、DEAE クロマトグラフィーにより精製した。得られた複合体の乳化性を評価したところ、全ての複合体において乳化活性および安定性の向上がみられた。BLG および 3 種類の複合体を BALB/c マウスに免疫し、血清中の BLG 特異的抗体価を測定することで免疫原性を評価したところ、全ての複合体において BLG 特異的抗体産生性は有意に低下していたが、特に HMW CMC を用いた複合体においてその効果が大きかった。本研究の結果、CMC との複合体化は BLG の機能改変に有効であると考えられ、特に分子量が大きな CMC が効果的であった。

β-lactoglobulin (BLG) is a useful food protein because of its functional properties. However, its use has been limited due to its allergenicity etc. In this study, BLG was conjugated with carboxymethyl cellulose (CMC) by using water-soluble carbodiimide (EDC) to improve its functional properties and its problems. We compared the properties of the conjugates with different saccharide contents or saccharide molecular weights. BLG (200 mg) and the required amount of CMC dissolved in distilled water and adjusted to pH 4.75. EDC was added and reacted for 3 h. At that time, the conjugates were prepared by reacting -NH_2 of BLG: -COOH of CMC (982.4 Da) = 1:3.5 or 1:7 (molar ratio), and the high molecular weight CMC (HMW CMC, 700 kDa) conjugate at 1:3.5 was also prepared. The conjugates were purified by DEAE chromatography. Emulsifying properties of BLG and the three conjugates were evaluated. Emulsifying activity and emulsion stability were improved in all conjugates. Immunogenicity of BLG and the three conjugates were evaluated by immunizing BALB/c mice with them and measuring value of BLG-specific antibodies in the serum by ELISA. We found that the production of BLG-specific antibodies was significantly reduced in all conjugates, especially in the conjugate using BLG-HMW CMC. The results of this study indicate that the conjugating with CMC is effective in improving the function of BLG, and that the conjugation of high molecular weight CMC is particularly effective.

β-lactoglobulin, protein conjugation, functional improvements

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2H04-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

カルボキシメチルセルロースとの複合体化によるβ-コングリシニンの高機能化

Functional improvements in β-conglycinin by conjugation with carboxymethyl cellulose

○畑石 結衣、好田 正、服部 誠（東農工大能）
○Yui HATAISHI, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. Agric. Tech)

大豆の主要タンパク質であるβ-コングリシニン(BCG)は、乳化性、ゲル形成性、気泡性など食品加工に有用な機能特性、抗肥満作用などの生理機能を持つ。一方、酸性条件下において溶解度が低く機能特性が損なわれてしまう、アレルゲン性を有するなどの問題点がある。本研究では、水溶性カルボジイミド(EDC)を用いて、BCG と酸性多糖カルボキシメチルセルロース(CMC)の複合体を創出し、これらの課題を克服することを目指した。BCG:CMC:EDC=1:11:10(モル比)で 24 時間反応させることで、タンパク質 22.5%、糖含量 76.8%の複合体を得た。CD スペクトル・自然蛍光測定の結果から、複合体化により、アミノ酸側鎖の遮蔽・わずかな二次構造の変化が見られたものの、全体的な構造は維持されていると考えられた。pH3.0~7.0 での溶解性、乳化活性、および乳化安定性は、いずれも複合体化によって大きく改善した。BALB/c マウスに、BCG または複合体を免疫し、その抗血清を用いて解析したところ、複合体化による有意な抗原性、免疫原性の低減化を認めた。本研究の結果、CMC との複合体化が BCG の溶解性、乳化性の改善、および低アレルゲン化に有効であると考えられた。

β-conglycinin (BCG), a major soybean protein, has functional properties useful for food processing such as emulsifying, gelling, and foaming properties, as well as physiological functions such as anti-obesity effect. On the other hand, there are issues such as low solubility under acidic conditions, which influence the functional properties, and allergenicity. In this study, we aimed to overcome these problems by preparing the conjugate of BCG and acidic polysaccharide carboxymethyl cellulose (CMC) by using water-soluble carbodiimide (EDC). The conjugate was composed of 22.5% protein and 76.8% saccharide through 24 h reaction of BCG: CMC: EDC = 1:11:10 (molar ratio). CD spectra and fluorescence measurement indicated that the overall structure of the BCG was maintained, although the surface of the molecule was shielded, and the secondary structure was slightly changed by the conjugation. Through the conjugation, the solubility at pH 3.0-7.0 and emulsifying property were improved. Analysis with antisera of BALB/c mice immunized with BCG or the conjugate showed that the production of BCG-specific IgG antibodies and the affinity for anti-BCG antibodies were significantly decreased by the conjugation. This study indicates that conjugation with CMC is effective in improving the solubility and emulsifying property and reducing the allergenicity of BCG.

β-conglycinin, protein conjugation, functional improvement

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2H04-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

貯蔵による米飯テクスチャーの劣化と可溶性タンパク質、アミノ酸の挙動

Studies on soluble proteins and the deterioration of cooked rice texture in aged rice

○大能 俊久、寺岡 若葉、古澤 和也（福井工大）
○Toshihisa OHNO, Wakaba TERAOKA, Kazuya FURUSAWA (Fukui University of Technology)

米の総タンパク質量が多いと米飯テクスチャーが劣化することは広く認識されている。しかし、タンパク質がどのように米飯テクスチャーに関与するのか、そのメカニズムについてはほとんど解明されていない。米を貯蔵すると米飯のバランス度（米飯の粘りを硬さで割った値）が低下する。このバランス度の低下はタンパク質の変化によって起こるという仮説を立て、貯蔵による可溶性タンパク質やアミノ酸の挙動を調べた。

精米を水分変化がないようにアルミパウチに密封して 40℃で 1 か月（40-1M）、または 2 か月（40-2M）貯蔵して古米とし、冷凍保存した精米（40-0M）と比較した。貯蔵前の米を炊飯した米飯のバランス度は 0.279 だったが、貯蔵に伴って 0.240（40-1M）、0.227（40-2M）へとバランス度は低下した。浸漬時可溶性タンパク質量をローリー法で測定したところ、貯蔵に伴って減少する傾向を示した。浸漬時可溶性タンパク質の減少は SDS-PAGE によっても確認することができた。これらのことから貯蔵により親水性のタンパク質が疎水性に変化したと推測した。一方、浸漬時の遊離アミノ酸量は貯蔵によって減少はしたが、その変化は小さかった。

実験結果を基にした可溶性タンパク質やアミノ酸の挙動と米飯テクスチャーとの関連についての推測も行う予定である。

It is widely known that the high content of protein causes the deterioration of cooked rice texture. However, the mechanism by which the protein concerns with the texture of cooked rice is little elucidated. The balance value (the value obtained by dividing the stickiness of cooked rice by the hardness) of aged rice is decreased. We examined the change of the soluble proteins and amino acids on the basis of the hypothesis that the protein causes decrease of balance value in aged rice.

We compared the polished rice stored for 1 (40-1M), or 2 months (40-2M) at 40℃ in a closed aluminum pouch with the rice cryopreserved (40-0M). The balance value of cooked rice (40-0M) was 0.279, but the balance value of cooked rice 40-1M and 40-2M decreased to 0.240 and 0.227 respectively. The soluble proteins by Lowry method and SDS-PAGE were decreased after storage. So we estimated that some soluble proteins changed to hydrophobic. On the contrary, the decrease of amount of amino acids in soaked water was slight. Based on the experimental results, we will estimate the relation between the proteins and the balance value.

protein, cooked rice, texture

発表責任者：大能俊久（ohno@fukui-ut.ac.jp）

講演番号：2H04-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

山形県産酒粕からのレジスタントプロテインの検出と解析

Detection and analysis of resistant proteins in sake lees from Yamagata Prefecture

○長 俊広、城 祥子、野内 義之、菅原 哲也（山形県工技セ）
○Toshihiro CHO, Sachiko SHIRO, Yoshiyuki NOUCHI, Tetsuya SUGAWARA (Yamagata Reserch Institute of Technology)

酒粕には難消化性タンパク質であるレジスタントプロテイン（RP）が豊富に含まれていることが知られている。しかしながら，酒粕の種類による RP の違いについてはほとんど報告がなされていない。そこで，我々は，山形県内酒造会社が製造した酒粕 20 点について RP 分析を試みた。電気泳動によるタンパク質分析を行ったところ，30，22，16，13 kDa 付近にバンドが確認されたが，酒粕の種類によってバンドの出現に大きな差はみられなかった。次に，消化酵素液浸漬後の酒粕について電気泳動を行ったところ，30，22 kDa 付近のバンドが消失し，16，13 kDa 付近のバンドのみが確認された。このことから 16，13kDa 付近のタンパク質が RP であると推測した。そこで，酒粕の電気泳動ゲル（16，13 kDa 付近）バンドを切り出し，MALDI-TOFMS による質量分析を行ったところ，原料米の異なる酒粕間で質量数のピークに大きな違いは見られなかったため，原料米の違いは RP の分子量に影響を及ぼさない可能性が示唆された。一方，酒粕の原料米を電気泳動した結果，酒粕で認められた 30，22，16，13 kDa 付近のバンドが確認されたが，消化酵素液浸漬後の原料米ではこれらのバンド全てが消失した。このことから，酒粕で見出された 16，13 kDa 付近のタンパク質は原料米とは異なる酒粕特有のタンパク質である可能性が示唆された。

It is known that sake lees are rich in resistant protein (RP), but there have been few reports on the differences in RP among different types of sake lees. So, we analyzed resistant protein (RP) in 20 sake lees produced by sake breweries in Yamagata. Electrophoretic analysis of them showed bands around 30, 22, 16, and 13 kDa, with no significant difference among the types of sake lees. The electrophoretic analysis of sake lees immersed in the digestive enzyme solution showed two bands around 16 and 13 kDa only, so we considered the bands around 16 and 13 kDa to be RP. Mass spectrometric analysis by MALDI-TOFMS of the electrophoresis gel bands (around 16,13 kDa) of sake lees derived from sake rice did not show any significant difference in the mass number peaks among sake lees from different source rice. These results indicate that the difference in the raw rice does not affect the RP molecular weight. The electrophoretic analysis of the raw rice in the sake lees showed bands around 30, 22, 16, and 13 kDa, but all of these bands disappeared in the analysis of the raw rice after immersion in the digestive enzyme solution. These results indicate that the proteins around 16 and 13 kDa found in sake lees are unique to sake lees, different from the raw rice.

resistant protein (RP), sake lees, electrophoresis

発表責任者：長俊広（choto@pref.yamagata.jp）

講演番号：2H04-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

各種マメタンパク質中の難消化性タンパク質量の推定

Estimating the amount of indigestible protein in various legume proteins

○中嶋 唯人[1]、石橋 勇作[2]、北川 竜揮[2]、宮原 一大[3]、尾関 健二[1,2]([1]金沢工業大学大学院・バイオ化学専攻、[2]金沢工業大学・応用バイオ学科、[3]イングレディオン・ジャパン株式会社)
○Yuito NAKASHIMA[1], Yushaku ISHIBASHI[2], Ruki KITAGAWA[2], Kazuhiro MIYAHARA[3], Kenji OZEKI[1,2] ([1]Kanazawa Institute of Technology Graduate School, [2]Kanazawa Institute of Technology, [3]Ingredion Japan　Co., Ltd.)

【背景・目的】難消化性タンパク質であるレジスタントプロテイン（RP）とはコレステロール低減効果等を示す食品成分で、日本食物繊維学会では「ヒトの小腸内で消化・吸収されにくく、消化管を介して健康の維持に役立つ生理機能を持つタンパク質」と定義された。RP は大豆タンパク質や酒粕等に含有していると報告されている。本研究では未だ研究データの少ないマメタンパク質中の RP に着目し、ソラマメ、レンズマメ、エンドウマメの難消化性タンパク質の検出、分析を目的とした。
【方法・結果】本研究では経口摂取を想定した人工消化液による以下のような消化試験※を行った。基質 3 g に対し 1 %量のペプシンを含む人工胃液（pH1.2）で 4 時間消化後、基質に対し 8 %量のパンクレアチンを含む人工腸液（pH6.8）で 16 時間消化を行った。消化後の残渣部分を難消化性タンパク質画分とし、Bradford 法、SDS-PAGE によって総タンパク質量の測定、タンパク質の検出を行った。初めに分子量や機能性が既知のコメ RP（プロラミン）を含んだサプリメントを基質として試験した結果、コメ RP の約 70%が残存した。この結果を得て各種マメタンパク質に対しても同様の試験と分析を行った。ソラマメの難消化性画分は総タンパク質中の 20%、レンズマメ 9%であった。ソラマメ、レンズマメは 37 kDa 付近にメインバンドが見られ、エンドウマメはバンドが見られなかった。

※参考文献：豆味噌のレジスタントプロテインについて（第 2 報）　野口 高廣, 辻 聡, 舘 博, 日本健康医学会雑誌　2018 年 27 巻 3 号

Resistant protein (RP), which is an indigestible protein, is a food ingredient that has a cholesterol-reducing effect. In this study, we focused on RP in legume proteins, for which research data is still scarce, and aimed to detect and analyze indigestible proteins in faba beans, yellow lentils, yellow peas. After digestion with artificial gastric juice (pH 1.2) containing 1% pepsin for 3 g of substrate for 4 hours, digestion was performed for 16 hours with artificial intestinal juice (pH 6.8) containing 8% amount of pancreatin for substrate. The residue after digestion was used as an indigestible protein fraction, and the total protein amount was measured and the protein was detected by Bradford method and SDS-PAGE. As a result of the test, about 70% of rice RP remained. Based on this result, similar digestion tests and analyzes were performed on various bean proteins. The indigestible fraction of faba beans was 20% of total protein and yellow lentils were 9%. The main band was found around 37 kDa for faba beans and yellow lentils. No significant band of RP was observed for yellow peas.

Resistant Protein, Bean protein

発表責任者：尾関健二（ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：2H04-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

大豆由来難消化性ペプチドによる腸内細菌叢改善効果の解析

Analysis of Improvement of Intestinal Microbiota by Soybean-derived Non-digestible Peptide

○網 優太[1]、平野 里佳[1,2]、金 倫基[3]、栗原 新[1] ([1]近畿大生物理工、[2]石川県大生資環、[3]慶應大薬)
○Yuta AMI[1], Rika HIRANO[1,2], Yun-Gi KIM[3], Shin KURIHARA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Ishikawa Prefect. Univ., [3]Keio Univ.)

腸内常在菌叢は様々な疾患と深く関連することが報告されており、その制御法を開発すれば人類の健康寿命は大きく伸長すると考えられる。現在、腸内細菌制御を目的として経口摂取される難消化性オリゴ糖（プレバイオティクス）が数多く上市され、2022 年には 60 億ドルの市場に成長すると見込まれている。しかし、三大栄養素の残り 2 種に対応する難消化性脂質、難消化性ペプチドは腸内細菌制御剤として非常に有望であるにも関わらず、ほとんど研究されていない。本研究では、大豆由来難消化性ペプチドを培地に添加して、ヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の生育に与える影響について試験した。この結果、ヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種に含まれる Bacteroides 属細菌 11 菌種の内、腸管バリアを破壊する *Bacteroides caccae* (Cell 167:1339-1353. (2016))、大腸がん発生を促進する可能性がある *Bacteroides fragilis* (Science 359:592-597. (2018)) 等、健康に悪影響を及ぼす可能性のある菌種を含む 9 菌種の生育が抑制された。次に、糞便由来細菌の共存下における大豆由来難消化性ペプチドによる Bacteroides 属細菌の生育抑制効果を次世代シーケンサーにより解析したところ、大豆由来難消化性ペプチド添加により Bacteroides 属細菌が糞便培養液中に占める割合が減少した (n = 7、48.4%→24.7%、p = 0.0032)。一方で、他の腸内細菌属の占有率には統計学的に有意な変動は観察されなかった。以上を総合すると、大豆由来難消化性ペプチドは、ヒト腸管内において悪玉菌である可能性が示唆されている Bacteroides 属細菌を「狙い撃ち」で減少させる素材であることが期待される。

The method of controlling the intestinal microbiota would extend healthy life span since intestinal microbiota has been reported to be closely associated with a variety of diseases. The global market for prebiotics, non-digestible oligosaccharides that are expected to control the intestinal microbiota, is estimated to reach nearly $6.0 billion in 2022. However, research on indigestible peptides has been minimal. The addition of soybean-derived indigestible peptide to the culture medium inhibited the growth of 9 of the 11 Bacteroides species tested. Next, the growth inhibition of Bacteroides spp. by the indigestible peptide in the presence of gut microbes was analyzed using human fecal culture, next-generation sequencing demonstrated that the addition of the indigestible peptide decreased the percentage of Bacteroides spp. in the fecal culture (n = 7, 48.4% → 24.7%, p = 0.0032).On the other hand, no significant changes were observed in the occupancy of other intestinal bacterial genera. These results suggested that the indigestible peptide is expected to be a material that inhibits specifically bacteria of the genus Bacteroides, which have been reported to be harmful, in human intestinal lumen.

Non-digestible Peptide, Intestinal Microbiota, Bacteroides spp.

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2H04-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

塩濃度の違いがカナバリンの溶解性および構造に与える影響

Effects of different salt concentrations on the solubility and structure of canavalin

○西澤 果穂[1]、有井 康博[2] ([1]龍谷大・農・食品栄養、[2]武庫川女子大・食物栄養・食創造科学)
○Kaho Nishizawa[1], Yasuhiro Arii[2] ([1]Ryukoku Univ., [2]Mukogawa Women's Univ.)

我々はナタマメ（*Canavalia gladiata*）の食品利用を促進するために、食素材となり得る栄養成分の抽出、抽出物の物理化学的特性の解析に取り組んでいる。本研究では、白ナタマメの主要タンパク質であるカナバリンについて、不溶化したカナバリンに対する NaCl 濃度の影響を検討した。さらに、蒸留水抽出液中および高濃度塩存在下で可溶化したカナバリンの違いについて、四次構造の観点から解析した。我々が確立した方法により、白ナタマメからカナバリンを抽出し、低濃度 $MgCl_2$ で不溶化させた[1, 2]。不溶化したカナバリンを様々な濃度の NaCl 溶液で懸濁し、遠心分離後、上清を SDS-PAGE に供してカナバリンの溶解性を検討した。不溶化したカナバリンは NaCl 濃度の上昇に伴って緩やかに可溶化し、180 mM でほぼ一定になった。次に、不溶化したカナバリンに高濃度の NaCl または $MgCl_2$ を添加し、カナバリンを可溶化させた。蒸留水抽出液および可溶化したカナバリンを含む液をゲル濾過クロマトグラフィーに供し、カナバリンの四次構造を比較した。蒸留水抽出液中のカナバリンは揺らぎの大きい一量体として存在すること、一方で、高濃度の NaCl または $MgCl_2$ で可溶化したカナバリンは三量体として存在することが示された。

In this study, we investigated the solubility changes and quaternary structures of canavalin, which is a major protein in sword bean. Canavalin was extracted from white sword bean and insolubilized by adding $MgCl_2$ at a lower concentration as reported previously [1, 2]. To investigate the effect of NaCl concentration on insoluble canavalin, $MgCl_2$-precipitated canavalin was suspended in various concentrations of NaCl. Canavalin was gradually solubilized increasing NaCl concentrations until it reached a maximum in the presence of 180 mM NaCl. Moreover, we examined the quaternary structures of soluble canavalin in the sword bean extract and in the presence of high-concentration NaCl or $MgCl_2$ using gel filtration chromatography. The results indicated that canavalin was in an unstable monomer in a water extract. On the other hand, it was also cleared that canavalin formed a trimer in the presence of high concentrations of NaCl or $MgCl_2$.

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP18K14429.

1. Nishizawa K., Masuda T., Takenaka Y., Masui H., Tani F. and Arii Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2016), 80, 1623-1631.
2. Nishizawa K. and Arii Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2016), 80, 2459-2466.

canavalin, food material, sword bean

発表責任者：西澤果穂（nishizawa@agr.ryukoku.ac.jp）

講演番号：2H04-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:30～ ミーティングルーム H

オリーブ成分による牡蠣アレルゲンタンパク質の重合化とモデルマウスによるアレルゲン性評価

Polymerization of oyster allergen protein using olive polyphenol and assessing the allergenicity in *vivo*

○菰田 俊一、折本 未奈、赤澤 隆志（宮城大 食産業）
○Toshikazu Komoda, Mina Orimoto, Takashi Akazawa (MIYAGI UNIv.)

本研究では、モデルマウスを使って、重合化した牡蠣アレルゲンタンパク質のアレルゲン性評価を行なった。これまで、牡蠣アレルゲンタンパク質をオリーブ由来ポリフェノールによって化学修飾することで、タンパク質を重合化し、アレルゲン性を低減化できる可能性を示してきた。本年度は、引き続きモデルマウスを用いた動物レベルの評価を行なった。

はじめに、牡蠣アレルゲンタンパク質とオリーブ由来ポリフェノールを加熱・乾燥することで化学修飾した。反応の様子は、SDS-PAGE およびドットブロット法によって行なった。次に、モデルマウスによる評価を行なった。まず、マウスに牡蠣アレルゲンタンパク質を投与して感作させ、牡蠣アレルギーモデルマウスを作成した。このモデルマウスに重合化した牡蠣アレルゲンタンパク質を投与したところ、重合化していない牡蠣アレルゲンタンパク質を投与したモデルマウスと比べて血中ヒスタミン濃度が抑制されていることが示された。このことから牡蠣アレルゲンタンパク質をオリーブ由来ポリフェノールによって重合化させるとアレルゲン性を低減化できる可能性が示された。

In this study, we assessed the allergenicity by using model mouse. Recentry, we reported olive polyphenol (OP) fraction may play a role as a cross linker to make an oyster allergen (OA) protein form a protein dimer, trimer, and polymer. Then we have also shown that these polymerizarion should contribute the depressing the allergenicity. In this meeting, we describe this the in *vivo* assessment study by using model mouse system.

We obtained the OA protein from the oyster (*Crassosrtea gigas*) boiled PBS solution. The OP fraction was extracted from olive leaf. The OA was subject to heat with OP and dried to form OA dimer, trimer, and polymer. The reaction was monitored by using SDS-PAGE, dot blotting, and western blotting technique. Then, we assessed the OA allergenicicy using model mouse system. The OA protein was injected (i.p.) into mouse. Then we obtained OA sensitized mouse. We injected OP treated OA polymer into the OA sensitized mouse and measured the blood histamine concentration. Therefore, the blood histamine level in OP treated OA polymer injected mouse was suppressed compared with that in non-treated OA injected mouse. In these result suggested that OP should act as cross linker in this system to form a low allergenic oyster allergen polymer.

Oyster, Olive, polymerization

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：2H07-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

シトロネリルグルコシドの皮膚バリア機能改善効果

Skin barrier function improving effect of citronellyl glucoside

○竹内 ちひろ[1]、井上 卓思[1]、新谷 恵[1]、石川 文博[1]、宮崎 優佳[2]、佐藤 芽衣[2]、加藤 敦[2,3] ([1]株式会社伏見製薬所、[2]富山大学学術研究部薬学・和漢系　臨床薬剤学研究室、[3]富山大学附属病院薬剤部)

○Chihiro TAKEUCHI[1], Takashi INOUE[1], Megumi SHINTANI[1], Fumihiro ISHIKAWA[1], Yuka MIYAZAKI[2], Mei SATO[2], Atsushi KATO[2,3] ([1]FUSHIMI Pharmaceutical Co.,Ltd., [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, [3]Department of Hospital Pharmacy, University of Toyama)

皮膚のバリア機能は体内へのアレルゲンやウイルス、細菌等の異物の侵入を防ぎ、さらに体内から水分が蒸散するのを防ぐ役割を持っている。皮膚バリア機能が低下すると様々な皮膚疾患を生じ、ドライスキンの原因にもなる。皮膚バリア機能の要は角層であり、角質細胞に存在するフィラグリンや細胞を取り囲む細胞間脂質であるセラミドが減少すると、バリア機能が低下することが知られている。

我々は、ブドウ、パッションフルーツ、ショウガなどに含まれる希少成分シトロネリルグルコシドに、フィラグリン産生促進作用とセラミド分解酵素阻害作用があることを見出した。さらにシトロネリルグルコシドは、近年バリア機能との関連性が報告されている表皮ヒアルロン酸の合成促進作用を持つことも明らかとなった。本発表では、シトロネリルグルコシドのフィラグリン遺伝子発現増加作用、セラミダーゼ阻害作用、表皮ヒアルロン酸合成酵素増加作用について報告する。

The barrier function of the skin has the role of preventing the invasion of foreign substances such as allergens, viruses and bacteria into the body, and further preventing the evaporation of water from the skin. Decreasing of the skin barrier function causes various skin diseases and dry skin. The most important part for the skin barrier function is the stratum corneum, and it is known that the barrier function decreases when filaggrin in the corneocytes and ceramide among the corneocytes decrease.

We have found that the rare component citronellyl glucoside contained in grapes, passion fruits and ginger has a filaggrin increasing effect and a ceramide-degrading enzyme inhibitory effect. Furthermore, it has been clarified that citronellyl glucoside has an effect of promoting the synthesis of epidermal hyaluronic acid, which plays a part of the barrier function. In our presentation, we will report on the filaggrin gene expression increasing effect, ceramidase inhibitory effect, and epidermal hyaluronan synthase increasing effect of citronellyl glucoside.

skin barrier, ceramide, filaggrin

発表責任者：竹内ちひろ（c-takeuchi@fushimi.co.jp）

講演番号：2H07-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

正常ヒト表皮角化細胞に対して紫外線障害への保護効果や創傷治癒効果を持つ物質の解析

Analysis of substances with protective effects and wound healing effects on normal human epidermal keratinocytes

○山田 康枝、村井 雅輝、鍬﨑 夕菜、三村 桂子、神谷 尚希（近畿大工）
○Yasue YAMADA, Masaki MURAI, Yuna KUWAKI, Keiko MIMURA, Naoki KAMIYA (Kindai Univ.)

紫外線などのストレスは，細胞の DNA，細胞膜上のリン脂質、蛋白を傷害し、生体の構造や機能を乱しており，皮膚においてシミやシワなど，皮膚の老化などが進行すると考えられている．紫外線による皮膚障害に対して保護効果を示す安全性の高い物質を見つけ，その作用機序を調べるために，正常ヒト表皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes：NHEK)を用いて検討した．紫外線(UVB)の照射に対する保護効果を持つ食品由来の物質について検討した．これまでに、皮膚の保湿効果などが知られておりすでに化粧品に用いられている日本酒由来のα-グルコシルグリセロール(α-GG)と保護効果が不明のβ-ガラクトシルグリセロール(β-GG)，抗酸化作用や様々な生理活性を持つ母乳や果物に多く含まれるピロロキノリンキノン(PQQ)，ローズマリーの成分であるカルノシン酸を用いて検討した．UVB による障害に対する保護効果をα-GG は示さなかったが，β-GG は有意に保護効果を示した．PQQ は NHEK では保護効果を示さなかった．カルノシン酸は低い濃度で保護効果を示した。スクラッチアッセイにおいて，β-GG で有意に創傷治癒効果が認められた．β-GG の日焼け止め成分への応用が可能である．

UV damages DNA, phospholipids and proteins on cell, disturbs the structure and function of the living cells, and is thought to promote skin aging such as spots and wrinkles on the skin. In order to find a highly safe substance that has a protective effect against skin damage caused by UV and to investigate its mechanism of action, we investigated food-derived substances that might have a protective effect against damages of UVB damage using normal human epidermal keratinocytes (NHEK). A scratch assay was performed to investigate the wound healing effect of the same substance on the skin. α-Glucosylglycerol (α-GG), β-galactosylglycerol (β-GG), pyrroloquinoline quinone (PQQ), and carnosic acid were used for the study. α-GG and PQQ did not show a protective effect against damage caused by UVB, but β-GG and carnosic acid showed significant protective effects. In the scratch assay, β-GG showed a significant wound healing effect.

normal human epidermal keratinocytes, α-glucosylglycerol, ß-galactosylglycerol

講演番号：2H07-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

SOD/カタラーゼ模倣薬は接触皮膚炎を緩和する

An SOD/catalase mimetics prevents contact dermatitis

○岩田 拓磨[1,2]、澁谷 修一[1]、渡辺 憲史[1]、清水 孝彦[1] ([1]国立長寿医療研究センター 老化ストレス応答研究プロジェクトチーム、[2]アドバンテック株式会社)
○Takuma IWATA[1,2], Shuichi SHIBUYA[1], Kenji WATANABE[1], Takahiko SHIMIZU[1] ([1]Aging Stress Response Research Project Team, National Center for Geriatrics and Gerontology, [2]Advantec co.,ltd)

PAPLAL は、白金とパラジウムのナノ粒子混合液で、SOD 活性とカタラーゼ活性を持つ日本で作られた抗酸化剤である。80 年以上にわたり様々な慢性皮膚疾患に使用されてきた歴史がある（Shibuya, *et al*. PONE 2014）。アレルギー性接触皮膚炎（ACD）は、ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）等のアレルゲンが皮膚に接触することで生じる湿疹性炎症である。ACD はⅣ型アレルギーの一種であり、マウスの耳介に反応させると炎症性細胞浸潤、及び表皮の肥厚、海綿状化等が観察され、活性酸素種（ROS）の寄与も示唆されている。本研究は、実臨床で使用されている PAPLAL の ACD に対する保護作用を調べ、ACD 発症過程での ROS の寄与を明らかにする。

0.5% DNFB 50 μL を腹部に 2 日間塗布（感作）させ、その 4 日後と 11 日後に 0.5% DNFB 20 μL を耳介に塗布（惹起）し、0、24、48、72 時間後に解析した。ACD モデルマウス耳介で表皮や真皮の肥厚が観察され、炎症性マーカー（*Tnf-α, Il-6, Il-1β*）の発現が有意に増加した。保護的に PAPLAL を耳介に塗布すると、炎症性変化と皮膚肥厚が著しく抑制された。PEG-SOD、又は PEG-カタラーゼを塗布した場合、皮膚肥厚は中程度抑制された。以上の結果から、ACD 発症に ROS が寄与し、SOD 活性及びカタラーゼ活性の両方が、症状を緩和することが強く示唆された。

PAPLAL, which is an antioxidant made in Japan, is a mixture of platinum and palladium nanoparticles with SOD and catalase activity. It has been used for the treatment with chronic skin diseases for over 80 years in Japan. Allergic contact dermatitis (ACD) is an eczematous inflammation caused by skin contact with allergens such as dinitrofluorobenzene (DNFB). Inflammatory cell infiltration, epidermal thickening and swelling are observed in the skin tissues. In addition, reactive oxygen species (ROS) have been suggested to contribute to the pathogenesis. This study investigates the protective effect of PAPLAL used in clinical practice on ACD and reveals a relationship between ROS and ACD.

In the ear of ACD model mice, epidermal and dermal thickening as well as the increased expression of inflammatory markers (*Tnf-α, Il-6, Il-1β*) was observed. When PAPLAL was applied to the ear, inflammatory changes and skin thickening were markedly suppressed. Application of PEG-SOD or PEG-catalase moderately reduced skin thickening. These results strongly suggest that ROS is involved in the development of ACD and that both SOD and catalase activities mitigate the symptoms.

antioxidant, inflammatory, ROS

講演番号：2H07-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

イワヒバの美容効果に関する機能性評価

Functional evaluation of the cosmetic effects of Selaginella tamariscina

○塩田 皐希、関根 結夏子、矢野 敏史、原 太一 (早稲田大学)
○Saki SHIOTA, Yukako SEKINE, Satoshi YANO, Taichi HARA (Waseda Univ.)

[背景と目的] イワヒバは日本や東アジアに分布するシダ植物である。シダ植物は古くから生薬として利用されていて、利尿・解熱・止血作用がある。一方、美容効果に関する研究は乏しく、皮膚に対する作用はあまり知られていない。そこで本研究では、ヒト角化細胞を用いて、イワヒバの美容効果における機能性を明らかにすることを目的とした。
[方法] イワヒバの水および 100%EtOH 抽出画分を調製した。この試料をヒト角化細胞 HaCaT に処理し、イワヒバ由来成分が細胞増殖および ROS 産生、UVB 障害に対する保護作用を検討した。
[結果と考察]本研究で用いたイワヒバの水抽出画分に、HaCaT 細胞の増殖亢進効果を見出した。また、UVB 障害に対する保護作用を確認した。以上の結果から、本研究で試験したイワヒバは機能性化粧品の有用素材となることが期待された。

[Background and Purpose] Selaginella tamariscina is a family of pterophyte plants distributed in Japan and East Asia. Pterophyte has been used as an herbal medicine for a long time because of its diuretic, antipyretic, and hemostasis effect. However, there is little knowledge on cosmetic effects, and its effects on the skin are not well understood. The purpose of this study was to clarify the functionality of selasinella tamariscina in the cosmetic effects using human keratinocytes.
[Method] Human keratinocyte HaCaT cells were treated with water- and 100% EtOH-extracted fractions of selaginella tamariscina to investigate the effects of selaginella tamariscina derived components on cell proliferation, ROS production, and protection from UVB damage.
[Results and Conclusion] We found the aqueous extract fraction of Selaginella tamariscina had the positive effect on the proliferation of HaCaT cells. We also confirmed the protective effect against UVB damage. From these results, it is expected that selaginella tamariscina would be a useful material for functional cosmetics.

skin aging, antioxidation, UV

講演番号：2H07-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

アコヤガイ貝殻真珠層抽出液の皮膚に対する抗老化作用

Effect of the nacre extract from pearl oyster against skin aging.

○山本 花菜、下村 七海、長谷川 靖（室蘭工大院）
○ Hana YAMAMOTO, Nanami SHIMOMURA, Yasushi HASEGAWA (Muroran Institute of Technology)

【背景・目的】真珠は古くから中国で漢方薬として利用されてきた。また日本においても化粧品素材として広く利用されているが、その生理活性物質や作用機構に関する知見はほとんどない。我々は真珠とほぼ同じ構造をもつアコヤガイ貝殻真珠層に含まれる成分が、スコポラミンで誘発した記憶障害を改善することを明らかにしてきた。本研究では、アコヤガイ真珠層抽出液が皮膚老化に対して効果を示すか老化モデルマウスを用いて検討した。
【方法】アコヤガイ貝殻真珠層から有機成分を抽出し真珠層抽出成分として使用した。この真珠層抽出成分を D-ガラクトース誘発老化モデルマウスおよび老化促進マウス SAMP8 に投与し、外見上の変化や皮膚組織切片の比較、抗酸化測定、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量について検討を行った。
【結果・考察】D-ガラクトース誘発老化モデルマウス、SAMP8 いずれにおいても、真珠層抽出成分の投与は、老化に伴う毛並みの乱れ、皮膚水分量の低下を改善し、しわ形成を抑制した。また、真珠層抽出液を投与した D-ガラクトース誘発老化モデルマウスの皮膚において過酸化脂質量の低下、ABTS ラジカル消去活性の増加がみられ、抗酸化タンパク質の mRNA 発現量の増加が見られたことから酸化障害を改善することで皮膚老化を抑制したものと考えられた。真珠層抽出成分は、経口投与においても抗老化作用を示したことから機能性食品としても有効利用できるかもしれない。

Shells are composed of two types of calcium carbonate polymorphs—the prismatic layer and the nacreous layer. Pearls, composed of the nacreous layer, have been used in Chinese medicine since ancient times. We have previously shown that extracts from the nacreous layer (nacre extract) improves scopolamine-induced memory impairment. In this study, we investigated the effect of the nacre extract against skin aging using d-galactose-induced aging mice and SAMP8 mice. Treatment with nacre extract suppressed decrease of water content, wrinkle formation, thinning of epidermis, and disorganization of collagen fiber in dermis accompanied by aging. Nacre extract reversed the increase in lipid peroxidation caused by d-galactose-induced aging in the skin through increasing the expression of catalase and superoxide dismutase. In addition, real-time PCR study showed that nacre extract increased the expression of involucrin which is key proteins of skin hydration. These results suggest that nacre extract is effective for suppressing skin aging.

skin aging, pearl, antioxidant

発表責任者：山本花菜（18023128@mmm.muroran-it.ac.jp）

講演番号：2H07-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

天然ヒト型セラミドの機能性解明

Functionalities of natural human-type ceramide

○福留 瑞葵[1]、亀田 菜月[1]、植木 達朗[2]、開 忍[3]、宮鍋 征克[4]、片倉 喜範[4]([1]九大農・生資環、[2]福岡県醤油醸造協同組合、[3]株式会社ジェヌイン R&D、[4]九大農)
○MIZUKI FUKUDOME[1], Natsuki KAMEDA[1], Tatsurou Ueki[2], Shinobu HIRAKI[3], Masakatsu MIYANABE[4], Yoshinori KATAKURA[4] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fukuoka Prefecture Soy Sauce Brewing Cooperative, [3]Genuine R&D Ltd., [4]Kyushu Univ.)

皮膚の角層に存在する細胞間脂質のセラミドは、外部の刺激から肌を保護する「バリア機能」、皮膚からの水分蒸発を防ぐ「保水機能」を持つ。ヒト角質中に存在するセラミドは長鎖脂肪酸を多く含み、経皮水分蒸発 量の低減や皮膚のバリア機能向上に寄与している。この構造を持つものを、「ヒト型セラミド」と呼ぶ。現在のスキンケア商品に含まれるセラミドは、殆どが非ヒト型であり、脂肪酸が比較的短鎖であるため、経皮吸収率が低いという欠点がある。本研究では、醤油粕や麹菌、鶏のもみじから抽出された天然ヒト型セラミド及びそれをナノ化したセラミドの機能性を検証するために研究を行った。定量リアルタイム PCR 法により長寿遺伝子である、SIRT1 及び SIRT3 の mRNA 発現量を測定し、内服皮膚バリア機能の評価を行った。その結果、ナノ化セラミドは HaCaT 内在性 SIRT1 及び SIRT3 の両者を増強させ、UV 照射後の HaCaT 内の ROS レベルを減少させると共に、ミトコンドリア数及び面積を増加させた。

Ceramide, an intercellular lipid present in the stratum corneum of the skin, has a "barrier function" that protects the skin from external stimuli and a "water retention function" that prevents water evaporation from the skin. Ceramide present in human keratin contains a large amount of long-chain fatty acids and contributes to reduction of transdermal water evaporation and improvement of skin barrier function. Those having this structure are called "human ceramides". Most of the ceramides contained in current skin care products are non-human type and have a relatively short chain of fatty acids, so that they have a drawback of low transdermal absorption rate. In this study, we conducted research to verify the functionality of natural human ceramide extracted from soy sauce lees, aspergillus, and chicken maple, and ceramide obtained by nanonizing it. The mRNA expression levels of SIRT1 and SIRT3, which are longevity genes, were measured by a quantitative real-time PCR method, and the oral skin barrier function was evaluated. As a result, nanonized ceramide enhanced both his HaCaT endogenous SIRT1 and SIRT3, reduced his ROS levels in his HaCaT after UV irradiation, and increased mitochondrial count and area.

ceramide, skin aging, sirtuin

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2H07-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

ヒト線維芽細胞におけるスチルベン化合物の抗老化作用の可能性

Potential anti-aging effects of stilbene compounds in human fibroblasts

○齋藤 靖和[1,2]、福田 大智[1]、岩本 大輝[2]、田邊 朝弓[2]、金井 直人[2]、濱田 博喜[3]([1]県立広島大院生命システム科学、[2]県立広島大生命環境、[3]岡山理科大理)
○Yasukazu SAITOH[1,2], Taichi FUKUDA[1], Taiki IWAMOTO[2], Tomomi TANABE[2], Naoto KANAI[2], Hiroki HAMADA[3] ([1]Program in Biological System Sciences, Prefectural University of Hiroshima, [2]Prefectural University of Hiroshim, [3]Okayama University of Science)

加齢に伴い蓄積した老化細胞は炎症性サイトカイン等の放出（Senescence-associated Secretory phenotype: SASP）を介して老化関連疾患に関与することが明らかとなる中、老化細胞制御化合物の探索が精力的に行われている。本研究では、ヒト正常線維芽細胞（TIG-1）におけるスチルベン化合物の抗老化作用の検証を目的に TIG-1 の非老化細胞と老化細胞にスチルベン化合物 7 種を添加し、リアルタイム PCR で SASP、老化、抗酸化関連遺伝子等の遺伝子発現への影響を調べた。その結果、特に SASP 関連遺伝子の発現低下を示した化合物の SA-βgal (Senescence-associated β-galactosidase) 活性への影響を SPiDER-βGal アッセイにより評価した。その結果、オキシレスベラトロール（OXY)、レスベラトロール多糖体（RSVgly)、プテロスチルベン多糖体（PTEgly）に SASP 関連遺伝子の発現抑制効果がみられ、特に OXY、PTEgly において顕著な抑制が認められた。また、PTEgly で顕著な SA-βgal 活性の低下が認められた。

以上の結果から、今回検討したスチルベン化合物 7 種のうち OXY, RSVgly、PTEgly が SASP 関連因子の発現を抑制する効果を有すること、その中でも PTEgly が優れており、抗老化作用を有することが期待される。

Senescent cells accumulate with age, and are involved in aging-related disorders through the release of inflammatory cytokines (senescence-associated secretory phenotype: SASP). The compounds regulating senescent cells have been thoroughly investigated. In this study, we focused on 7 stilbene compounds and studied their effects on expressions of genes related to senescence, such as those involved in SASP, aging, and oxidative stress production by real-time PCR in TIG-1 cells. In addition, their effects on SA-βgal (Senescence-associated β-galactosidase) activity were examined using SPiDER-βGal assay. It was observed that resveratrol polysaccharide (RSVgly), oxyresveratrol (OXY), and pterostilbene polysaccharide (PTEgly) suppressed the senescence effects, with the latter two compounds exerting a greater effect. In addition, a higher decrease in SA-βgal activity was observed with PTEgly. These results suggest that OXY, RSVgly, and PTEgly inhibit the expression of SASP-related genes to various degrees. PTEgly was observed to be the most effective among all the compounds tested, and is expected to have an anti-aging effect.

anti-aging, stilbene, senescence-associated secretory phenotype

講演番号：2H07-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

緑茶カテキン EGCG による抗加齢タンパク質 SMP30 発現制御は proteasome 活性阻害を介し 67LR 非依存的である

The regulatory mechanism of anti-aging protein SMP30 by EGCG is mediated by inhibiting proteasome activity independent 67LR.

○荒川 航太[1]、井上 博文[1]、石神 昭人[2]、佐藤 綾美[2]、滝野 有花[2]、田中 未央里[1]、高橋 信之[1]、上原 万里子[1] ([1]東農大応生、[2]東京都健康長寿医療医療センター)
○Kohta ARAKAWA[1], Hirofumi INOUE[1], Akihito ISHIGAMI[2], Ayami SATO[2], Yuka TAKINO[2], Miori TANAKA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agri., [2]Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology)

これまでに我々は加齢とともに発現が減少する Senescence Marker Protein 30 (SMP30)タンパク質が epigallocatechin gallate (EGCG)により増加することを報告している(Inoue H, Arakawa K *et al.*, *JCBN*, 2021) 。しかしながら、EGCG による SMP30 発現増加の機序については未だ不明である。そこで本実験では、ラット肝臓由来細胞株 FAO 細胞を用いて、EGCG による SMP30 発現増加機構を明らかにすることを目的とした。これまでに EGCG は Ubiquitin-proteasome 機構 (UPS)活性を阻害することが報告されている。そこで anti-SMP30 抗体を用いた免疫沈降法による SMP30 の被ユビキチン化状態を解析した。その結果、EGCG は被ユビキチン化 SMP30 を増加させた。続いて、SMP30 発現増加が EGCG による UPS 阻害か否かを明らかにするため、EGCG で 24 時間処理後、EGCG を除去し、経時的な SMP30 発現を解析した。その結果、EGCG 除去後 3 時間から SMP30 発現が減少した。加えて、EGCG 受容体である 67LR の関与について anti-67LR 中和抗体を用いて検討した結果、EGCG による SMP30 発現増加は 67LR 非依存的であった。以上より、EGCG は UPS の阻害を介して SMP30 発現を安定化および増加させることを明らかにした。

Senescence marker protein-30 (SMP30), a novel ageing marker, suppresses oxidative stress in the liver. However, there is a lack of research on the regulation of SMP30 by phytochemicals. Our group previously reported that epigallocatechin gallate (EGCG) positively regulates SMP30 expression and prevents liver injury due to *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BHP), an oxidative stress inducer in Fao cells (*in vitro*) and in mice (*in vivo*) (Inoue H, Arakawa K *et al.*, *JCBN*, 2021). However, the regulatory mechanism underlying the association between EGCG and SMP30 expression is unclear. In the present study, we revealed that cell treatment with EGCG up-regulates SMP30 expression and total ubiquitinated proteins. Using an immunoprecipitation assay, EGCG treatment increased ubiquitinated SMP30 compared to non-treated cells. Significantly, up-regulation of SMP30 and total ubiquitinated proteins by EGCG attenuated after washing cells. These results showed that EGCG stabilized and up-regulated SMP30 expression by inhibiting the ubiquitin-proteasome system (UPS). Additionally, we evaluated the effect of the EGCG receptor 67LR on the up-regulation of SMP30 expression by EGCG. Subsequently, pre-treatment of anti-67LR antibody to the cells did not abolish the up-regulation of SMP30 expression by EGCG. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that EGCG up-regulated SMP30 levels by inhibiting UPS in a 67LR signaling-independent manner.

SMP30, EGCG, proteasome

発表責任者：上原万里子（mari@nodai.ac.jp）

講演番号：2H07-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

ポリフェノール修飾タンパク質の構造解析並びにヒストンとの相互作用メカニズムの解明

Structural analysis of polyphenol-modified proteins and elucidation of their interaction mechanisms with histones

○山口 公輔[1]、板倉 正典[1]、北澤 麗磨[1]、林 世映[1]、永田 宏次[1]、柴田 貴広[2]、赤川 貢[3]、内田 浩二[1]([1]東大農、[2]名大院生命農、[3]大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科)
○ Kosuke YAMAGUCHI[1], Masanori ITAKURA[1], Roma KITAZAWA[1], Sei Young LIM[1], Koji NAGATA[1], Takahiro SHIBATA[2], Mitsugu AKAGAWA[3], Koji UCHIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [3]Osaka Pref. Univ.)

ポリフェノール類は多様な健康機能性を示す食品成分である。その中でも、エピガロカテキンガレート（EGCG）やピセアタンノールなどのポリフェノールがタンパク質を修飾し、その機能性を変化させることが明らかになりつつある。こうした知見を踏まえ、ポリフェノールはタンパク質修飾を介して健康機能性を発揮しうると予想し、ポリフェノール修飾タンパク質の構造及び機能性解明を試みた。まずアミノ酸アナログを用いた構造解析から、ポリフェノールはタンパク質と反応し酸化型リジン構造やポリフェノールアダクト構造などユニークな修飾構造を形成することが分かった。また固相結合試験から、これらのポリフェノール修飾構造はシッフ塩基形成や静電相互作用を介してヒストンタンパク質との結合をもたらすことが分かった。さらにマウス血清を用いた in vitro 実験から、EGCG は低濃度・短時間であっても血清タンパク質を修飾しヒストン結合能を与えうることが示唆された。そして血管内皮細胞株を用いた LDH assay から、ポリフェノール修飾タンパク質とヒストンとの相互作用はヒストン誘発性の細胞傷害を緩和することが分かった。
以上の結果より、ポリフェノールはタンパク質との反応を介して酸化型リジンやポリフェノールアダクトといったユニークな修飾構造を形成し、ヒストンとの結合能を与えることが明らかとなった。またポリフェノール修飾タンパク質はヒストンの細胞傷害性を緩和することが明らかとなり、ポリフェノールのタンパク質修飾を介した細胞保護作用が示唆された。
Polyphenols exhibit diverse health functionalities. Recently, we have revealed that polyphenols modify proteins and change their structures. Based on this finding, we predicted that polyphenols may exert their functions through protein modification.
First, using amino acid analogs, we found that polyphenols form oxidized lysine and polyphenol adducts. From the solid-phase binding assay, we found that polyphenol-modified structures can bind to histone proteins through Schiff base formation and electrostatic interactions. LDH assay showed that the interaction of polyphenols-modified proteins with histones alleviated the histone-induced cell damage. These results indicate that polyphenols form unique modified structures on proteins and provide the histone-binding ability. In addition, polyphenol-modified proteins mitigated the cytotoxicity of histones, suggesting a cytoprotective effect of polyphenols through protein modification.

Polyphenol, Non-enzymatic protein modification, Extracellular histone

講演番号：2H07-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:30～ ミーティングルーム H

脳腸相関活性化ポリフェノールの探索とその機能性

Molecular basis for the polyphenol-induced activation of gut-brain axis

○田中 綾乃[1]、原口 瑞木[1]、片倉 喜範[2] ([1]九大院・生資環、[2]九大院・農院)
○Ayano TANAKA[1], Mizuki HARAGUCHI[1], Yoshinori KATAKURA[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

腸と脳は自律神経系や液性因子を介して相互に影響を及ぼしあっている（脳腸相関)。これまでの研究で、カルノシンや GABA の脳腸相関活性化効果を明らかにしている。本研究では、脳腸相関活性化を促進するポリフェノールを探索し、その機能性と分子基盤について検証した。実験系としては、ポリフェノール処理した Caco-2 細胞の培養上清、あるいは Transwell 上に培養した Caco-2 細胞にポリフェノールを添加し、透過した培養液をそれぞれ SH-SY5Y 細胞に添加した系を採用した。SH-SY5Y 細胞の神経突起伸長は、IN Cell Analyzer 2200 で定量化するとともに、同細胞における遺伝子発現変化は定量 RT-PCR 法により検証した。解析の結果、上記ポリフェノール処理した培養上清の中には、SH-SY5Y 細胞において神経突起を伸長させ、また同時に SH-SY5Y 細胞における神経突起関連遺伝子の発現を増強するものが確認された。以上の結果から、ポリフェノールが腸管細胞を活性化し、その結果として神経細胞の活性化を引き起こしているものと考えることができた。現在、その分子基盤の解明を目指し研究を行っている。

The gut and brain interact with each other through the autonomic nervous system and fluid factors (brain-gut axis). Previous studies have revealed the effects of carnosine and GABA on the activation of brain-gut correlation. In this study, we searched for polyphenols that promote brain-gut correlation activation and examined their functionality and molecular basis. As an experimental system, we adopted a system in which polyphenol was added to the culture supernatant of polyphenol-treated Caco-2 cells or to Caco-2 cells cultured on Transwell, and the permeabilized culture medium was added to SH-SY5Y cells, respectively. The neurite outgrowth of SH-SY5Y cells was quantified by IN Cell Analyzer 2200, and the gene expression changes in the cells were verified by quantitative RT-PCR. As a result of the analysis, some of the above polyphenol-treated culture supernatants were found to elongate neurites in SH-SY5Y cells and simultaneously enhance the expression of neurite-related genes in SH-SY5Y cells. These results suggest that polyphenols activate intestinal cells, which in turn activate neurons. Currently, we are conducting research to elucidate the molecular basis of this phenomenon.

brain-gut axis, polyphenol, SH-SH5Y

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2H09-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

ヒト味覚受容体発現細胞を用いた清涼飲料水をモデル溶液とした呈味強度評価法の改良

Evaluation of taste intensities in model tastant solutions using cultured cells expressing human taste receptors

○山口 美波、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Minami YAMAGUCHI, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景・目的】口腔内において甘味・苦味を呈する味物質は、GPCR ファミリーに属する甘味・苦味受容体によって受容される。味覚受容体の機能解析法として、培養細胞にこれら受容体を発現させた解析系が汎用されており、人間が感じる呈味強度を客観的に評価する手法として確立している。しかし、甘味料や天然成分のような様々な物質が混在する清涼飲料水をこの評価系に供すると、浸透圧や pH が培養細胞にとって適切でない、夾雑物が含有するなどの理由で、呈味強度の評価が行えていなかった。そこで本研究では、低浸透圧条件、夾雑物の存在下、弱酸性条件のそれぞれについて、各要因の影響の大きさの検討と、正確な呈味評価を行うための測定系改良を行った。
【方法・結果】培養細胞にヒト甘味受容体・ヒト苦味受容体をキメラ G タンパク質とともに一過的・安定的に発現させた。受容体発現細胞にリガンドを投与した時の受容体活性化は、細胞内カルシウムイオン感受性蛍光指示薬の蛍光強度変化によって評価した。
水あるいは市販の緑茶に呈味物質を溶解したリガンド溶液を作製し、低浸透圧溶液や夾雑物含有溶液のモデルとした。低浸透圧条件または夾雑物の存在下では、リガンド投与後の細胞において非特異的な応答が確認されるが、リガンド溶液の浸透圧やアッセイバッファーの組成に工夫を加えることで、非特異的な応答の軽減が可能となった。また 6 種類の甘味物質、および 3 種類の苦味物質にクエン酸を混合することで pH を調整し、甘味・苦味受容体の活性調節能をそれぞれ評価した。その結果、受容体・リガンドの種類に応じて pH 感受性が大きく異なることが明らかになった。

Sweet and bitter tastants are recognized by taste receptors belonging to G protein-coupled receptor family in mammals. The responses of cultured cells expressing human taste receptors are applicable indicators in evaluating gustatory intensities for basic tastes. When beverages are used as a ligand solution in cell-based assay system, some factors made it impossible to show accurate cellular responses. In this study, the effects of low osmotic pressure, impurities, or acidity on the assay system were examined. When the compositions of ligands or assay buffer were modified, nonspecific responses, that were caused by low osmotic pressure or impurities, were confirmed to decrease. Moreover, the sensitivity to the acidity was indicated to be distinct among each receptor and each ligand.

taste, receptor, cell-based assay

発表責任者：三坂巧（amisaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2H09-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

霊長類における旨味受容体のヌクレオチド感受性と食性の関わり

Relationship between the nucleotide sensitivity of T1R1/T1R3 and diets in primates

○戸田 安香[1]、早川 卓志[2]、糸井川 壮大[3]、栗原 洋介[4]、中北 智哉[1]、Amanda Melin[5]、河村 正二[6]、今井 啓雄[3]、石丸 喜朗[1]、三坂 巧[7]([1]明大農・農芸化、[2]北大院地球環境・環境生物、[3]京大・霊長類研、[4]静大農、[5]カルガリー大学、[6]東大院新領域・先端生命、[7]東大院農生科・応生化)

○Yasuka Toda[1], Hayakawa Takashi[2], Akihiro Itoigawa[3], Yosuke Kurihara[4], Tomoya Nakagita[1], Melin Amanda[5], Shoji Kawamura[6], Hiroo Imai[3], Yoshiro Ishimaru[1], Takumi Misaka[7] ([1]Dept. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]Fac. Env. Earth Sci., Hokkaido Univ., [3]Pri. Res. Inst., Kyoto Univ., [4]Ctr. Educ. Res. Field Sci., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [5]Dept. Anthropol. Archaeol., Calgary Univ., [6]Dept. Integrated Biosci., The Univ. Tokyo, [7]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

旨味は、舌上などに存在する旨味受容体 T1R1/T1R3 を介して受容され、アミノ酸（タンパク質）を検出する役割を果たす。ヒトの旨味受容体は、アミノ酸の中でも昆布の旨味成分であるグルタミン酸に強く応答する。これまで発表者らは、ヒトを含む 17 種の霊長類を対象に解析を行い、ヒト旨味受容体の特徴である高グルタミン酸感受性は、主要タンパク質供給源を葉に依存する大型霊長類が新たに獲得した機能であることを見出した（日本農芸化学会 2021 年度大会)。一方、鰹節に含まれるグアニル酸や干しシイタケに含まれるイノシン酸などのヌクレオチドが旨味受容体におけるアミノ酸応答を増強する活性増強剤（アロステリックモジュレーター）として機能することが知られていたが、旨味受容体のヌクレオチド感受性と動物の食性の関わりは不明だった。そこで本研究では、これまで解析を行ってきた 17 種の霊長類を対象に、旨味受容体の機能解析、食物成分分析、行動実験を行い、旨味受容体のヌクレオチド感受性の違いが霊長類の食性とどう関わっているのかを検証した。

結果、単体では旨味受容体を活性化できないと考えられてきたヌクレオチドが、様々な霊長類の旨味受容体を単体で強く活性化することを明らかにした。特に、昆虫を主要タンパク質供給源とする小型霊長類の旨味受容体は、アミノ酸よりもヌクレオチドに対して高い感受性を示した。また、成分分析から、昆虫には遊離ヌクレオチドが豊富に含まれることを明らかにした。さらに、行動実験から、小型昆虫食霊長類であるリスザルが、ヌクレオチドを強く嗜好することを明らかにした。

霊長類の共通祖先は体が小さく、昆虫食だったと考えられている。本研究から、我々ヒトを含む霊長類の祖先では、旨味受容体が高感度なヌクレオチドセンサーとして機能しており、ヌクレオチドを豊富に含む昆虫をおいしく食べるのに役立っていたと考えられた。

Umami tastes are sensed by a taste receptor complex, T1R1/T1R3, that detects proteinogenic amino acids. High sensitivity to glutamate is a characteristic of human T1R1/T1R3, but the T1R1/T1R3 of other vertebrates does not consistently show this glutamate response. Here, we reveal a widespread and robust response to nucleotides across T1R1/T1R3 of primates. Our chemical analysis reveals that insects contain large amounts of free nucleotides. We also corroborated the preference to nucleotides using behavioral tests in insectivorous squirrel monkeys. These suggest that nucleotides can serve as an agonist of T1R1/T1R3 and enables insectivorous primates, including our ancestors, to perceive and prefer tastes of insects.

taste, umami, GPCR

講演番号：2H09-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

消化管苦味受容体を介したホップ由来苦味成分の機能性研究

Health benefits of hop-derived bitter components via intestinal bitter taste receptors

○山崎 雄大[1]、髙橋 千佳[1]、谷口 慈将[1]、成川 真隆[2]、三坂 巧[3]、阿野 泰久[1] ([1]キリンホールディングス(株)、[2]京都女子大家政学部、[3]東大農)

○ Takahiro YAMAZAKI[1], Chika TAKAHASHI[1], Yoshimasa TANIGUCHI[1], Masataka NARUKAWA[2], Takumi MISAKA[3], Yasuhisa ANO[1] ([1]Kirin Holdings Company, Limited, [2]Kyoto Women's University, [3]The University of Tokyo)

我々は、ビール原料であるホップを熟成すると、穏やかな苦味を持つ熟成ホップ由来苦味酸（MHBA）が生成されることを見出している。これまでに MHBA の経口胃内投与が、迷走神経を介したノルエピネフリン産生による褐色脂肪組織の熱産生を誘導するとともに、脂肪減少効果、認知機能改善効果を発揮することを報告している。一方で、苦味を呈する MHBA の消化管苦味受容伝達への関与など、その詳細な分子機序は不明であった。本研究では、各種苦味受容体の強制発現細胞を用いた細胞内 Ca^{2+}測定により、ヒト苦味受容体 TAS2R1、TAS2R8、TAS2R10、マウス苦味受容体 Tas2r119、Tas2r130、Tas2r105 が MHBA に応答することを見出した[1)]。消化管内分泌細胞でこれら苦味受容体の遺伝子発現を抑制すると、MHBA 投与による Ca^{2+}応答およびその後の消化管ホルモン cholecystokinin（CCK）の産生誘導が抑制された。さらに、MHBA 投与による自律神経活性化および褐色脂肪組織の熱産生誘導は、CCK1 受容体阻害剤の投与により阻害された。同様の機序により認知機能の改善可能性も示唆されるため、MHBA は消化管における特定の苦味受容体へのアゴニスト作用による脳腸相関活性化を介して、脂肪減少および認知機能改善作用を発揮することが示唆され、生活習慣病や認知症といった社会課題への貢献が期待される。

Matured hop bitter acids (MHBA) are bitter acid oxides from hops. Previous studies have shown that intragastric administration of MHBA induces norepinephrine production through autonomic nerves, resulting in thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) and improvement of cognitive function; however, the mechanism including MHBA recognition site on gastrointestinal cells remains unclear. Our study shows that MHBA is recognized by specific bitter taste receptors (human TAS2R1, 8, 10 and mouse Tas2r119, 130, 105)[1)]. Knockdown of these receptors suppressed an MHBA-induced calcium response and CCK (gastrointestinal hormone) production in enteroendocrine cells. Furthermore, induction of autonomic nerve activation and thermogenesis in BAT by MHBA is suppressed by CCK1 receptor antagonist. Our results demonstrate that a potential gut-brain mechanism, which are induced by specific bitter taste receptor activation by MHBA, drives calcium response and CCK production in enteroendocrine cells, leading to thermogenesis in BAT through autonomic nerves.

[1)] T. Yamazaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **533**, 704-709 (2020)

bitter taste receptor, hop, gut-brain mechanism

発表責任者：山崎　雄大（Takahiro_Yamazaki@kirin.co.jp）

講演番号：2H09-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

コイ苦味受容体 T2R の機能解析

Functional analysis of common carp (Cyprinus Carpio) T2Rs

○浅岡 亮太、清水 駿希、中北 智哉、戸田 安香、石丸 喜朗 (明大農)
○Ryota ASAOKA, Toshiki SHIMIZU, Tomoya NAKAGITA, Yasuka TODA, Yoshirou ISHIMARU (Meiji Univ.)

脊椎動物では，多様な化学構造を持つ苦味物質は，T2R ファミリーと呼ばれるＧタンパク質共役型受容体によって検出される。多くの魚種は数種類の T2R 遺伝子しか持たない。本研究対象のコイ(*Cyprinus carpio*)は，近縁種のゼブラフィッシュより 1 回多い 4 回の全ゲノム重複を経験しているが, 両種の T2R 遺伝子数はほとんど同じである。過去の本大会において我々は, *in situ* hybridization 法を用いた発現解析を行い，一部のコイ T2R が味蕾において下流シグナル伝達因子と共発現することを報告した。最近，ゼブラフィッシュとシーラカンス T2R のリガンド特性が報告された（Behrens et al., 2020)。本研究では，コイ T2R のリガンド特性を解明することを目的とした。

コイ口唇由来の cDNA やゲノム DNA を PCR 増幅して得た 6 種類の T2R について，培養細胞を用いて機能解析を行った。リガンドとしては約 20 種類の化合物を投与した。その結果，コイ T2R はゼブラフィッシュと同様に，少数の化合物のみに応答する受容体と，幅広い化合物に応答する受容体が存在した。天然苦味物質アンドログラフォリドやピクロトキシニンに濃度依存的に応答する受容体を同定した。以上より，環境中に存在する天然苦味物質に対して応答する苦味受容体が口腔内に存在することが示唆された。

Thousands of bitter compounds with diverse chemical structures are detected by a family of G protein-coupled receptors, namely T2Rs, in vertebrates. Most fish species have several T2Rs. Although common carp (*Cyprinus carpio*), has experienced an additional (4th) round of whole genome duplication after its divergence from zebrafish, the number of common carp T2R (ccT2R) genes was comparable to that of zebrafish T2R genes. We previously reported that ccT2R gene was co-expressed with genes encoding downstream signal transduction molecules in subsets of taste receptor cells. Recently, Behrens et al. investigated the agonist profiles of coelacanth and zebrafish T2Rs (Behrens et al., 2020). Here we aimed to elucidate agonist profile of ccT2Rs.

We performed functional analyses using cultured cells transiently transfected with six ccT2Rs obtained by PCR amplification from lip cDNA and genomic DNA. Approximately 20 chemical compounds were administered as ligands. Each ccT2R showed narrowly, intermediately, or broadly tuned ligand specificity, as in the case of zebrafish T2Rs. we identified three ccT2Rs to be activated by natural bitter compounds, andrographolide and/or picrotoxinin in a dose-dependent manner. Collectively, these results suggest that bitter taste receptors for natural bitter compounds found in the habitats are expressed in the oral cavity.

carp, T2R, bitter

講演番号：2H09-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

ヒト T1R1/T1R3 の受容体活性を調節する受容体内の構造的特徴

Characterization of regulating factors of the receptor activity in human T1R1/T1R3

○陳 思宇、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Siyu CHEN, Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背景・目的】グルタミン酸などのうま味物質は、クラス C GPCR ファミリーに属する T1R1 と T1R3 から構成されるうま味受容体によって受容される。これまでに当研究グループではヒト・マウスを対象に、T1R1/T1R3 のアミノ酸認識に重要な残基の同定を行い、受容体の活性の強さを調節する残基の特定に成功している（Toda Y. *et al., J. Biol. Chem.*, 2013）。しかし、これらの残基における受容体活性調節の詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。本研究では、特定した残基について網羅的な変異体を作出し、T1R1/T1R3 受容体活性を調節する因子の探索を行った。
【方法・結果】ヒト T1R1 の細胞外領域において受容体活性調節に関わる 6 残基を対象に、それぞれを複数種類のアミノ酸残基に変異させた網羅的な点変異体シリーズをデザインした。これらの点変異導入 T1R1 それぞれを T1R3、キメラ G タンパク質、発光タンパク質とともに培養細胞に一過的に発現させた。受容体発現細胞にリガンドを投与後、カルシウム感受性発光タンパク質の発光強度によって、受容体の活性の強さやリガンドに対する感受性を評価した。
　グルタミン酸あるいは人工うま味物質の S807 を点変異導入受容体発現細胞に投与し、各変異体のリガンド応答活性を評価した。網羅的な変異体解析を行ったところ、ヒト T1R1 サブユニットの非オルソステリック部位において、受容体活性調節に最も大きく寄与する 2 残基を特定した。これら 2 残基はヒト T1R1 の細胞外領域の表面近くに上下対となる位置に存在し、野生型 T1R1 ではともに側鎖に陽電荷をもつ塩基性アミノ酸となっている。活性上昇した変異体においては、これら残基間に生ずる静電的な反発作用が低減あるいは消失し、受容体活性が上昇することが示唆された。

The heterodimeric receptor of T1R1 and T1R3, both of which are members of G protein-coupled receptor family, functions as an umami taste receptor. Previously, we succeeded in identifying important 6 residues, that represent the difference in receptor activities between human and mouse receptors, located at the extracellular domain of T1R1. In this study, we designed a series of point mutants of human T1R1 for each residue, and measured those responses to umami tastants using a cell-based assay system. We here found 2 residues in the allosteric site of the extracellular domain to play a crucial role in determining the receptor activity. Since both of 2 key residues are positively charged in wild-type human T1R1, it was strongly suggested that the electrostatic repulsion affects the receptor activity of the umami taste receptor.

taste receptor, umami, cell-based assay

発表責任者：三坂巧（amisaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2H09-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

塩味受容に関与する新規分子の同定

Identification of a molecule that is involved in salty taste reception

○成川 真隆[1]、笠原 洋一[2]、石丸 喜朗[3]、三坂 巧[2]、阿部 啓子[2,4]、朝倉 富子[2]([1]京都女子大家政、[2]東大院農生科、[3]明治大農、[4]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Masataka NARUKAWA[1], Yoichi KASAHARA[2], Yoshiro ISHIMARU[3], Takumi MISAKA[2], Keiko ABE[2,4], Tomiko ASAKURA[2] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]The Univ. Tokyo, [3]Meiji Univ., [4]KISTEC)

塩味は利尿薬アミロライドに対する感受性の違いから、アミロライド感受性（AS）と非感受性（AI）成分に分けられる。このうち、AS 成分の受容には上皮性 Na チャネルを介した分子機構が関与すると考えられている。一方、AI 成分の受容機構の詳細は不明である。そこで本研究では、AI 成分の受容に関わる分子の同定を試みた。味蕾に発現する遺伝子の網羅的な解析と組織染色を実施し、機能未知の膜タンパク質 Transmembrane channel-like 4（Tmc4）が味蕾特異的に発現することを見出した。味蕾は舌上で茸状乳頭と葉状、有郭乳頭に局在し、それぞれ鼓索神経と舌咽神経という異なる味覚神経によって支配されている。AS 受容には茸状乳頭－鼓索神経が関与する一方、AI 受容には葉状・有郭乳頭－舌咽神経が関与することが知られている。*Tmc4* mRNA の発現はこのうち葉状・有郭乳頭味蕾で強く観察された。次いで、味受容における Tmc4 の役割を明らかにするために、Tmc4 欠損マウスを用いて塩味刺激に対する味覚神経応答を記録した。鼓索神経の塩味応答において野生型と欠損マウス間に明確な差は認められなかった。しかし一方で、舌咽神経の塩味応答が Tmc4 欠損マウスで有意に低下していた。これらの結果は Tmc4 が AI 成分の受容に関わる分子として機能する可能性を強く示唆する。なお、動物を用いた実験は 2017 年以前に実施した。本研究成果は、科学技術振興機構事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP シーズ育成タイプの支援を受けた。

The goal of the study was to identify a molecule related to the detection of amiloride-insensitive (AI) salty taste. A comprehensive gene expression analysis and histological staining of taste tissue revealed that transmembrane channel-like 4 (Tmc4) was specifically expressed in taste bud cells. The tongue is innervated by two types of gustatory nerves: the chorda tympani and the glossopharyngeal nerve. These nerves are distributed around the fungiform and the foliate and circumvallate papillae, respectively. The foliate and circumvallate papillae – the glossopharyngeal nerve is known to be involved in the detection of AI salty taste. High expression of *Tmc4* mRNA was observed in taste buds of the foliate and circumvallate papillae. To understand the role of Tmc4 in the process of taste reception, the gustatory nerve responses to taste stimuli were measured in Tmc4-deficient mice. In the chorda tympani nerve, no significant difference was observed in the response to salty taste stimuli between wild-type and Tmc4-deficient mice. Conversely, the glossopharyngeal responses to salty taste stimuli were significantly decreased in Tmc4-deficient mice. These results suggest that Tmc4 functions as the molecule involved in the detection of AI salty taste.

Salty taste, Tmc4, Tmc4 KO mice

講演番号：2H09-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

新規塩味受容分子 Transmembrane channel-like 4 の機能解析

Functional analysis of the novel salt taste receptor, Transmembrane channel-like 4

○笠原 洋一[1]、成川 真隆[2]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]([1]東大農、[2]京都女子大家政、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Yoichi KASAHARA[1], Masataka Narukawa[2], Takumi Misaka[1], Keiko Abe[1,3], Tomiko asakura[1]
([1]Tokyo Univ., [2]Kyoto Women's Univ., [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

Transmembrane channel-like（TMC）ファミリーは、細胞内カルシウム感受性クロライドチャネルである Ano1 に代表されるアノクタミンスーパーファミリーに属する。哺乳類では TMC1-8 の 8 種が確認されている。近年の遺伝子解析研究から TMC ファミリーは、生理的に重要な役割を持つことが示唆されている。しかしながら TMC1 と TMC2 が難聴に関与する陽イオンチャンネルとして報告されている以外には、TMC ファミリーの分子機能は不明であった。本研究では、Whole-cell patch-clamp 法を用いて塩味受容に関与することが示唆された TMC4 分子の機能解析を行った。結果、TMC4 は電位依存性クロライドチャネルであることが示唆された。また TMC4 は、グルコン酸イオンも透過する程の大きなポアを持ち、細胞内 Ca^{2+}濃度の影響を受けないことから活性化の駆動力は、細胞の脱分極であることが示唆された。以上のことから TMC4 は、塩味受容に関与する初めてのクロライドチャネルであり、減塩効果を持つ物質のスクリーニングをはじめ食品開発における新たなツールとして期待される [1)]。

Transmembrane channel-like (TMC) refers to a family belonging to the anoctamine(ANO) superfamily. One of the representative molecules of this family is ANO1, which is an intracellular calcium-sensitive chloride channel. Eight species of TMC1-8 have been identified in mammals. In recent years, genetic analysis has suggested that the TMC family has a physiologically important role. However, the molecular functions of the other TMC families were unknown, except for reports that TMC1 and TMC2 are mechanosensitive cation channels involved in deafness. We analyzed the molecular function of TMC4 involved in salty taste reception using whole-cell patch-clamp technique and found that TMC4 is a voltage dependent chloride channel. It was also suggested that TMC4 has a relatively large pore and is not affected by intracellular Ca^{2+}. TMC4 is the first chloride channel involved in salt taste reception, and is expected to be a new tool in taste science.

1) Kasahara *et al.*, ***J Physiol Sci*** (2021) **71**:23

本研究成果は、科学技術振興機構事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP シーズ育成タイプの支援を受けた。

Salty taste, TMC4, Whole-cell patch-clamp

発表責任者：朝倉富子（asakura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2H09-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

Transmembrane channel-like 4 チャネルの温度及び pH 依存性

Transmembrane channel-like 4is involved in pH and temperature-dependent modulation of salty taste

○朝倉 富子[1]、笠原 洋一[1]、成川 真隆[2]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1] ([1]東大院農生科、[2]京都女子大)
○Tomiko ASAKURA[1], Yoichi KASAHARA[1], Masataka NARUKAWA[2], Takumi MISAKA[1], Keiko ABE[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kyoto Women's Univ.)

Transmembrane channel-like 4（TMC4)は、電位依存性のクロライドチャネルで、塩味の受容に関わる分子として発表者らが報告した[1)]。ヒト TMC4（hTMC4）とヒトの塩味感受性を比較し、hTMC4 が塩味受容分子であることを検証することを目的とする。

HEK293T 細胞に TMC4 を発現させ、whole cell path 法を用いて温度及び、pH を変化させた際の Cl^-電流の変化を測定した。温度を、17～47℃で連続的に変化させたところ 42.6±0.52 で変曲点を示した。また、pH に対する応答は、弱酸性（pH 5.5）では、pH 7.4 、pH 6.5 に比べて、有意に活性化が抑制された[2)]。

過去の官能評価から、ヒトが塩味を最も強く感じるのは体温付近（22～37℃）であると報告されている。また、酸性条件下では塩味が抑制されることが示されている。TMC4 の食塩に対する応答性は、ヒトの塩味感受性と近いことが明らかになった。

Human susceptibility to NaCl varies depending on temperature and pH, the molecular mechanisms of which remain unclear. The voltage-dependent chloride channel, transmembrane channel-like 4 (TMC4), is activated at approximately 40 °C and is suppressed at pH 5.5. As these are similar in character to human sensory evaluations, human TMC4 may be involved in human salt taste reception.

1) Kasahara et al. ***J.Physiol Sci*** (2021) **71**:23
2) Kasahara et al ***Biosci. Biotechnol. Biochem.*** (2021) **85**:2295
本研究成果は、科学技術振興機構事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP シーズ育成タイプの支援を受けた。

transmembrane channel-like 4, temperature, pH

発表責任者：朝倉富子（asakura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2H09-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

新規塩味増強物質 3-guanidinyl-1-propanol の Transmembrane channel-like 4 に対する応答性

A new salt-enhancing substance, 3-guanidinyl-1-propanol was responded to hTMC4

○山下 治之[1]、笠原 洋一[1]、成川 真隆[2]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科、[2]京都女子大)
○Haruyuki YAMASHITA[1], Yoichi KASAHARA[1], Masataka NARUKAWA[2], Keiko ABE[1], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kyoto Women's Univ.)

塩分の過剰摂取が世界的に問題となるなか、日本人の塩分摂取量は依然として基準値を上回っている。塩分の摂取量を下げるためには、食物のおいしさの基本である塩味を変えることなく、塩分含有量を低下させることが出来る塩味増強物質の利用が有効である。既知の塩味増強物質のうち L-Arg HCl が異味のない増強効果を示すことから、グアニジ二ル基を有する化合物に塩味増強効果があると推定し、数種類のグアニジ二ル化合物を合成した。これらのうち、3-guanidinyl-1-propanol (3-GPrOH) に塩味増強活性があることを官能評価によって確認した。3-GPrOH がどのように塩味を増強するか、そのメカニズムを解明するために、低濃度の塩味を受容するといわれている humanENaCαβγ (hENaCαβγ)と human Transmembrane channel-like 4 (hTMC4)に対する応答を調べたところ 3-GPrOH は、hENaCαβγには応答せず、hTMC4 にのみ応答することが見出された。本研究は、科学技術振興機構事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP シーズ育成タイプの支援を受けた。

While an excessive salt intake has become a global health problem, this situation in Japan is still above the recommendation. In order to reduce the individual salt intake, it is effective to use same saltiness-enhancing substance that can same the salt content of foods without changing its saltiness, which is a basis of deliciousness. Since L-Arg HCl is known to show a saltiness enhancing effect without unpleasant taste. It is kindly that the substance having a guanidinyl group generally has a salt-enhancing effect. In particular we synthesized several guanidinyl substances and found that 3-ganidinyl propanol (3-GPrOH) showed salty taste enhancing effect by sensory evaluation. To reveal the mechanism of 3-GPrOH salty enhancement, the response to the ENaCαβγ and hTMC4 were examined. As a result 3-GPrOH responded to hTMC4 but not hENaCαβγ.

salty taste, guanidinyl alcohol, TMC4

発表責任者：朝倉富子（asakura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2H09-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:30～ ミーティングルーム H

オトガイ舌骨筋からの表面筋電位を用いた PLS 回帰分析による嗜好と飲み込みやすさの可視化

Characterization of palatability and ease of deglutition of the five basic tastes by partial least squares regression analysis using myoelectric potential parameters of the submental muscle

○森 安珠[1]、上田 玲子[1]、梅谷 華奈[1]、阿部 啓子[1,2]、朝倉 富子[1] ([1]東大院・農生科、[2]KISTEC)
○Anju MORI[1], Reiko UEDA[1], Kana UMETANI[1], Keiko ABE[1,2], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KISTEC)

【目的】　食品は、物性・味・匂い・嗜好性等様々な要素を持ち、これらの要素が摂食時の飲み込みやすさに影響を与えることが予想される。本研究では、五基本味の嗜好性と飲み込みやすさとの関連をオトガイ舌骨筋の表面筋電位から明確化することを目的とした。
【方法】　五基本味溶液について、それぞれ嗜好・忌避濃度を含む（苦味除外）５段階の濃度水準を設定し、強度、嗜好、飲み込みやすさについて 20 代女性 41 名に対し官能評価を実施した。41 名より各味質における代表者 17~20 名を抽出し、表面筋電位測定の被験者とした。官能評価値を目的変数、14 の表面筋電図測定パラメーターを説明変数として PLS 回帰分析を適用し、変数重要度 VIP>0.1 で選択された筋電位要素を用いて、各味質の予測式を構築した。さらにプリファレンスマップを用いて目的変数と説明変数の関係性を可視化し、その相関やベクトル関係を検討した。
【結果】　官能評価値と表面筋電位要素との関係について、構築した予測式は全ての味質で高い精度が得られた。一方で選択された VIP は味質ごとに異なっていた。プリファレンスマップにおいては、嗜好と飲み込みやすさは旨味以外の味質で正の相関関係にあり、塩味、甘味、酸味は周波数因子と相関しているという点で類似していた。苦味は継続時間と高い負の相関を持っていた。旨味については嗜好と飲み込みやすさに相関が見られなかった。これより、嗜好性の高い味ほど飲み込みやすいといった通説と実際の飲み込みやすさは必ずしも一致しないことが明らかになった。
本研究成果は、科学技術振興機構事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP シーズ育成タイプの支援を受けた。

[Purpose] Food has various factors such as tastes, smells, texture or palatability, and it is expected that these factors affect the ease of deglutition. In this study, we clarify the relationship between sensory evaluation of the five basic tastes and response of the geniohyoid muscle.　[Method]For each of the five basic tastes, we set five concentration level. 41 healthy young females participated in sensory evaluation, and 17-20 females of those for each taste participated in the sEMG measurement. PLS regression analysis was applied with the sensory evaluation as objection and sEMG components selected with the variable importance VIP>0.1 as explaining component for constructing prediction formulas. Also, we visualized those relationships using the preference map.　[Results] The relationship between sensory evaluation values and sEMG components was composed different parameters between each taste.

sensory evaluation, electromyography, partial least squares regression analysis

講演番号：2I01-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子の探索

Investigation of genes for gramine biosynthesis in barley

○金井 詞音、石川 恵里加、須恵 雅之（東京農大・農化）
○Shion KANAI, Erika ISHIKAWA, Masayuki SUE (Tokyo Univ. Agric.)

オオムギの耐病性化合物であるグラミン(Grm)は、Trp に由来する 3-アミノメチルインドール(AMI)がメチル基転移酵素(HvNMT)によって修飾を受けることで生合成される。Trp から AMI への過程で、インドール環-アミノ基間の二つの炭素原子のうち一つが失われる興味深い反応が起こっているが、この変換に関与する酵素や遺伝子、中間体は明らかにされていない。我々はこれまでに、オオムギの Grm 生産品種と非生産品種を用いた RNA-seq により候補遺伝子を選抜し、シロイヌナズナを用いた機能解析によって AMI 生成に関与しうる酵素遺伝子として *DN62993* を特定した。しかし、シロイヌナズナは双子葉植物であり、また、アブラナ科植物特有なインドールグルコシノレート生合成中間体が、DN62993 の基質となることで AMI が生成している可能性がある。そのため、今回は単子葉植物であるイネを用いて *DN62993* と *HvNMT* を導入した過剰発現株を作出し、代謝変動を解析した。その結果、シロイヌナズナと同様に AMI と Grm の生成が確認することができ、DN62993 が AMI の生合成に関与していることが強く示唆された。一方で、*DN62993* と *HvNMT* は、一部の Grm 非生産品種においても発現していることがこれまでに明らかになっている。そこで、両酵素の一次構造および機能の品種間差を検討するために、複数のオオムギ品種における *DN62993* と *HvNMT* を比較した。その結果、DN62993 と HvNMT 共に Grm 生産性と相関のある変異が見られた。現在、この変異と機能の関係について解析中である。

Gramine (Grm), a defensive compound in barley, is biosynthesized from Trp-derived 3-aminomethylindole (AMI) by the action of a methyltransferase (HvNMT). While a notable reaction is involved in the course of AMI formation from Trp, no information about the enzymes, genes, and intermediates are available. Recently, we demonstrated that *Arabidopsis thaliana* overexpressing *DN62993* which was isolated by RNA-seq analysis as a gene expressed at higher level in Grm-producing barley cultivar accumulated AMI. Since *A. thaliana* is a dicot plant and produces indole glucosinolates whose biosynthetic intermediates may serve as a substrate for DN62993, we introduced, in this work, *DN62993* into *Oryza sativa* to confirm its role in Grm biosynthesis. Additionally, we isolated *DN62993* and *HvNMT* genes from several barley cultivars with or without Grm-accumulating ability to compare their sequences because qPCR analyses showed that some of the Grm-lacking cultivars express the genes. As the results, it was shown that DN62993 is involved in Grm synthesis in the recombinant rice and single nucleotide mutation causes the loss of DN62993's function.

Gramine, biosynthesis, barley

発表責任者：須恵雅之（sue@nodai.ac.jp）

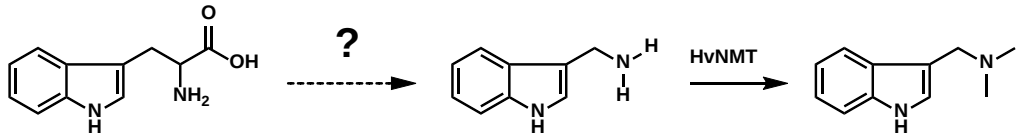
講演番号：2I01-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子の単離と解析

Investigation into the gramine biosynthetic gene in barley

○石川 恵里加、金井 詞音、須恵 雅之（東農大・農化）
○Erika ISHIKAWA, Shion KANAI, Masayuki SUE (Tokyo Univ. Agric.)

オオムギの一部栽培品種は、グラミンを耐病性化合物として生産・蓄積している。グラミンの生合成経路は、トリプトファン(Trp)のインドール環とアミノ基の間の 2 つの炭素原子のうちの 1 つが除去されるというユニークな反応を経て、アミノメチルインドール(AMI)が合成され、さらに 2 段階の *N*-メチル基転移反応を経て生成すると推測されているが、Trp から AMI への反応機構は未だ明らかとなっていない。グラミン生産能を指標にした RNA-seq による網羅的解析とシロイヌナズナへの遺伝子導入の結果より、一つの遺伝子(DN62993)が AMI の蓄積に関与していることが示唆された。そこで本研究では、AMI 生合成における DN62993 の機能をより詳細に解明することを目的として、ピキア酵母を用いた異種発現系の構築を行った。ピキア形質転換体を Trp 含有培地で培養し、培養液中の代謝産物を LC/MS で分析したところ、野生株では見られなかった AMI の生成が見られた。そこで、ミクロソーム画分を調製し、Trp やトリプタミンなどの複数のインドール化合物を基質としてそれぞれ反応させたところ、Trp でのみ AMI の生成が見られた。このことから、DN62993 は単独で Trp から AMI への変換を行っていることが強く示唆され、オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子である可能性が示された。



tryptophan (Trp)　3-aminomethylindole (AMI)　gramine (Grm)

Some barley cultivars accumulate an alkaloidal secondary metabolite, gramine, as a defensive compound. Gramine is biosynthesized from tryptophan (Trp) via aminomethylindole (AMI) followed by two sequential *N*-methylation by a methyltransferase (HvNMT). However, the pathway from Trp to AMI has not been identified. Our recent study using RNA-seq analysis suggested that one of the genes (DN62993) more highly expressed in a gramine-accumulating barley cultivar caused AMI production when it was overexpressed in *Arabidopsis thaliana*. In this study, we aimed to evaluate the functions of DN62993 using the heterologously expressed enzyme to elucidate its role in gramine biosynthesis. As the results, DN62993 catalyzed conversion of Trp into AMI both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that DN62993 is a gramine biosynthetic gene.

gramine, biosynthesis, barley

発表責任者：石川恵里加（10420001@nodai.ac.jp）

講演番号：2I01-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

ムラサキ代謝における 4-coumaroyl-CoA ligase の機能分担とシコニン生合成への関与

Functional assignment of 4-coumaroyl-CoA ligase in Lithospermum erythrorhizon metabolism and its involvement in shikonin biosynthesis

○中西 浩平[1]、李 豪[1]、市野 琢爾[1]、巽 奏[1]、刑部 敬史[2]、渡辺 文太[3]、下村 講一郎[4]、矢崎 一史[1]([1]京都大学 生存圏研究所、[2]徳島大学 生物資源産業部、[3]京都大学 化学研究所、[4]東洋大学 生命科学研究所)

○ Kohei Nakanishi[1], Li Hao[1], Takuji Ichino[1], Kanade Tatsumi[1], Keishi Osakabe[2], Bunta Watanabe[3], Koichiro Shimomura[4], Kazufumi Yazaki[1] ([1]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, Japan, [2]Graduate School of Technology, Industrial and Social Science, Tokushima University, Japan, [3]Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan, [4]Plant Regulation Research Center, Toyo University, Japan)

薬用植物ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）は、有用二次代謝産物のシコニンを根特異的に生産する。シコニンは、*p*-hydroxybenzoic acid（PHB）と geranyl diphosphate のカップリングにより生成する *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid を基本骨格とし、その後数段階の酵素反応を経て生合成される。シコニン生合成の重要前駆体の一つである PHB の生合成については、4-coumaroyl-CoA ligase（4CL）が関与するか否かに関し長年の議論がある。すなわち、ATP と CoA を必要とする 4CL を介した経路と、NAD^+のみを必要とする *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase を介した経路の 2 つが植物の PHB 生合成として報告されており、シコニン生合成における PHB の供給経路は不明のままであった。本研究では、ムラサキ培養細胞へ 4CL の特異的阻害剤の投与実験を行い、シコニン生産への影響を解析した。その結果、4CL 阻害剤の投与により、シコニン生産が顕著に阻害された。一方で、ゲノムのアセンブルとオミクスデータを利用した *in silico* 解析により、ムラサキゲノム上には少なくとも 8 つの *4CL* パラログが存在し、その内 3 遺伝子がシコニン生産と同調して発現することが示唆された。そこで、ゲノム編集により、これら 3 遺伝子を標的としたノックアウト（KO）毛状根を作製し、シコニン生産量への影響を解析した。その結果、*4CL7* および *4CL8* の KO 毛状根においてシコニン生産量が顕著に減少した。これらの結果から、*4CL7* および *4CL8* の両者がシコニン生合成に関与することが示唆された。

Lithospermum erythrorhizon (Boraginaceae) produces a useful secondary metabolite, shikonin, in root epidermis. There has been a long debate concerning the biosynthesis of *p*-hydroxybenzoic acid (PHB), a key precursor of shikonin biosynthesis, whether 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) is involved or not. In this study, we applied a 4CL-specific inhibitor *in vivo* to evaluate the relevance of 4CL for PHB formation using cell cultures of *L. erythrorhizon.* As the result, shikonin production was significantly inhibited by the inhibitor. According to genome assembly and *in silico* analysis of *L. erythrorhizon* gene, three genes out of eight *4CL* paralogs were highlighted as being possibly involved in the shikonin biosynthesis. To identify which gene is responsible for the shikonin biosynthesis, we generated knockout (KO) hairy roots targeting those *4CL* genes by use of genome editing. The production of shikonin in *4CL7_KO* or *4CL8_KO* mutant was significantly decreased. These results indicate that both *4CL7* and *4CL8* are involved in the shikonin biosynthesis.

4-coumaroyl-CoA ligase, PHB biosynthesis, shikonin

講演番号：2I01-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

ムラサキ科におけるシコニン／アルカニンアシル基転移酵素の分子進化
Molecular evolution of shikonin/alkannin acyltransferases in Boraginaceae

○押切 春佳[1]、李 豪[2]、眞辺 美咲[3]、山本 浩文[4]、矢崎 一史[2]、高梨 功次郎[1,3]([1]信州大院・総合医理工、[2]京大・生存研、[3]信州大・理、[4]東洋大・生命科学)
○Haruka Oshikiri[1], Hao Li[2], Misaki Manabe[3], Hirobumi Yamamoto[4], Kazufumi Yazaki[2], Kojiro Takanashi[1,3] ([1]Grad. Sch. Med., Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]RISH, Kyoto Univ., [3]Fac. Sci., Shinshu Univ., [4]Fac. Life Sci., Toyo Univ.)

一部のムラサキ科植物は、根の表皮において紅色を呈するシコニンおよびアルカニンを生産する。シコニンとアルカニンの多くは低分子脂肪酸エステル誘導体として排出されており、これらシコニン／アルカニン誘導体の組成はムラサキ科植物の種や個体間で異なる。この違いはシコニンおよびアルカニンのアシル化を触媒する酵素の多様化に起因すると推測し、これまでにムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) において明らかにしたシコニンおよびアルカニン特異的なアシル基転移酵素、LeSAT1 および LeAAT1 に着目した [1]。ムラサキ科植物 8 種のトランスクリプトームデータから候補遺伝子を探索し、全長配列を取得できた 13 遺伝子について解析を行なった。分子系統解析の結果、2 タイプの *SATs* (*SAT1*、*SAT2*)、および 2 タイプの *AATs* (*AAT1*、*AAT2*) がそれぞれ検出され、植物種を問わず各タイプ内でアシル基供与体の基質特異性が保存されていた。このことはムラサキ科植物種間のシコニン／アルカニン誘導体組成の違いは、SATs および AATs の基質特異性に起因しないことを示唆する。本大会では解析対象とした SATs および AATs の細胞内局在や転写量のデータと併せて、ムラサキ科植物における SATs と AATs の分子進化と、シコニン／アルカニン誘導体生産について議論する。

Some Boraginaceae plants produce red pigments, shikonin and alkannin derivatives, in the root epidermis. Shikonin and alkannin are mostly secreted as acylated derivatives, and the composition of them are different among species, even among individuals within the same species. To investigate whether these differences in shikonin and alkannin derivatives are due to the functional diversification of shikonin/alkannin-specific acyltransferases (SATs/AATs, respectively), 13 orthologues of *LeSAT1* and *LeAAT1*[1], enantio-specific BAHD acyltransferases of *Lithospermum erythrorhizon*, were cloned from eight Boraginaceae plants and analyzed. However, all orthologues showed the same acyl donor specificities, suggesting that the variety of shikonin and alkannin derivatives among Boraginaceae plants are not caused by the functional diversification of SATs/AATs.

1) Oshikiri, *et al.*, Plant Physiology (2020) 184: 753-761.

Shikonin/Alkannin derivatives, Acyltransferase, Boraginaceae

発表責任者：高梨 功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2I01-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

二次代謝のモデル植物ムラサキの ABC タンパク質の解析

Analysis of ABC proteins in *Lithospermum erythrorhizon*, a model of secondary metabolism

○坪山 愛、李 豪、松田 陽菜子、棟方 涼介、杉山 暁史、矢﨑 一史（京大　生存圏）
○Ai TSUBOYAMA, Hao LI, Hinako MATSUDA, Ryosuke MUNAKATA, Akihumi SUGIYAMA, Kazuhumi YAZAKI (RISH, Kyoto Univ.)

ATP-結合カセット(ABC)タンパク質は、植物において最大の膜輸送体ファミリーであり、植物の発生制御や環境応答で重要な役割を果たしている。さらに植物に特有な二次代謝産物の輸送にも ABC タンパク質は関与すると考えられている。しかし、二次代謝産物の輸送に関わる ABC タンパク質の同定は未だ報告数が限られている。本研究では、多様なメロテルペンやフェニルプロパロイドを多量に生産するムラサキ(*Lithospermum erythrorhizon*、ムラサキ科)実験に好適な培養細胞系を有していることに着目し、本植物の ABC タンパク質の全体像を明らかにして、その中から二次代謝産物の輸送に関与するメンバーの解析を行うこととした。

ゲノム解析の結果、ムラサキには 115 個の ABC タンパク質遺伝子をコードすると推定される配列が発見された。ムラサキの ABC タンパク質の特徴として、フルサイズの ABCG サブファミリーの数がシロイヌナズナと比べて 2 倍以上に増加していることが明らかになった。G-タイプの ABC タンパク質遺伝子はイントロンが多く、ゲノム構造を確定しづらいという特徴があるが、特にメロテルペンやフェニルプロパノイドの生産誘導時に高い発現を示す ABCG タンパク質遺伝子について、その全長 cDNA を取得した。大会では、その発現特性や遺伝子産物の局在解析等について発表する。

ABC proteins are the largest family of membrane transporters in plants, and are thought to be involved in the transport of various secondary metabolites. However, the number of ABC proteins involved in the transport of secondary metabolites is still limited.

In this study, we tried to have an inventory of ABC proteins in *Lithospermum erythrorhizon*, which produces large amounts of various meroterpenes and phenylpropanoids, and to characterize a member for the involvement in the transport of secondary metabolites.

The genome analysis of *L. erythrorhizon* revealed 115 sequences putatively encoding ABC protein genes. As a characteristic feature of the ABC proteins in *L. erythrorhizon*, the number of full-size ABCG subfamilies was found to be more than doubled compared to that of in *Arabidopsis thaliana*. We are now focusing on a member of ABCG protein, which is highly expressed under meroterpene production condition, and conducting the expression analysis and the subcellular localization.

ATP-binding cassette protein, secondary metabolites, membrane transport

講演番号：2I01-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

ステロイドグリコアルカロイド生合成に関わる新規生合成遺伝子の機能解析
Functional analysis of a novel candidate gene involved in steroidal glycoalkaloid biosynthesis
○米田 彩乃[1]、秋山 遼太[1]、中安 大[1,2]、刑部 敬史[3]、刑部 祐里子[4]、梅基 直行[5]、斎藤 和季[5]、村中 俊哉[6]、安本 周平[6]、三浦 謙治[7]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]（[1]神大農、[2]京大生存圏、[3]徳島大生物資源産業、[4]東京工業大生命理工、[5]理研基盤研、[6]阪大工、[7]筑波大生命環境系）
○ Ayano YONEDA[1], Ryota AKIYAMA[1], Masaru NAKAYASU[1,2], Keishi OSAKABE[3], Yuriko OSAKABE[4], Naoyuki UMEMOTO[5], Kazuki SAITO[5], Toshiya MURANAKA[6], Shuhei YASUMOTO[6], Kenji MIURA[7], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1]（[1]Kobe Univ,, [2]Kyoto Univ., [3]Tokushima Univ., [4]Tokyo Tech., [5]RIKEN, [6]Osaka Univ., [7]Tsukuba Univ.）

ステロイドグリコアルカロイド（SGA）は分子内に窒素原子を含むステロイド配糖体であり、ジャガイモの α-ソラニンやトマトの α-トマチンは代表的な SGA である。SGA はコレステロールを前駆体として生合成され、その生合成経路は水酸化（22 位、26 位、16α位）、アミノ基転移、EF 環化などによるアグリコン形成と、3 位水酸基への配糖化の二段階に分けられ、これまでに多くの生合成遺伝子が単離同定されている。我々は、既知 SGA 生合成遺伝子と 7 番染色体上で遺伝子クラスターを形成し、かつ、SGA 生合成遺伝子と協調して発現するジャガイモの *Cellulose Synthase-Like M*（*StCSLGT*）を新規な生合成候補遺伝子として見出した。本遺伝子はカンゾウのグリチルリチン生合成に関わる GuCSyGT とアミノ酸レベルで 40%の相同性を示す 713 アミノ酸残基からなる膜タンパク質をコードしている。カンゾウ GuCSyGT はアグリコンのグリチルリチン酸の 3 位水酸基にグルクロン酸を転移する酵素であることから、*StCSLGT* もステロイドの配糖化に関わる可能性が示唆された。一方、最終産物である α-ソラニンの糖鎖ソラトリオースにはグルクロン酸は存在せず、すでに UDP 糖依存性転移酵素が同定されていることから、*StCSLGT* が SGA 生合成へ関与する反応ステップは不明である。本発表では、ゲノム編集による *StCSLGT* ノックアウト株、StCSLGT 組換え酵素、タバコ一過的発現系などの解析結果をもとに、SGA 生合成における *StCSLGT* の役割や新たに提案される SGA 生合成経路について議論したい。

Steroidal glycoalkaloids (SGAs) are glycosides of nitrogen-containing steroids, and most representatives of SGAs are α-solanine in potato and α-tomatine in tomato. These SGAs are biosynthesized from cholesterol and the biosynthetic pathway is divided into two steps: aglycone synthesis and glycosylation at the C-3 hydroxy group. The aglycone synthesis has the multiple reaction steps: hydroxylation at C-16, C-22, and C-26, transamination at C26, and E- and F-rings closure. Several SGAs biosynthetic genes have been isolated and identified. We found *potato Cellulose Synthase-Like M* (*StCSLGT*) as a novel biosynthetic candidate gene, which forms a gene cluster with the known SGA biosynthetic genes on chromosome 7 and is cooperatively expressed with the known genes. In this presentation, we discuss a possible role of *StCSLGT* in SGAs biosynthesis and propose a new SGA biosynthetic pathway.

Steroidal glycoalkaloid, Biosynthesis, Genome editing

講演番号：2I01-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

大腸菌を用いたアピゲニン-7-*O*-グルコシドの生産

Production of apigenin-7-*O*-glucoside using the engineered *Escherichia coli*

○小林 美稀[1]、柿木 優佑[1]、石水 毅[2]、大橋 貴生[1] ([1]摂南理工、[2]立命館生命)
○Miki KOBAYASHI[1], Yusuke KAKINOKI[1], Takeshi ISHIMIZU[2], Takao OHASHI[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【背景】植物特化代謝産物の一種であるフラボノイドは、その多くが単糖やオリゴ糖が結合したフラボノイド配糖体として存在する。アピインはアグリコンにアピゲニン、糖鎖にアピオース β1,2-グルコース構造を持ち、パセリやセロリ等のハーブ類に多く含まれている。アピインはヒトの健康維持・増進、がんを始めとする様々な疾患の治療薬候補となり得る機能性を持つことから大きな注目を集めている。オリゴ糖部分の化学構造がこれらの機能性に重要であると考えられるが、分子レベルでの作用機構は十分に分かっていない。そこで微生物を用いたアピインの大量生産系を構築することを最終目的とし、本研究ではアピゲニンにグルコースが転移したアピゲニン-7-*O*-グルコシド（A7G）の *In vivo* 生産を目指した。
【方法と結果】シロイヌナズナ由来 *UGT73B1* (*AtGT-2*) 遺伝子をグルコース転移酵素遺伝子として利用するため、大腸菌発現ベクターを構築した。形質転換体中の組換え AtGT-2 タンパク質の発現は SDS-PAGE とウエスタンブロットにより確認した。次に、形質転換体を生体触媒として、受容体基質であるアピゲニンに作用させ、醗酵法による A7G の *In vivo* 生産を行った。生成物の逆相 HPLC 解析の結果、グルコース転移酵素遺伝子（*AtGT-2*）を導入した大腸菌形質転換体を用いた A7G の *In vivo* 生産が確認された。現在、A7G の *In vivo* 生産における至適温度を調査中であり、本発表で報告予定である。今後の展開としては、本研究で構築した A7G 生産系に、さらに UDP-アピオース合成酵素およびアピオース転移酵素遺伝子を導入することで、アピインの生産系の構築を目指す。

Apiin, a flavonoid glycoside composed of aglycone apigenin harboring an apiose β1,2-glucose disaccharide, is abundant in herbs such as parsley and celery. Apiin is attracting great attentions due to its human health benefits and its potential for therapeutic drug candidates for various serious diseases. In this study, we aimed at *in vivo* production of apigenin-7-*O*-glucoside (A7G) as a primary step for the apiin production using the engineered *E. coli*.

An *E. coli* expression vector for *Arabidopsis UGT73B1 (AtGT-2)* gene encoding a glucosyltransferase was constructed. Expression of recombinant AtGT-2 protein in transformants was analyzed by SDS-PAGE and western blot. Next, *in vivo* production of A7G from apigenin was carried out using the engineered *E. coli* expressing AtGT-2. Reversed-phase HPLC analysis showed the successful *in vivo* production of A7G.

Flavonoid, UGT, *Escherichia coli*

発表責任者：大橋　貴生（takao.ohashi@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2I01-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

ラズベリー花に含まれるポリフェノール化合物の分析研究

Analytical studies of polyphenolic compounds in raspberry flowers

○小堀 亮[1]、道下 僚[1]、高江 桃花[2]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻、[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科)
○Ryo Kobori[1], Ryo Doge[1], Momoka Takae[2], Akiko Saito[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU)

ラズベリー(*Rubus ideaus*)の果実や葉には、多くのフラバン-3-オール誘導体やエラグ酸誘導体、フラボノール誘導体など多種類のポリフェノール化合物が豊富に含まれており[1)]、様々な健康機能性が報告されている。これまで我々は、フラボノイドの中でも特に機能性が高いと考えられているフラバン-3-オール誘導体について、構造-活性相関研究や分析・定量研究を進め、化合物 **1** に高いガン細胞増殖抑制活性があることを見出している[2,3)]。本発表ではラズベリー果実や葉のポリフェノール化合物分析に加え、ラズベリーの花について検討を行ったので報告する。果実や葉の分析に加え花を 5 種類の部分 (花托・萼片・雌蕊・雄蕊・花弁)に分けて抽出操作を行い LCMS 等の各種分析を行った。その結果、花弁には果実や葉では微量成分として含まれていた化合物 **1** が、花の中でも花弁に特に多く含まれていることが明らかになった。

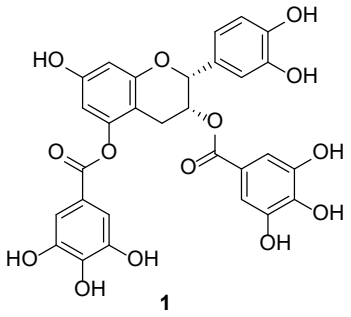


Figure 1. フラバン-3-オール誘導体の構造

The fruits and leaves of raspberries (*Rubus ideaus*) are rich in polyphenolic compounds, including many flavan-3-ol derivatives, ellagic acid derivatives, and flavonol derivatives,[1)] and various health functions have been reported. We have conducted structure-activity relationship studies and analytical/quantitative studies on flavan-3-ol derivatives, which are considered to have particularly high functionality among flavonoids, and have found that compound **1** has high cancer cell growth inhibitory activity.[2,3)] Therefore, in addition to the analysis of polyphenolic compounds in raspberry fruits and leaves, we have also studied raspberry flowers. The flowers were divided into five parts (receptacle, sepals, pistils, stamens, and petals) for extraction and various analyses such as LCMS. As a result, it was found that compound **1**, which was contained as a trace component in the fruits and leaves, was particularly abundant in the petals among the flowers.

1) J. Beekwilder, *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3313 (2005).
2) Y. Higashino, *et al*., *Molecules*, **23**, 205 (2018). 3) R. Kobori, *et al*., *Metabolites*, **9**, 56 (2019).

raspberry flower, polyphenol, flavan-3-ol

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2I01-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

チャ由来 UGT85K11 の配列情報を用いたコーヒーからのテルペン類配糖化酵素遺伝子の単離と機能解析

Isolation and characterization of UDP-glucose glycosyltransferase involved in production of terpene glucoside from coffee

○井田 美帆、佐々木 香織、能代 志歩、川上 寛子、水野 幸一（秋田県大）
○Miho IDA, Kaori SASAKI, Shiho NOSHIRO, Hiroko KAWAKAMI, Kouichi MIZUNO (Akita prefectural Univ.)

［背景・目的］ 植物は様々な化合物を生成し、その多くは植物自身の生体維持や生長、生存に関与している。その中でもテルペン類は身近な植物に含まれる二次代謝産物の一種であり、これらは食品や飲料の美味しさや品質に大きく関与している。また、これらテルペン類は、植物体内での生合成後は揮発性であるため速やかに大気中へ放出されるが、一部は配糖化を受け、チャでは二糖配糖体として蓄積していることが報告されている。この配糖化は UGT（UDP-glucose glycosyltransferase：UGT）および GGT（Glycoside-specific glycosyltransferase：GGT）が触媒している。本研究はアラビカコーヒー(*Coffea arabica*)におけるテルペン類の配糖化を担う酵素遺伝子の網羅的解析を進め、それら揮発性物質の植物体内における蓄積のメカニズムを明らかにする。これにより、最終的に他の成分はそのままに、芳香成分の含量を高めた高付加価値なコーヒー開発に向けた知見の蓄積をめざす。本研究では、リナロールを主としたテルペン類配糖化に関わる *UGT* 遺伝子の単離同定および機能解析を試みた。
［方法］ チャ（*Camellia sinensis*）から単離されたゲラニオール配糖化酵素 *UGT85K11* の配列情報から *C. arabica* の *in silico* スクリーニングを行い、候補遺伝子を絞り込んだ。最終的に 6 種の *UGT* 遺伝子（*CaUGT4*、*5*、*10*、*14*、*15* および *20*）を選抜し、これらの遺伝子を RT-PCR にて単離し、大腸菌組換え型酵素を用いた機能解析を試みた。
［結果と考察］ 6 種の候補遺伝子のうち、*C. arabica* の若葉由来 mRNA から *CaUGT4*、*5*、*10* および *20* を、つぼみから *CaUGT15* の単離に成功した。これらの組換え型酵素の活性を UDP-[^{14}C]-Glc を用いた TLC にて検出したところ、CaUGT4 および 10 はリナロール、シトロネロール、ペリリルアルコール、テルピネオールおよびゲラニオールに活性を示した。CaUGT15 はこれらに加え、メントールにも活性を示した。CaUGT5 および 20 はリナロール以外の複数の基質に活性を示した。そのほか、特に CaUGT4 のリナロールに対するシグナルは、CaUGT10 および CaUGT15 のそれと比較して最も明瞭であった。以上の結果から、現在 CaUGT4 に注目し至適条件等のより詳細な機能解析に取り組んでいる。

The aroma is important to decide the value of coffee beans. Linalool, which is one of the volatile terpene compounds, is dominant in the coffee aroma. Since terpenoids are generally accumulated as glycosides, the glycosylation is catalyzed by the UDP-glucose glycosyltransferases (UGTs). In this study, we identified those *UGT* genes from *Coffea arabica* and analyzed them with recombinant enzymes. Here, we report the isolation and characterization of an enzyme that has activity towards linalool.

Secondary metabolite, Terpene, Glycosylation

講演番号：2I01-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

ウルシ樹液に含まれる Fe2D タンパク質のアラビドプシスホモログの機能解析

Roles of Arabidopsis AT1G47980 and AT3G62730, homologs of Ferritin 2 domain-containing protein

○横山 優花[1]、今村 大樹[1]、飯伏 純平[1]、村山 佳加[1]、椎名 隆[2]、石崎 陽子[2]、北島 佐紀人[1]([1]京工繊大応生、[2]摂南大農)
○Yuka Yokoyama[1], Taiki Imamura[1], Junpei Iibushi[1], Yoshika Murayama[1], Takashi Shiina[2], Yoko Ishizaki[2], Sakihito Kitajima[1] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Setsunan University)

ウルシ(*Toxicodendron vernicifluum*)樹液の主成分であるフェノール性物質ウルシオールは、酵素ラッカーゼにより酸化重合することで固化する。これまでに我々は、ウルシ樹液中の機能未知な Fe2D タンパク質がラッカーゼによる酸化反応を抑制することを示した。Fe2D タンパク質のホモログはアラビドプシスにも存在し(AT1G47980 と AT3G62730)、翻訳産物は細胞外に局在すると推定された。これらが同様にラッカーゼやペルオキシダーゼが関わる生命現象(二次細胞壁のリグニンや種皮のリグニンおよびフラボノイドの沈着)に関与するか検証することを本研究の目的とした。

大腸菌で生産した組換えタンパク質は、*In vitro* でラッカーゼやペルオキシダーゼによる基質酸化物の蓄積を抑制した。アラビドプシスで両ホモログの promoter::GUS 融合遺伝子は互いに異なる発現パターンを示し、AT3G62730 の発現部位は部分的にリグニン沈着部位と一致した。CRISPR/Cas9 により両遺伝子を破壊した二重変異体の、発芽 7 日後の芽生えを用いて RNA-seq を行うと、核、細胞壁、原形質連絡、細胞膜に関連する遺伝子の発現が低下していた。一方、浸透圧ストレス応答性のいくつかの遺伝子の発現が増加していた。以上により、アラビドプシスの AT1G47980 あるいは AT3G62730 は、ラッカーゼあるいはペルオキシダーゼ活性の制御を通して細胞壁または細胞膜の機能に関与し、両遺伝子を欠損すると弱い浸透圧ストレスを受けるものと推定された。リグニンは二次細胞壁に沈着するため、Fe2D ホモログとリグニンとの関連が期待された。

The sap of lacquer tree (*Toxicodendron vernicifluum*) has urushiol as the main component, and it is oxidized by laccase. We have previously shown that Fe2D protein has negative effect on laccase activity. In this study, we focused on its Arabidopsis homologs AT1G47980 and AT3G62730. The recombinant proteins of these genes produced in *E. coli* suppressed the accumulation of oxidized substrate by laccase and peroxidase in vitro. The expression of AT3G62730 promoter::GUS was partly associated with the lignin deposition site, suggesting its involvement the secondary cell wall. Double mutants of two homologs were generated by CRISPR/Cas9, and RNA-seq of the seedlings revealed that down-regulation of the genes related to the nucleus, cell wall, plasmodesmata, and cell membrane, and up-regulation of several osmotic stress-responsive genes. It was inferred that two Arabidopsis homologs may be related to cell wall function through regulation of laccase and/or peroxidase.

lacquer, lignin, laccase

発表責任者：横山優花（m1641033@edu.kit.ac.jp）

講演番号：2I01-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 09:00～ ミーティングルーム I

SPME-GC/MS を用いた 17 品種のマンゴー葉の揮発性物質の品種間比較

Profiling of leaf volatiles of 17 mango cultivars using SPME-GC/MS

○藤阪 芽以[1]、松川 哲也[1,2]、志水 恒介[2]、伊藤 仁久[2]、重岡 成[2]、梶山 慎一郎[1]([1]近大生物理工、[2]近大附属農場)
○Mei Fujisaka[1], Tetsuya Matsukawa[1,2], Kosuke Shimizu[2], Kimihisa Itoh[2], Shigeru Shigeoka[2], Shin'ichiro Kajiyama[1] ([1]Kindai Univ. BOST, [2]Kindai Univ. Experimental Farm)

マンゴー（*Mangifera indica* L.）はインドや東南アジア原産のウルシ科マンゴー属に属する熱帯果樹であり、現在は世界中で栽培されている人気の高い園芸作物である。その需要の高さから育種も盛んに進められており、現在では世界に 1000 以上の品種が存在する。マンゴー育種には形態学的マーカーや生化学的な特性が重要な指標となるが、優良品種を早期選抜するための分子マーカーが存在しておらず、結実した果実の官能特性で選抜しているのが現状である。我々は、これまでに果実の香気成分が品種の特性に大きな影響を与えることを示した。そこで本研究では優良品種を早期選抜するための分子マーカーを探索するため、葉の香気成分を分析し、その品種間差及び果実の香気成分との比較を行った。実験材料には近畿大学附属農場湯浅農場に保存されているフロリダ系統 9 品種、台湾系統 3 品種、タイ系統 3 品種、インド原産 1 品種、本学で育種した‘愛紅（アイコウ）’の計 17 品種の葉を用いた。葉を採取後 HS-SPME-GCMS で分析し、得られたピークデータを多変量解析に供した。その結果、葉の香気成分も果実と同様に品種間差がみられた。一方、葉には果実では少なかったセスキテルペン類が豊富に含まれており、それらの成分がクラスター形成に強い影響を及ぼすことが示された。

The mango (*Mangifera indica* L.) was originated from India and Southeast Asia and now is one of the most popular tropical fruits cultivated in the world. Due to the high commercial values, breeding and cultivation of the mango have been widely conducted, and now more than 1000 mango cultivars are available. The systematic breeding of novel mango cultivars requires morphological and biochemical markers for fruit quality traits. However, there are few reports concerning the molecular markers available for selection. In our previous report, aroma composition of mango fruit was suggested to be one of the most important factors to characterize mango cultivars. To evaluate whether the leaf volatiles can be utilized as the molecular markers concerning aroma composition in mango breeding, analyses of leaf volatiles of 17 mango cultivars were conducted using HS-SPME-GCMS and the profiles of leaf and fruit metabolites were compared. Profiles of leaf volatiles were clearly different among the cultivars as well as fruit aroma, but there were some differences between leaf and fruit profiles. Specifically, sesquiterpenes were rich in leaf volatiles, while fruits aroma mainly contained monoterpenes.

Mangifera indica L., HS-SPME-GCMS, Volatile

講演番号：2I03-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

1 残基のアミノ酸置換がもたらすハバネロと夢祭りの pAMT 酵素活性の違い

Differences in pAMT enzyme activity between Habanero and Yumematsuri caused by amino acid substitution of one residue

○中里 彩夏、佐野 香織、古旗 賢二（城西大）
○Saika NAKASATO, Kaori SANO, Kenji KOBATA (Josai Univ.)

トウガラシの辛味成分カプサイシン（CAP）は代謝促進などの生理活性を有することから、機能性食品素材としての利用が期待され、果実あたりの含量増強が望まれている。CAP は果実の胎座で合成され、その生合成経路は以下のように考えられている。推定アミノトランスフェラーゼ（putative aminotransferase, pAMT）がバニリン（V）をバニリルアミン（VNH_2）に変換し、さらに、VNH_2と脂肪酸が脱水縮合して CAP となる。ハバネロと夢祭りの胎座抽出液を用いて、pAMT 活性を比較すると、夢祭りの方が VNH_2合成活性が高いことがわかった。2 種の pAMT のアミノ酸配列を比較すると、56 番目のアミノ酸残基が、ハバネロでは Ala であるのに対し、夢祭りでは Thr であることがわかった。私たちはこの 1 残基の違いが、pAMT 活性に違いをもたらしているのではないかと考えた。そこで、ハバネロと夢祭りのリコンビナント pAMT（rpAMT）および 56 番目のアミノ酸を相互に置換した rpAMT を作製し、活性比較や酵素の特徴付けを行った。その結果、56 番目のアミノ酸が Thr のとき、pAMT は補酵素 PLP との親和性が高く、VNH_2合成活性が高いことが示唆された。

Capsaicin (CAP), a pungent component of *Capsicum* plants, has attracted us as a functional food material because of its bioactivity such as metabolic promotion, and it is desired to increase its content per fruit. CAP is synthesized in the placenta of the fruit, and its biosynthetic pathway is thought to be as follows. A putative aminotransferase (pAMT) converts vanillin (V) to vanillylamine (VNH_2), and then, VNH_2 and a fatty acid dehydrate and condense to form CAP. Comparison of pAMT activity between placental extracts of Habanero and Yumematsuri showed that VNH_2 synthesis activity was higher in Yumematsuri.Comparing the amino acid sequences of the two pAMTs, it was found that the 56th amino acid residue is Ala in Habanero, and Thr in Yumematsuri. We hypothesized that the difference in this one residue might be responsible for the difference in pAMT activity. Therefore, we prepared a recombinant pAMT (rpAMT) of Habanero and Yumematsuri and rpAMT in which the 56th amino acid was mutually substituted, and compared their activities and characteristics. The results suggest that when the 56th amino acid is Thr, pAMT has a high affinity for the coenzyme PLP and a high VNH_2 synthesis activity.

capsaicin, putative aminotransferase (pAMT), amino acid substitution

発表責任者：古旗　賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：2I03-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

野性イネとの QTL 解析による栽培イネのストレス適応時のオートファジー機能の解明

Functional role of autophagy during stress adaptation in rice cultivation process

○森角 真友奈[1]、小野 聖二郎[2]、木村 成介[3]、朽津 和幸[4]、野々村 賢一[2]、来須 孝光[1]([1]公立諏訪理大・工、[2]国立遺伝研・植物細胞遺伝、[3]京産大・総合生命、[4]東京理科大学・理工)
○Mayuna MORIKAKU[1], Seijiro ONO[2], Seisuke KIMURA[3], Kazuyuki KUCHITSU[4], Ken-ichi NONOMURA[2], Takamitsu KURUSU[1] ([1]Suwa Univ. Sci., [2]NIG, [3]Kyoto Sangyo Univ., [4]Tokyo Univ. Sci.)

オートファジーは，発生・分化やストレス適応を含めた多様な生理応答に重要な役割を果たす。栽培イネのオートファジー欠損株(*Osatg7-1*)は，通常の栽培環境においてもシビアな不稔形質を示し，僅かに得られる稔実種子は，くず米様の形質を示す。一方，他のモデル植物に比べ，栽培イネにおけるオートファジー欠損のバイオマスや生殖への影響は極めて大きいが，その原因は不明な部分が多い。

本研究では，野生イネが本来持つストレス耐性形質と，栽培イネのストレス適応時のオートファジー機能に着目し，栽培イネ由来の *Osatg7-1*(*O. Sativa* cv *Nipponbare*)と，栽培イネの起源と想定される野性イネ系統(*O. Rufipogon* W0106)との雑種後代 F_2 系統から，QTL 解析により，野性イネ由来の不稔回復因子を同定し，栽培化の過程で喪失したストレス適応経路の解明を目的としている。

オートファジー欠損を遺伝的背景に持つ雑種後代 F_2 系統を基盤に，RAD-seq ライブラリーを作成し，次世代シークエンサーによる配列解析から，品種間における SNP マーカーを 849 個作成した。SNP マーカーと稔実率を指標に，CIM 法と Two-QTLscan の 2 種類のプログラムを用いて QTL 解析を行った。その結果，W0106 系統の 5 番染色体上に稔性回復への寄与が高い領域が見出された。本発表では，上記の研究成果とともに，栽培化におけるイネのオートファジー機能の役割についても議論したい。

Autophagy plays crucial roles in the recycling of metabolites, and is involved in several stress adaptation. Rice mutants defective in autophagy are male sterile due to immature pollens, and has small grains with a chalky appearance at the mature stage under normal growth condition. However, physiological roles of autophagy in cultivar rice during stress adaptation remain largely unknown. We here focus on the potential ability for stress adaptation of wild relative rice, and the effect of stress sensitivity on spikelet fertility was evaluated using an F_2 plants derived from F_1 hybrid line by crossing the autophagy deficient mutant *Osatg7-1* (*O. Sativa* cv *Nipponbare*) and a wild relative rice (*O. Rufipogon* W0106). We generated a RAD-seq library and identified 849 SNP markers among cultivars throughout the chromosome by NGS system. Quantitative trait locus (QTL) mapping based on the autophagy deficient line identified a candidate region on chromosome 5 of W0106 significantly associated with the recovery of sterility in paddy fields. We will also discuss the roles of autophagy during stress adaptation in rice domestication process.

rice, autophagy, QTL

発表責任者：来須 孝光（kurusu@rs.sus.ac.jp）

講演番号：2I03-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

アスコルビン酸噴霧による植物一過的タンパク質発現における壊死の抑制

Prevention of necrosis caused by transient expression in *Nicotiana benthamiana* by application of ascorbic acid

○三浦 謙治[1]、野﨑 翔平[1]、金子 美華[2]、鶴田 文憲[1]、加藤 幸成[2]([1]筑波大・生命環境、[2]東北大医)
○Kenji MIURA[1], Shohei NOSAKI[1], Mika KANEKO[2], Fuminori TSURUTA[1], Yukinari KATO[2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Tohoku Univ.)

植物において組換えタンパク質を過剰に発現させると、折りたたみが不十分なタンパク質が蓄積して、葉の壊死が引き起こされ、組換えタンパク質が分解されてしまうことがある。組換えタンパク質の蓄積を促進するためには、根本的かつ簡便な解決方法が求められてきた。本研究では、ベンサミアナタバコ植物に高濃度（100 mM 以上）のアスコルビン酸ナトリウム(AsA)を、アグロインフィルトレーション後に葉面噴霧することで壊死を抑制できることを明らかにした。ヒト Cul1 と F-box タンパク質 Fbxw7 をベンサミアナタバコ葉に発現させると、壊死が確認されるが、AsA 噴霧により葉の壊死が抑制された。壊死が抑制されたことで、組換えタンパク質の蓄積量が 3 倍以上に増加した。また 200 mM の AsA で処理すると、抗 RAP タグ抗体である PMab-2 の発現と、四量体の形成が促進された。このように高濃度の AsA をスプレーで噴霧することで、葉の壊死を効果的に抑制し、機能性組換えタンパク質の蓄積量を増加させることができる。そのため、特別な施設が不要で、様々な種類の施設で簡単に適用することが可能である。

The overexpression of recombinant proteins can sometimes result in the accumulation of unfolded or misfolded proteins, triggering leaf necrosis, and/or dehydration and subsequent degradation of recombinant proteins. To enhance the accumulation of active proteins, a fundamental and a simple treatment to overcome leaf necrosis is required. In this study, treatment of *Nicotiana benthamiana* plants with high concentrations (100 mM or more) of sodium ascorbate (AsA) via foliar spraying after agroinfiltration suppressed the necrosis of leaves expressing human Cul1 (hCul1) and F-box protein, Fbxw7. The suppression of necrosis accordingly enhanced the accumulation of recombinant proteins by three-fold or more. Treatment with 200 mM AsA enhanced the formation and accumulation of PMab-2, an anti-RAP (rat Aggrus/podoplanin [PDPN]) tag antibody with antigen-binding activity. Thus, spray application of high concentrations of AsA is simple and easily applicable in several kinds of facilities to effectively suppress leaf necrosis, leading to an increase in the accumulation of functional recombinant proteins.

ascorbic acid, necrosis, Tsukuba system

発表責任者：三浦謙治（miura.kenji.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2I03-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

揮発性テルペノイドの分泌に関わる候補因子の探索と基盤構築

Candidate factors involved in the secretion of volatile terpenoids and the establishment of host plant for the functional characterization

○段 奈々子、上岡 颯人、李 豪、橘 頼人、杉山 暁史、棟方 涼介、矢﨑 一史（京大生存研）
○Nanako DAN, Hayato UEOKA, Hao LI, Yorihito TACHIBANA, Akifumi SUGIYAMA, Ryosuke MUNAKATA, Kazufumi YAZAKI (RISH, Kyoto Univ.)

植物は光合成で固定された炭素のうち最大 10%を揮発性有機化合物（VOC: Volatile Organic Compound）の生産に当て、環境適応や生物間コミュニケーションを行うために細胞外へと放出している。近年の研究から、VOC の生合成やその制御に関する理解は進んでいるが、細胞外への輸送・放出の分子機構には不明な点が多く、特に植物 VOC 中、種類・量ともに最も多いモノテルペンやセスキテルペンの分泌に関わる知見はごくわずかである。そこで本研究では、形質転換が可能なイチゴ（*Fragaria* × *ananassa*）を材料に、そこに含まれるリナロールなどテルペン類の細胞外分泌機構の解明に向けて関連する候補因子の探索を行った。

イチゴの花托は成熟に伴ってモノテルペンの放出量を増加させることから、成熟過程と同調して発現が上昇するイチゴの VAP（Vesicle Associated Protein）および LTP（Lipid Transfer Protein）を分泌関連の候補因子として選定し、クローニングを行った。さらに本候補因子の植物体内における機能を評価するための基盤植物として、モデル植物であるベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）でリナロール合成系を確立し、葉から放出される化合物を捕集・分析するヘッドスペース分析系も併せて構築した。

現在、VAP・LTP のそれぞれをリナロール合成タバコで発現させた際にリナロールの放出にどのような影響を与えるかを調べており、その結果についても議論したい。

Plants produce a variety of volatile organic compounds (VOCs) and release them into atmosphere as tools for environmental adaptation and communication with other organisms. Recent studies characterized the biosynthetic genes of plant VOCs and its regulation, while little is known about the molecular mechanisms of transport and emission of VOCs from the cells. In this study, we have searched for candidate genes putatively involved in VOC secretion, i.e., vesicle associated protein (VAP) and lipid transfer protein (LTP) in strawberry (*Fragaria ananassa*). We have cloned genes encoding VAP and LTP, which are induced with the maturation process of strawberry, and in parallel constructed a linalool producing *Nicotiana benthamiana* for functional analysis of those genes. We are currently analyzing the in vivo function of VAP and LTP in the transgenic *N. benthamiana*.

Transport, Volatile terpenoid, Strawberry

講演番号：2I03-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

NBRP トマト大規模変異体プールから単離した形態変異体コレクション

Collections of tomato mutants screened from the mutagen-treated Micro-Tom resources

○杉本 貢一、有泉 亨、江面 浩（筑波大・生命環境）
○Koichi SUGIMOTO, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura (Univ. Tsukuba)

植物の発生プログラムが正しい順序・正しいタイミングで働くことは、健全な植物体を維持するのに欠かせない。一方で移り変わる生育環境に適応して生存するためには、物理化学的な環境や競合個体の存在、植食者の存在などをいち早く察知し、発生プログラムを柔軟に変更する必要がある。人類が植物の高度な環境適応能力を有効に利用するためには、発生プログラムに関わる遺伝子の機能を明らかにすることが必要である。我々ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）―トマトでは研究用モデルトマトとしてマイクロトムを親品種とした変異体の収集を大規模に行っており、発生プログラムに異常をきたしたと考えれれる形態異常変異体を数多く単離した。今発表では、これまで収集した形態異常変異体を紹介する。これら変異体の写真やのデータは変異体データベースサイト TOMATOMA（https://tomatoma.nbrp.jp/）から公表しているため、ぜひとも皆さんの研究に活用していただきたい。

Healthy and rigid architecture of plants can be made up of the accurate and well-organized expression patterns, spatially and temporally, of their development-associated genes. The gene expressions should also be fine-turned in response to the fluctuating environments, such as irradiations, nutrition availabilities, precipitations, and presence of competitors and natural enemies. To maximize the plants' productions, it is essential to know the genes for plant developments and their regulations. In the National BioResource Project (NBRP)-Tomato, we developed the mutant collection of the experimental model cultivar, Micro-Tom and isolated various mutants that showed abnormal shape, for example, of plant architecture. Here we introduce our mutant collections, potentially useful for your research. We also introduce our TOMATOMA database (https://tomatoma.nbrp.jp/) that contains mutant information and encourage to use the database.

Solanum lycopersicum, Mutant collection, Bioresource

講演番号：2I03-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

細胞膜透過ペプチドを利用した遺伝子組換えに依存しない植物ゲノム編集技術

Non-transgenic plant genome editing methods using cell-penetrating peptides

○田中 淑乃[1]、七里 吉彦[2]、大村 昂誠[1]、遠藤 圭太[3]、河野 強[1]、岩﨑 崇[1]([1]鳥取大院、[2]森林総研森林バイオ、[3]森林総研林育セ)
○ Yoshino TANAKA[1], Yoshihiko NANASATO[2], Kousei OMURA[1], Keita ENDOH[3], Tsuyoshi KAWANO[1], Takashi IWASAKI[1] ([1]Grad. Sch. Tottori Univ., [2]Forest Bio-research Center, FFPRI, [3]Forest Tree Breeding Center, FFPRI)

ゲノム編集は任意のゲノム領域を改変できる革新的技術であるが、植物ではゲノム編集酵素を細胞内で機能させるために遺伝子組換え技術が必要になるという大きな問題が存在する。この問題を解決するには、ゲノム編集酵素 Cas9 タンパク質と gRNA からなる RNP を植物細胞に直接導入する方法が効果的である。これまでに我々は、独自に開発した細胞膜透過ペプチドの一種である「ポリヒスチジンペプチド」（PolyHis）が、植物細胞に対する効果的なタンパク質キャリアーとして働くことを明らかにした（Tanaka et al., 2021, BBB）。そこで本研究では、PolyHis を利用して RNP を植物細胞内へ直接導入することによる「遺伝子組換えに依存しない植物ゲノム編集技術」の開発を試みた。PolyHis を融合発現した Cas9-PolyHis を調製し、スギ(*Cryptomeria japonica*)の *Magnesium chelatase* 遺伝子を標的とした PolyHis 融合 RNP をスギ培養細胞に添加し、ゲノム編集効率を次世代シーケンス解析により評価した。その結果、期待通りに標的遺伝子の改変（ゲノム編集による塩基欠失）が確認された（最大変異誘導率 7.95%, mutated reads/total reads = 272/3,423）。さらに簡便性を向上させるために、未修飾の RNP と PolyHis を混合して静電的に結合させ、スギ培養細胞内への RNP の導入を試みた。その結果、最大変異誘導率 0.93%（mutated reads/total reads = 226/24,311）の割合で標的遺伝子のゲノム編集（塩基欠失）が確認された。以上の結果から、PolyHis を利用することで「遺伝子組換えに依存しない簡便な植物ゲノム編集技術」の開発に成功した。本技術は、従来の植物ゲノム編集技術の問題点を打破する革新的手法である。

We attempted to develop "non-transgenic plant genome editing methods" using polyhistidine peptide (PolyHis), an efficient protein delivery carrier into plant cells (Tanaka et al., 2021, BBB), to deliver ribonucleoprotein complex (RNP) into plant cells directly. We prepared a genome-editing enzyme Cas9 fused with PolyHis, and formed RNP with gRNA targeting the *Magnesium chelatase* gene in *Cryptomeria japonica*. This PolyHis-fused RNP was successfully delivered into cultured *C. japonica* cells and induced the base deletion in the targeted gene (maximum efficiency = 7.95%, mutated reads/total reads = 272/3,423). To simplify the procedure, we developed a method to modify RNP with PolyHis by electrostatic interaction and deliver the PolyHis-modified RNP into plant cells. This simplified method also induced genome editing (base deletion) in cultured *C. japonica* cells (maximum efficiency = 0.93%, mutated reads/total reads = 226/24,311). These results indicate that we succeeded in developing "non-transgenic plant genome editing methods" using PolyHis.

genome editing, plant cells, cell-penetrating peptides

講演番号：2I03-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における Cas9 nickase（Cas9n）を利用したエピソーム型ゲノム編集

Episomal genome editing with Cas9 nickase (Cas9n) in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*

○上河 ほのか[1]、北川 諒治[1]、米井 龍[2]、坂田 大季[2]、岡本 賢治[2]、原田 尚志[2]([1]鳥大院持社創科、[2]鳥大工)
○Honoka KAMIKAWA[1], Ryoji KITAGAWA[1], Ryo YONEI[2], Daiki SAKATA[2], Kenji OKAMOTO[2], Hisasi HARADA[2] ([1]Tottori grand Univ., [2]Tottori Univ.)

地球環境上重要なカーボンシンクである珪藻類は、バイオディーゼル生産をはじめとする有用物質生産宿主として注目を集めており、近年では様々な遺伝子工学技術の開発も進められている。CRISPR/Cas9 は珪藻類においても極めて有用なゲノム編集技術である一方、オフターゲット切断がしばしば問題となっている。本研究では Cas9 nickase（Cas9n）による二重ニック形成型ゲノム編集を利用し、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における変異導入効率の向上を試みた。ウラシル生合成の初発酵素遺伝子であるウリジン一リン酸シンターゼ（UMPS）遺伝子（*Ptumps*）をターゲットとし、2 つの single guide RNA（sgRNA）の 5’末端間距離（オフセット距離）を 5 段階（-11 bp、3 bp、9 bp、21 bp、および 49 bp）に調節したベクターを珪藻に導入し、オフセット距離がゲノム編集効率に与える影響を検証した。その結果、オフセット距離と編集効率には高い相関が見られ、オフセット距離 9 bp の時に 85%の最大編集効率を示した。また、Cas9n によるゲノム編集効率は、既存手法である CRISPR/Cas9 および TALEN と比較して 20%以上向上していることから、有用な珪藻類ゲノム編集法の一つであることが示された。

Diatoms, which are important carbon sinks in the global environment, have been attracting attention as hosts for the production of useful materials such as biodiesel, and various genetic engineering techniques have been developed in recent years. Although CRISPR/Cas9 is an extremely useful genome editing technology in diatoms, off-target cleavage is often a problem. In this study, we attempted to improve the efficiency of mutagenesis in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* by using double nick-forming genome editing with Cas9 nickase (Cas9n). Five vectors with different 5'-end distances (offset distances; -11 bp, 3 bp, 9 bp, 21 bp, and 49 bp) of two single guide RNAs (sgRNAs) targeting uridine monophosphate synthase (UMPS) gene (*Ptumps*), the first step of uracil biosynthesis, were introduced into diatoms to investigate the effect of offset distance on the efficiency of genome editing. As a result, there was a high correlation between the offset distance and the editing efficiency, and the editing efficiency was highest at 85% when the offset distance was 9 bp. In addition, the efficiency of genome editing by Cas9n was improved by more than 20% compared to the existing methods, CRISPR/Cas9 and TALEN, indicating that it is one of the useful diatom genome editing methods.

marine diatom, genome editing, Cas9 nickase

発表責任者：上河ほのか（kamikawa.tottori.u@gmail.com）

講演番号：2I03-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

Prime editing によるイネ内在性遺伝子の精密ゲノム編集
Precise genome editing in rice using prime editing

○横井 彩子[1]、土岐 精一[1,2,3] ([1]農研機構・生物研、[2]横浜市大・生命ナノ、[3]龍谷大・農)
○Ayako NISHIZAWA-YOKOI[1], Seiichi TOKI[1,2,3] ([1]NIAS, NARO, [2]Grad. Sch. Nanobioscience, Yokohama City Univ., [3]Fac. Agric., Ryukoku Univ.)

相同組換え修復を介さない精密ゲノム編集技術として開発された Prime editing (PE) は、ニッカーゼ型の Cas9 に逆転写酵素を融合させたタンパク質と標的配列の認識に必要な sgRNA の末端に逆転写酵素の鋳型となる RNA 分子を連結させた prime editing gRNA (pegRNA) を用いて標的遺伝子に任意の改変を導入できる技術である。本研究では、PE による精密ゲノム編集を作物育種に活用することを目指し、まずはイネの内在性遺伝子の改変に PE を適用した。ゲノム編集効率評価のモデルとして利用されるイネアセト乳酸合成酵素（*OsALS*）に除草剤耐性となる 1 塩基置換を PE により導入し、その効率を評価した。逆転写による変異の導入と非変異導入鎖におけるニックの誘導を組合わせた PE 系による改変効率を評価したところ、形質転換イネカルスの約 1%で目的の点変異が導入されていた。次に、2 種類の pegRNA を利用して 2 分子の PE 酵素により両鎖に同時に変異導入を試みたところ、形質転換カルスの 10～30%において変異の導入が認められた。また、PE による変異導入効率は、遺伝子座や導入する変異の種類によっても低下することから、より高効率な PE 系の確立を試みている。

Prime editing (PE) is developed recently as a precise genome editing tool without mediating homologous recombination. It is composed of a Cas9-nickase/reverse transcriptase fusion protein and a prime-editing guide RNA (pegRNA) and can introduce any small genetic modification at the target site. To use genome editing via PE for crop breeding, we report here the application of PE to the modification of an endogenous gene in rice. The frequency of the introduction of a point mutation conferring resistance to herbicides into rice acetolactate synthase (*OsALS*) via PE3 which expressed pegRNA and additional gRNA for nicking at non-edited strand was 1% of transformed rice calli. However, the PE efficiency was improved by using dual-pegRNAs: 10 to 30% of transformed rice calli. Because it is thought that PE efficiency could be changed depending on the target locus or the complexity of the mutations, we are attempting to develop an efficient PE system by the regulation of DNA repair pathways in plants.

genome editing, Prime editing, rice

発表責任者：横井彩子（ayokoi@affrc.go.jp）

講演番号：2I03-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

シコニン関連遺伝子を標的としたムラサキのゲノム編集毛状根の評価

Genome editing of shikonin-related genes and the evaluation of hairy roots in Lithospermum erythrorhizon

○李 豪[1]、中西 浩平[1]、草野 博彰[1]、刑部 敬史[2]、下村 講一郎[3]、矢崎 一史[1]([1]京大農、[2]徳島大、[3]東洋大)
○Hao LI[1], Kohei NAKANISHI[1], Hiroaki KUSANO[1], Keishi OSAKABE[2], Koichiro SHIMOMURA[3], kazufumi YAZAKI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokushima Univ., [3]Toyo Univ.)

植物は高い代謝多様性を持ち、植物界全体で 20～100 万種もの代謝物を作ると言われている。これら天然の化合物は工業原料、医薬品、香料、色素、嗜好品などとして幅広く利用され、我々の生活の質の維持向上にとって欠かせない資源である。しかしながら、実用植物における研究では、形質転換手法の確立から生化学的解析まで、個別に乗り越えるべき困難も多く、進展には多大な時間と労力がかかるのが実情である。しかしながら、近年急激に植物研究に適用されるようになってきた CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトは、一つのブレイクスルーをもたらしている。本研究では、薬用植物ムラサキの毛状根を用いたゲノム編集に取り組んでいる。本手法用いることで、約 1～2 ヶ月で目的遺伝子を破壊した形質転換体の作製が可能となっている。

我々は、ムラサキのシコニン誘導体（以下シコニンと称す）の生合成と輸送分泌に関わる遺伝子の同定を行っている。まず、ムラサキ科植物の RNAseq データを使い、シコニンの生合成と輸送に関連すると期待される候補遺伝子を網羅的に絞り込んだ。次いで、候補遺伝子 *LePGT-1*、*LeDI-2*、*LeDI-5*、*LeGPPS*、Le4CL などを破壊したムラサキ毛状根を順次作製し、USB 型ロングリードシーケンサー（MinION）で毛状根のゲノム編集結果を確認した。その結果、多く毛状根個体において、多様な遺伝子破壊パターン及びモザイク変異が確認された。

Plants have evolved great metabolic diversity and are presumed to produce 20,000-100,000 kinds of metabolites throughout the plant kingdom. These compounds are used as industrial raw materials, pharmaceuticals, etc., which are indispensable resources for human quality of life. Here, we introduce a method using hairy roots and the CRISPR/Cas9 system, for quick evaluation system of gene of interest within 2 months.

We are conducting a research to identify genes involved in biosynthesis and transport of shikonin derivatives produced in a medicinal plant Lithospermum erythrorhizon. We knocked out the candidate genes, LePGT-1, LeDI-2, LeDI-5, LeGPPS, Le4CL, etc. by genome editing. The editing results of hairy roots were evaluated using a USB-type long read sequencer (MinION). As a result, various gene disruption patterns and mosaicism were found in individual hairy roots with high efficiency.

shikonin, genome editing, MinION

講演番号：2I03-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 10:00～ ミーティングルーム I

植物有用産物の効率的生産を目指した複合微生物培養系の開発

Establishment of a co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for efficient production of valuable plant metabolites

潤井 みや[1]、山田 泰之[1]、池田 義人[1]、中川 明[2]、佐藤 文彦[3,4]、南 博道[2]、○士反 伸和[1] ([1]神戸薬大、[2]石川県大、[3]京大院生命、[4]大阪府大理)

Miya Urui[1], Yasuyuki Yamada[1], Yoshito Ikeda[1], Akira Nakagawa[2], Fumihiko Sato[3,4], Hiromichi Minami[2], ○Nobukazu Shitan[1] ([1]Kobe Pharm. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Osaka Pref. Univ.)

植物が生産する二次代謝（特化代謝）産物は極めて多様な化学構造や生物活性を有し、医薬品原料などに用いられるものも多い。一方、植物資源の枯渇や植物中の含量の少なさなどから安定供給の難しい産物も存在する。その課題解決として代謝工学が発展し、大腸菌や出芽酵母を用いた生産も報告されてきた。しかし、1 細胞内に全ての生合成経路を構築するには多大な労力を必要とする。我々は、多くの二次代謝産物が共通中間体から派生することから、生合成の部分的な反応を担う微生物同士の共培養生産に着目した。また、高いタンパク発現性から生物変換のホストとして近年に注目されるピキア酵母にも着目した。本研究では、炭素源からアルカロイド中間体レチクリンを生産する大腸菌と、レチクリンからスチロピンを生産するピキア酵母（B52 株）をモデルに、大腸菌-ピキア酵母共培養生産系の確立を目指し研究を進めた。はじめに、ピキア酵母用の一般的な 4 種の培地（MM、BMM、BM、BMMY）にレチクリンを添加し、ピキア B52 株を培養した。一定時間後の生育とスチロピン生産性を比較したところ、BMMY 培地において最も良好な生産が観察された。そこで本培地を用いて大腸菌の生育およびレチクリン生産性を検討したところ、LB 培地を用いた際よりも高いレチクリン生産性を示した。以上から共培養には BMMY 培地が適していると判断し、本培地中で大腸菌とピキア酵母を共培養したところ、炭素源としてグリセロールを添加したのみで、最終産物であるスチロピンの生産が確認された。またその生産は大腸菌の割合が多いほど生産量は多かった。以上より、大腸菌-ピキア酵母による共培養生産に世界で初めて成功した[1)]。我々は大腸菌への輸送体発現によるレチクリン生産性と培地への放出の促進にも成功しており[2)]、今後、共培養系と輸送工学を組み合わせた複合微生物培養系を開発していくことで、様々な有用二次代謝産物のより効率的な生産が期待される。

Plants produce a variety of specialized metabolites. To efficiently produce such valuable metabolites using microorganisms, a co-culture system is one possible strategy. Here, we established a co-culture system using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for valuable alkaloid production. Co-culture of *E. coli* cells, which produce reticuline from glycerol, and *P. pastoris* cells, which produce stylopine alkaloid from reticuline, in BMMY medium succeeded to produce stylopine from glycerol[1)]. A higher ratio of *E. coli* cells led to higher production of stylopine. Combining co-culture and transport engineering[2)] might further enhance productivity.

[1)] Urui et al., Microb Cell Fact. 2021, 20:200., [2)] Yamada et al., Metab Eng Commun. 2021, 13:e00184.

Co-culture system, *Pichia pastoris*, Plant specialized metabolites

発表責任者：士反伸和（shitan@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：2I05-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

デハイドリン TypK 配列による LDH 凍結保護メカニズムに関する研究

A study on a mechanism of lactate dehydrogenase cryoprotective activity by TypK sequence of dehydrin

○大須田 穂波[1]、吉原 有紗[3]、原 正和[2,1,3,4] ([1]静大院農、[2]静大創造院、[3]静岡大農、[4]静大グリーン研)
○Honami OSUDA[1], Arisa YOSHIHARA[3], Masakazu HARA[2,1,3,4] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景】デハイドリンは低温や乾燥によって誘導される植物固有の LEA（late embryogenesis abundant) タンパク質であり、低温感受性である乳酸脱水素酵素（LDH）の凍結失活を抑制する。酵素保護活性にはデハイドリンの疎水性アミノ酸が重要であることが明らかになっているが、その機能メカニズムは十分に解明されていない。本研究では、デハイドリンの保存ドメインである K-segment の典型配列（TypK）を用い、LDH 凍結保護メカニズムについて調査した。
【結果と考察】15 アミノ酸からなる TypK の配列をランダムにシャッフルすると、概ね保護活性が低下することから、TypK における疎水性アミノ酸の位置が活性に関与することが示唆された。また、TypK およびシャッフルペプチドの円二色性偏光（CD）スペクトルを測定したところ、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）添加時のランダム構造の減少と保護活性に一定の相関が見られた。さらに、サイズ排除 HPLC 試験とクロスリンク実験において、TypK は LDH に強く結合することはないが、近接する可能性が示唆された。したがって、TypK は LDH の部分的な変性に伴って二次構造を獲得し、疎水性領域を介して LDH と相互作用することで LDH の失活を抑制すると考えられる。

Introduction: Dehydrin is a plant-specific LEA (late embryogenesis abundant) protein which inhibits cryoinactivation of cold-sensitive lactate dehydrogenase (LDH). Although it showed that hydrophobic amino acids are important for enzyme cryoprotective activity, the mechanism of its function has not been fully solved. In this study, we investigated the LDH cryoprotective mechanism by using typical sequence of K-segment (TypK) conserved in dehydrins.

Results and Discussion: Random shuffling of the TypK sequence consisting of 15 amino acids reduced the cryoprotective activity, suggesting that the position of hydrophobic amino acids of TypK is involved in the activity. In addition, the circular dichroism polarization (CD) spectra of TypK and shuffle peptides showed a certain correlation between the decrease in random structures upon addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) and the increase in cryoprotective activities. Furthermore, size-exclusion HPLC and cross-linking experiments suggested that TypK did not bind to LDH, but might be just close to LDH. The results suggest that TypK may acquire a secondary structure during the partial denaturation of LDH and interact with LDH through its hydrophobic region to inhibit the LDH inactivation.

Dehydrin, Cryoprotection, Lactate dehydrogenase

発表責任者：大須田穂波（ricewaves.0804@gmail.com）

講演番号：2I05-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

ダイコン液胞カルシウム結合タンパク質によるリポソームの凍結凝集抑制に関する研究

A study on the inhibition of liposome cryoaggregation by radish vacuolar calcium-binding protein

○木村 友紀[1]、大須田 穂波[1]、原 正和[2,1,3] ([1]静大院農、[2]静大創造院、[3]静大グリーン研)
○Yuki KIMURA[1], Honami OSUDA[1], Masakazu HARA[2,1,3] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景】ハツカダイコン（*Raphanus sativus* L.）肥大根の可溶性画分から精製された RVCaB は、液胞膜に局在するカルシウム結合タンパク質である。本研究では、RVCaB が生体膜モデルとして用いたリポソームの凍結凝集を低濃度で抑制することを明らかにした。さらに、配列特性や円偏光二色性などの各種解析を行い、RVCaB の膜保護メカニズムを考察した。
【結果・考察】RVCaB は、中性であるフォスファチジルコリン（PC）リポソームに対する高い凍結凝集抑制活性を示した。しかし、RVCaB 配列中の特定の領域が活性に寄与することはなかったため、配列全体が膜保護に関与することが判明した。また、RVCaB のカルボキシ基をカルシウムや修飾試薬でブロックすると活性が低下したことから、カルボキシ基が膜保護に関与する可能性が示唆された。定常状態における RVCaB の無秩序な構造は、PC リポソームの添加によってさらに増加した。また、両者は強く結合しなかった。以上より、PC リポソームの膜表面のコリン（正電荷）が RVCaB のカルボキシ基を穏やかに捕捉し、RVCaB が膜表面を覆うことでリポソーム間の融合を防ぐ可能性が示唆された。

Introduction: RVCaB, purified from the soluble fraction of radish (*Raphanus sativus* L.), is a calcium-binding protein that localizes to the vacuolar membrane. In this study, we found that RVCaB inhibited the cryoaggregation of liposomes used as a model of biomembrane at low concentrations. Furthermore, we discussed the membrane-protection mechanism of RVCaB from the data of sequence properties and circular dichroism.

Results and Discussion: RVCaB showed high cryoaggregation inhibition activity for neutral (phosphatidylcholine; PC) liposomes. Although the specific region in the RVCaB sequence did not contribute to the protective activity, the entire sequence was required for the activity. In addition, blocking carboxyl groups of RVCaB by calcium and modification reagents reduced the activity, suggesting that the carboxy groups might be involved in the membrane protection. The disordered structures of RVCaB in the steady state were increased by the addition of PC liposomes. RVCaB did not strongly bind to PC liposomes. These results suggest that the choline moieties (positively charged) on the membrane surface of PC liposomes were weakly associated with the carboxy groups of RVCaB, and RVCaB covered the membrane surface to prevent fusion between liposomes.

liposome, cryoprotection, radish vacuolar calcium-binding protein

発表責任者：木村友紀（yuki021677@outlook.jp）

講演番号：2I05-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

シロイヌナズナアスコルビン酸生合成の光調節に関与する VTC3 のリン酸化標的タンパク質の探索と解析

Analysis of phosphorylation target proteins by VTC3, a regulatory factor for light-inducible ASC biosynthesis in Arabidopsis

○田中 泰裕[1]、丸田 隆典[1,2]、小川 貴央[1,2]、森 大[3,4]、重岡 成[5]、石川 孝博[1,2]（[1]鳥取大院連合農学、[2]島根大院・自然科学、[3]慶應大・先端生命研、[4]慶應大・政策・メディア、[5]近畿大・附属農場）
○Yasuhiro Tanaka[1], Takanori Maruta[1,2], Takahisa Ogawa[1,2], Masaru Mori[3,4], Shigeru Shigeoka[5], Takahiro Ishikawa[1,2] ([1]United Grad. Sch. Agr. Sci., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [3]Instit. Adv. Biosci., Keio Univ., [4]SFC Grad. Sch. Media Govern., Keio Univ., [5]Exp. Farm, Kindai Univ.)

維管束植物のアスコルビン酸（ASC）は、光誘導的に D-マンノース（D-Man）/L-ガラクトース（L-Gal）経路により生合成される。シロイヌナズナのアスコルビン酸欠乏変異体 3（*vtc3*）は ASC 量の低下に加え、生合成の光誘導が抑制されている。その原因遺伝子となる *VTC3* は、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼを有するキメラタンパク質をコードしており、タンパク質のリン酸化/脱リン酸化を介して ASC 生合成の光調節に関与していると考えられるが、そのメカニズムは不明である。本研究では、ASC 生合成の光制御機構解明を目的として、VTC3 によるリン酸化標的タンパク質の同定と機能解析を行った。リン酸化プロテオーム解析の結果、野生株と比較して光照射後の *vtc3* では、D-Man/L-Gal 経路構成酵素の GDP-D-Man エピメラーゼ(GME)と GDP-L-Gal ホスホリラーゼ(GGP) のリン酸化レベルが有意に低下していた。組換え体タンパク質により両酵素の疑似リン酸化が酵素活性に及ぼす影響を検討した結果、GME では活性の抑制が、GGP では酵素安定性の亢進が認められた。以上の結果より、VTC3 は GME および GGP のリン酸化制御を介して ASC 生合成の光調節に寄与していることが示唆された。

Vascular plants biosynthesize ascorbate (ASC) through the D-mannose（D-Man）/L-galactose (L-Gal) pathway, which is regulated by light. Arabidopsis *vtc3* mutant lacks light-inducible ASC biosynthesis, and VTC3 is suggested to be involved in the light-dependent regulation of ASC biosynthesis through protein phosphorylation. To clarify the molecular mechanism of light-induced ASC biosynthesis, we performed phospho-proteomics analysis using *vtc3* mutant after light exposure. Two enzymes involved in the D-Man/L-Gal pathway, GDP-D-Man epimerase (GME) and GDP-L-Gal phosphorylase (GGP), showed significant decrease in their phosphorylation levels after light exposure. Recombinant GME and GGP, which mimicked their phosphorylation, resulted in a suppression of epimerase activity and an increase in enzyme stability, respectively. These results suggest that VTC3 affects the light-dependent ASC biosynthesis by altering both GME and GGP phosphorylation levels.

Ascorbic acid, Biosynthesis, Phosphorylation

講演番号：2I05-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

アスコルビン酸生合成の鍵酵素・GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼの光制御

Light regulation of GDP-L-galactose phosphorylases, key enzymes in ascorbate biosynthesis

○有馬 功貴[1]、田中 泰裕[1,2]、濱田 珠未[1]、小川 貴央[1,2]、石川 孝博[1,2]、丸田 孝典[1,2]([1]島根大・生資科、[2]鳥取大院連合農学)
○ Koki ARIMA[1], Yasuhiro TANAKA[1,2], Tamami HAMADA[1], Takahisa OGAWA[1,2], Takahiro ISHIKAWA[1,2], Takanori MARUTA[1,2] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci., Tottori Univ.)

強光下におけるアスコルビン酸プールサイズの増加は、生合成の鍵酵素・GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ（GGP）の活性化を介して起こる。シロイヌナズナにおいて GGP は *VTC2* および *5* 遺伝子にコードされており、前者が主要な役割を果たす。タンパク質キナーゼ/ホスファターゼのドメインを持つ VTC3 は光依存的なアスコルビン酸蓄積に必要であることから、このタンパク質は VTC2/5 の調節に関与する可能性が考えられた。そこで本研究では、VTC3 のアスコルビン酸代謝への影響を詳しく調べた。強光下におけるアスコルビン酸の高蓄積は *vtc3* で著しく抑制されたが、アスコルビン酸再生活性は VTC3 欠損の影響を受けなかった。強光照射前後において *vtc2* は野生株よりも低いアスコルビン酸レベルを示したが、興味深いことに、強光によるアスコルビン酸の増加はこの欠損株でも見られた。*vtc2* 欠損株では GGP 反応の段階でアスコルビン酸生合成が強く制限される。そのため、*vtc2* 欠損株におけるアスコルビン酸増加は VTC5 の活性化に起因すると考えられる。そこで、*vtc2 vtc3* 二重欠損株を作出したところ、強光によるアスコルビン酸増加はほぼ完全に抑制されたことから、VTC3 は GGP（VTC2/5）の活性化に必要であることが強く示唆された。

In plants, ascorbate pool size is highly enhanced by high light through the activation of GDP-L-galactose phosphorylases (GGPs), the rate-limiting enzymes of ascorbate biosynthesis. GGPs are encoded by the *VTC2* and *5* genes in Arabidopsis, the former of which plays a predominant role. An Arabidopsis protein kinase/phosphatase, VTC3, has been indicated to be required for ascorbate pool size regulation, which led us to hypothesize that VTC3 regulates of VTC2/5. In this study, we investigated the impacts of VTC3 on ascorbate metabolisms. The increase in ascorbate pool size under high light was largely inhibited in *vtc3* mutants, while ascorbate recycling activity was not affected. Although ascorbate content in *vtc2* mutants was lower than that in wild type both before and after high light, this mutant still retained the ability to enhance ascorbate pool, suggesting that the residual VTC5 was activated in the *vtc2*. To address if VTC3 regulates GGP in more detail, we generated *vtc2 vtc3* double mutants. As a result, the response of ascorbate pool size to high light was almost completely inhibited in the double mutants, strongly supporting our hypothesis.

ascorbate, GDP-L-galactose phosphorylase, VTC3

発表責任者：丸田隆典（maruta@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2I05-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

酸化ストレス下のアスコルビン酸再生におけるグルタチオン依存経路の生理学的重要性

Physiological significance of glutathione-dependent pathways for ascorbate recycling under oxidative stress

○濱田 あかね、小川 貴央、石川 孝博、丸田 隆典（島根大院・自然科学）
○Akane HAMADA, Takahisa OGAWA, Takahiro ISHIKAWA, Takanori MARUTA (Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ.)

植物においてアスコルビン酸（ASC）は重要なレドックスバッファーである。ASC は自身の抗酸化作用の結果として不安定な酸化型（デヒドロアスコルビン酸、DHA）となるが、DHA は DHA 還元酵素（DHAR）反応または還元型グルタチオン（GSH）による非酵素反応によって ASC へと再生される。最近、私たちはシロイヌナズナの全 3 つの *DHAR* 遺伝子を全て欠損させたΔ*dhar* 三重欠損株と、GSH 欠乏変異株（*pad2*）を掛け合わせた四重変異株を用いた解析から、DHAR および GSH の協働が強光下のアスコルビン酸蓄積に不可欠であることを示した。一方、この協働において細胞質型（DHAR1/2）と葉緑体型（DHAR3）のどちらが重要であるかは未解明であった。そこで本研究では、別の GSH 欠乏変異株アリル（*cad2*）と各々の DHAR 欠損株との多重変異株を作出した。

dhar1 dhar2 cad2 三重変異株、*dhar3 cad2* 二重変異株およびΔ*dhar cad2* 四重変異株を作出した。これらの株に強光を照射した結果、前述のΔ*dhar pad2* と同様に、Δ*dhar cad2* では ASC レベルの増加が完全に抑制された。ASC 蓄積の阻害は *dhar1 dhar2 cad2* では見られず、一方で *dhar3 cad2* では四重変異株レベルで起こった。さらに、酸化ストレスを誘発するパラコート処理下において、ASC レベルの顕著な低下は *dhar3 cad2* とΔ*dhar cad2* で起こったが、*dhar1 dhar2 cad2* は野生株レベルの ASC レベルを保持した。したがって、葉緑体型 DHAR3 と GSH の協働が光酸化的ストレス下の ASC 蓄積に重要であることが明らかになった。

Ascorbate (ASC) acts as an important redox buffer in plants. Its oxidized form (dehydroascorbate, DHA) is highly unstable but can be recycled back into ASC through either the DHA reductase (DHAR) or non-enzymatic reaction by glutathione (GSH). Recently, we generated *Arabidopsis* quadruple mutants (Δ*dhar pad2*) lacking all three *DHAR* genes and having a *pad2* mutation, which causes GSH deficiency, and found that cooperation of DHARs and GSH is required for ASC accumulation under high light stress. However, it was unclear which is more important: cytosolic DHAR1/2 or chloroplastic DHAR3. To address this, we used another GSH deficient allele *cad2* and generated *dhar1 dhar2 cad2*, *dhar3 cad2*, and Δ*dhar cad2*. Under high light or paraquat-induced oxidative stress, a failure of ASC accumulation was found in *dhar3 cad2* and Δ*dhar cad2*, but not in *dhar1 dhar2 cad2*, indicating a critical role of cooperation between DHAR3 and GSH.

Ascorbic acid, Glutathione, Photooxidative stress

発表責任者：濱田あかね（hahakane407@gmail.com）

講演番号：2I05-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

植物のアスコルビン酸生合成の律速酵素 VTC2 の発現制御機構の解明
Elucidation of a mechanism involved in the regulation of VTC2 gene expression encoding a rate-limiting enzyme for plant ascorbate biosynthesis

○鈴木 花奈子[1]、古澤 帆乃香[2]、石川 孝博[3]、吉村 和也[1,2]（[1]中部大院・応生、[2]中部大・応生・食栄、[3]島根大・生資科・生命工）
○ Kanako SUZUKI[1], Honoka FURUZAWA[2], Takahiro ISHIKAWA[3], Kazuya YOSHIMURA[1,2] ([1]Biosci. Biotech., Grad. Sch., Chubu Univ., [2]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

植物における主要なアスコルビン酸(AsA)生合成経路は D-マンノース/L-ガラクトース経路と呼ばれ、*VTC2* 遺伝子にコードされた GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼが律速段階を触媒している。葉での *VTC2* 遺伝子の発現量および AsA 蓄積量は明期および暗期にそれぞれ増加および減少し、光強度に依存して亢進する。しかし、*VTC2* の発現制御機構については不明な点が多い。そこで本研究では、*VTC2* プロモーター制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現させたシロイヌナズナ(VTC2pro::Fluc)を用いた遺伝学的手法により *VTC2* の発現制御に関わる因子を同定し、その機能を明らかにすることを試みている。

VTC2p:Fluc 株の EMS 処理変異株(約 7800 株)から、培養装置付全自動生物発光測定装置を用いて明暗に応答した Fluc 発光の増減に異常を示すものをスクリーニングした結果、明期での Fluc 発光が高い株(*eve*)を 35 株、低い株(*sve*)を 7 株得た。現在までに、*eve1*, *3* および *4* 株において Fluc および VTC2 の発現量が明期/暗期ともに増加していることを確認した。また、それらすべての株の独立栄養条件下での AsA 量はコントロール株より高い値を示した。次世代シークエンス解析による変異部位の解析を行った結果、*eve1* 株では 3 つの候補原因遺伝子が同定された。そのうちの一つの遺伝子(*EVE1*)の T-DNA 挿入株の AsA 量を測定した結果、野生株よりも高い値を示した。現在、他の株の候補原因遺伝子の同定とともに、*EVE1* の AsA 生合成制御に果たす役割の解析を行っている。

The predominant pathway for ascorbate (AsA) biosynthesis in plant leaf is called the D-mannose/L-galactose pathway. The GDP-L- galactose phosphorylase encoded by the *VTC2* gene catalyzes the rate-limiting reaction in the pathway. The levels of *VTC2* expression and AsA is increased by light but decreased by dark. To identify a regulatory factor for the *VTC2* expression, we are trying to isolate mutants with abnormality in the light/dark response from EMS-mutagenized Arabidopsis plants expressing the luciferase reporter gene driven by the VTC2 promotor (VTC2p:Fluc). Up to now, we isolated 35 (*eve*) and 7 (*sve*) mutants having high and low Fluc luminescence, respectively. The expression levels of *Fluc* and *VTC2* in *eve1*,*3* and *4* mutants during the daytime were higher than those in the control plants. We identified 3 candidate genes responsible for the phenotype in *eve1*. The AsA levels in plants having T-DNA insertion in one of the genes (*EVE1*) were higher than those in the wild-type plants. Now, we are trying to identify the gene responsible for the phenotype in the other *eve* and *sve* mutants and to analyze the role of *EVE1* in the AsA biosynthesis.

ascorbic acid, VTC2, plant

発表責任者：吉村和也（k-yosi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2I05-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

陸上植物の生殖細胞分化に必要な bHLH 転写因子複合体の解析
A bHLH transcription factor complex required for land plant germ cell differentiation

○山岡 尚平[1]、齊藤 美咲[1]、樅木 亮介[1]、吉竹 良洋[1]、光田 展隆[2]、海老根 一生[3,4]、西浜 竜一[1,5]、荒木 崇[1]、河内 孝之[1]([1]京大・院・生命科学、[2]産総研・生物プロセス、[3]基生研・細胞動態、[4]総研大・生命科学、[5]東京理科大・理工・応用生物)
○Shohei YAMAOKA[1], Misaki SAITO[1], Ryosuke MOMIKI[1], Yoshihiro YOSHITAKE[1], Nobutaka MITSUDA[2], Kazuo EBINE[3,4], Ryuichi NISHIHAMA[1,5], Takashi ARAKI[1], Takayuki KOHCHI[1] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Bioproduction Res. Inst., AIST, [3]Div. Cellular Dynamics, NIBB, [4]Sch. Life Sci., SOKENDAI, [5]Fac. Sci. Tech., Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Sci.)

陸上植物は単数体の多細胞組織である配偶体から生殖細胞を分化させ、配偶子を形成する。近年の研究により、配偶子形成の鍵因子はコケ植物と被子植物の間で進化的に保存されていることが明らかとなった。最近、シロイヌナズナの精細胞分化には、根系発生制御など多面的な機能をもつ bHLH 転写因子 LRL1/DROP1 と LRL2/DROP2 が必要であることが示された。また我々は、ゼニゴケの順遺伝学解析とそれに基づくシロイヌナズナの逆遺伝学解析から、bHLH 転写因子 BONOBO (BNB) が生殖系列細胞の分化に必要であることを示した。本研究では、BNB と LRL/DROP は相互作用して複合体を形成することを明らかにした。ゼニゴケ Mp*LRL* は配偶子器始原細胞の分化と生殖器托発生に必要であった。またシロイヌナズナ *LRL1/DROP1* と *LRL2/DROP2* は、花粉形成における雄原細胞の分化運命決定に冗長的に必要であった。これらのことから、BNB-LRL/DROP 複合体は、陸上植物間で進化的に保存されており、配偶体から生殖系列細胞を分化させるために必要な鍵因子であると考えられる。この複合体を標的とした、花粉稔性の制御技術についても議論したい。

Land plants differentiate germline cells from haploid multicellular gametophytes to produce gametes. Key regulators for land plant gametogenesis are evolutionarily conserved between bryophytes and angiosperms. LRL1/DROP1 and LRL2/DROP2, bHLH transcription factors involved in multiple aspect of plant development including rooting system regulation, are required for sperm cell formation in *Arabidopsis thaliana*. Our previous study showed that, by genetic analyses of *Marchantia polymorpha* and *A. thaliana*, novel bHLH transcription factors named BONOBOs (BNBs) are required for germline differentiation. Here, we show that BNB physically interacts with LRL/DROP to form a bHLH transcription factor complex. In *M. polymorpha*, Mp*LRL* was required for gametangium initial cell differentiation and reproductive development. *A. thaliana LRL1/DROP1* and *LRL2/DROP2* are redundantly required for generative cell specification. These findings suggest that the BNB-LRL/DROP complex is an evolutionarily conserved regulator required for differentiation of germline cells from land plant gametophytes. The potential of angiosperm BNB-LRL/DROP complex as a novel target for developing artificial control technique of male fertility in plants will also be discussed.

gametogenesis, plant reproduction, transcription factor

発表責任者：山岡尚平（syamaoka@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2I05-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

シロイヌナズナの鉄恒常性に及ぼすビスマスの影響

Iron homeostasis disturbance of Bismuth on IRT1 promoter knockout *Arabidopsis thaliana*

○長田 武、西村 信人、山野 菜摘 (摂南大理工)
○Takeshi NAGATA, Makoto NISHIMURA, Natsumi YAMANO (Setsunan Univ.)

ビスマス（Bi）は鉛代替用途など近代産業界において必要な重金属の一つである。しかし、詳細な環境排出量が不明であり、生物への影響も解明されていない。我々はモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、Bi の毒性評価を試みてきた。現在までに、Bi は微量でシロイヌナズナに対して生育阻害効果を示し、鉄の異常蓄積を惹き起こすことを明らかにしている。しかし、その機序などの詳細は解明されていないため、本研究では鉄恒常性に関わる遺伝子や鉄局在などについて検討を試みた。
まず、2μM Bi で処理したシロイヌナズナから RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に処した。その結果、鉄調節に関与するカスケードのうち、いくつかの転写因子の誘導が認められた。そこで、鉄調節トランスポーターである IRT1 のプロモーターをノックアウトした変異株を用いて、Bi による生育影響を評価した。本変異株は野生株同様、Bi および Fe 蓄積が促進していることが判明した。このことから、Fe の異常蓄積に IRT1 が関与していないことが示唆された。さらに、Bi 存在下で培養したシロイヌナズナの根における鉄局在について調べた。2μM Bi で処理した根では、鉄局在が認められず、根の全体で鉄の染色が観察された。このことから Bi は Fe の恒常性を著しく損なうことが示唆された。
Bismuth (Bi) is used in semiconductors and water pipes as a substitute for lead. Until now, the Bi concentration in the soil has not been investigated, and there is no environmental quality standard for Bi in Japan. We previously reported Bi accumulation and phytotoxicity in *Arabidopsis thaliana*, which presented that Bi disturb Fe accumulation. However, the mechanism of Bi phytotoxicity remains uncleared. Therefore, we investigated the toxicity of Bi to the IRT1 defective *A. thaliana*.
We examined the toxic effect of Bi for the expression of Fe-related gene in *A. thaliana*. The microarray analysis revealed an increase of the Fe regulation cascade including the subgroup Ib transcription factor. We tried to clear the effect to Fe homeostasis using the *Iron-Regulated Transporter1* (*IRT1*) promoter knockout line. Bi inhibits the growth, while Bi induces Fe contents. In wild type, Fe was located in the stem cell niche (SCN) without Bi condition. Fe location in *IRT1* promoter knockout line was disturbed by 2 μM Bi treatment. These results suggest that Bi disturbed the Fe homeostasis, and Bi damaged SCN in *A. thaliana* root tip.

Bismuth, Fe, Stem cell niche

発表責任者：長田　武（t-nagata@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2I05-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

活性酸素種により制御されるシロイヌナズナにおけるランタノイド応答
The response to lanthanide in Arabidopsis is regulated by reactive oxygen species

○松田 旭生[1]、川井 はな[2]、大沼 貴之[1,2,3]、武田 徹[1,2] ([1]近大院農、[2]近大農、[3]近大アグリ技研)
○teruki MATSUDA[1], hana KAWAI[2], takayuki OHNUMA[1,2,3], toru TAKEDA[1,2] ([1]Grad. Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]ATIRI)

レアアースに分類されるランタン（La）およびセリウム（Ce）は、それらの地殻中存在量が亜鉛や鉛などのベースメタルと同等かそれ以上である。そのため、La および Ce は生物に直接的に作用すると考えられているが、詳細は不明である。当研究室ではこれまでに、低濃度（<10 μM）の Ce は、シロイヌナズナの主根伸長を促進することを見出している。本研究では、低濃度および高濃度（100 μM <）の Ce、La およびテルビウム（Tb）に対するシロイヌナズナの応答と活性酸素種（ROS）の生成分布との相関について検討した。

ムラシゲスクーグ混合塩類を含む培地に播種後、低温処理を経て 7 日間栽培したシロイヌナズナは、1～250 μM レアアースを含む培地に移植し、7 日間栽培した。in planta での H_2O_2 および O_2^- の生成・蓄積はジアミノベンジジンおよびニトロブルーテトラゾリウム染色により評価した。主根伸長に対して促進効果を示した低濃度（<10 μM）の Ce あるいは La の存在下で栽培した植物において、根端での ROS の蓄積が認められた。一方、側根の形成率上昇に対して効果を示した高濃度（100 μM <）の Ce あるいは La の存在下で栽培した植物において、側根原基での H_2O_2 の有意な蓄積が観察された。第 2 葉の ROS の蓄積は、いずれの植物でも認められなかったが、高濃度 Ce 存在下で栽培した植物の葉のトライコームにのみ O_2^- の蓄積が認められた。Tb の結果についてもあわせて報告する。

The correlation between the response of *Arabidopsis thaliana* to cerium (Ce) and lanthanum (La) and the generation and distribution of reactive oxygen species (ROS) was investigated. Accumulation of ROS was observed at the root tips in plants cultivated in the presence of low concentrations (<10 μM) of Ce, which showed a promoting effect on primary root elongation. On the other hand, high concentrations of Ce (100 μM <), which increase the rate of lateral root formation, resulted in significant ROS accumulation in the lateral roots. ROS was not detected in the second leaves of any of the plants, but O_2^- was observed only in the trichomes of the leaves of plants cultivated in the presence of high concentrations of Ce.

lanthanide, reactive oxygen species, Arabidopsis thaliana

発表責任者：松田 旭生（2133690016w@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2I05-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

植物のα-リノレン酸-グルタミン縮合体の同定
Identification of alpha-linolenic acid-glutamine in plants
○高橋 公咲[1]、伊藤 詩織[2]、謝 肖男[3]、中川 博之[4]、北岡 直樹[2]、松浦 英幸[2] ([1]東京農大、[2]北大農、[3]宇都宮大農、[4]農研機構)
○Kosaku Takahashi[1], Shiori Ito[2], Xiaonan Xie[3], Hiroyuki Nakagawa[4], Naoki Kitaoka[2], Hideyuki Matsuura[2] ([1]Tokyo Univ. of Agri., [2]Hokkaido Univ., [3]Utsunomiya Univ., [4]NARO)

エリシターは化学因子とも呼ばれ、植物の生体防御反応を誘導する化学物質である。これまで様々なエリシターが発見されてきた。エリシターの一種である脂肪酸-アミノ酸縮合体（fatty acid-amino acid conjugates: FACs）は、植食者である幼虫の唾液分泌物に含まれ、植物の生体防御反応を誘導することが知られている。我々は、これまで幼虫の唾液中に存在が確認されてきた FACs の一種であるα-リノレン酸-グルタミン縮合体をモデル植物のシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）も生産していることを見出した。また、GH3 ファミリータンパク質は、植物ホルモンのオーキシンやジャスモン酸とアミノ酸を縮合する酵素であるが、その一種である GH3.15 がα-リノレン酸とグルタミンを基質としてα-リノレン酸-グルタミン縮合体を合成することも明らかにした。さらに、シロイヌナズナの他にもトマト、トウモロコシおよびナスなどにもα-リノレン酸-グルタミン縮合体は含まれており、α-リノレン酸-グルタミン縮合体は植物に広く存在することが示された。
本講演では、上記の研究成果とともにシロイヌナズナに対するα-リノレン酸-グルタミン縮合体の生物活性についても紹介したい。

Elicitors are chemical substances that induce biological defense reactions in plants. Thus far various elicitors have been identified. Fatty acid-amino acid conjugates (FACs), known as a type of elicitor, were found in the salivary secretions of predator larvae, and were shown to induce biological defense responses in plants. We found that *Arabidopsis thaliana* also produces α-linolenic acid-glutamine conjugate, one of FACs that exist in the saliva of larvae. The GH3 family proteins are enzymes that conjugate amino acids with the plant hormones such as auxin and jasmonic acid. Among them, GH3.15 was indicated to synthesize α-linolenic acid-glutamine conjugate using α-linolenic acid and glutamine as substrates. Furthermore, the presence of α-linolenic acid-glutamine conjugate was revealed in several plants such as tomato, corn, and eggplant, suggesting that α-linolenic acid-glutamine conjugate widely exists in plants.
In addition to the above research results, we would like to present the biological activities of α-linolenic acid-glutamine conjugate in *Arabidopsis thaliana.*

Elicitor, Fatty acid-amino acid conjugate, Plant

発表責任者：高橋　公咲（kt207119@nodai.ac.jp）

講演番号：2I05-11
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 11:00～ ミーティングルーム I

高糖度トマトを生産する新しい栽培方法の分子生理学的な解析

Molecular physiological analysis of cultivation methods to produce sweeter tomato fruits

○中田 大輔[1]、戸高 大輔[1]、城所 聡[1]、徳長 そよ香[1]、谷水 俊之[2]、篠崎 一雄[3]、篠崎 和子[1,4]、溝井 順哉[1] ([1]東大院農、[2]株式会社プラントライフシステムズ、[3]理研 CSRS、[4]東農大)
○Daisuke NAKATA[1], Daisuke TODAKA[1], Satoshi KIDOKORO[1], Soyoka TOKUNAGA[1], Toshiyuki TANIMIZU[2], Kazuo SHINOZAKI[3], Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI[1,4], Junya MIZOI[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Plant Life Systems Co., Ltd., [3]RIKEN CSRS, [4]Tokyo Univ. Agr.)

トマトにおいて、果実の糖度は重要形質の一つである。高糖度トマトを生産する方法として、塩ストレス等により水分吸収を抑制することが一般的に行われているが、収量が大きく減少するという欠点がある。一方、サンゴ砂礫を固定培地に用いて ICT 技術で養液の濃度を制御することで、収量の低下を抑えつつ、高糖度トマトを生産することができる新しい養液栽培法が近年開発された。本研究では、この栽培方法による糖度上昇のメカニズムについて解析を行った。トランスクリプトーム解析の結果、サンゴ砂礫で栽培したトマトの葉では、リン欠乏誘導性遺伝子の発現量が高まることが明らかになった。実際にサンゴ砂礫栽培では、養液中および葉のリン酸濃度が低下していたことから、リン欠乏応答が糖度の向上に関連している可能性が見出された。水耕栽培によって、トマトをサンゴ砂礫栽培と同程度の弱い低リンストレスを与えて栽培したところ、果実の収量は低下したが、糖度は上昇した。果実の形質および遺伝子発現の解析から、サンゴ栽培や低リン栽培による糖度上昇には、果重の低下による可溶性成分の濃縮と糖代謝の変化の両方が寄与している可能性が示唆された。

Soluble solute content (Brix) is one of important agronomical traits in tomato. High Brix tomatoes are generally produced by applying water stress, but this has a disadvantage of reducing yield. Recently developed hydroponic method that uses coral sand as medium and ICT technology for nutrition management enables production of high-Brix tomatoes without severe yield loss. In this study, we analyzed mechanism of increased Brix in this method. Transcriptome analysis showed that the expression of phosphorus deficiency-inducible genes was increased in the leaves of tomato plants grown on coral sand. Phosphate concentration was decreased in both nutrient solution and leaves when plants were grown on coral medium, implying that a weak level of phosphorus deficiency response may be related to the increase in Brix. We then hydroponically grew tomatoes under a low-phosphate condition that can induce similar level of phosphate-deficiency response compared to coral sand culture and found that although fruit yield was reduced, Brix in fruits was increased. The analyses of fruit traits and gene expression suggested that both concentration of soluble solute due to a reduction in fruit weight and changes in sugar metabolism may contributed to the increased Brix induced by coral sand and low phosphate.

tomato, soluble solute content, low phosphate

発表責任者：溝井順哉（ajmizoi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2I06-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

小腸オルガノイド由来単層上皮細胞の生理学的特性評価

Physiological characterization of intestinal organoid-derived monolayer cells

○高橋 裕、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yu TAKAHASHI, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

オルガノイドは臓器特異的幹細胞およびその分化細胞から構成される三次元構造体と定義され，高度に生理的で自己組織化するという特長を持つ。これまでに我々は小腸オルガノイドより単層性の上皮細胞の樹立に成功しており，本上皮細胞はオルガノイドよりも管腔側からの栄養素などの吸収，代謝評価に有用であることが期待される。また，これまでヒト小腸の上皮モデルとして結腸がん由来細胞株である Caco-2 細胞が広く用いられてきたが，Caco-2 細胞は正常なヒト小腸上皮とは異なる性質を持つことが報告されている。今回，我々は樹立した単層上皮細胞の有用性を評価するため，Caco-2 細胞との性質の違いを検討した。

Caco-2 細胞では正常な小腸上皮細胞とは異なり, 薬物代謝に重要な CYP3A4 誘導が見られず, SGLT1 を介した糖取り込みが見られないことが知られているが，単層上皮細胞ではこれらの現象が見られることを確認できた。また，薬物の応答性を網羅的に比較するため，既知薬理活性ライブラリを用いて細胞毒性の感受性を調べたところ，Caco-2 細胞に選択的に毒性を示す化合物として HDAC 阻害剤などの抗がん剤が同定され，Caco-2 細胞は正常な上皮細胞というよりはがん細胞としての性質を示すことが判明した。したがって，オルガノイド由来単層上皮細胞は，正常なヒト上皮の生理機能や栄養素などの生理活性物質の代謝機構を解明するための新たな実験ツールになり得ると考えられた。

Organoids are self-organizing cell complexities composed of tissue-specific stem cells and their differentiated cells in three-dimensional cultures. We have established monolayered intestinal epithelial cells (IECs), potentially applicable to evaluate nutrient absorption and metabolism, from human intestinal organoids. Here, we compared physiological properties between organoid-derived IECs and Caco-2 cells, a commonly used established cell line from adenocarcinoma.

We found CYP3A4 induction and SGLT1-mediated glucose transport in organoid-derived IECs, but not in Caco-2 cells. We further performed screening of compounds from thousands of known bioactive substances to compare sensitivity against cell toxicity between two cell types. Consequently, we identified several anti-cancer drugs selective to Caco-2 cells, highlighting their characteristics as cancer cells. Taken together, we concluded that organoid-derived IECs would be a novel biological tool for investigating the physiological function and nutrient metabolism in the human intestine.

Organoid, Caco-2, Physiology

講演番号：2I06-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

霊長類膵管オルガノイドを用いた tuft 細胞の新たな生体防御機構の解明
Investing a new biophylactic role of pancreatic tuft cells using ductal organoids from non-human primate

○坂口 恒介[1]、稲葉 明彦[2]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、今井 啓雄[2]、岩槻 健[1]([1]東農大　応生、[2]京大　ゲノム)
○Kousuke SAKAGUCHI[1], Akihiko INABA[2], Takumi YAMANE[1], Yuichi OISHI[1], Hiroo IMAI[2], Ken IWATSUKI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Kyoto Univ.)

膵管は十二指腸へ開口するため、消化管内腔を流れる外来物質の逆流による危険に曝されているが、膵臓における生体防御機構についての知見はほとんどない。我々は消化管上皮において寄生虫を認識し、自然免疫系を活性化させる tuft 細胞がサルの膵管上皮に存在することを最近見出し、その機能解析を目指している。これまでにサル膵管オルガノイドを初めて作製し、インターロイキン(IL)-4 を加えることで tuft 細胞の分化誘導系の開発に成功している。

今回、同細胞が化学受容機能を有するか調べた結果、膵管オルガノイドに苦味受容体である *T2R4*、*T2R46* が発現し、分化誘導後には味覚シグナル伝達分子の *PLCb2*, *TRPM5* の発現が上昇することが確認された。また、Ca^{2+}イメージング法により膵管オルガノイドは苦味物質に応答し、同応答は PLCb2 に対する阻害剤により消失することを確認した。膵管における tuft 細胞の分布を調べたところ、外来物質に曝露されやすい十二指腸開口部により多くの tuft 細胞が集積していた。これらの結果より、膵管 tuft 細胞は十二指腸からの逆流を認識し、生体防御に関与することが示唆された。

Although the main pancreatic duct is exposed to foreign substances from gastrointestinal tract, little is known about its self-defense mechanisms. We have recently identified tuft cells in monkey pancreatic duct. Tuft cells are known to detect parasites and activate the innate immune system. We have previously generated pancreatic ductal organoid from monkeys and established a method to induce tuft cells by interleukin (IL)-4.

Here, we examined whether the tuft cells exert chemosensory functions and found that ductal organoids expressed bitter receptors *T2R4* and *T2R46* and other taste cell markers such as *PLCb2* and *TRPM5*. Ca^{2+} imaging showed that pancreatic ductal organoids responded to bitter taste substances and the response was suppressed by PLCb2 inhibitors. These results suggest that tuft cell recognize chemicals through bitter taste receptors. We have found that within the duct, tuft cell expression is abundant at the opening of the duodenum. These results suggest that tuft cells recognize reflux from the duodenum and are involved in biological defense.

pancreatic duct, organoid, tuft cell

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：2I06-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

Blocking mevalonate pathway impairs protein homeostasis through the Akt-FoxO1 axis in human iPS cell-derived myocytes

○XIAOLIN ZHAO[1], Miharu Kubo[1], Hidetoshi Sakurai[2], Ryuichiro Sato[1], Yoshio Yamauchi[1]
([1]Graduate School of Agri. and Life Sci.・The Univ. of Tokyo, [2]CiRA・Kyoto Univ.)

Statins are widely used to treat atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD). They inhibit the rate-limiting enzyme HMG-CoA reductase in the mevalonate pathway, a critical cholesterol biosynthesis pathway, thereby increasing low-density lipoprotein receptor (LDLR) expression and reducing plasma LDL-cholesterol levels. On the other hand, clinical evidence shows that statins cause muscle symptoms such as myalgia, myopathy, and rhabdomyolysis, indicating that the mevalonate pathway is critical in skeletal muscle. However, mechanisms by which the mevalonate pathway regulates skeletal muscle homeostasis are not fully understood. Previously, we established a statin-related myotoxicity model with human iPSC-derived myocytes and proved that the mevalonate pathway maintained skeletal muscle proteostasis by regulating Atrogin-1, a muscle-specific E3 ubiquitin ligase. In this study, we investigated the mechanism by which the mevalonate pathway regulates Atrogin-1 expression. Briefly, the blockage of the mevalonate pathway by cerivastatin inactivated Akt, thus increasing the nuclear accumulation of FoxO1 and inducing the expression of Atrogin-1. On the contrary, the addition of the mevalonate pathway intermediates mevalonate and geranylgeraniol reversed the Akt activity, thus preventing FoxO1 from entering the nuclei and reducing the expression of Atrogin-1. Moreover, the FoxO1 inhibitor attenuated statin-induced atrophy. These results suggest that the mevalonate pathway plays an essential role in regulating Atrogin-1 expression through the Akt-FoxO1 axis during statin-related myotoxicity in human myocytes.

HiPSC, Mevalonate pathway, FoxO

発表責任者：趙　暁琳（xiaolinzhao@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2I06-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルームⅠ

水酸化部位特異的な内因性酸化ステロールによるコレステロール恒常性制御

Hydroxylation site-specific roles of endogenous oxysterols in the regulation of intracellular cholesterol homeostasis

○齋藤 穂高、佐藤 隆一郎、山内 祥生（東大院・農生科・応生化）
○Hodaka SAITO, Ryuichiro SATO, Yoshio YAMAUCHI (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

小胞体やミトコンドリアでコレステロールが水酸化されることで産生される酸化ステロールは、高コレステロール血症や乳がんの病態生理、アルツハイマーと関連する。また、酸化ステロールは脂質代謝にも影響を及ぼす。酸化ステロールの内、特にコレステロール側鎖が水酸化された酸化ステロールは、小胞体に局在する INSIG と結合し、その分解を抑制することで、転写因子 SREBP-2 と SCAP、INSIG 三者複合体を小胞体へ繋留し、SREBP-2 活性を負に制御し、コレステロール生合成を抑制する。さらに、酸化ステロールは，核内受容体 LXR のリガンドとして LXR を活性化し、細胞外へのコレステロール搬出に関与する遺伝子群の発現を亢進させ、過剰なコレステロールの細胞内への蓄積を抑制する。しかし、酸化ステロールに関するこれまでの研究では培地に添加された過剰量の“外因性”酸化ステロールについて解析されており、細胞内で産生される“内因性”酸化ステロールがコレステロール恒常性制御に果たす役割は不明な点が多い。そこで、本研究では、25-Hydroxycholesterol を産生する CH25H と、27-Hydroxycholesterol を産生する CYP27A1、24(S)-Hydroxycholesterol を産生する CYP46A1、7α-Hydroxycholesterol を産生する CYP7A1 の発現が、コレステル恒常性制御に及ぼす影響について解析した。その結果、CH25H と CYP27A1、CYP46A1 発現では、SREBP-2 標的遺伝子 *Hmgcs1* などの発現が抑制され、SREBP-2 活性が抑制された。一方、LXR 標的遺伝子 *Abca1* や *Abcg1* の遺伝子発現は変動しなかった。さらに、CH25H 発現により、INSIG の安定化が引き起こされ、SREBP-2 活性が抑制されたが、LXR 依存的に発現する ABCA1 のタンパク質発現はほとんど変動しなかった。また、CH25H 発現によるコレステロール前駆体量の変動を GCMS/MS を用いて解析した結果、Lanosterol や、Lathosterol、Desmosterol など、コレステロール前駆体が減少することも明らかになった。以上の結果より、内因性酸化ステロールは、主に小胞体膜上で INSIG を安定化し、SREBP-2 活性を抑制するが、LXR のリガンドとしては利用されにくいことが示された。

Oxysterols are synthesized enzymatically from cholesterol in the ER or mitochondria. Oxysterols play a vital role in the regulation of cellular cholesterol homeostasis. However, most of the previous reports investigating the role of oxysterol in cholesterol homeostasis used "exogenous" oxysterol added to the culture medium. The role of "endogenous" oxysterol produced intracellularly in its regulation remains largely unknown. Here, we show that the expression of CH25H, CYP27A1, and CYP46A1, major cholesterol hydroxylases, suppressed SREBP-2 activity, whereas their expression hardly affected LXR activity.

Oxysterol, SREBP-2, Cholesterol

発表責任者：齋藤穂高（adca1066@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2I06-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

Crucial role of the mevalonate pathway in the regulation of TAZ signaling in human iPS cell-derived myocytes

○Naipapohn Chuenmeechow[1], Kubo Miharu Kubo[1], Hidetoshi Sakurai[2], Ryuichiro Sato[1], Yoshio Yamauchi[1] ([1]Graduate School of Agri. and Life Sci.・The Univ. of Tokyo, [2]CiRA・Kyoto Univ.)

Statins are drugs that lower plasma LDL-cholesterol, thereby reducing the risk of cardiovascular events. Statins inhibit HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme for the mevalonate pathway that provides isoprenoids and cholesterol. Despite the efficient reduction in LDL-cholesterol and cardiovascular events, statin-induced myotoxicity is well known as the most adverse side-effect of this drug, which causes statin intolerance. Although clinical evidence shows that mevalonate pathway is essential for integrity of the skeletal muscle, mechanisms by which they exhibit myotoxic effect remain not fully understood. In this study, we investigated a role of mevalonate pathway-YAP/TAZ axis in the skeletal muscle homeostasis using human iPS cell-derived myocytes. Based on the RNA-seq data, the expression of YAP/TAZ target genes are highly dependent on mevalonate pathway. Cerivastatin reduced the expression of YAP/TAZ target gene expression at both mRNA and protein levels, and the reduction was reversed by adding mevalonic acid or geranylgeraniol (GGOH), suggesting that geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) is an essential mevalonate pathway metabolite regulating YAP/TAZ activity. To distinguish the role of YAP and TAZ in human iPS cell-derived myocytes, we silenced YAP or TAZ expression using siRNAs. The results showed that the expression of YAP/TAZ target genes is suppressed by silencing TAZ but not YAP. Furthermore, we found that cerivastatin suppresses nuclear accumulation of TAZ in a mevalonate pathway-dependent manner, indicating that it inactivates TAZ. It was shown that TAZ knockdown caused atrophy in iPSC-myocytes. Taken together, the current results suggest that mevalonate pathway-TAZ axis play a crucial role in maintaining skeletal muscle integrity.

hiPSC, mevalonate pathway, TAZ

発表責任者：Naipapohn Chuenmeechow（naiipapohn@gmail.com）

講演番号：2I06-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

芳香族炭化水素受容体（AhR）は時計遺伝子 Bmal1 の変調を介して消耗性症候群を誘導する

Aryl hydrocarbon receptor-mediated down-regulation of BMAL1 expression causes wasting syndrome

○野村 拓也[1]、北風 智也[2]、芦田 均[1] ([1]神戸大院、[2]大阪府大院)
○Takuya Nomura[1], Tomoya Kitakaze[2], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

【目的】脂肪などの抹消組織には時計遺伝子 BMAL1 が制御する概日リズムが存在する. 芳香族炭化水素受容体 (AhR) はベンゾピレン (B[a]P)などの環境汚染物質によって活性化し, 脂肪重量の減少を伴う消耗症や脂肪肝を誘発する受容体であり, 概日リズムとの関連性が示唆されている. 本研究では, AhR 誘導性の消耗症が概日リズムの乱れを介しているという仮説のもと, その機序解明行なった.**【方法と結果】**分化後の成熟脂肪 3T3-L1 細胞に 50% FBS による血清刺激で概日リズムを同調させたところ, *Bmal1* は約 24 時間周期の発現振動を示し, B[a]P はこの振幅を低下させる傾向があった. 時計遺伝子について, B[a]P は *Bmal1* に加え *Clock* の発現を顕著に低下させた. B[a]P による AhR の活性化は, 概日リズムを同調させた場合のみ脂質蓄積を減少させた. 脂質代謝関連因子について, B[a]P は概日リズムを同調させた場合のみ脂質合成に関わる *Fas, Acc, Srebp1,* 分化に関わる *Ppar γ, c/ebp α/β/γ,* 脂肪酸取り込みや輸送に関わる *Cd36, aP2,* 血中の脂肪分解に関わる *Lpl* の発現を低下させた. 一方, 脂肪中の脂肪分解に関わる *Hsl* の発現量を上昇させた. 脂質蓄積への BMAL1 の関与を検証するため, siRNA を用いて BMAL1 をノックダウンしたところ, B[a]P による脂質蓄積の減少は確認されなかった.**【結論】**脂肪において, B[a]P による AhR の活性化は BMAL1 の発現減少を介してに脂質代謝を乱して消耗症を誘発することが明らかとなった.

[Objective] Circadian rhythms play important roles in physiology and behavior. They are mainly regulated by BMAL1, a transcription factor called clock gene. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcription factor responding to its ligands, such as polycyclic aromatic hydrocarbons including B[a]P. AhR causes various adverse effects including wasting syndrome, fatty liver. However, the relationship between AhR and circadian rhythms has not been understood yet. Therefore, we investigated the involvement of circadian disruption in AhR-caused wasting syndrome. **[Method and Result]** To induce the oscillation in the expression of clock genes in 3T3-L1 adipocytes, 50% FBS was treated to the cells for 2 h. B[a]P reduced the expression of *Bmal1* and *Clock*, followed by induced wasting syndrome. As for lipid metabolism, B[a]P decreased the expression of *Fas*, *Acc*, *Srebp1*, *Pparγ*, *c/ebpα/β/γ*, *Cd36*、*aP2*, and *Lpl*, while increased the expression of *Hsl* in the synchronized cells. B[a]P did not reduce lipid accumulation in the BMAL1-knockdowned cells. **[Conclusion]** It was revealed that B[a]P-induced AhR activation caused wasting syndrome through down-regulation of BMAL1 expression.

Aryl hydrocarbon receptor, BMAL1, wasting syndrome

講演番号：2I06-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

分化型および脱分化型平滑筋細胞におけるギャップ結合因子コネキシン 43 の発現解析

Expression Analysis of Gap Junction Gene Connexin43 in Differentiated and Dedifferentiated Smooth Muscle Cells

○中込 睦生[1]、徳永 亘祐[2]、穐本 翔太[2]、饗場 万知子[2]、鈴木 貴弘[2]、辰巳 隆一[2]、中村 真子[1]([1]九州大学共創学部、[2]九州大学院生物資源環境科学府)
○Mutsuki NAKAGOMI[1], Kosuke TOKUNAGA[2], Shota AKIMOTO[2], Machiko AIBA[2], Takahiro SUZUKI[2], Ryuichi TATSUMI[2], Mako NAKAMURA[1] ([1]School of Interdisciplinary Science and Innovation, Kyushu Univ., [2]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu Univ.)

【背景・目的】超高齢社会において、生活習慣病は健康寿命に大きく影響を及ぼす社会問題である。様々な症状の中でも、血管内が肥厚し血流を妨げる動脈硬化は特徴的なものであり、その肥厚部位には血球、血管内皮および血管平滑筋層のそれぞれを由来とする細胞の侵入や増殖が認められる。健常な生体内では、収縮性を持つ収縮型（分化型）平滑筋が認められる。一方、動脈硬化による肥厚部位では、収縮性を持たず、遊走性と増殖性に富む増殖型（脱分化型）平滑筋が認められる。しかし、分化型から脱分化型の変化の制御については未だ未解明な点が多い。そこで我々は各表現型の培養モデルを、ニワトリ胚砂嚢に豊富に存在する平滑筋細胞（SMC）を用いて確立し、両者の表現型の違い及びその機能解明を研究目的とした。本研究では、特に平滑筋細胞に発現することが知られる細胞間接着因子 Connexin43（Cx43）に着目し表現型と発現の解析を行った。
【方法】孵卵開始から 15 日目の鶏卵 （ Boris Brawn ） より胚を取り出し、砂嚢から平滑筋層を摘出後、酵素液で処理後、セルストレーナーを用いて細胞を単離した。 IGF-1 添加無血清培地を用いて分化型を維持、または FBS 添加培地を用いて脱分化を誘導した。細胞培養 1 日目と 3 日目でサンプルを回収し、Western Blotting、蛍光免疫染色、real-time RT-qPCR によって平滑筋分化初期マーカーであるα-Smooth muscle actin（ACTA2）、分化後期マーカーである Calponin 1（CNN1）、Connexin43（Cx43）の発現量、局在の解析を行った。
【結果】Western Blotting 解析、RT-qPCR 解析の結果、ACTA2、CNN1、Cx43 はいずれも分化型において、培養時間の経過に伴い発現が上昇した。蛍光免疫染色像の解析の結果、分化型平滑筋細胞では CNN1 は細胞質内全体に、Cx43 は細胞膜上に局在した。 一方、脱分化型 SMC では CNN1、Cx43 とも細胞質内に発現が認められた。現在、Western Blotting 解析により脱分化型平滑筋細胞の発現量の解析を進行中である。

In this study, we hypothesized that intercellular adhesion is involved in phenotypic modulation of smooth muscle cells (SMC), and analyzed the expression of connexin43, the core protein of the gap junction. Gizzard SMC were isolated from 15-day old chicken embryos and cultured either with the serum-free DMEM supplemented with BSA and IGF-1 for differentiation or with the 10% serum containing DMEM that induces dedifferentiation. The Expression of the SMC marker genes as well as Cx43 were analyzed by western blotting, RT-qPCR and Immunofluorescent staining.

smooth muscle cells, Connexin43, differentiation/dedifferentiation

講演番号：2I06-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

25-ヒドロキシビタミン D による脂肪細胞の分化制御機構

Effect of 25-hydroxy vitamin D on adipocyte differentiation

○三谷 塁一[1,2]、中嶋 桃菜[2] ([1]信州大農、[2]信州大院総合理工（農学専攻））
○Takakazu MITANI[1,2], Momona NAKASHIMA[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tec., Shinshu Univ.)

【目的】肥大化した脂肪細胞は炎症誘発性のサイトカインを産生するが、その一方で脂肪細胞は糖や脂質代謝を改善するホルモンの産生にも寄与する。また、未成熟な脂肪細胞ではインスリンの感受性が低く、細胞外からのグルコースの取り込みが不十分である。従って、脂肪細胞の正常分化は、糖代謝や血糖値の正常維持の観点から非常に重要と言える。ビタミン D は不足しやすい栄養成分の 1 つであり、成人では 40～70%が不足していると言われている。ビタミン D の欠乏は肥満を誘導することが知られていることから、ビタミン D である 25-ヒドロキシビタミン D が脂肪細胞の分化に及ぼす影響を解析した。
【方法と結果】実験にはマウス皮下脂肪組織から単離精製した脂肪前駆細胞を不死化させた細胞を用いた。細胞を 25-ヒドロキシビタミン D（25VtD）の存在下で脂肪細胞へと分化誘導した。グルコース取り込み能を解析したところ、25VtD の存在によりグルコースの取り込み量は増加し、ビタミン D 受容体（VDR）を siRNA でノックダウンすることで 25VtD によるグルコースの取り込み量は低下した。糖や脂質代謝の改善ホルモンである Adiponectin の発現量は 25VtD の存在下で増加し、VDR のノックダウンにより減少した。糖の取込みと脂質代謝改善ホルモンの発現量が 25VtD と VDR によって制御されたことから、ビタミン D は脂肪細胞への分化を制御することが示唆された。そこで脂肪細胞分化に関与する転写因子の発現を解析した。脂肪細胞の分化初期に関わる転写因子 C/EBPβ と C/EBPδ の mRNA レベルは 25VtD により増加し、VDR のノックダウンで低下した。これら転写因子はグルココルチコイドによって発現が誘導される。25VtD は VDR を介してグルココルチコイドの活性化酵素である 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1（11β-HSD1）の発現を増加した。さらに、25VtD 存在下でも 11β-HSD1 をノックダウンすることで、C/EBPβ と C/EBPδ の発現量が減少し、脂肪細胞への分化も抑制された。以上の結果から、25VtD は VDR を介してグルココルチコイドの活性化型への代謝を促進することで脂肪細胞の分化を制御することが示された。

We investigated the effect of vitamin D on the adipocyte differentiation by using adipose-derived stem cells. 25-hydroxy vitamin D (25VtD) increased glucose uptake and adiponectin expression, and these effects was canceled by knockdown of vitamin D receptor (VDR). Knockdown of VDR decreased the expression of C/EBPβ and C/EBPδ which induce adipocyte differentiation at early phase. C/EBPβ and C/EBPδ are regulated by glucocorticoid and its receptor in adipocytes. 25VtD increased the expression of 11β-HSD1, which metabolizes cortisone to cortisol. Knockdown of 11β-HSD1 suppressed adipocyte differentiation. Our result indicated that 25VtD and VDR induced adipocyte differentiation through induction of 11β-HSD1.

adipogenesis, vitamin D, glucocorticoid

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2I06-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

L-セリン欠乏は胚性線維芽細胞において膜脂質のリモデリングを誘発する
L-Serine depletion elicits membrane lipid remodeling in MEFs

○須崎 智史[1]、安田 時生[1]、佐矢野 智子[4]、松本 悠[1]、藤井 遥[1]、大崎 友輔[1]、松尾 優樹[1]、田代 康介[1,2]、古屋 茂樹[1,2,3] ([1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]イノベ・バイオアーキ、[4]慶応大医)
○Satoshi SUZAKI[1], Tokio YASUDA[1], Tomoko SAYANO[4], Yu MATSUMOTO[1], Haruka FUJI[1], Yusuke OSAKI[1], Yuki MATSUO[1], Kosuke TASHIRO[1,2], Shigeki FURUYA[1,2,3] ([1]Grad. Biores. Bioenv. Kyushu Univ., [2]Fac. Agric. Kyushu Univ., [3]iBAC, [4]Keio Med. Sch.)

de novo セリン合成経路の初発酵素 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh)遺伝子を全身で不活性化したノックアウトマウス (KO)マウスは、著しい成長遅滞を伴って胎性致死に至る。上記 KO マウス胚より樹立した不死化マウス線維芽細胞 (KO-MEF)では、L-セリン欠乏により細胞死が誘発される。その際にスフィンゴ脂質代謝の恒常性が大きく損なわれる現象を見出していたが（Esaki et al, 2015）、同時に遺伝子発現解析からは初期からコレステロール代謝関連酵素の発現誘導と、合成系の発現抑制が観察されていた（Hamano et al, 2016）。そこで本研究では L-セリン欠乏が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、L-セリン制限下における KO-MEF の脂質及び脂質代謝物のメタボローム解析と、脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った。L-セリン制限後 24 時間の KO-MEF において、コレステロールの増加に加え、リゾリン脂質と脂肪酸、脂肪酸代謝産物の顕著な変化など、大規模な脂質リモデリングが確認された。さらにホスホリパーゼ A_2 を含む脂質代謝関連遺伝子がセリン制限後に転写促進された。以上の結果は細胞内 L-セリン欠乏がコレステロールの蓄積に加えてリン脂質の分解を促進しており、それは細胞内エネルギー代謝の変化を反映していると推定された。

3-Phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) is the first committed enzyme in the *de novo* L-serine (L-Ser) biosynthetic pathway. Mice with systemic inactivation of *Phgdh* gene show significant intrauterine growth retardation, leading to embryonic lethality. In immortalized mouse fibroblasts (KO-MEFs) established from the above KO mouse embryos, L-Ser depletion induces cell death, in which the homeostasis of sphingolipid metabolism is greatly impaired (Esaki et al, 2015), and gene expression analysis shows that the induction of enzymes involved in cholesterol metabolism and suppression of genes involved in cholesterol synthesis at the early stage of L-Ser depletion (Hamano et al, 2016). In the present study, we aimed to clarify the effects of L-Ser deficiency on lipid metabolism, and conducted comparative lipidomic analysis in KO-MEFs as well as expression analysis of genes related to lipid metabolism. Lipidomic analysis revealed that L-Ser depletion led to increases in cholesterol and its metabolites together with alterations in lysophospholipids, fatty acids, and fatty acid metabolites. These changes in membrane lipids were accompanied by upregulated expression of fatty acid metabolic genes. These observations indicate that L-Ser deficiency promotes the remodeling of membrane lipids and impairs the homeostasis of the cell membrane, which may reflect energy metabolism alteration.

L-serine depletion, cholesterol, lipid metabolism

講演番号：2I06-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 13:00～ ミーティングルーム I

セリン制限下での Igfbp4 誘導は insulin/IGF シグナルを減弱させる

Induction of Igfbp4 under Ser depletion attenuates insulin / IGF signaling

○松本 悠[1]、須崎 智史[1]、藤井 遥[1]、大崎 友輔[1]、松尾 優樹[1]、古屋 茂樹[1,2,3] ([1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]イノベ・バイオアーキ)
○Yu MATSUMOTO[1], Satoshi SUZAKI[1], Haruka FUJII[1], Yusuke OOSAKI[1], Yuki MATSUO[1], Shigeki FURUYA[1,2,3] ([1]Grad. Biores. Bioenv. Kyushu Univ., [2]Fac. Agric. Kyushu Univ., [3]iBAC)

de novo セリン合成経路の初発酵素である Phgdh (3-Phosphoglycerate dehydrogenase)遺伝子を全組織で不活性化したノックアウト（KO）マウスは胎生 13.5 日以降に脳形態形成異常及び重度の子宮内発達不全を伴って胎生致死に至る。我々はセリン欠乏による致死表現型の分子メカニズム解明のため、*Phgdh* KO マウス胚より樹立した不死化マウス線維芽細胞（KO-MEF）を用いて細胞レベルでのセリン欠乏応答経路の解析を進めてきた。KO-MEF をセリン制限培地で培養することにより、KO マウス組織と類似した発現変化を伴って細胞増殖が停止し、その後細胞死に至る。これらの致死性表現型に係る上流機序の中でも特に、セリン欠乏による insulin/IGF シグナル伝達経路の変化に着目した。これまでにマイクロアレイと関連解析から、細胞外 IGF シグナル抑制作用を持つ *Igfbp4* mRNA の顕著な発現増加を確認し、同時に *Igf1* mRNA の発現抑制と細胞内 insulin/IGF シグナル伝達経路主要構成因子の活性低下を認めている。これらのシグナル伝達限弱はセリン欠乏 6 時間後から 24 時間までに劇的に進行していた。本研究では、insulin/IGF シグナル伝達減弱における *Igfbp4* 誘導の機能的意義解明を目的とし、組換え Igfbp4 タンパク質添加が同経路にもたらす変化に着目して発現解析を行った。その結果、セリン制限条件下での Igfbp4 添加による *Igf1* mRNA の発現抑制、並びに Akt-S473 残基リン酸化レベルの減少を確認した。また、Igfbp4 添加は Irs1 には影響を与えなかった。以上より、*Igfbp4* 誘導によりセリン欠乏時の insulin/IGF シグナル伝達減弱が促進されていると考えられた。

Targeted disruption of Phgdh (3-Phosphoglycerate dehydrogenase), the first committed enzyme of the de novo L-serine (Ser) synthesis pathway, leads to embryonic lethality in mice with abnormal brain morphogenesis and severe intrauterine growth retardation in mid-embryonic stages. To elucidate the molecular mechanism of the lethal phenotypes caused by Ser depletion, we established an immortalized mouse fibroblast line deficient in Phgdh (KO-MEFs), and have characterized the molecular response to Ser depletion. We have demonstrated that Ser depletion diminishes the insulin/IGF signaling pathway in KO-MEFs. Microarray and related analyses demonstrated that upregulation of *Igfbp4* mRNA, which suppresses extracellular IGF signaling, and downregulation of *Igf1* mRNA were elicited in Ser-depleted KO-MEFs. To elucidate the functional significance of Igfbp4 induction in the insulin/IGF signaling, we examined the effect of the recombinant Igfbp4 treatment and found that *Igf1* expression and Akt phosphorylation were attenuated in KO-MEFs under Ser-depleted condition, suggesting a mechanistical role for Igfbp4 in the insulin/IGF signaling diminishment caused by Ser depletion.

Ser depletion, insulin Igf signaling, Igfbp4

講演番号：2I08-01
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

尿酸トランスポーター発現ヒト培養細胞における purine nucleotide 代謝物解析

Analysis of purine nucleotide metabolites in cultured human cells expressing urate transporter

○北山 沙笑[1]、宮本 大資[2]、久保 裕亮[1]、佐藤 奈々[1]、永田 宏次[1]、安西 尚彦[3]、市田 公美[4]、岡本 研[1] ([1]東大農、[2]日本医大、[3]千葉大、[4]東薬大)
○ Sae KITAYAMA[1], Daisuke MIYAMOTO[2], Yusuke KUBO[1], Nana SATO[1], Koji NAGATA[1], Naohiko ANZAI[3], Kimiyoshi ICHIDA[4], Ken OKAMOTO[1] ([1]UTokyo, [2]NMS, [3]CU, [4]TUPLS)

尿酸トランスポーターとして知られている Urate Transporter１(URAT1)は、尿細管からの尿酸の再吸収を行う膜タンパク質である。URAT1 の遺伝子の欠損は腎性低尿酸血症(RHUC)の原因となり、尿酸の排泄が亢進し血清尿酸値が低下する。この病気の患者は激しい運動をすると運動後急性腎不全を発症する場合があるが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、URAT1 を発現させた HEK293 細胞のプリン代謝物を解析し、URAT1 のプリン代謝に対する影響について調べた。本研究では URAT1 を発現させた細胞と mock 細胞を用いた。これら 2 種の細胞を好気的条件と、運動負荷を模した酸素濃度 0.5%の低酸素負荷条件で培養し、細胞内代謝物を抽出し、その濃度変化を観察した。その結果、低酸素条件下での細胞内ヒポキサンチン濃度が URAT1 発現細胞で mock 細胞に比べ高い傾向にあった。両細胞の Energy Charge、アデニンヌクレオチド濃度ともに差がないことから、URAT1 の発現が何らかの形でヒポキサンチンの動態に影響することが示唆された。RHUC 患者と健常者とで虚血負荷実験を行った結果においても、RHUC 患者でヒポキサンチンの尿中排泄速度が上昇しており、培養細胞実験結果とともに考察する。

Urate Transporter1 (URAT1), known as uric acid transporter, is a membrane protein that reabsorbs uric acid from the tubules. Defects in the URAT1 gene cause renal hypouricemia, which results in increased uric acid excretion and decreased serum uric acid levels. Patients with this disease may develop post-exercise acute renal failure after strenuous exercise, but the mechanism is not clear. In this study, we analyzed purine metabolites in HEK293 cells expressing URAT1 and investigated the effect of URAT1 on purine metabolism. We cultured URAT1-expressing cells and mock cells under aerobic conditions and hypoxic conditions with an oxygen concentration of 0.5% to mimic exercise, and the concentration changes of intracellular metabolites were observed. The results showed that the intracellular hypoxanthine concentration under hypoxic conditions tended to be higher in URAT1-expressing cells than in mock cells. It was suggested that the expression of URAT1 somehow affects the dynamics of hypoxanthine.

URAT1, transporter, purine

発表責任者：岡本研（akenokamoto@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2I08-02
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

プロテインキナーゼ MEK1 および LKB1 による抗がん剤トランスポーターABCG2 の制御機構の解析

Analysis for mechanisms of modulations of anti-cancer drug transporter ABCG2 (BCRP1) by protein kinases MEK1 and LKB1.

○西出 高大、漆間 裕紀、平野 秀鷹、丸山 貴大、牧平 実紀、三谷 匡、田口 善智 (近畿大 生物理工 遺伝子)
○ Takahiro NISHIDE, Hiroki URUMA, Hotaka HIRANO, Takato MARUYAMA, Minori MAKIHIRA, Tasuku MITANI, Yoshitomo TAGUCHI (Kindai Univ.)

【目的】ABCG2 (BCRP1：Breast Cancer Resistance Protein1)は、多種の抗がん剤、尿酸などの様々な物質を細胞内から外へ能動輸送するトランスポータータンパク質である。ABCG2 は、がんの抗がん剤耐性の獲得に関与する他、痛風の発症、血液幹細胞等の幹細胞活性の維持にも関係する。ABCG2 は各種のプロテインキナーゼによって、その細胞内局在や細胞膜上における半減期が制御されている。当研究グループでは、マウス ES 細胞において ABCG2 と相互作用する候補タンパク質として、2 種類のプロテインキナーゼ、MEK1 と LKB1 を単離した。これら 2 つのプロテインキナーゼが、ABCG2 と相互作用し、その制御に関与している可能性を検討した。あわせて、すでに ABCG2 をリン酸化することでその細胞膜への局在を促進することが報告されている PIM1 との比較を行った。
【方法・結果】HEK293 細胞に発現させた GFP-Abcg2 と、FLAG-Lkb1, FLAG-Mek1, FLAG-Pim1 はそれぞれ共免疫沈降することを確認した。共発現細胞における GFP-Abcg2 の細胞内局在とそのタンパク質としての半減期を比較した。その結果、共発現させた FLAG-Mek1 が野生型か dead kinase 変異体かによって有意な差異が観察され、Mek1 が Abcg2 の細胞内局在や分解を制御していることが示唆された。また、共発現させたプロテインキナーゼによって、Abcg2 の細胞内局在や、共発現細胞の Abcg2 の基質となる抗がん剤に対する耐性度に違いが観察されたので併せて報告する。

ABCG2 (BCRP1) is a plasma membrane protein, and actively transports a wide variety of compounds, such as anti-cancer drugs, uric acid, and porphyrins. By the yeast two-hybrid screening to identify proteins that were associated with ABCG2 in mouse ES cells, in which ABCG2 highly expressed, we found two serine/threonine protein kinases, LKB1, a tumor suppressor gene product, and MEK1 (MAPKK1), as potential interacting partners of ABCG2.

In this study, we examined and compared the involvement of MEK1, LKB1, and PIM1, which has been reported to promote expression in plasma membrane of ABCG2 by phosphorylating it, in the regulation of intracellular localization and stability in the plasma membrane of ABCG2. These three protein kinases were co-immunoprecipitated with ABCG2 when expressed in HEK293 cells. We also report and discuss the differences among them of how they control the localization and the activity of ABCG2.

ABCG2, ABC transporter, protein kinase

発表責任者：田口善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2I08-03
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

HPLC-ELSD を用いた糖脂質および ABCG4 の輸送基質の解析

Analysis of the glycolipids and transport substrates of ABCG4 using HPLC-ELSD

○西岡 紗来[1]、末永 光[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]、木村 泰久[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大 iCeMS)
○Sara NISHIOKA[1], Hikaru SUENAGA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS., Kyoto Univ.)

【背景】ABC タンパク質は、ATP 加水分解のエネルギーを利用して基質の能動輸送を行うトランスポーターである。その一つである ABCG4 は脳に多く発現し、神経細胞で余剰となったコレステロールの輸送に関与することから、脳内のステロール恒常性の維持を担っていると考えられている。先行研究において、ABCG4 は糖脂質を輸送することが薄層クロマトグラフィー(TLC)による解析で示唆された。しかし TLC による解析は定量が難しく、また糖脂質と他の脂質種との比較が困難である。そこで本研究では、糖脂質を簡便かつ定量的に検出するための分析系を確立するとともに、これを用いた ABCG4 の新規輸送基質の探索を目的とした。
【方法・結果】シリカゲルカラムを用いた順相クロマトグラフィーにて、脂質を極性相互作用の違いによる分離を行い、ELSD で分離脂質の検出を行った。ヘキサンと 2-プロパノールを用いたグラジエント溶出により、脳脂質に含まれる糖脂質であるセレブロシドやコレステリルグルコシドを分離できた。分離条件が確立できたため ABCG4 を HeLa 細胞に一過的に発現させ、脳極性脂質を添加した。HDL に脂質を排出させた後、培地を回収して脂質を抽出し HPLC にて分析を行った。その結果、これまでの報告通り ABCG4 からのコレステロールの排出が確認できた。さらに、脳極性脂質を添加した ABCG4 発現細胞から排出された脂質中には糖脂質が含まれており、ABCG4 が糖脂質を基質として輸送する可能性が示唆された。

【Background】ATP binding cassette (ABC) transporters transport substrates using the energy of ATP hydrolysis. ABCG4 is expressed in brain and transport cholesterol to maintain sterol homeostasis of brain. In a previous study, we found that ABCG4 also transports glycolipids by thin layer chromatography (TLC) analysis of transported lipid. However, TLC analysis is difficult to quantify and to compare glycolipids with other lipids. Here, we established the normal phase HPLC method that can separate glycolipids to analyze the lipid exported by ABCG4.
【Method and Result】To analyze glycolipids by HPLC, samples were separated by normal phase chromatography and detected by ELSD. Several glycolipid including cerebroside and cholesteryl glucoside can be separated by gradient elution with hexane-2-propanol. By this method, the lipids exported by ABCG4 was analyzed.

ABC transporter, lipid transport, HPLC

発表責任者：木村泰久（kimura.yasuhisa.2u@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2I08-04
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

MRP6 (ABCC6) の局在する細胞内管状膜構造の解析

Analysis of MRP6 (ABCC6) localized on the intracellular tubular membrane structures

○永田 紅[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[2] ([1]京大農、[2]京大高等研究院 iCeMS)
○Koh NAGATA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMS)

MRP6 (ABCC6) は、ABC タンパク質(ATP-binding cassette protein)ファミリーに属する膜タンパク質であり、その機能不全は弾性線維性仮性黄色腫 (PXE) を引き起こすことが知られている。ABC タンパク質の多くは、ATP 加水分解依存的に生体異物や膜脂質などを細胞外へ排出するトランスポーターとして機能するが、MRP6 を発現させると細胞外 ATP が増加することから、MRP6 は ATP を消費して ATP 排出を介在するトランスポーターであると考えられている。

本研究において、HeLa 細胞で発現させた MRP6 の細胞内局在性を調べたところ、MRP6 は細胞膜、細胞内小胞膜、および細胞内の特徴的な管状膜構造に局在した。我々はこの管状膜構造を MRP6-tubules と名付けた。蛍光色素 FM4-64 や蛍光標識デキストランを用いた実験から、MRP6-tubules は細胞膜と連続し、細胞外へ開口した構造であることがわかった。また MRP6-tubules はアクチン繊維にそって配置していた。MRP6 の ATP 加水分解活性は、MRP6-tubules の形成あるいは MRP6 の管状膜への局在化には必要なかった。MRP6 は、BAR ドメインタンパク質のひとつ PACSIN2 (Syndapin2) や、tubular recycling endosome マーカーである Rab8、MICAL-L1 と一部共局在した。細胞が自らの内部にこのような管状の膜構造をもつ生理的意義については、まだよくわかっていない。本発表では、リガンド分子としての細胞外 ATP を局所的に高濃度で保持する場として MRP6-tubules が機能している可能性についても議論したい。

MRP6 (ABCC6) is a member of ABC (ATP-binding cassette) protein family, and mutations in MRP6 are associated with a genetic disease, pseudoxanthoma elasticum (PXE). Many ABC transporters export xenobiotics or membrane lipids, and MRP6 is believed to mediate ATP efflux from the cells. In this study, we examined the localization of MRP6 expressed in HeLa cells. MRP6 was localized on the plasma membrane, vesicles, and furthermore, on the intracellular tubular membrane structures. We named these tubular structures as MRP6-tubules. MRP6-tubule was continuous to the plasma membrane and its lumen was open to outside the cell. MRP6-tubules were arranged along actin filaments. ATP hydrolysis activity of MRP6 was not necessary for the formation of MRP6-tubules. MRP6 partially co-localized with a BAR domain protein, PACSIN2 (Syndapin2), or tubular recycling endosome makers, Rab8 and MICAL-L1. The physiological significance of the intracellular tubular membrane structures is not well understood. We propose a hypothesis that MRP6-tubules are important for maintaining extracellular ATP locally high, which is a ligand for purinergic signaling pathway.

MRP6(ABCC6), ATP, tubular membrane structure

発表責任者：永田紅（nagata.koh.6c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2I08-05
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

巨大リポソーム（GUV）を用いた膜輸送体再構成手法の開発

Development of a reconstitution method of membrane protein into giant unilamellar vesicle

○宮岡 穂花[1]、白永 直子[1]、木岡 紀幸[1]、阿部 一啓[2]、木村 泰久[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]名大・CeSPI）
○ Honoka MIYAOKA[1], Naoko SHIRANAGA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazuhiro ABE[2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]CeSPI, Nagoya Univ.)

[背景・目的]
膜タンパク質は物質の輸送やシグナル伝達などを担う生理的に重要なタンパク質である。個別のタンパク質に対する詳細な解析にはリポソームを用いた *in vitro* の実験が有用であり、小粒径のリポソーム(SUV)が汎用的に用いられる。SUV はタンパク質の再構成手法が確立されているものの、容積や膜の曲率は細胞の環境と大きく異なる。一方で巨大リポソーム(GUV)は細胞ほどの大きさを持つため、再構成が実現すれば目的タンパク質の機能を生理的条件に近い状態で解析できるようになると期待される。本研究では、構造や機能の解析が進展しているフリッパーゼ(ATP11C)をモデルタンパク質として GUV への再構成を検討し、輸送体の機能解析手法を構築することを目的とした。
[方法・結果]
正電荷を持つ SUV と負電荷を持つ GUV とを混合し、SUV と GUV が融合する条件を確立した。続いて、正電荷を持つ SUV に ATP11C を再構成したのちに負電荷を持つ GUV と混合したところ、GUV に ATP11C が再構成された。さらに GUV や SUV の脂質組成を検討することで、再構成効率の向上を検討している。

[Introduction]
Membrane proteins are biologically important, and the *in vitro* experiments are useful for detailed analysis for each protein. Currently, small unilamellar vesicles (SUVs) are widely used for the functional analysis of the membrane protein. However, their physical properties such as curvature are different from those of cells. In contrast, giant unilamellar vesicles (GUVs) are as large as cells, which enable to mimic cellular environment. In our study, we developed GUV-reconstitution method by using lipid flippase as model protein.
[Results]
SUVs containing cationic lipids were mixed with anionic GUVs. The fusion of cationic SUVs and anionic GUVs were confirmed by microscopy. Then, cationic proteo-SUVs reconstituted ATP11C were mixed with anionic GUVs, ATP11C was successfully reconstituted into GUVs. Furthermore, the lipid compositions of liposomes are currently adjusting to improve the efficiency of reconstitution.

Giant unilamellar vesicle (GUV), reconstitution, membrane protein

講演番号：2I08-06
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

高密度で培養したイヌ横紋筋肉腫株から分泌されるエクソソーム内の 5-oxoproline の低下について
Decreased 5-oxoproline in exosomes secreted from densely cultured canine rhabdomyosarcoma strains

○宮本 汐里、佐藤 稲子、片山 欣哉、寺師 宗嵩、田村 好、田崎 弘之（日獣大・獣医学科）
○Shiori MIYAMOTO, Touko SATO, Kinya KATAYAMA, Munetaka TERASHI, Konomi TAMURA, Hiroyuki TAZAKI (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

腫瘍細胞は高い細胞密度にすることで、増殖・転移・浸潤能力が高まることが知られている。我々はこれまでにイヌの横紋筋肉腫細胞(CMS-C)を高密度で培養し、細胞と、培養上清から分離したエクソソームの代謝産物を定量し、細胞内では培養条件が異なっても有意差のなかった 5-oxoproline が高密度細胞のエクソソーム内で有意に低値となることを明らかにしている。本研究では、CMS-C 播種密度を高密度(HD)及び低密度(LD)で培養し、回収した細胞について、グルタチオン(GSH)代謝経路中に含まれる 5-oxoproline 代謝に関与する酵素である CHAC1、CHAC2、GGT、GGCT の mRNA の発現量を RT-qPCR で測定した。結果、CHAC1 は LD に比べ HD で発現量が有意に増加し、他の mRNA では変化しなかった。CHAC1 は酸化ストレスで亢進することが知られているため、HD で細胞内に酸化ストレスが生じたと考えられる。細胞密度の違いによる細胞内 GSH 濃度には差のない結果を得ており、GSH 濃度を維持する機構の一つとして、GSH の原料となる 5-oxoproline の濃度を維持するため、エクソソーム中への 5-oxoproline の排出が抑制されると示唆された。

Tumor cells are known to have an increased ability to proliferate, metastasize, and invade at high cell densities. We have previously cultured canine rhabdomyosarcoma cells (CMS-C) at high densities and quantified the metabolites in the cells and exosomes isolated from the culture supernatant. We found that 5-oxoproline, which was not significantly different in the cells under different culture conditions, was significantly lower in the exosomes of high-density cells. In this study, CMS-C cells were cultured at high density (HD) and low density (LD), and the collected cells were analyzed for the expression levels of mRNAs for CHAC1, CHAC2, GGT, and GGCT, which are enzymes involved in the metabolism of 5-oxoproline in the glutathione (GSH) metabolic pathway, were measured by RT-qPCR. The expression levels of CHAC1 were significantly increased in HD compared to LD, while the expression levels of other mRNAs did not change with cell density. Since CHAC1 is known to be up-regulated by oxidative stress, it is likely that oxidative stress occurred in the cells in HD. The results showed no difference in intracellular GSH concentration between different cell densities, suggesting that one of the mechanisms for maintaining GSH concentration is the suppression of 5-oxoproline efflux into exosomes to maintain the concentration of 5-oxoproline, a source of GSH.

exosome, chac1, 5-oxoproline

発表責任者：宮本　汐里（v18082@nvlu.ac.jp）

講演番号：2I08-07
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

哺乳類細胞における接着斑タンパク質 CAP の精製系構築

Purification of Focal adhesion protein CAP expressed by mammalian cells

○松山 大輝、小段 篤史、木村 泰久、木岡 紀幸（京大農）
○Daiki Matsuyama, Atsushi Kodan, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka (Kyoto Univ.)

動物細胞を取り囲む細胞外マトリックス(ECM)は、構成タンパク質の種類だけでなく硬さによっても遊走や分化といった細胞の挙動を制御している。細胞は ECM の硬さを細胞-ECM 間接着部位に形成されるタンパク質複合体である接着斑を介して感知する。接着斑タンパク質 c-Cbl associated protein(CAP)は硬い ECM 上で別の接着斑タンパク質ビンキュリンと相互作用し、硬さ依存的な細胞の挙動に必要な因子である。CAP は生体内では複数のキナーゼによってリン酸化されていることが知られており、CAP の生化学的解析、構造解析には哺乳類細胞で発現、精製した CAP が適切であると考えた。そこで本研究では哺乳類細胞を用いて高収量かつ高純度で CAP を精製する条件の確立を目的とした。

まず、GFP を融合した CAP をヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞へ発現させ、様々な組成の緩衝液に可溶化させたところ、CAP は塩濃度 0.15 M あるいは 0.5 M、4℃での pH が 8.0 の緩衝液で非常に高い可溶性を示した。次に FreeStyle293 浮遊細胞に発現させた His-GFP-CAP を Ni-NTA によるバッチ法で精製したところ、100 mL の細胞培養液あたり 370 μg の His-GFP-CAP が得られ、さらにゲル濾過に供することで 66 %の純度で取得できた。現在は構造解析にむけて GFP を除いた His-CAP の精製を試みている。今後は精製タンパク質を用いてビンキュリンとの結合解析を実施する予定である。

Cells sense the stiffness of extracellular matrix (ECM) through cell-ECM contact sites called focal adhesions (FAs) to regulate its behavior such as migration and differentiation. Focal adhesion is a supramolecular protein complex involved in sensing ECM stiffness, called machanosensing. c-Cbl associated protein (CAP), a protein localized at FA, plays an essential role for mechanosensing through the interaction with another FA protein vinculin. CAP is known to be phosphorylated by kinases in vivo, therefore CAP purified from mammalian cells is appropriate for biochemical and structural analysis.

First, in order to find out buffer composition suitable for solubilization of CAP from mammalian cells, we solubilized HEK293 cells transiently expressing GFP-tagged CAP under various conditions changing in salt concentration, pH, and detergent. This work indicated that, among all tested conditions, 0.15 or 0.5 M salt concentration and pH 8.0 at 4℃ without detergent is the best for solubilization. Then we purified His-GFP-CAP at 66 % purity. Now we try to purify His-CAP for structural analysis and plan to analyze its interaction with vinculin.

focal adhesion, c-Cbl associated protein, protein purification

講演番号：2I08-08
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

脂質修飾酵素の接着斑及び細胞膜への局在化システムの構築

Construction of a system for the localization of lipid-modifying enzymes to focal adhesions and plasma membrane

○増元 亮裕、木村 泰久、木岡 紀幸（京大院農・応用生命）
○Akihiro MASUMOTO, Yasuhisa KIMURA, Noriyuki KIOKA (Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

細胞-細胞外マトリックス(ECM)間の接着部位に形成される接着斑(FA)は、多数のタンパク質から成る複合体で、細胞は FA を介して ECM の性質を感知し、細胞機能を調節している。近年、FA 近傍の細胞膜が周囲の細胞膜とは異なる特殊な脂質組成であることが示唆され、私達は FA 近傍の脂質が FA の機能に重要な役割を持つのではないかと予想している。FA 近傍の脂質の役割を調べるには、脂質を修飾する酵素を FA に局在化させ、FA 近傍の脂質組成を局所的に変化させ、影響を調べることが有用である。これまでに、ジベレリン代謝物 GA_3 の添加によりタンパク質 GID1 と GAI が結合することを利用した「化学誘導性二量体化(CID)」を用いてタンパク質を FA に局在化させるシステムを確立してきた。今回は本システムにより、PIP_2 を産生する PIP5K、及び PIP_2 を脱リン酸化する OCRL と INPP5E の 3 つの酵素を FA へ局在化できたことを報告する。

各酵素と YFP-GID1 との融合タンパク質を作製し、FA 局在タンパク質-CFP-GAI と共にマウス胎児線維芽細胞(MEFs)に共発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、GA_3 添加 30 分後に PIP5K/OCRL/INPP5E が、細胞質から FA へ局在化する様子が観察された。また、FA 脂質の役割解明には、FA 近傍の脂質組成を変えた際の影響と、細胞膜（PM）全体の脂質組成を変えた際の影響を比較する必要があると考え、CID を用いた脂質修飾酵素の PM 局在化システムを構築した。これを用いて、HEK293T において、OCRL/INPP5E を GA_3 添加により細胞質から PM へ局在化させることに成功した。さらに、OCRL/INPP5E の PM 局在化により、PIP_2 に結合するプローブ(mCherry-PH)の PM から細胞質への移行が観察され、各酵素が PM で機能していることが示された。今後は酵素の FA 局在化と PM 局在化が細胞や FA に与える影響を調べ、FA 近傍の脂質の役割解明を目指す。

Cells regulate their differentiation and migration depending on the stiffness and variety of the extracellular matrix (ECM). Cells sense the properties of ECM through focal adhesions (FAs) that form at the sites of cell-ECM adhesion. Recent studies have shown that FA membranes has a special lipid composition. We hypothesized that the lipid composition of the FA membrane is important for sensing ECM properties. To test this hypothesis, it is necessary to manipulate the lipid composition of FA membranes and observe its effects on FA and cells. We have constructed a system that localizes proteins to FA by using Chemically Induced Dimerization (CID). In this study, we successfully localized PIP5K/OCRL/INPP5E to FA and OCRL/INPP5E to plasma membrane (PM) using this system. Furthermore, we confirmed that the PM-localized OCRL/INPP5E reduced PIP_2 in PM using mCherry-PH, which binds to PIP_2. We will investigate the effects of FA localization and PM localization of the enzymes and compare them to elucidate the role of FA lipids.

focal adhesion, chemically induced dimerization, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

講演番号：2I08-09
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルーム I

哺乳類細胞で発現している接着斑タンパク質ビネキシンαは脂質ホスファチジン酸と相互作用する
Focal Adhesion Protein, Vinexin α Expressing in Mammalian Cells Interacts with Phosphatidic Acid

○鎌田 一希、木村 泰久、木岡 紀幸（京大院農・応用生命）
○Kazuki KAMADA, Yasuhisa KIMURA, Noriyuki KIOKA (Div. of Appl. Life Sci. Grad. Sch. of Agri. Kyoto Univ.)

動物細胞を取り囲む細胞外マトリックス(ECM)の硬さは、細胞の増殖や分化等を調節する。ECM の硬さは、細胞-ECM 間接着部位に形成されるタンパク質複合体、接着斑により感知される。接着斑タンパク質ビネキシン α は、硬い ECM 上で別の接着斑タンパク質ビンキュリンと結合し、硬さに応じた細胞遊走に必要である。またこのようなビネキシン α の機能には特殊な膜領域、脂質ラフトへの局在が重要だが、ビネキシン α の脂質ラフト局在の仕組みや脂質との結合性は不明である。当研究室の先行研究で、大腸菌で精製したビネキシン αΔN が、酸性リン脂質ホスファチジン酸(PA)と特異的に結合することが示唆されたが、ビネキシン α は哺乳類細胞内ではリン酸化修飾を受ける。そこで本研究は、哺乳類細胞内で発現したビネキシン αΔN と PA との結合を検証することを目的とした。

まず GFP-ビネキシン αΔN を HEK293 細胞に発現させ、蛍光ゲル濾過法により可溶化液組成(塩濃度、界面活性剤)を決定した。続いて GST タグ融合 GFP-ビネキシン αΔN を FreeStyle293 浮遊細胞に発現させ、バッチ法で精製した。その後 HRV 3C プロテアーゼによる GST 切断、ゲル濾過法によるピーク分画によって、250 mL 培養液から純度 78%で 57 μg の GFP-ビネキシン αΔN が精製された。続いてホスファチジルコリン(PC)のみ、及び PA を 20%含むリポソームを作製し、精製 GFP-ビネキシン αΔN との共沈降実験を行った。結果 GFP-ビネキシン αΔN は PA リポソーム存在下に効率良く沈降し、哺乳類細胞内で発現するビネキシン α は PA と特異的に相互作用することが示唆された。

Cells sense extracellular matrix (ECM) stiffness through cell-ECM contact sites called focal adhesions, which consist of hundreds of protein complexes. Recently, it has been revealed that the focal adhesion protein, vinexin α, plays a role in sensing ECM stiffness, and localizes at lipid rafts. However, it is unclear what lipids vinexin α interacts with. Previous preliminary studies showed purified mouse vinexin αΔN expressed in *E. coli* specifically bound to acidic phospholipids, phosphatidic acid (PA). Vinexin α is phosphorylated at various sites in mammalian cells. Therefore, we tried to examine the interaction between vinexin α expressing in mammalian cells and PA.

First, we solubilized GFP-vinexin αΔN expressed in HEK293 cells under various conditions and optimized buffer conditions for solubilization. Next, we tried to purify GST-fused GFP-vinexin αΔN expressed in FreeStyle 293 cells using batch method. As a result, 57 μg of GFP-vinexin αΔN was purified with 78% purity from 250 mL culture. Finally, we performed liposome cosedimentation assay. GFP-vinexin αΔN sedimented efficiently in the presence of PA liposome. These results indicated that vinexin α expressing in mammalian cells can bind to PA.

vinexin, focal adhesion, phosphatidic acid

講演番号：2I08-10
質疑応答日時、会場：3 月 16 日 14:00～ ミーティングルームⅠ

ヒト骨肉腫細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞の接着斑細胞膜の単離と脂質組成の解析

Isolation and lipid composition analysis of focal adhesion's membrane of human osteosarcoma cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

○立花 大[1]、長尾 耕治郎[2]、黒田 美都[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1] ([1]京大農、[2]京都薬科大)
○ Hiroshi TACHIBANA[1], Kohjiro NAGAO[2], Mito KURODA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ.)

接着斑は、動物細胞と細胞外マトリックス(ECM)との接着部位に形成され、ECMの硬さを初めとする細胞外環境を感知して細胞内へとその情報を伝達する。接着斑タンパク質については解析が進んでいるが、接着斑細胞膜の脂質組成やその生理的意義については不明な点が多い。私たちは接着斑細胞膜が特殊な脂質組成であり、それが細胞外環境を感知する接着斑の機能を調節されているという仮説を立てて、検証している。昨年の農芸化学会ではマウス胎児繊維芽細胞(MEF)の接着斑を単離して、そこに含まれている脂質を解析し、脂質ラフト様の特殊な脂質組成であることを報告した。接着斑細胞膜の脂質組成が普遍的に特殊であることを明らかにするため、ヒト骨肉腫細胞のU-2 OS細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞のUE7T-13細胞から接着斑を単離する実験系を構築した。

MEFの接着斑を単離した手法を用いて、フィブロネクチンでコートしたシャーレ上に播種した細胞から接着斑を含むと考えられる画分を得た。この画分を濃縮してウエスタンブロッティング法で調べたところ、接着斑タンパク質が強く濃縮するのに対してゴルジ体タンパク質は検出されなかった。このことからU-2 OS細胞やUE7T-13細胞でも接着斑を同様の手法で単離できることがわかった。現在、この画分から脂質を抽出して、微量な脂質も測定できる酵素蛍光法を用いた定量を行っている。脂質組成の特徴を明らかにできれば、接着斑細胞膜の普遍的な役割の解明に近づくことが期待される。

Focal adhesions (FAs) are formed at cell-extracellular matrix (ECM) adhesion sites. They are responsible for sensing ECM properties and transmitting the information inside the cell to modify cellular behavior. Previous studies suggest that FA membrane is low fluid, like lipid raft, but little is known about its composition. We previously showed that FA membrane from mouse embryonic fibroblasts has lipid raft-like composition. To show that lipid raft-like composition of FA membrane is not limited MEFs, we developed a method to isolate FA from U-2 OS osteosarcoma cells and UE7T-13 mesenchymal stem cells.

We collected a fraction resistant to hydrodynamic force from U-2 OS or UE7T-13 cells. Western blotting analysis showed FA proteins were concentrated but golgi protein was not detected in the fraction, indicating that this fraction can be used as FA fraction. We, now, analyze lipids of the fraction using fluorescent enzyme assay.

focal adhesion, plasma membrane, cholesterol

講演番号：3A01-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

Azoarcus sp. DN11 のヨウ素酸呼吸に関与する鍵酵素の同定
Identification of key enzyme involved in iodate respiration by *Azoarcus* sp.DN11
○笹村 星夜、天知 誠吾（千葉大・院・園芸）
○Seiya SASAMURA, Seigo AMACHI (Chiba Univ.)

米国をはじめとする核施設では、核分裂に起因する放射性ヨウ素 I-129 による地下水汚染が問題となっている。放射性のヨウ素酸イオン（IO_3^-）は銀イオンと反応せず、回収が困難である。一方、ヨウ化物イオンは銀イオンと反応し、固体のヨウ化銀として容易に回収できる。このため、ヨウ素酸のヨウ化物への還元反応は、放射性ヨウ素による環境汚染の修復という観点から重要である。当研究室ではこれまで、海洋性のヨウ素酸呼吸細菌 *Pseudomonas* sp. SCT 株からヨウ素酸還元酵素 Idr を同定している。BLAST 検索より、*idr* 遺伝子は陸圏細菌のドラフトゲノムや地下圏メタゲノムライブラリーにも高頻度に見つかった。そこで本研究では、*idr* 遺伝子を保有する陸圏由来の細菌 *Azoarcus* sp. DN11 株を用いて、そのヨウ素酸呼吸能と鍵酵素の同定を目的に研究を行った。ヨウ素酸を電子受容体、酢酸を電子供与体とした培養実験より、DN11 株は最大 2 mM のヨウ素酸を 3 日間で全て還元した。DN11 株の生育はヨウ素酸に依存していたことから、本菌はヨウ素酸呼吸を行うことが確認された。転写解析より、*idr* 遺伝子（*idrA, idrP*$_1$*, idrP*$_2$）は脱窒条件と比較してヨウ素酸呼吸条件で強く転写されることがわかった。さらに、Native-PAGE により、Idr 活性を可視化することに成功したため、LC-MS/MS 解析によるヨウ素酸還元酵素の同定を試みた。さらに、銀担持活性炭などを用いたヨウ素除去試験の予備検討も行った。

Contamination of groundwater with radioiodine (^{129}I) has been a problem at radiological waste disposal sites. Iodate ion (IO_3^-) does not react with silver ion and are difficult to recover from groundwater. On the other hand, iodide ion (I^-) reacts with silver ion and can be easily recovered as a solid AgI. Thus, the reduction of iodate to iodide is of great importance from the viewpoint of radioiodine bioremediation. Previously, we identified a dissimilatory iodate reductase (Idr) from a marine iodate-respiring bacterium *Pseudomonas* sp. SCT. The *idr* genes were also frequently found in the draft genomes of terrestrial bacteria and from subsurface metagenomic libraries. In this study, we determined iodate respiration by *Azoarcus* sp. strain DN11, a terrestrial bacterium which possesses *idr* genes. Growth experiments, transcriptomic analysis of *idr* genes, and LC-MS/MS analysis of peptides recovered from the activity-stained Native-PAGE gel revealed that strain DN11 is a novel iodate-respiring bacterium. A preliminary experiment for removal of iodine using silver-impregnated active carbon was also conducted.

Azoarcus sp. DN11, iodate, respiration

講演番号：3A01-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

過酢酸作用における枯草菌芽胞のスポアコートの役割と発芽能損傷

Role of spore coat for peracetic acid sensitivity and induced germinability damage in *Bacillus subtilis* spores

○福田 一輝[1]、朝田 良子[1,2]、坂元 仁[2,3]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]([1]大阪府大院・工、[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ、[3]関西大・化生工)
○Kazuki FUKUDA[1], Ryoko ASADA[1,2], Jin SAKAMOTO[2,3], Tetsuaki TSUCHIDO[2], Masakazu FURUTA[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ, [2]Res. Ctr. Microorg. Control, Org. Res. Promot., Osaka Pref. Univ., [3]Kansai Univ.)

[目的]過酢酸は細菌芽胞にも強い殺菌作用を示し、諸環境の殺菌に幅広く用いられている。その作用部位として主に芽胞内膜への作用が指摘されているが、詳細は未解明である。加えて枯草菌芽胞の最外層にあるスポアコート（芽胞殻、以下コート）が過酢酸耐性に大きく寄与していることが知られている。本研究では、芽胞の過酢酸耐性の要因を明らかにすることを目的に、関係遺伝子の変異や化学的処理でコートを種々変化させた枯草菌芽胞の過酢酸感受性を調べるとともに、コート近傍や内膜に局在する芽胞発芽過程を担う酵素への影響を検討した。
[方法と結果]枯草菌 168 株とコート・発芽関連遺伝子の欠損株を用いた。脱コート処理として Sodium dodecylsulfate (SDS)、Dithiothreitol(DTT)、Urea の単独・併用による過酢酸感受性を評価した。その結果、Urea を他の処理と併用すると過酢酸感受性が上昇したのに対し、DTT は単独では感受性を低下させたことから、コートに多いとされる SH 基が過酢酸作用の重要因子と考えられた。また、発芽過程のコルテックス（皮層）分解系酵素のうち、SH 基が多い CwlJ にも過酢酸が影響している可能性を想定して CwlJ とコルテックス分解の対となる SleB 欠損株について検討したところ、芽胞の発芽能が比較的強く低下した。現在、過酢酸耐性におけるコートの分子構造変化と発芽能損傷の関係について検討中である。

Peracetic acid (PAA) has a strong sporicidal action and is widely used for sterilization in different fields. Although it has been indicated to attack the spore inner membrane, the detailed mechanism is unknown. In addition, the spore coat has been suggested to contribute to the spore resistance to PAA. In this study, to understand how PAA acts on spores, we analyzed the PAA sensitivity of *Bacillus subtilis* 168 spores having different deficiencies in spore coat and also germinability including germinant receptors and cortex-degrading enzymes (CwlJ and SleB). For removal of spore coat SDS, DTT and urea were used alone or in combination. Among those treatments the combinations between urea and either of others sensitized spores to PAA, whereas DTT decreased the sensitivity, that indicates SH-group of mostly cysteine residue locating in coat may be a key factor in the PAA action. We then examined the sensitivities of either cortex-degrading enzyme-deficient mutants. As a result, SleB-deficient mutant (having normal CwlJ) was found to be substantially more sensitive to PAA in comparison with CwlJ-less mutant. At present, the relationship between the structural alterations in coat proteins and germinability damage in relation to the PAA sensitivity is under investigation.

Bacillus subtilis spore, peracetic acid, spore coat

発表責任者：福田一輝（me106009@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A01-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

寿命をコントロールする液胞膜局在性トランスポーターの機能解析

Functional analysis of the Ssg1 transporter that localizes to the vacuolar membrane and regulates lifespan in budding yeast

○益村 晃司[1]、金井 宗良[2]、荒川 賢治[1]、米山 香織[3]、河田 美幸[3,4,5]、関藤 孝之[3,4]、水沼 正樹[1]([1]広島大院・統合生命、[2]酒総研、[3]愛媛大院・農、[4]愛媛大・PROS、[5]愛媛大・学術支援)
○ Koji MASUMURA[1], Muneyoshi KANAI[2], Kenji ARAKAWA[1], Kaori YONEYAMA[3], Miyuki KAWANO-KAWADA[3,4,5], Takayuki SEKITO[3,4], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Grad. Sch. of Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]Natl. Res. Inst. of Brew., [3]Grad. Sch. of Agric., Ehime Univ., [4]PROS, Ehime Univ., [5]ADRES, Ehime Univ.)

「寿命決定メカニズム」の解明は、健康長寿社会の実現のため、優先して取り組むべき課題の一つである。我々は、出芽酵母を用いた解析から、実験室酵母の *SSG1* 変異によってメチル基供与体である *S*-アデノシルメチオニン(SAM)が液胞内に高蓄積し、細胞寿命が延長することを見出した。そこで、Ssg1 の機能解明を通して、SAM が関わる寿命延長の仕組みを明らかにすることを目的とした。

SSG1 変異株ではフレームシフトにより C 末端が伸長した Ssg1 が液胞膜に発現する。伸長型 Ssg1(以後、Ssg1)は、薬剤輸送体 MATE(multidrug and toxic compound extrusion)ファミリーと高い相同性を有することから、Ssg1 は SAM を液胞内へと輸送するトランスポーターと予想している。実際、*SSG1* 変異株では SAM が液胞内に高蓄積していた。MATE ファミリーはプロトンの対向輸送を介して標的化合物の輸送を行うことから、液胞型 ATPase サブユニットの *VMA2* を破壊したところ、Ssg1 は液胞膜に局在しているにも関わらず SAM の蓄積や寿命延長は消失した。そこで、SAM の輸送に Ssg1 が直接関与するか調べるため、Ssg1 を高発現させた液胞膜小胞を単離し、SAM 輸送活性解析を行っている。SAM による寿命延長メカニズム解明は，生活習慣病をはじめとする老化に伴う疾患に対する予防医学に貢献する可能性を秘めるほか、SAM 高蓄積酵母株の育種などの応用にも期待される。

Elucidation of the mechanisms that determine lifespan is one of the important issues in order to realize a healthy and long-lived society. We found that *SSG1* mutation in laboratory yeast causes high accumulation of *S*-adenosylmethionine (SAM), a methyl group donor, in the vacuole and increases lifespan. In this study, we focused on the mechanism of SAM-mediated lifespan extension by investigating the Ssg1 function.

In the *SSG1* mutant, the C-terminus of Ssg1 is elongated by a frameshift and is expressed in the vacuolar membrane. Since Ssg1 is highly homologous to the MATE family of drug transporters, we hypothesized that Ssg1 is a transporter that transports SAM into the vacuole. We found that disruption of the vacuolar ATPase subunit *VMA2* abolished SAM accumulation and lifespan extension despite Ssg1 is localized to the vacuolar membrane, suggesting the significance of proton exchange transport. We are currently isolating vacuolar membrane vesicles with high expression of Ssg1 and analyzing their SAM transport activity to determine if Ssg1 is directly involved in SAM transport.

Yeast, lifespan, transporter

講演番号：3A01-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

Saccharomyces cerevisiae におけるピルビン酸デカルボキシラーゼ I 欠損は 2-デオキシグルコース感受性を高める
Deletion of pyruvate decarboxylase I enhances the sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*

○宇田 竜成[1]、向山 佳歩[1]、井上 善晴[1]、野村 亘[1,2] ([1]京大院・農・応生科、[2]京大・生理化学研究ユニット)
○Ryusei UDA[1], Kaho MUKOYAMA[1], Yoshiharu INOUE[1], Wataru NOMURA[1,2] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., [2]Research Unit for Physiological Chemistry.)

ピルビン酸デカルボキシラーゼ 1（Pdc1）は、出芽酵母のアルコール発酵においてピルビン酸をアセトアルデヒドへと脱炭酸する反応を触媒する酵素である。Pdc1 には Pdc5 というアイソザイムが存在しており、Pdc1 欠損時のピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を補完するが、Pdc1 が存在する時には *PDC5* 遺伝子の発現は強く抑制されている。この抑制機構はオートレギュレーションと呼ばれており、Pdc1 の酵素活性に依存しない。また、一般に解糖系の酵素群は細胞質に局在するのに対して、蛍光タンパク質を付加した Pdc1 は主に核内に観察される。これらのことは、Pdc1 が脱炭酸酵素以外の細胞内機能を持つ可能性を示唆しているが、Pdc1 のオートレギュレーションにおける分子機構や、核内での機能などについてはよく分かっていない。

今回我々は、Pdc1 の欠損株が解糖系を阻害する 2-デオキシグルコース（2-DG）に対して高い感受性を示すことを新規に見出した。一方、Pdc1 の核局在に影響を及ぼすストレスについて検討した結果、窒素源飢餓により核局在が減少することを見出した。さらに、Pdc1 の C 末端の塩基性アミノ酸の変異により核局在は著しく減少し、この変異株は 2-DG に感受性となった。以上のことから、2-DG に対する応答性に Pdc1 の核内での機能が関与している可能性が考えられた。現在、Pdc1 欠損株の 2-DG 感受性におけるオートレギュレーションや Pdc1 の細胞内局在性との関連に着目して解析を行っている。

Pyruvate decarboxylase I (Pdc1) catalyzes the decarboxylation of pyruvate to yield acetaldehyde, the reaction of which the initial step in alcoholic fermentation in the budding yeast *Saccharomyces crevisiae*. Contrasting other glycolytic enzymes being localized in the cytoplasm, Pdc1 is observed in the nucleus and involved in the repression of *PDC5* expression independently of its catalytic activity, suggesting that Pdc1 is a multifunctional protein. However, the intercellular function of Pdc1 other than that of pyruvate decarboxylase remains to be unraveled.

In this study, we found that the deletion of *PDC1* enhanced the susceptibility to 2-deoxyglucose (2-DG), and a Pdc1 mutant defective in the nuclear localization also conferred susceptible to 2-DG in yeast. Investigation of the relationship between nuclear functions of Pdc1 and the 2-DG sensitivity is now underway.

Saccharomyces cerevisiae, Pyruvate decarboxylase I, 2-deoxyglucose

発表責任者：野村 亘（nomura.wataru.4r@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A01-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母を利用した 5 型キネシン阻害薬探索ツールの開発

Complementation of fission yeast kinesin-5/Cut7 with human Eg5 provides a versatile platform for screening of anti-cancer compounds

○湯川 格史[1,2]、黄 宇商[1]、登田 隆[1,2]（[1]広島大・院統合生命、[2]広島大・健康長寿研究拠点）
○Masashi YUKAWA[1,2], Woosang HWANG[1], Takashi TODA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

染色体分配装置として働く紡錘体微小管の形成阻害はガン細胞の増殖を効果的に抑制できるため、これまで微小管を標的とする抗ガン薬が臨床で広く利用されてきた。しかし、微小管作用薬は神経障害等の副作用を引き起こすという深刻な課題を抱えている。そこで、より副作用の少ない抗ガン剤を開発するため、新たな分子標的として５型キネシンが着目されている。新たな５型キネシン阻害薬を効率的に開発する上で、如何に５型キネシンの細胞内活性を迅速かつ簡便に検出できるかが非常に重要である。５型キネシンは紡錘体形成に必須な役割を果たし、真核生物で広く保存されている。本研究では、まず、ヒト 5 型キネシン Eg5 を分裂酵母内で発現させ、分裂酵母５型キネシン Cut7 との機能互換性について検証した。その結果、Eg5 を発現させただけでは Cut7 の機能を補完できないが、核局在化シグナルを付加した Eg5（Eg5-NLS）では補完できることが判った。また、Cut7 あるいは Eg5-NLS を過剰発現させた分裂酵母細胞は致死性を示し、紡錘体微小管の両極が異常に突出した表現型を示すことが判明した。さらに、この致死性が既存の Eg5 阻害剤添加により抑制されることがわかった。以上の結果から、Eg5-NLS 過剰発現酵母株は新たな５型キネシン阻害剤の探索ツールとして活用できると期待される。

Currently human kinesin-5 Eg5 is expected as one of the attractive targets in anti-cancer drug discovery, as its inhibitor would have fewer side effects than conventional mitotic inhibitors. For the development of novel Eg5 inhibitors, it is important to establish *in vivo* assay systems in which to easily monitor the Eg5 activity. In this study, we first addressed the evolutionary conservation of the kinesin-5 function between human and fission yeast by cross-species complementation. We show that human Eg5 expressed in the fission yeast nucleus shares functional overlap with fission yeast counterpart Cut7 in bipolar spindle assembly; Eg5 completely rescues lethality derived from Cut7 deletion. Next, we found that Eg5 overproduction results in cytotoxicity to fission yeast cells. Finally, we showed that this lethality is neutralized by the treatment of a well-known Eg5 inhibitor. We propose that the fission yeast cells overproducing Eg5 provides a versatile platform for development of novel Eg5 inhibitors.

fission yeast, spindle microtubule, kinesin motor

発表責任者：湯川格史（myukawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A01-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母における細胞外代謝物による鉄飢餓の克服

Growth recovery of iron-starved fission yeast by extracellular metabolites

○中村 優里[1]、西村 慎一[1,2]、平塚 知成[1,3]、松山 晃久[1,3]、吉田 稔[1,2,3] ([1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス)
○ Yuri NAKAMURA[1], Shinichi NISHIMURA[1,2], Tomoshige HIRATSUKA[1,3], Akihisa MATSUYAMA[1,3], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS)

鉄はほとんどの生物において必須な元素であるが、酸素の豊富な地球環境中においてそのほとんどは難溶性の $Fe(OH)_3$ として存在する。微生物や植物はこの鉄を取り込み、貯蔵するためのシステムの一つとして Fe(Ⅲ)のキレート能を持つシデロフォアと呼ばれる二次代謝産物を生産し、これを環境中に分泌し細胞内に取り込むことで鉄を獲得することが知られている。モデル生物として広く利用されている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はフェリクロームと呼ばれるシデロフォアの生合成酵素をコードする *sib1* 遺伝子とトランスポーターをコードする *str1* 遺伝子を有している。

分裂酵母におけるフェリクロームの機能解析の過程で、我々は鉄飢餓条件下で野生株が *sib1* 破壊株の生育をサポートすることを見出した。これは鉄飢餓環境下で同種細胞の生育をサポートする物質を分泌していることによると考え、原因物質の特定を試みた。まず、野生株の細胞抽出液に *sib1* 破壊株の生育回復活性を見出した。ひとつはフェリクロームと考えられ、実際にフェリクロームを添加したところ、*sib1* 破壊株の生育回復が見られた。しかし詳細を調べると、フェリクロームは細胞外にほとんど存在しないこと、フェリクロームを取り込むことのできない *str1* 破壊株でも野生株により生育回復することが明らかになったため、他に生育回復の原因となる物質があると考えられた。さらなる探索により、クエン酸が *str1* 破壊株、*sib1* 破壊株の生育回復を引き起こすことを見出した。この作用メカニズムについて詳細を検討中であり、その結果も含めて報告する。

Iron is an essential element in organisms. However, iron in the environment exists as $Fe(OH)_3$ which is poorly soluble. Therefore, some plants and microorganisms produce secondary metabolites called siderophores, which facilitate iron uptake by chelating Fe(Ⅲ). The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, a widely used eukaryotic model, produces ferrichrome (FC), which is synthesized by the NRPS Sib1 and taken up into cells via the membrane transporter Str1.

During our analysis of the function of FC in *S. pombe*, we found that the growth of cells lacking *sib1* in iron-depleted conditions was recovered when they were cultured in the vicinity of will-type cells. This suggests that fission yeast secretes molecules that support cell growth in iron-deficient conditions. Although the growth of the *sib1* mutant could be recovered by addition of FC, the *str1* mutant could also grow near the wild-type cells, suggesting the existence of factors other than FC. We identified citrate as such an active molecule, whose mechanisms of action will be presented.

iron, siderophore, fission yeast

講演番号：3A01-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

牛尿発酵液のラン藻培養への利用とその影響の評価

Evaluation of using Fermented Cattle Urine for cultivation cyanobacteria.

○加藤 勇太[1,2]、邱 泰瑛[1]、小西 正朗[1] ([1]北見工大院、[2]環境大善株式会社)
○Yuta Kato[1,2], Tai-Ying CHIOU[1], Masaaki Konishi[1] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]Kankyo Daizen Co., Ltd.)

牛尿発酵液(Fermented Cattle Urine, FCU)はシアノバクテリアの増殖と植物の生長を促進することができる. しかし, なぜそれらに効果があるのかは明らかになっていない. そこで, FCU がシアノバクテリアの増殖を促進する際の挙動について調査した. BG-11 に 50% (v/v) FCU を加えて 7 日間培養した場合は, FCU と同等の硝酸塩, リン酸塩, カリウムが含まれた模擬牛尿発酵液(S-FCU)を添加した場合と比べて増殖が 50%向上した. さらに, 乾燥菌体重量, クロロフィル量, 細胞内のグリコーゲン量がそれぞれ 1.5 倍, 2.0 倍, 1.9 倍に増加した. 加えて, 培養液中の硝酸塩, リン酸塩の消費量も増加していた. 一方でフローサイトメトリー分析によって細胞数は 12%減少していることがわかった. 培養後の細胞を顕微鏡によって形態監察したところ 50% (v/v) FCU を添加して培養された細胞は肥大化していることが確認された. これらの結果から, FCU は細胞数への影響は少なく, 細胞毎のバイオマス重量を増加させていることがわかった.

'Fermented cattle urine (FCU)' can promote growths of photosynthetic autotroph, cyanobacteria and annual herb. However, the mechanism is still unclear. Here, we investigated the behavior of growth promoting for cyanobacteria in FCU. Cultivating *Synechococcus elongates* PCC7942 in BG-11 for 7 days, 50%(v/v) FCU were observed to enhance to 50% higher growth than that under a simulating condition (BG-11 medium added with nitrate, phosphate, and potassium; equivalent amounts of 50% (v/v) FCU). Furthermore, FCU respectively increased amounts of dry cell weight, chlorophyll, and intracellular glycogen to 1.5, 2.0, and 1.9-folds compared to the control condition. It was also found that FCU stimulated consumption of nitrate and phosphate. On the other hand, cell numbers in the FCU-contained medium showed 12% lower than that in case of the control condition by flowcytometry. According to microscopic observation, the size of cells was observed become bigger when cells were incubated with 50% FCU. From the results, FCU would be remarkably influence on the cell size and amounts of biomass, but less on numbers of cells.

Cyanobacteria, Cattle urine, Livestock waste

発表責任者：小西　正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：3A01-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

放線菌 *Streptomyces lividans* の細胞が死滅する高温ストレス下における糖代謝能の向上
Accelerated glucose metabolism under heat stress in *Streptomyces lividans*
○櫻井 惇[1]、内倉 寛斗[1]、山本 省吾[2]、山田 佑樹[2]、曽田 匡洋[2]、柘植 陽太[1,3] ([1]金沢大院・自科、[2]長瀬産業株式会社、[3]金沢大・新学術)
○Jun SAKURAI[1], Hiroto UCHIKURA[1], Shogo YAMAMOTO[2], YUUKI YAMADA[2], Masahiro SOTA[2], Yota TSUGE[1,3] ([1]Kanazawa Univ., Natural System, [2]NAGASE & CO., LTD., [3]Kanazawa Univ., InFiniti)

増殖至適温度は細胞構成成分や ATP などを合成する代謝反応に加えて, 細胞分裂や染色体複製など増殖に関わる多くのタンパク質の温度依存性から成り立つ。従って，増殖よりも関与するタンパク質の数が少ない糖代謝の最適温度は増殖至適温度と異なる可能性がある。有用化合物の生産では糖消費速度が重要であるため、糖代謝の最適温度の方が増殖至適温度よりも効率的に物質生産を行える可能性がある。本研究では放線菌 *Streptomyces lividans* における温度変化に伴う一次代謝の変動を調べることを目的とし、培養温度が糖代謝と細胞の生死に与える影響を検証した。
初めに *S. lividans* 1326 株をフラスコ培養してグルコース消費の最適温度を調べた結果，40ºC で最大となり，消費速度は増殖至適温度である 28ºC と比較して 45%増加した。一方，40ºC における乾燥菌体重量は常に 28ºC を下回り，最大重量は 28ºC と比べて 26%低かった。また，興味深いことに 40ºC における Colony Forming Unit は 28ºC よりも常に 10 分の 1 以下に減少した。これらの結果から、40ºC では 28ºC と比べて死細胞数が増加することが示唆された。そこで蛍光顕微鏡下で生細胞と死細胞の染め分けを行ったところ，予想通り 40ºC では多くの細胞が死細胞として染色された。
以上の結果から *S. lividans* では多くの細胞が死滅する高温下で糖代謝能が逆に促進されることが明らかになった。この原因としては、数少ない生細胞の糖代謝能が大幅に向上しているか、死細胞も糖代謝能を維持しながら細胞当たりの糖代謝能が向上している可能性が考えられた。
The optimum growth temperature is determined by temperature dependency of numerous proteins involved in cell proliferation. Therefore, the optimal temperature for glucose metabolism, which requires less proteins than cell proliferation, could be different from the optimal growth temperature. In this study, we investigated the temperature dependency of glucose metabolism and cell viability in *Streptomyces lividans*. When *S. lividans* 1326 was grown in shake flask, glucose consumption was maximized at 40ºC with 45% higher than that at the optimal growth temperature, 28ºC. However, dry cell weight (DCW) at 40 ºC was constantly lower than that at 28ºC throughout the cultivation, and the highest DCW at 40ºC was 26% lower than that at 28ºC. Surprisingly, colony forming unit at 40ºC was decreased to less than 1/10 compared to that at 28ºC. These results indicated that number of dead cells was increased at 40ºC. Indeed, a substantial number of dead cells were observed under fluorescent microscopy. Overall, we showed that *S. lividans* accelerated glucose metabolism at high temperature in which a number of cells cannot proliferate.

Streptomyces, heat stress, metabolic response

発表責任者：柘植陽太（ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：3A01-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

Lactobacillus fermentum NBRC 15885 の増殖に対するアミノ酸の影響評価

Assessment of the effect of amino acids on the growth of *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885

○小林 美水[1,2]、邱 泰瑛[2]、小西 正朗[2] ([1]北海道糖業（株）、[2]北見工大院)
○Yoshimi KOBAYASHI[1,2], Tai-Ying CHIOU[2], Masaaki KONISHI[2] ([1]Hokkaido Sugar Co., [2]Kitami Institute of Technology)

深層学習（DNN）を用いて、アミノ酸が乳酸菌の増殖に与える影響を調査した。最小培地に 20 種類のアミノ酸を加えた培地について、乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 をマイクロウェルプレートで培養した。実験条件はラテン方格(3 水準 64 条件)により実験配置した。培養実験の結果、8 時間後の濁度は最小値が 0.214±0.039、最大値が 0.842±0.013 となり、最大で 3.9 倍の差が認められた。複数のアミノ酸の添加量が小さい条件で増殖が大幅に抑制されたことから、アミノ酸の添加量が乳酸菌増殖に多大な影響を与えることが示唆された。培養データを用いて DNN モデルを構築し、クロスバリデーションにより評価したところ、学習データ、検証データの予測値に関する二乗和誤差(MSE_{train}, MSE_{test})はそれぞれ 0.309×10^{-3}, 0.246×10^{-3} を示した。DNN モデルから増殖に影響が大きい特徴量を抽出したところ Asp、Tyr、Lys が増殖に影響を与える成分と予測された。DNN-Bayesian 最適化により、複数の最適培地が推測され、高濃度で添加することが必要な成分(Asn, Asp, Thr, Tyr, Lys)と予測ごとに傾向が異なる成分が観察された。傾向が異なる一部のアミノ酸は他のアミノ酸と相補関係にあり相互作用があるためと思われた。

We investigated the effects of amino acids on the growth of lactic acid bacteria (LAB) by deep neural networks (DNN). *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 was cultivated in minimal medium adding various concentrations of amino acids on a microwell plate. The medium compositions were set by latin square design (L64, 20^3). According the microwell cultivation, maximum and minimum of OD_{600} for 8 h were increased to 0.214±0.039 and 0.842±0.013, respectively. The fold-change of growth was 3.9 folds. Since the growth were limited in cases of small amounts of amino acid addition, the amino acids was influence on the LAB growth. Calculating DNN model using the culture data, the mean square errors for training (MSE_{train}) and estimation (MSE_{test}) in cross validation test were $0.309\times10^{-3}$and 0.246×10^{-3}, respectively. The model also predicted Asp, Tyr, and Lys were significant factors for the growth. Based on DNN-Bayesian optimization, several optimal compositions were obtained. In the optimal compositions, some amino acids, Asn, Asp, Thr, Tyr, and Lys, required high concentration, but the others and not. For LAB growth, amino acids which did not require high concentration seems that the amino acids would indicate some interaction between the other amino acids added.

Lactic acid bacteria, amino acid requirement, deep neural network

講演番号：3A01-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

プラスミド由来の H-NS 様因子が宿主細菌の集団内での生残性に与える影響

Effect of a plasmid-encoded H-NS family protein on the survivability of host bacteria in populations

○盧 梁凝[1]、高島 綾[1]、杉山 京佳[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大院・農生科・AgTECH、[2]東大・微生物連携機構）

○Liangning LU[1], Aya TAKASHIMA[1], Kyoka SUGIYAMA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

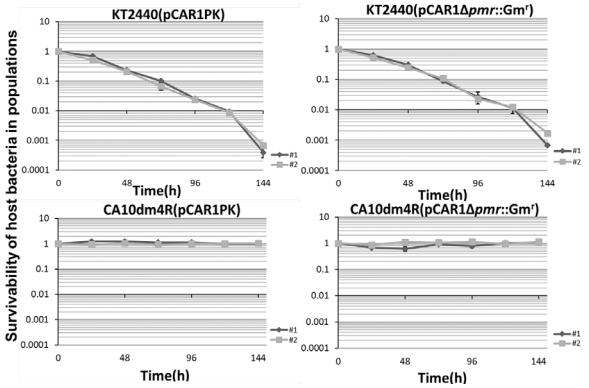


Fig. 1. The result of competition assay

プラスミド pCAR1 は *Pseudomonas* 属細菌を主な宿主とし、難分解性物質カルバゾールの分解能を宿主に与える自己伝達性プラスミドである。一般にプラスミド保持は宿主細菌に負荷を与えるが、腸内細菌のプラスミドでは、プラスミド由来の H-NS 様タンパク質（核様体タンパク質の一種）がプラスミド保持に起因する負荷を軽減することが報告されている [*Science*, 315:251-2, 2007]。本研究では pCAR1 にコードされる H-NS 様タンパク質 Pmr が、pCAR1 保持株の集団内での生残性向上に寄与するか評価した。*Pseudomonas putida* KT2440 株と *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株を宿主として、*pmr* 遺伝子を破壊した pCAR1Δ*pmr* 保持株の単独培養を行ったところ、pCAR1Δ*pmr* は両宿主で安定に保持された。そこでプラスミド保持株を非保持株と混合し、24 時間ごとに継代培養を行うことで集団内でのプラスミド保持率を経時的に比較する competition assay を行った。その結果、KT2440 株では pCAR1、pCAR1Δ*pmr* のいずれを保持させた場合にもプラスミド保持株は集団中から同様に淘汰される傾向が見られた（**Fig. 1 上段**）。一方、CA10dm4 株では *pmr* の有無にかかわらず、プラスミド保持株の割合が非保持株と同程度のまま推移した（**Fig. 1 下段**）。以上より、腸内細菌のプラスミドとは異なり、pCAR1 の場合 Pmr 単独では宿主の集団内での生残性向上には寄与しない可能性が示唆された。現在、他の *Pseudomonas* 属細菌も宿主として同様の評価を進めている。

Plasmid pCAR1 is a self-transmissible plasmid, which was isolated from *Pseudomonas resinovorans* CA10 and provides the carbazole degradation ability to *Pseudomonas* host strains. In general, plasmid retention imposes a fitness cost on the host bacteria. We focused on the H-NS family protein, which is a nucleoid associated protein that was reported to reduce the fitness cost in Enterobacteriaceae host. The H-NS family protein Pmr is encoded on the plasmid pCAR1. The *pmr* gene-disrupted strains of pCAR1-harvoring *P. resinovorans* CA10dm4 and *P. putida* KT2440 were constructed. After confirming that the plasmid was stably retained, the effect of Pmr on survivability in the population was evaluated by competition assay with each plasmid-free strain. Contrary to the previously reported view, *pmr* did not contribute to the host survivability in competitive culture **(Fig. 1)**.

Pseudomonas, plasmid, H-NS family protein

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A01-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム A

CO_2 が *Akkermansia muciniphila* の生理状態に及ぼす影響に関する研究

Effects of CO_2 on the physiological state of *Akkermansia muciniphila*.

○荻原 修也[1]、櫻井 海月[2]、川﨑 信治[1,2]、佐藤 拓海[2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Shuya OGIWARA[1], Mitsuki SAKURAI[2], Shinji KAWASAKI[1,2], Takumi SATOH[2] ([1]TUA Bio., [2]TUA microbiol.)

近年、腸内細菌研究において、細菌叢構成の腸内における存在比と宿主の健康状態に関する研究が多く報告されているが、栄養条件などの変化による個々の細菌の生理状態の変化と宿主への影響に関する研究の報告は少ない。そこで、本研究では腸内嫌気性細菌の様々な環境下における生理状態の変化に着目し、その生理意義や生存戦略、宿主への影響に関して知見を得ることを目的とした。これまでに当研究室では、CO_2 がビフィズス菌のコロニー形成を促進することを報告している。これを受け、他の腸内細菌として次世代プロバイオティクスとして注目されている *Akkermansia muciniphila* (以下 *A. muc.*)を供試菌として選定し、様々な気相 CO_2 濃度で培養した。結果、*A. muc.* の良好な生育には５％以上の気相 CO_2 濃度が必要であることが示唆され、CO_2 非存在下では生育が低下し、細胞の伸長を伴った。また、LC-MS を用いたメタボローム解析において、CO_2 非存在下と比較して CO_2 存在下では異なる代謝プロファイルが観察された。これらの結果から、*A. muc.* は腸内の CO_2 を利用した生存戦略を有していることが示唆された。

Recently, it has been reported the relationship between the composition of gut microbiota and host health, but there are few reports that the changing physiological states of individual bacteria in various gut conditions and its effects on host health. In this study, we focus on the changing physiological state of gut microbiota and aim to clarify its physiological significance and effects on host health. Previously we have been reported that CO_2 stimulates the colony formation of *Bifidobacterium*. In response to this, we choose the next generation probiotic bacteria, *Akkermansia muciniphila* (*A. muc.*) as test bacteria. *A. muc.*, a Gram-negative, oval-shaped, belongs to the phylum Verrucomicrobia. *A. muc.* has been studied well for its function to host health, but the physiological state of *A. muc.* under various condition remain unclear. In this study, we cultured *A. muc.* under various gas-phase CO_2 concentrations. *A. muc.* showed growth stimulation under the presence of CO_2 and the cell shape elongated under the absence of CO_2. Metabolomic analysis using LC-MS showed significant differences between CO_2 conditions and no CO_2 conditions. These results suggest the existence of a survival strategy using CO_2 in the gut.

Akkermansia muciniphila, microbiota, metabolomics

発表責任者：佐藤拓海（ts200062@nodai.ac.jp）

講演番号：3A03-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

マイクロ流体デバイスと融合させたラマン分光顕微鏡によるバイオフィルム中の油分解細菌の不均一性の解析

Heterogeneity of oil-degrading bacterial cells in biofilms revealed by Raman microspectroscopy using a microfluidic device

○中務 百花[1]、プラサド マノージュ[2]、ウタダ アンドリュー[2,3]、重藤 真介[1]([1]関西学院大院・理工、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大・MiCS)
○Momoka NAKATSUKASA[1], Manoj PRASAD[2], Andrew S. UTADA[2,3], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Kwansei Gakuin Univ., [2]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba)

原油流出事故などにより汚染された海洋環境の生物環境修復の実用化に向けて，原油を分解できる微生物の細胞特性や集団の不均一性を理解し巧みに制御することが極めて重要である。本研究では，顕微ラマン分光法と独自のマイクロ流体デバイスを組み合わせた新たな微生物の分光観察系を構築し，アルカン分解能を有する海洋細菌 *Alcanivorax borkumensis* が油滴の周りにバイオフィルムを形成し代謝する過程を経時的にモニターすることを目的とした。

共焦点ラマン顕微鏡下で，流路にトラップされた同一の油滴に対して培養開始から 72 時間後まで，バイオフィルム形成挙動の観察および空間分解ラマンスペクトル測定（励起波長 632.8 nm）を行った。その結果，油滴表面に形成されるバイオフィルム中の *A. borkumensis* 細胞は，典型的な桿状と特異的な球状の 2 つの形状表現型を示すことが確認された。それらの代表的なラマンスペクトルから，タンパク質が支配的な桿状細胞に比べて，球状細胞は優位にヘキサデカンを取り込み，ヘキサデカンの分解生成物であるワックスエステルや脂肪酸，トリアシルグリセロールを大量に蓄積した「肥満状態」であることが明らかとなった。発表では，細胞形状の違いによるヘキサデカンの取り込みと代謝の違いを非破壊的に定量評価した結果についても議論する。

Understanding and ultimate control of the cellular characteristics and heterogeneity of bacteria in biofilms are vitally important from both basic and applied aspects. Here we develop a novel microbial observation system that combines a confocal Raman microscope and a unique microfluidic device to monitor the biofilm formation and metabolic processes of *Alcanivorax borkumensis*, an alkane-degrading marine bacterium.

The biofilm formation of *A. borkmensis* around an oil droplet which was trapped in a microchannel of the device was continuously observed under a laboratory-built confocal Raman microscope for 72 h after inoculation, and 632.8 nm-excited Raman spectra were acquired in a space-resolved manner. We found two shape phenotypes of *A. borkumensis* cells in the biofilm: a typical rod shape and a spherical shape. Their Raman spectra show that characteristic spherical cells predominantly take up hexadecane and accumulate its decomposition products such as wax esters, fatty acids, and triacylglycerols, compared to normal rod-shaped cells.

biofilm, Raman spectroscopy, microfluidic device

講演番号：3A03-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

インデックスマッチング材料に形成した緑膿菌バイオフィルムの 3 次元形態
Three-dimensional morphology of biofilm on the index-matched materials

○岡野 千草[1]、高部 響介[1]、平山 智弘[2]、野村 暢彦[1,3]、八幡 穣[1,3] ([1]筑波大・生命環境系、[2]筑波大・生命環境科学研究科、[3]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター)
○Chigusa OKANO[1], Kyosuke TAKABE[1], Tomohiro HIRAYAMA[2], Nobuhiko NOMURA[1,3], Yutaka YAWATA[1,3] ([1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Microbiology research Center for Sustainability, University of Tsukuba)

共焦点反射顕微鏡法 (CRM)は生細胞の 3 次元形態を定量的かつ非侵襲的に評価できる。しかし CRM で固体-細胞界面を可視化することは困難だった。なぜなら固層と液層の屈折率が異なり、固液界面で強いバックグラウンド反射が生じるためだ。そこで本研究では液層(培地)と同じ屈折率を持つインデックスマッチング材料 (IMM)の層をガラス表面に作り、固体-細胞界面の可視化をデモンストレーションした。IMM としてフッ素化ポリマーとヒドロゲルを試験した。結果はどちらもバックグラウンド反射を効果的に抑制し、固体-細胞界面を可視化できた。これまで蛍光タンパク質標識技術はバイオフィルムの三次元構造の可視化に広く用いられてきた。しかし嫌気条件下では蛍光タンパク質の蛍光発光が阻害されるため適さない。一方、本手法は嫌気環境でも高いコントラストの画像を得ることができ、嫌気性の脱窒条件下で緑膿菌 PAO1 株のバイオフィルムの全容をイメージングできた。さらに画像解析の結果、バイオフィルム内の細胞は固体表面に対して順水平に配向しており、これらの細胞が 2D メッシュ構造を形成し積層することでバイオフィルムを形成していることが分かった。今後はバイオフィルムの形成ダイナミクスを追跡し、秩序立ったバイオフィルムの構造が形成されるメカニズムを明らかにしたい。

Confocal reflection microscopy (CRM) has been utilized to visualize the three-dimensional morphologies of intact microbial communities. However, CRM imaging of cells directly adhering to a solid surface is often hindered by the refractive index mismatch between the solid and liquid phases. Such mismatch causes strong background reflection, which dwarfs the signals of the cells. Herein, we visualized the solid-microbe interface using index matching materials (IMM). We overlaid IMM on the glass and showed that IMM sufficiently canceled the background reflection. We successfully visualized whole picture of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under anaerobic denitrification condition. The image analysis showed that the structure of biofilm consists of laminated layers of “2D-mesh” knitted with elongated cells that were oriented quasi-horizontally.

Biofilm, Confocal reflection microscopy, Refractive index matching

講演番号：3A03-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

Analysis of unknown interaction between soil-original bacteria

○ ThomasKouyou SAVAGE[1], Nobuhiko Nomura[1,2], Masanori Toyfuku[1,2,3] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ. MiCS, [3]SunRiSE)

Various species of bacteria thrive as communities where they interact with each other. However, the full-scale mechanism of cell-cell interactions among the billion-per-gram cells in soil samples are yet to be uncovered. In this research we focused on controlled fertilizer samples from an experimental farmland as one example of soil samples.

We isolated bacteria from soil samples collected from Tsukuba-Plant Innovation Research Centre (T-PIRC). Bacteria were first selected by the visual characteristics of colonies they formed. To further screen bacteria that may be involved in bacterial interactions, a combination of 2 bacteria screened from the same sample were co-cultured on 1.5% agar media. The characteristics of colonies formed in this process were then compared with those cultured solely on 1.5% agar media. Combinations of bacteria with any visual changes of colonies when co-cultured, were selected as bacterial pairs that may be involved in cell-cell interactions. After testing 457 pairs, a possible interaction between 2 different colonies, one yellow and one white was observed. Results of 16S rRNA sequencing indicated that the yellow colony was formed by *Bacillus megaterium* 1T-05, and the white by *Paenibacillus polymyxa* 1T-08. As a result of co-culturing the 2 strains, the yellow colony of *B. megaterium* 1T-05 changed its colour to white. Also, the shape and size of the colonies of *B. megaterium* 1T-05 formed by the co-culturing with *P. polymyxa* 1T-08 differed to those formed when cultured alone. This suggests the possibility of growth inhibition. To seek the factor involved in this interaction, we conducted an experiment to see if any volatile substances are involved. The result of this experiment denied the possibility of that. Neither *B. megaterium* 1T-05 nor *P. polymyxa* 1T-08 showed active motility on 1.5% agar media. Thus, the factor may possibly be secreted from cells of either *B. megaterium* 1T-05 or *P. polymyxa* 1T-08. Further experiments to uncover the factor and mechanism of this microbial interaction is under process.

cell-cell interaction, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*

講演番号：3A03-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

抗生物質が *Streptomyces* 属放線菌のコロニー形成率を高める現象の解析

Analysis of the phenomenon that antibiotics enhance the colony formation rate in streptomycetes

○向井 慶一郎[1]、吉松 亜美[2]、保坂 毅[1,2,3] ([1]信州大・総合医理工、[2]信州大・農、[3]信州大・バイオメディカル研)

○Keiichiro MUKAI[1], Ami YOSHIMATSU[2], Takeshi HOSAKA[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Med. Sci. and Technol., Shinshu Univ., [2]Fac. of Agric., Shinshu Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

微量の抗生物質は細菌に対して好影響を及ぼすことがある。抗生物質のそのような作用を探索する中で，低濃度の抗生物質を含む寒天培地上に一定量の放線菌胞子を接種し，培養すると，コロニー形成率が高まることを見出している。この現象を様々な抗生物質と放線菌の組み合わせで検証した。

8 種類の *Streptomyces* 属放線菌を供試菌株とした。作用標的の異なる 12 種類の抗生物質それぞれを含む寒天培地に，各放線菌の胞子懸濁液を接種した。30°C で培養後，出現したコロニー数を計測し，抗生物質を含まない条件下で出現したコロニー数と比較することで，コロニー形成率を算出した。

抗生物質存在下で放線菌のコロニー形成数が増加する現象は，*Streptomyces curacoi* NBRC12761 とリボソームを標的とする抗生物質の組み合わせで顕著に認められた。興味深いことに，エリスロマイシン(1.25 μM)存在下における *S. curacoi* NBRC12761 のコロニー形成率は，抗生物質非存在下に比べて約 5 倍高いことも突き止めた。本研究で見出した現象は胞子の発芽率向上によるものと考えている。この仮説の実験的証明は今後の課題であるが，以上の結果から，リボソームを標的とする抗生物質の新たな特質が見えてきた。

Trace amounts of antibiotics can positively affect bacterial growth and metabolism, etc. While exploring such positive effects of antibiotics, we have found that when a certain amount of actinomycete spores are inoculated onto an agar medium containing a low concentration of antibiotics and cultured, the rate of colony formation increases. This study verified the phenomenon with various combinations of antibiotics and streptomycetes.

Eight *Streptomyces* strains were used in this study. Spore suspensions of *Streptomyces* strains were inoculated on agar containing each of the 12 antibiotics with different mechanisms of action. After incubation at 30°C, the number of colonies that appeared was measured and compared with the number of colonies that appeared in the absence of antibiotics to calculate the colony formation rate.

The increase in the number of colonies formed in the presence of antibiotics was most pronounced in the combination of *Streptomyces curacoi* NBRC12761 and ribosome-targeting antibiotics. Interestingly, the colony formation rate of *S. curacoi* NBRC12761 in the presence of 1.25 μM erythromycin was about five times higher than that in the absence of erythromycin. We speculate that the phenomenon found in this study is due to an increase in the germination rate of spores. Although the hypothesis remains to be verified, our observations reveal a new characteristic of ribosome-targeting antibiotics.

Antibiotics, *Streptomyces*, Colony formation

発表責任者：保坂 毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A03-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* におけるスクアレンの生理的機能の解析

Analysis of the physiological function of squalene in extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*

○佐野 歩[1]、鈴木 理紗[1]、楊 影[1]、中村 聡[1,2]、八波 利恵[1] ([1]東工大生命理工、[2]沼津高専)
○Ayumu Sano[1], Risa Suzuki[1], Ying Yang[1], Satoshi Nakamura[1,2], Rie Yatsunami[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Numazu College)

スクアレンはイソプレンを構成単位とするトリテルペンである。生理的にはステロイドやホパノイドといった細胞膜の構成成分の前駆体であるほか、商業的には保湿剤や潤滑剤などの用途がある。

高度好塩菌古細菌 *Haloarcula japonica* はスクアレン及びその誘導体を生産する。本菌はゲノム上にフィトエン/スクアレンシンターゼとアノテーションされる遺伝子ホモログである *sqs1* 遺伝子及び *c1220* 遺伝子を有し、前者が主にスクアレン生産に関与していることが明らかにされた。しかしながら、*Ha. japonica* におけるスクアレンの生理的役割は明らかにされていない。そこで、本研究では *Ha. japonica* におけるスクアレンの生理的機能の解明を目的とした。まず、*sqs1* 遺伝子の一部を欠損したプラスミドを野生型の遺伝子と 2 回相同組み換えさせることにより、*sqs1* 遺伝子破壊株 (Δ*sqs1*) を作製した。同様にして、*sqs1* 遺伝子と *c1220* 遺伝子の二重破壊株 (Δ*sqs1*/Δ*c1220*) を作製した。各破壊株のスクアレン及びその誘導体生産量を評価したところ、いずれもほとんど生産しないことが確認された。また生育至適条件においては Δ*sqs1* 及び Δ*sqs1*/Δ*c1220* と野生株の生育には大きな差異は認められなかった。

現在、各破壊株の生育における NaCl 濃度及び温度の影響を調べるとともに、各条件下におけるスクアレンとその誘導体の生産量ついても解析を進めているところである。

Squalene is a triterpene whose constituent unit is isoprene. Physiologically, it is a precursor of cell membrane constituents such as steroids and hopanoids, and it is also commercially used as a moisturizer and a lubricant.

Haloarcula japonica produces squalene and its derivatives. *Ha. japonica* has the *sqs1* and the *c1220* gene, which are gene homologues annotated as phytoene/squalene synthase on the genome, and it was clarified that the former is mainly involved in squalene production. However, the role of squalene in *Ha. japonica* is not clear. Therefore, the purpose of this study was to elucidate the physiological function of squalene in *Ha. japonica*. First, the *sqs1* gene disruption strain (*Δsqs1*) was prepared by homologous recombination of a plasmid lacking a part of the *sqs1* gene with a wild-type gene twice. In the same manner, a double-disrupted strain of the *sqs1* gene and the *c1220* gene (*Δ sqs1/Δc1220*) was prepared. The production of squalene and its derivatives was evaluated for each disrupted strain, and it was confirmed that none of them was produced. In addition, there was no significant difference in the growth of the wild strains, *Δsqs1* and *Δsqs1/Δc1220*, under the optimum growth conditions.

Extremely halophilic archaeon, Squalene

発表責任者：八波利恵（yatsunami.r.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：3A03-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

大腸菌における persister cell の特徴と persister 化に関わる因子の探索

Characterization of persister cells and their formation factors in *E. coli*

○鹿野 将希[1]、松村 吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○Masaki SHIKANO[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Dept. Life Science & Biotechnol., Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

公衆衛生や清潔志向への関心の高まりとともに微生物による汚染が注目され、様々な微生物制御法・抗微生物処理法が活用されている。一方で、薬剤耐性株や休眠型細胞は通常の抗微生物処理法では効果的な処理が困難となっており、それら細胞の特徴や耐性メカニズムの解明と効果的な抗微生物処理法の構築が期待されている。我々の研究室では、抗菌性陽イオン性界面活性剤、臭化セチルトリメチルアンモニウム塩（CTAB）に耐性を示す変異株を単離し、その変異株細胞を 30℃、30 分間の CTAB 処理を行った結果、休眠型細胞である persister cell の存在を確認した。研究室で調整した Persister cell に様々な抗微生物処理を施した結果、多くの抗生物質に耐性を示すこと、低 pH 耐性能が増加していたことなどが明らかになった。Persister 化関与因子の探索のため、野生株と変異株との間でトランスクリプトーム解析を行った結果、toxin 遺伝子である *yhaV*、*yafO*、*yafQ* の 3 つの発現量が全ての変異株で増加していた。これら遺伝子が persister cell 形成に関与していることを確かめるため、それぞれに対応した antitoxin 遺伝子欠損株における persister cell 形成能を確認したが、顕著な persister cell 形成は確認されなかった。今後も引き続き toxin 遺伝子の persister cell 形成への関与を検証する予定である。

With growing concerns of microbial contamination in public and food hygiene, several of antimicrobial treatments and microbial control methods have been developed and applied to social lives. On the other hand, drug-resistant bacterial strains and dormant cells like persister cells have been isolated after antimicrobial treatments, but their characters and their formation mechanisms for drug resistance have been unidentified. In our laboratory, some mutant strains, resistant to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), an antibacterial cationic surfactant, were isolated. After the CTAB treatment at 30°C for 30 minutes to mutant cells, persister cells were confirmed in survival cells. Persister cells showed to be resistant to many antibiotics and to increase low pH tolerance. Transcriptome analysis of mutant strains, comparing with the wild-type strain, showed that the expression of three toxin genes, *yhaV*, *yafO*, and *yafQ*, were markedly increased in all mutant strains. However, no significant persister formation was observed in the antitoxin-gene deficient strains corresponding to the toxin.

dormant cell, toxin-antitoxin system, stress resistance

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3A03-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母における微小管重合阻害剤によるミトコンドリアの融合・分裂異常

Microtubule polymerization inhibitors induce abnormal mitochondrial fusion and fission

○村田 和加惠[1,2]、黒見 まい[1]、山口 良弘[2]、荻田 亮[2,3]、藤田 憲一[2]([1]米子高専、[2]阪市大院・理、[3]阪市大・健康研セ)
○ Wakae MURATA[1,2], Mai KUROMI[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[2], Akira OGITA[2,3], Ken-ichi FUJITA[2] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol, [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ, [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)

真核生物の主要な細胞骨格の一つである微小管は、細胞の形態維持や、細胞分裂などの多様な細胞機能において重要な役割を担っている。一方でミトコンドリアは、細胞分裂に必要なエネルギー供給などを担い、融合・分裂を繰り返すことで自身の形態を維持している。ミトコンドリアの融合･分裂に関わるタンパク質はいくつか同定されている。しかし、微小管との関係についての研究報告はほとんどなされていない。本研究では微小管重合阻害剤である Benomyl, Thiabendazole, また微小管安定化剤である Nordihydroguaiarentic acid を出芽酵母に添加し、ミトコンドリアの融合・分裂異常がどのような割合で生じるのかを GFP を用いて細胞内での局在を観察することによって検証を行った。その結果、Benomyl 添加細胞ではミトコンドリアの分裂異常によって生じるモヤ状の構造が、Thiabendazol 添加細胞においては融合異常によって生じる分裂したミトコンドリアが観察された。また単離したミトコンドリアを電子顕微鏡で観察した結果、GFP 観察と同様の結果が得られた。このことから、微小管はミトコンドリアの融合・分裂と関係性があると考えられる。

Microtubules play an important role in maintaining cell morphology and various cellular functions such as cell division. Mitochondria are responsible for the production of energy necessary for cell division. Mitochondria maintain their own morphology by repeatedly fusing and dividing. Several proteins involved in mitochondrial fusion and fission have been identified. However, there have been few reports on the relationship between microtubules and mitochondria. In this study, microtubule polymerization inhibitors, Benomyl and Thiabendazole, and microtubule stabilizer, Nordihydroguaiarentic acid, were added to budding yeast, and the rate of mitochondrial fusion and fission abnormality was examined by observing the subcellular localization using GFP. Mitochondrial fission abnormalities were observed in Benomyl-treated cells, and fusion abnormalities were observed in Thiabendazol-treated cells. In addition, observation of the isolated mitochondria by electron microscopy showed similar results to the GFP observation. This suggests that microtubules were associated with mitochondrial fusion and fission.

Saccharomyces cerevisiae, mitochondria, microtubule

講演番号：3A03-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞膜におけるステロールの役割の解析
Role of sterol in the plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
○東 慶紀[1]、堀内 裕之[1,2]、福田 良一[1,2] ([1]東大農、[2]東大　微生物連携機構)
○Yoshinori HIGASHI[1], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

ステロールは真核細胞の生体膜を構成する主要脂質の一つである。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において細胞膜は細胞内で最もステロール含量が高い膜であるが、細胞膜におけるステロールの役割については未解明な点が多い。本研究では、*S. cerevisiae* の細胞膜におけるステロールの役割を明らかにすることを目的として、細胞膜のステロール含量を人為的に低下させる系を構築し、その影響を解析することにした。*S. cerevisiae* のステロールアシルトランスフェラーゼをコードする *ARE1*、*ARE2* を破壊した株において、細菌由来のステロールアシルトランスフェラーゼ SatA に細胞膜の SNARE タンパク質 Sso1 またはヒトの GTPase である Rit の細胞膜移行配列を連結した融合タンパク質を発現させた。細胞抽出液の分画を行ったところ、これらの融合タンパク質は細胞膜を多く含む画分に回収されたことから、これら融合タンパク質が細胞膜に局在する可能性が示唆された。また、これらの株の脂質抽出液中にステロールアシルトランスフェラーゼの産物であるステリルエステルが検出されたことから、これら融合タンパク質が酵母細胞内で機能していることが明らかになった。これらの融合タンパク質を発現させた場合の生育への影響等についても合わせて報告する。

Sterols are one of the major lipids that constitute biological membranes of eukaryotic cells. The plasma membrane displays the highest sterol content among membranes in the cell of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but the roles of sterols in the plasma membrane remain poorly understood. In this study, to elucidate the roles of sterol in the plasma membrane of the yeast, we attempted to construct strains in which the sterol content of the plasma membrane can be artificially reduced. The bacterial sterol acyltransferase SatA fused with the yeast plasma membrane SNARE Sso1 or the plasma membrane targeting sequence of the human GTPase Rit was expressed in the deletion strain of *ARE1* and *ARE2* encoding sterol acyltransferases of *S. cerevisiae*. In the fractionation of the cell extracts, these fusion proteins were recovered in the fractions in which the plasma membrane marker protein was enriched, suggesting that these proteins localize to the plasma membrane. In addition, steryl ester, which is the product of steryl acyltransferase, was detected in lipid extracts of these strains, indicating that these fusion proteins function in the yeast cells. The effects of expression of these fusion proteins on the growth will be reported.

sterol, *Saccharomyces cerevisiae*, plasma membrane

発表責任者：福田良一（afukuda@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A03-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

紡錘体チェックポイントと連動したアクチン依存的細胞核移動の解析

Actin-dependent movement of the mitotic nucleus linked with the spindle assembly checkpoint in fission yeast

○黄 宇商[1]、湯川 格史[1,2]、登田 隆[1,2] ([1]広島大・院統合生命、[2]広島大・健康長寿研究拠点)
○WOOSANG HWANG[1], MASASHI YUKAWA[1,2], TAKASHI TODA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

酵母を含めて全ての真核細胞は、動原体 - 微小管間結合の異常に遭遇すると、紡錘体チェックポイントを作動させ、染色体未分離の状態で M 期停止する。ところが、このチェックポイントによる M 期停止は永続せず、ある時点でチェックポイントから逸脱する結果、細胞質分裂が起こる。この時、もし未分離の染色体が細胞中央部にあると、細胞収縮環によって染色体が物理的に破断され、cut 表現型と呼ばれる細胞分裂死を引き起こす。
当研究室では、M 期遅延・停止を引き起こす分裂酵母変異体において、細胞核が非対称的に細胞中央部から移動するという興味深い現象を見出した。さらに、この核移動を促進する原動力が、微小管ではなく、フォーミンおよびミオシンにより形成される M 期特異的アクチン繊維であることを明らかにした（Yukawa et al, 2021, iScience 24: 102031）。本現象は、分裂期崩壊による細胞分裂死から逃れるための回避機構ではないかと考えている。現在、核移動の詳しい分子メカニズムならびに生物学的意義について解析を行なっている。

All eukaryotic cells, including yeast, activate a spindle assembly checkpoint (SAC) to prevent precocious chromosome segregation, if they have abnormal spindle formation or improper spindle attachment to kinetochores. However, mitotic arrest by SAC activation does not last forever and cells exit mitosis abnormally without chromosome segregation. In fission yeast, mitotically arrested cells undergo septation despite abnormal chromosome segregation, so that the septum physically divides the nucleus into two parts and produces inviable daughter cells (called “cut” phenotype).
In this laboratory, we found that several fission yeast cell-cycle mutants that arrest in mitosis displace the nucleus from the cell center. Interestingly, mitosis-specific actin filaments drive this asymmetric nuclear movement (Yukawa et al, 2021, iScience 24: 102031). However, it is still unknown why and how these cells move their nucleus during prolonged mitotic arrest. This study aims to investigate the molecular mechanisms that drive the mitotic nuclear movement and to understand its biological significance.

actin, nuclear movement, fission yeast

発表責任者：HWANG WOOSANG（M211139@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A03-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母の核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析

Study of the mechanism of nuclear size control mediated by nucleocytoplasmic transport in fission yeast

○藤本 尭玄、水沼 正樹、久米 一規（広大院・統合生命）
○Takahiro FUJIMOTO, Masaki MIZUNUMA, Kazunori KUME (Hiroshima Univ. of Integr. Sci. for Life)

分裂酵母の核サイズは細胞サイズと比例関係を示し、核と細胞の体積比（以下 N/C 比）は細胞周期を通して一定に維持されている（JCB, 2007）。しかし、核サイズ制御の分子機構やその重要性については不明な点が多い。これまでの私たちの解析から、適切に制御された核-細胞質間の物質輸送が N/C 比の維持に重要であることがわかってきた。本研究では、核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御の分子機構を明らかにするために、核外輸送に着目して解析を行った。

出芽酵母において、核外輸送に重要なアミノ酸配列（核外輸送シグナル/NES）に GFP を連結した NES-GFP の過剰発現は増殖悪化を示す（Sci Rep, 2016）。私たちはこの現象に注目して、分裂酵母において NES-GFP を過剰発現すると出芽酵母と同様、増殖悪化を示した。さらに NES-GFP 過剰発現により、核が肥大化したことから、核肥大化と増殖悪化との関連性が示唆された。現在、NES-GFP 過剰発現による核肥大化の原因を明らかにするために、核肥大化と既存の核サイズ制御因子との関連性について解析を進めている。

In fission yeast, nuclear size is proportional to cell size, and the ratio of nuclear volume and cell volume (N/C ratio) is maintained at a constant level throughout the cell cycle (JCB., 2007). However, the molecular mechanisms underlying the regulation of nuclear size and its importance have not yet been elucidated. Our previous analysis has shown that properly regulated nucleocytoplasmic transport is important for maintaining the N/C ratio. In this study, we focused on the nuclear export to elucidate the molecular mechanism of nuclear size control mediated by the nucleocytoplasmic transport.

In budding yeast, overexpression of NES-GFP, in which GFP is linked to nuclear export signal/NES, shows cell growth defects (Sci. Rep., 2016). We focused on this phenomenon and found that overexpression of NES-GFP in fission yeast results in cell growth defects similar to those observed in budding yeast. Furthermore, NES-GFP overexpression increased nuclear size, suggesting a link between increased nuclear size and cell growth defects. We are currently investigating whether factors involved in nuclear size control are implicated in the increased nuclear size observed in cells overexpressing NES-GFP.

fission yeast, nuclear size, nucleocytoplasmic transport

講演番号：3A03-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母における複数の液胞タンパク質輸送に関わる新規 VPS 遺伝子の解析

Identification of a novel VPS gene required for multiple vacuolar vesicle sorting in fission yeast.

○稲川 智章、大久保 和真、樋口 裕次郎、竹川 薫（九州大生資環）
○Tomoaki INAGAWA, Kazuma OKUBO, Yujiro HIGUCHI, Kaoru TAKEGAWA (Kyushu Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、液胞へのタンパク質輸送や液胞形態形成には、*VPS*(vacuolar protein sorting)と呼ばれる多数の遺伝子群が関与している。一方、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても *VPS* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を有しており、これまで当研究室において解析されてきたが、まだ未解明な部分も多く存在している。その過程において、*vps3844* と名付けた機能未知遺伝子を破壊すると液胞局在 CPY が細胞外にミスソートする VPS 表現型を示すことを見出した。興味深いことに、この遺伝子と相同性の高い遺伝子は分裂酵母 4 種や一部の子嚢菌類には存在するが、出芽酵母には存在しない。このことから、本遺伝子産物が関与する特有な液胞タンパク質輸送機構が分裂酵母には存在することが示唆された。そこで本研究ではこの遺伝子の機能解析を試みた。

vps3844 欠損株では液胞局在タンパク質の輸送欠損の他に、FM4-64 が正常に液胞膜へと輸送されないエンドサイトーシス欠損の表現型を示した。さらに解析の結果、本タンパク中の DUF3844 という機能未知ドメインが液胞タンパク質輸送に重要であることを明らかにした。また、*vps3844* 欠損株ではオートファジーを含む複数の液胞小胞輸送に異常が見られ、*vps3844* が複数の液胞への輸送経路に関与している事が示唆された。

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, genetic selections and genome-wide screens have resulted in the identification of a large number of genes (called *VPS* genes) required for delivery of proteins to the vacuole. We found that most of the genes required for vacuolar biogenesis and protein transport are conserved between *Schizosaccharomyces pombe* and *S. cerevisiae*. Although the roles of the fission yeast *vps* genes were revealed, the transport mechanism to the vacuole still remains elusive. In this study, we found that the deletion of *S. pombe* gene *vps3844* showed the missort of vacuolar CPY to the cell surface. The *vps3844* encodes a protein (428 aa) with two transmembrane regions. This protein has DUF3844 family domain, and homologs in other fission yeasts and some ascomycetes, but does not have homologs in *S. cerevisiae*. This suggests that fission yeast has a unique vacuolar protein transport mechanism which this gene product is involved. The deletion of *vps3844* gene resulted in pleiotropic phenotypes including low-temperature sensitivity and endocytosis defects. These results suggest that *vps3844* protein is essential for the sorting of vacuolar proteins and for the internalization process in *S. pombe*. Further studies suggest that *vps3844* is also involved in multiple vacuolar sorting pathways.

Schizosaccharomyces pombe, vacuolar protein sorting, endocytosis

講演番号：3A05-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファジーを介した核分解の分子機構の解析
Analysis of nuclear degradation by autophagy in *Aspergillus oryzae*
○藤田 純佳[1]、橋本 真宇[1]、吉田 稔[1,2,3]、有岡 学[1,2]([1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研環境資源セ)
○ Junka FUJITA[1], Mau HASHIMOTO[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

オートファジーは真核生物に保存された自己分解機構であり、細胞内成分が液胞/リソソームで分解される。その中でも核が選択的に分解される機構はヌクレオファジーと呼ばれている。核の一部のみが分解される出芽酵母の場合とは異なり、麹菌 *Aspergillus oryzae* ではヌクレオファジーによって核全体が分解されるという特徴を持つ。本研究では、*A. oryzae* におけるヌクレオファジー機構の解明を目指し、核タンパク質の分解に着目して研究を行った。核のマーカータンパク質として、ヒストン H2B と EGFP の融合タンパク質を *A. oryzae* に導入し、野生株、オートファジー欠損株（Δ*Aoatg8*、Δ*Aoatg15*）、*PEP4* オルソログ遺伝子破壊株（Δ*pepE*）における分解をプロセシングアッセイにより調べた。その結果、液胞での分解が阻害されると予想されたΔ*Aoatg15* 株でも分解が起こり、さらにΔ*pepE* 株では野生株と同等のレベルの分解が確認された。顕微鏡観察においても、Δ*pepE* では野生株よりも顕著な分解が観察された。これらの結果から、*A. oryzae* では AoAtg15 や PepE がヌクレオファジーにおける分解に関与している可能性が低いことが示唆された。現在、より明確にヌクレオファジーの分解を解析するため、他の液胞プロテアーゼ遺伝子との二重破壊株の作製や、新たな核マーカーの探索等を行っている。

Autophagy is a self-degrading mechanism conserved in eukaryotes. Selective degradation of the nucleus by autophagy is called nucleophagy. In contrast to the partial degradation in the budding yeast, *Aspergillus oryzae* has a characteristic feature in which the whole nucleus is degraded by nucleophagy. In this study, we focused on the degradation of nuclear proteins to understand the mechanism of nucleophagy in *A. oryzae*. Histone H2B-EGFP fusion protein (H2B-EGFP) was expressed in *A. oryzae* wild-type, autophagy-deficient (Δ*Aoatg8*, Δ*Aoatg15*), and *PEP4* ortholog-deficient (Δ*pepE*) strains, and the degradation was examined by processing assay. Surprisingly, degradation of H2B-EGFP occurred even in Δ*Aoatg15*, and the similar level of degradation to the wild type was observed in Δ*pepE*. Microscopic observation also confirmed that the degradation of H2B-EGFP was more remarkable in Δ*pepE* than in the wild-type. These results suggest that AoAtg15 and PepE are unlikely to be involved in nucleophagy in *A. oryzae*. To analyze the degradation of nucleophagy more clearly, deletion of other vacuolar protease genes and a search for new nucleophagy markers are in progress.

nucleophagy, *ATG15* ortholog, *PEP4* ortholog

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A05-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

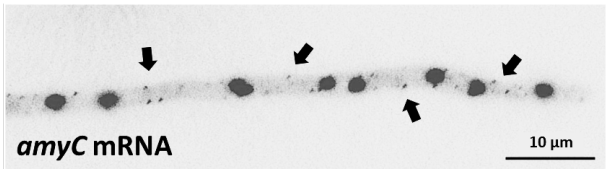
黄麹菌における α-アミラーゼ mRNA のライブセルイメージング

Live cell imaging of mRNA encoding α-amylase in *Aspergillus oryzae*

○守田 湧貴、竹川 薫、樋口 裕次郎（九大院・生資環）
○Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi (Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の発酵醸造産業で利用される有用糸状菌であり、優れたタンパク質分泌能を有する。主に分泌される菌糸先端部でのタンパク質発現は、効率的なタンパク質分泌に重要である可能性が考えられる。しかし、多核多細胞である糸状菌では、タンパク質の局所的な発現に寄与する mRNA の局在化機構がほとんど解明されていない。我々はこれまでに、single-molecule fluorescence in situ hybridization (smFISH)法により、固定化細胞においてタンパク質ごとに mRNA 局在が異なることを見出している。本研究では、黄麹菌生細胞において mRNA 可視化の手法を確立した。

生細胞における mRNA 可視化には、MS2-MCP system を用いた。RNA 結合タンパク質(MCP)に特異的に結合するアプタマー配列(MBS)を利用する手法であり、生細胞の mRNA を一分子レベルで可視化することが可能である。本研究では、α-アミラーゼをコードする *amyC* の mRNA を可視化した。*amyC* 遺伝子の下流に Cre/loxP system を用いて MBS 配列を導入し、緑色蛍光タンパク質(EGFP)を融合した MCP を共発現させ、*amyC* mRNA の生細胞解析を行った。その結果、*amyC* が発現誘導されるマルトース含有培地において、mRNA のシグナルを確認した(右図)。発表においては、さらなる局在および動態解析について報告する。



Aspergillus oryzae is a useful filamentous fungus in Japanese fermentation industry, and is capable of producing abundant secretory proteins. It has been suggested that localized protein expression at the hyphal apical region plays a significant role for protein secretion. However, molecular mechanisms of the mRNA localization in filamentous fungi remain unclear. In our previous study, we found that mRNA localization is different for each protein by smFISH. Here, we report the visualization of mRNAs in *A. oryzae*-living cells.

We used MS2-MCP system, which enables to visualize mRNAs in living cells as a single molecule using RNA-binding protein (MCP) and MCP-binding sequence (MBS). In this study, we selected *amyC* encoding α-amylase as a target mRNA. We constructed a strain that harbored the MBS sequence between stop codon and 3'UTR of *amyC* by using Cre/loxP system. Then, we expressed enhanced green fluorescent protein (EGFP)-fused MCP, in the resultant strain of which we observed *amyC* mRNA localization.

We have succeeded to visualize *amyC* mRNAs as single molecules by MS2-MCP system. In the presentation, we will report further analyses of localization and dynamics of *amyC* mRNAs in living *A. oryzae* cells.

Aspergillus oryzae, mRNA, live cell imaging

発表責任者：守田湧貴（moritayuuki.795@gmail.com）

講演番号：3A05-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

Aspergillus nidulans のα-1,3-グルカン生合成におけるα-アミラーゼ AmyD の GPI アンカーの重要性

GPI anchor is essential for the function of α-amylase AmyD for α-1,3-glucan biosynthesis in *Aspergillus nidulans*

○宮澤 拳[1,2]、竹内 歩[2]、小泉 亜未[2]、吉見 啓[3,4]、山形 洋平[5]、阿部 敬悦[2,4]([1]感染研真菌部、[2]東北大院農、[3]京大院農、[4]東北大 NICHe、[5]東京農工大院農)
○ Ken MIYAZAWA[1,2], Ayumu TAKEUCHI[2], Ami KOIZUMI[2], Akira YOSHIMI[3,4], Youhei YAMAGATA[5], Keietsu ABE[2,4] ([1]Dep. Fungal Infection, NIID, [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ., [5]Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. of Agr. and Tech.)

真菌の GPI アンカー型タンパク質は、細胞膜上に局在したのち糖転移酵素の機能により細胞壁中に移行することが知られている[1)]。また、真菌の細胞壁再構築において、GPI アンカー型糖質加水分解酵素は必須の役割を担う[2)]。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の GPI アンカー型α-アミラーゼ AmyD は細胞壁多糖α-1,3-グルカン（AG）の合成量に対して負に働くことが示されていた[3)]。我々は、AmyD が AG 分子量も減少させることを示している[4)]。上述の背景から、AmyD による AG の分子量減少には GPI アンカーを有して発現されることが必要条件である可能性が考えられた。そこで本研究では、AG 生合成における AmyD の GPI アンカーの重要性を検証することを目的とした。まず、*amyD* 遺伝子破壊（Δ*amyD*）株を親株として、*amyD* を ORF 全長（$amyD^{OE}$(full)）または C 末端側の GPI アンカー結合サイト以降を削って高発現させる（$amyD^{OE}$(ΔGPI)）株をそれぞれ作製した。$amyD^{OE}$(full)株は、細胞壁 AG が親株に比べて顕著に減少していた一方、$amyD^{OE}$(ΔGPI)株では親株と同等であった。また、AG 高発現株に対して $amyD^{OE}$(full)株および $amyD^{OE}$(ΔGPI)株を作製し AG 分子量を評価したところ、$amyD^{OE}$(full)株でのみα-1,3-グルカンの分子量が顕著に低下した。これらのことから、AG の生合成において AmyD が機能するには GPI アンカーの存在が必須であることが明らかになった。

It is known that fungal glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins localize on the plasma membrane, and then are transferred to the cell wall[1)]. GPI-anchor type glycosyl hydrolases have an essential role for cell wall remodeling[2)]. An GPI-anchored α-amylase AmyD shows the negative effect for cell wall α-1,3-glucan biosynthesis in *Aspergillus nidulans*[3)]. We previously revealed that AmyD decreased the molecular mass of α-1,3-glucan[4)]. We here constructed the $amyD^{OE}$(full) and $amyD^{OE}$(ΔGPI) strains, and evaluated the role of the GPI anchor for α-1,3-glucan biosynthesis. The amount of α-1,3-glucan was decreased only in the $amyD^{OE}$(full) compared to the parental (Δ*amyD*) strain. In addition, the molecular mass of α-1,3-glucan was significantly decreased in the $amyD^{OE}$(full), but not in $amyD^{OE}$(ΔGPI) under α-1,3-glucan-overexpressing conditions. These results suggest that GPI anchor is essential for the function of AmyD for α-1,3-glucan biosynthesis.

1) Vogt et al., PNAS 2020, 117:22061-22067; 2) Li et al., J. Fungi 2018, 4:19; 3) He et al., Mol. Microbiol. 2014, 91:579-595; 4) 日本農芸化学会 2019 年度大会講演要旨集 1C1p02

α-1,3-glucan, cell wall, GPI anchor

発表責任者：阿部　敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：3A05-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

麹菌 *Aspergillus oryzae* における推定新規選択的オートファジー関連タンパク質の機能解析

Functional analysis of a putative selective autophagy-related protein in *Aspergillus oryzae*

○西尾 譲一郎、武田 陽一、菊間 隆志（立命大生命）
○Joichiro NISHIO, Yoichi TAKEDA, Takashi KIKUMA (Ritsumeikan Univ.)

選択的オートファジーは真核細胞内において特定のタンパク質やオルガネラを液胞に輸送し分解する機構である。一般的に選択的オートファジーの選択性は分解基質がもつ特異的なレセプタータンパク質と隔離膜上に存在する Atg8 が結合することにより生じると考えられているが、麹菌をはじめとする糸状菌において、これらのレセプタータンパク質を含む選択的オートファジーに関連するタンパク質は殆ど同定されていない。そこで本研究は、麹菌 AoAtg8 結合タンパク質の同定、新規選択的オートファジー関連タンパク質の機能解析を目的とした。

TAP (tandem affinity purification)法により AoAtg8 結合タンパク質の精製を行い、得られたタンパク質を LC-MS/MS および MASCOT 検索により同定した。その中から、機能未知である AO090011000108 を推定新規選択的オートファジー関連タンパク質（AO108）として抽出した。AO108 の局在解析を行ったところ、通常の生育条件下ではドット状構造に局在し、炭素源枯渇条件下ではドット状構造に加えて、大きなカップ状構造へ局在した。これらの構造は AoAtg8 と共局在していたことから PAS および隔離膜であることが示唆された。また一部はペルオキシソームにも局在した。AO108 の破壊株を作製し、表現型の解析を行ったところ野生型と大きな違いはなく分生子形成にもほとんど差異はなかった。これらのことから、AO108 はペルオキシソームを選択的に分解するペキソファジーをはじめとする選択的オートファジーに関与する可能性が示唆された。

Selective autophagy is a mechanism in eukaryotic cells for degradation of specific organelles and proteins. In general, specificity of cargo recognition in the process is due to interactions between Atg8 and cargo receptor proteins. However, few selective autophagy-related proteins, including receptor proteins, have been identified in filamentous fungi. In this study, we intend to identify selective autophagy-related proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Using the tandem affinity purification (TAP) method and LC-MS/MS, we identified AoAtg8 binding proteins. AO090011000108 screened as a putative selective autophagy-related protein (AO108) was localized to PAS-like dot structures in the cytoplasm under the growth condition. Under carbon starvation conditions, it was localized to large cup-shaped isolation membranes. Some of the dot structures also localized to peroxisomes. Furthermore, we generated AO108 gene disruption strains and performed phenotypic analysis. There was no significant difference in conidiation between the disruptants and WT. These results suggest that AO108 may be related to selective autophagy including pexophagy.

Aspergillus oryzae, selective autophagy, Atg8

講演番号：3A05-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

マイクロ流体デバイスで示す外部環境に応じた糸状菌の伸長方向制御

Analysis of hyphal chemotropism using microfluidic devices

○山本 里穂、福田 紗弓、高谷 直樹、竹下 典男（筑波大 / 微生物サステイナビリティ研究センター(MiCS)）
○Riho YAMAMOTO, Sayumi FUKUDA, Naoki TAKAYA, Norio TAKESHITA (Tsukuba Univ. / MiCS)

糸状菌は菌糸を伸ばして生長し，先端生長と分岐によりネットワーク状の菌糸体を形成する。生長の際，多くの酵素を細胞外に分泌して有機物を分解し，栄養を吸収する。糸状菌はより良い環境を探すため，外部シグナルを感知して菌糸の生長速度や方向，分岐を制御する「屈性」を示すと考えられているが，その機構は未解明のままである。本研究では菌糸の栄養源に対する屈性を細胞レベルで調べるためにマイクロ流体デバイスを構築し，液体培地を流した流路内で糸状菌を培養しながら，顕微鏡で菌糸生長の観察を行なった。デバイスの 2 つの入り口から異なる溶液を流すと隣り合った 2 層の層流となる。このうち一方は炭素源，窒素源などを含み，他方は含まないように設定して菌糸を生育させた。ライブイメージングの結果，*Aspergillus nidulans* の菌糸が培地中に含まれる栄養源や特定の pH に対してその方向に向かう屈性を示すことを明らかにした。菌糸はグルコースやリン酸，ミネラルに対して正の屈性を示し，一方で硝酸イオンやアンモニウムイオンに対しては，それを避けるように生長する負の屈性を示した。さらに pH4 に対して顕著な屈性を示し，形質膜上のプロトンポンプをコードする *pmaA* のノックダウン株ではその屈性応答が弱まった。植物病原糸状菌 *Fusarium oxysporum* でも屈性が見られるものの，*A. nidulans* と異なる応答を示した。糸状菌の屈性の理解と制御は，菌糸状の生長様式と密接に関連するバイオ産業や医学，農業分野への貢献が期待される。

Filamentous fungi grow by extending hyphae and form network-like mycelium by tip growth and branching. They secrete many enzymes extracellularly to break down organic matter and absorb nutrients. Filamentous fungi are thought to have "chemotropism" that controls the growth rate, direction, and branching of hyphae by sensing external signals, but the mechanism remains unclear. In this study, we constructed a microfluidic device to investigate the chemotropism of hyphae to nutrient sources at the cellular level. We observed hyphal growth under a microscope where two streams are next to each other. We revealed that the hyphae of *Aspergillus nidulans* show chemotropism toward the nutrient source and a specific pH. The hyphae showed positive tropism to glucose, phosphate and minerals, while they showed negative tropism to nitrate and ammonium ions that grew to avoid it. In addition, they showed significant tropism to pH 4. *Fusarium oxysporum* also showed tropism, but they showed a different response from *A. nidulans.*

Microfluidic devices, Chemotropism, *Aspergillus nidulans*

講演番号：3A05-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

糸状菌リボソームペプチド生合成因子の細胞内局在
Compartmentalized biosynthesis of fungal ribosomal peptides in fungal hyphae

○梅村 舞子[1]、栗岩 薫[1]、加藤 薫[2]、町田 雅之[3]、五味 勝也[4]([1]産総研生物プロセス、[2]産総研バイオメディカル、[3]金工大工、[4]東北大院農)
○Maiko Umemura[1], Kaoru Kuriiwa[1], Kaoru Katoh[2], Masayuki Machida[3], Katsuya Gomi[4] ([1]AIST, BPRI, [2]AIST, BMRI, [3]KIT, [4]Tohoku Univ.)

Ustiloxin は糸状菌 *Ustilaginoidea virens* および *Aspergillus flavus* が産生する環状ペプチドであり、糸状菌で初めてのリボソームペプチド (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides; RiPPs) の例である [1]。その生合成クラスは Fungi 界に広く多様に保存されており [2,3]、化合物骨格構造を形成する前駆体タンパク質が、小胞体への移行シグナルペプチドとゴルジ体局在ペプチダーゼ KexB 認識サイトでの高度な繰り返し構造を持つ特徴を持つ。KexB で切断された前駆体ペプチドは、環化因子 UstYa/Yb およびチロシナーゼ UstQ によって環化された後、さらに 5 つの酵素によってノルバリン修飾等を受けて細胞外へ分泌されるが、これらの複雑な修飾が細胞内のどこで行われるかは不明である。この点を明らかにするため、今回 ustiloxin 生合成に関わる 9 つのタンパク質に蛍光タンパク質を融合し、共焦点顕微鏡にて細胞内局在を観察した。

初めに UstYa に緑色蛍光タンパク質を融合し、mCherry 蛍光タンパク質を融合したオルガネラ局在マーカータンパク質との共局在を観察した。その結果、UstYa は特定の細胞内小器官に局在することが分かった。次に UstYa 以外の 8 つの生合成タンパク質に mCherry 蛍光タンパク質を融合し、それぞれ UstYa との共局在を観察した。すると、環化に関わる UstYa/Yb/Q と輸送体 UstT は同じ小器官に局在するが、それ以外の 5 つの修飾酵素は細胞質に存在することが分かった。また環化因子を含む小器官が、約 5 μm/s の速度で細胞内を直線的に移動する様子が観察された。

以上の結果から、ustiloxin は、ゴルジ体で切り出された前駆体ペプチドが特定の小器官へ輸送されて環化された後、細胞質内を移動しながら最終構造へ生合成される機構が示唆された。

Ustiloxin is a cyclic peptide produced by *Aspergillus flavus* and *Ustilaginoidea virens*, as the first example of RiPPs in Ascomycetes. Its precursor peptide has a signal peptide to endoplasmic reticulum and a highly repeated sequence at the recognition site of the KexB protease located in Golgi apparatus. To elucidate the location and timing of ustiloxin biosynthesis in cells, we fused UstYa, the cyclization factor of ustiloxin biosynthesis, with green fluorescent protein and analyzed colocalization of UstYa with mCherry-fused organelle marker proteins or eight other ustiloxin biosynthetic proteins. [1] Umemura et al., *Fungal Genet. Biol.*, 68:23-30, 2014, [2] Nagano et al., *Fungal Genet. Biol.*, 86:58-70, 2016, [3] Umemura, *Fungal Biol. Biotechnol.*, 7:11, 2020.

Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide, Compartmentalized biosynthesis, Fungal secondary metabolite

発表責任者：梅村舞子（umemura-m@aist.go.jp）

講演番号：3A05-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Sec14 ファミリータンパク質欠損がもたらすオルガネラと細胞壁への影響

Effects of the defects of Sec14 family proteins on the organelle and cell wall of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

○楊 淳児[1]、須澤 徹生[1]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携)
○ Chuner YANG[1], Tetsuki SUZAWA[1], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、特にその頭部の構造により、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルイノシトール (PI)などに分類される。これらのリン脂質の合成酵素はそれぞれ特有なオルガネラに局在しており、各々の生体膜間でリン脂質が輸送されることは不可欠である。生体膜間リン脂質輸送において、小胞輸送に依存しないリン脂質輸送が知られており、それに関わるタンパク質は脂質輸送タンパク質 (LTP)と呼ばれる。LTP の一種である Sec14 は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、PI や PC を輸送するタンパク質として知られる。*S. cerevisiae* には、5 つの Sec14 ホモログである Sfh (Sec-fourteen homolog)タンパク質群が存在するが、Sfh タンパク質の欠損は *S. cerevisiae* の生育に大きな影響を与えないことが知られていた。我々は糸状菌 *Aspergillus nidulans* における Sfh タンパク質群の役割に着目し、オルソログをコードする 9 つの遺伝子（*sfhA*～*sfhI* と命名）のうち *sfhA* と *sfhE* の破壊株について解析を行った。その結果、*sfhA* 破壊株は大幅な生育の遅れ、分生子形成効率の低下を示すこと、*sfhE* 破壊株は分生子の保存中の生存率の低下を示すことを報告した(1)。今回、残りの 7 遺伝子について単独欠損株の作製と解析を行い、*sfhB* の破壊株は細胞壁ストレス誘導薬剤に対して耐性化することが示された。一方、*sfhA* 破壊株についてはミトコンドリアが異常な形態を示すことも明らかとなった。これらの結果から、*A. nidulans* において種々の Sfh タンパク質が生育に重要な機能を持つことが示唆された。

Sec14 is a protein known to transport phospholipids. *S. cerevisiae* has five Sec14 homologs (Sfh1-5, Sec-fourteen homolog 1-5); the loss of Sfh proteins does not significantly affect the growth of *S. cerevisiae*. We have focused on the functions of nine Sfh protein-encoding genes (*sfhA – sfhI*) in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* and reported that the *sfhA* deletion mutant showed a marked growth retardation and the reduction of conidiation efficiency and that the *sfhE* deletion mutant showed the reduction of germination rate of old conidia (1). Here, we constructed and characterized the other 7 *sfh* deletion mutants. Growth of the *sfhB* deletion mutant was resistant to the cell wall stress-inducing drugs. In addition, we found that the *sfhA* deletion mutant formed mitochondria with abnormal morphology. These results suggest that various Sfh proteins play important roles in the growth and morphogenesis of *A. nidulans*.

1. 楊ら、日本農芸化学会 2021 年度大会 講演番号 2B02-12

Aspergillus nidulans, phospholipid, Sec14

講演番号：3A05-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* のα-1,3-グルカン合成酵素遺伝子の同定と機能解析

Identification and functional analysis of α-1,3-glucan synthase gene in *Pleurotus ostreatus*

○名和 義順[1]、河内 護之[1]、中沢 威人[1]、坂本 正弘[1]、阿部 敬悦[2]、田中 千尋[1]、吉見 啓[1]、本田与一[1] ([1]京大院・農、[2]東北大院・農)

○Yoshinori NAWA[1], Moriyuki KAWAUCHI[1], Takehito NAKAZAWA[1], Masahiro SAKAMOTO[1], Keietsu ABE[2], Chihiro TANAKA[1], Akira YOSHIMI[1], Yoichi HONDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tohoku Univ.)

糸状菌の細胞周囲を覆う細胞壁は、菌糸成長を行い生存する上で必須の構造である。糸状菌の中でも特に真性担子菌の細胞壁を構成する多糖は、薬理作用や機能性材料への応用面で注目され、その構造を改変する技術が求められている。しかしながら、真正担子菌の細胞壁生合成やその合成制御機構はほとんど明らかとなっていない。本研究では、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* をモデルとして細胞壁中の α-1,3-グルカン (α グルカン) 構造に着目し、その合成酵素遺伝子の同定と機能解析を行った。

まず、*Aspergillus oryzae* の α グルカン合成酵素遺伝子 (*ags*) をクエリーとした BLAST サーチにより、ヒラタケでは 1 つのホモログ遺伝子 *ags1* が同定された。続いて、ヒラタケ 20b 株 (*ku80* 破壊株) を用いて、*ags1* を相同組換えにより遺伝子破壊した。細胞壁構成単糖の分析を行った結果、*ags1* 破壊株では α グルカン含量の顕著な低下が確認された。また、電子顕微鏡を用いた観察により、細胞壁が有意に薄くなると共に、菌糸が細くなり菌糸密度が低下していることが明らかとなった。さらに、*ags1* 破壊株ではキチン及びβグルカン合成阻害剤に対する感受性の増大が観察された。以上の結果から、*ags1* は α グルカン合成に寄与し、ヒラタケの適切な細胞壁形成に必要であることが明らかとなった。

The cell wall of filamentous fungi is an essential structure for hyphal growth. The cell wall polysaccharide in Agaricales has been reported several beneficial characters as pharmacological agents and the material production. However, the regulation and biosynthesis of cell wall in Agaricales has not been elucidated well. In this study, we focused on the α-1,3-glucan (α-glucan) structure in the cell wall of *Pleurotus ostreatus*. The biosynthetic genes were identified, and their functions were analyzed.

From a result of BLAST search using α-glucan synthase (*ags*) genes from *Aspergillus oryzae* as a query, a homolog named *ags1* was identified in *P. ostreatus* genome. This gene was disrupted in the 20b strain (*ku80* disruptant) by homologous recombination. Analysis of the cell wall constituted monosaccharides displayed that the α-glucan content of the Δ*ags1* strain was significantly reduced. Electron microscopy observation of the Δ*ags1* strain showed thinner cell wall and hyphae and reduced hyphal density. In addition, increased sensitivity against chitin and β-glucan synthesis inhibitors was observed in the Δ*ags1* strain. These results suggest that *P. ostreatus ags1* contributes cell wall integrity of *P. ostreatus* through the formation of α-glucan.

cell wall, α-1,3-glucan, *Pleurotus ostreatus*

講演番号：3A05-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

COPII 小胞輸送を制御する遺伝子の探索と機能解析

Screening and functional analysis for genes that regulate COPII vesicle trafficking

○中里 光希、池田 敦子、船戸 耕一 (広大院　統合生命)
○Mitsuki Nakazato, Atsuko Ikeda, Koichi Funato (Hiroshima Univ)

細胞が正常に機能するためには、細胞小器官の間でのタンパク質や脂質の輸送が厳密に制御されている必要がある。そのため、様々な輸送のしくみが細胞内には存在しており、小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う COPⅡ小胞を介した輸送もその一つである。当研究室の先行研究から、COPII 小胞の形成は、小胞体膜上のホスファチジン酸濃度感知機構を介した転写抑制によって調節されていることが明らかになっている。しかし、COPⅡ小胞の形成に関わる転写因子（Ino2/Ino4）の標的遺伝子は不明である。そこで本研究では、*IN02/IN04* 破壊株のマイクロアレープロファイルをもとに、機能的な網羅的スクリーニングを行なった。その結果、COPⅡ小胞の形成に関与する因子が小胞体膜上に局在することが知られている機能未知タンパク質 Yip3 であることを発見した。さらに、Yip3 と物理的相互作用を示す Reticulon タンパク質も COPⅡ小胞の形成に関与することが示唆された。

Transport of proteins and lipids among cell organelles must be tightly regulated to maintain organelle homeostasis. After translation and translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum (ER) lumen, folded cargo proteins are transported towards the Golgi apparatus.　This anterograde transport is mediated by the formation of COPII vesicles that bud from the ER. Our recent studies showed that COPII vesicle formation is regulated by transcription factors Ino2/Ino4, which are controlled by phosphatidic acid level in the ER membrane. However, the target genes involved in COPII vesicle formation are unknown. In this study, we have carried out a functional screening based on the profiles of microarray of Ino2/Ino4 deleted cells. The results suggest that Yip3 and its binding proteins reticulons are candidate proteins involved in regulating COPII vesicle formation.

Saccharomyces cerevisiae, Gene, Lipid

講演番号：3A05-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

土壌微生物と共存する新規ウイルス様粒子の生物学的意義
Biological significance of the phage tail-like nanostructures produced by soil bacteria
○永久保 利紀[1,2]、浅水 俊平[3,4]、山本 達也[1]、豊福 雅典[1,2,5]、野村 暢彦[1,2]、尾仲 宏康[3,4] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・MiCS、[3]東京大院・農、[4]東京大・CRIIM、[5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in Life Sciences)
○ Toshiki NAGAKUBO[1,2], Shumpei ASAMIZU[3,4], Tatsuya YAMAMOTO[1], Masanori TOYOFUKU[1,2,5], Nobuhiko NOMURA[1,2], Hiroyasu ONAKA[3,4] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, [3]The Univ. Tokyo, [4]CRIIM, [5]SunRiSE)

土壌などの自然環境中では、多種多様な微生物が密集し、細菌や真菌からなる複雑な微生物生態系を形成している。そのような環境においては、限られた栄養源などをめぐって、異種の微生物の間で激しい競争が生じていると考えられる。放線菌に属する *Streptomyces* は、土壌などに普遍的に存在する菌糸状のグラム陽性細菌である。本菌群は胞子形成を伴う独特な生活環を有し、その形態分化は抗生物質をはじめとする様々な二次代謝産物の生産と深く関連している。近年、*Streptomyces* にはファージ(細菌に感染するウイルス)とよく似た一連の遺伝子群が高度に(94 種/116 種の解読済ゲノム)保存されていることが明らかになってきた。これらの知見は、本菌群においてファージ様遺伝子が重要な生物学的意義を有することを示唆するが、それらの遺伝子を破壊しても表現型には全く変化が見られないことから、15 年以上にわたって上記遺伝子群の存在意義は不明のままであった。

そこで、我々は上記ファージ様遺伝子群の生物学的意義の解明を目的として研究を開始した。様々な培養条件を検討した結果、ファージ様遺伝子を破壊した放線菌(*S. lividans*)のコロニーが、真菌(酵母)によって深く侵略されることを見出した(Nagakubo *et al. Sci. Rep.* 2021)。さらに、本菌におけるファージ様遺伝子の転写レベルは、酵母との接触により増加した。加えて、遺伝子操作と局在解析を通じて、上記遺伝子群の産物がファージ尾部に似た粒子を形成し、この粒子が菌糸内に局在することが分かった。さらに詳細な機能解析を進めたところ、上記粒子は真菌の増殖阻害には寄与せず、むしろ酵母コロニーとの接触面で生じうる細胞表層ストレスへの耐性に寄与していることが強く示唆された。これらの結果は、なんらかのきっかけを通じて感染能力を失ったファージが、微生物間競争を生き抜く上での利点をもたらすナノ粒子として放線菌ゲノムに定着してきたことを示唆している。

Streptomyces are soil bacterial which are known for their unique life cycle and the abilities to produce various antibiotics. Although genomic analyses have revealed that phage related-genes are highly conserved among *Streptomyces*, their biological significance have remained unknown because of the absence of phenotypic differences between the gene deletion mutants and the parental strain. Here, we show that the colony of the *S. lividans* strains lacking the phage-related genes are severely invaded by fungi. These genes encode the phage tail-like nanostructures that localize within *S. lividans* mycelia. Loss of the phage-related genes led to the increased sensitivity to cell envelope stresses which could occur in the microbial competition.

Phage tail-like nanostructures, Streptomyces, Microbial competition

発表責任者：永久保 利紀（nagakubo.toshiki.gp@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A05-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム A

加熱式たばこが有する化学・生物学的特徴の理解

Understanding the Chemical and Biological Characterization of Aerosols Generated from Heated Tobacco Products

○橋爪 恒夫、谷本 美智子、石川 晋吉、高橋 智裕、福島 俊朗（日本たばこ産業株式会社　製品評価センター)
○Tsuneo HASHIZUME, Michiko TANIMOTO, Shinkichi ISHIKAWA, Tomohiro TAKAHASHI, Toshiro FUKUSHIMA (Scientific Product Assessment Center, Japan Tobacco Inc.)

近年、加熱式たばこ（Heated Tobacco Products、以下 HTP）は世界的に普及しつつあり、その健康影響に関心が高まっている。HTP はたばこ葉の燃焼を伴わず、加熱によりベイパーを発生させる機構が特徴であるが、その加熱温度は製品間で異なる。

本発表では、4 種の HTP（加熱温度 約 40～350℃）と紙巻たばこ 1R6F について、機械喫煙により発生させたたばこベイパー /たばこ煙を対象とした化学分析および *in vitro* 試験結果を報告する。化学分析では、カナダ保健省がたばこ製品に対して報告を義務付けている煙中成分を参考に 48 成分を分析した。*in vitro* 試験としては、Ames 試験、小核試験、細胞毒性試験、ToxTracker アッセイ、酸化ストレスアッセイを実施した。化学分析の結果から、HTP ベイパー中の検出可能な成分数 種類およびそれらの量は、加熱温度依存的に増加する傾向が認められた。1R6F と比較した場合、いずれの HTP においても検出成分は種類、量ともに少なかった。*in vitro* 試験の結果でも、一部の HTP が細胞毒性や酸化ストレス応答を示すものの、いずれの HTP も生物学的レスポンスは 1R6F に対して顕著に弱い傾向にあることが分かった。

今回の結果から、HTP から発生されるベイパーは従来のたばこ煙と比較して、化学的・生物学的特徴が異なると確認されたので、今後も他の非臨床および臨床試験による網羅的な検討を通じて、ヒトへの健康影響の理解を深めたい。

There has been increasing interest in the biological effects of heated tobacco products (HTPs) because of their increasing popularity worldwide. HTPs are designed to heat rather than combust tobacco, thus producing vapor.

In this study, we compared the chemical profiles and biological effects of vapors from four types of HTPs with those of the 1R6F reference cigarette smoke. Chemical analyses revealed that the kind and amount of constituents detected in the HTP vapors were lower than those of 1R6F cigarette smoke and that there were differences among the four HTP vapors. The results of *in vitro* tests revealed that HTP vapors showed less biological potential compared with 1R6F cigarette smoke, and some HTP vapors showed responses in a cytotoxicity test or test systems where oxidative stress response was triggered.

The overall results indicated that the chemical profiles and biological effects of the HTP vapors were different from those of 1R6F cigarette smoke.

Heated tobacco products, Chemical profiles, Biological effects

発表責任者：橋爪 恒夫（tsuneo.hashizume@jt.com）

講演番号：3A06-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

大腸菌の Trk 系 K トランスポーターの機能解析

Distinct property of two types of Trk K^+ transport system in *Escherichia coli*

○Ellen[1]、星 直美 [1]、古田 忠臣 [2]、山本 兼由 [3]、辻井 雅 [1]、石丸 泰寛 [1]、魚住 信之 [1] ([1] 東北大学大学院工学研究科、[2] 東京工業大学 生命理工学院、[3] 法政大学生命科学部生命機能学科)
○ Ellen[1], Naomi Hoshi[1], Tadaomi Furuta[2], Kaneyoshi Yamamoto[3], Masaru Tsujii[1], Yasuhiro Ishimaru[1], Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Biomolecular Engineering Dept., Tohoku Univ., [2]Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Inst Technol., [3]Dept of Frontier Bioscience, Hosei Univ.)

生物の種類を超えて K は細胞内の主要元素であり，細胞内浸透圧，体積維持，酵素活性化，膜電位形成, 物質の共輸送などに重要となる．数種類の K トランスポーターは大腸菌で最初に同定され，大腸菌にその原型となる遺伝子が存在している．これまでに，私たちは大腸菌の Kup 系 K トランスポーター（Kup/HAK/KT 系）が Rb や Cs も輸送することで、低 K 濃度環境で生体を維持することを報告した．Kup 系と膜貫通構造が異なる Trk/Ktr/HKT 系の K トランスポーターも，大腸菌のほか，藍藻，酵母，植物において機能しており，耐塩性，浸透圧調節などのストレス応答に重要である．大腸菌には TrkG と TrkH の 2 種類の Trk が K 輸送体として機能しているが，その詳細な性質は不明である．今回，両輸送体について解析を行い，それぞれの特徴と生理的役割について検討した．大腸菌の多重 K 輸送体遺伝子変異株を作成して TrkG と TrkH の輸送活性を調べたところ, 輸送活性化に必要な条件や他のイオンの影響に違いが見いだされた.

Escherichia coli (*E. coli*) transport potassium ion (K^+) into the cell through three major classes of K^+ uptake systems: Kdp, Trk, and Kup. Kup mediated other cations as well as K^+, whereas Kdp and Trk are K^+ specific transport system (Sato et al. J. Biochem. 2014, Tanudjaja et al. Sci. Rep 2017). Moreover, the Trk system consists of two different pathways: TrkG and TrkH, both are homologous proteins with very similar predicted structures. Hence TrkG characteristics are usually often generalized from TrkH. *E. coli* Trk transporters belong to the Trk/Ktr/HKT family that can be found in various species of bacteria, fungi, and plants. K^+ transporters in this family are characterized by their distinct secondary structure that consists of four repetitions of the membrane-pore-membrane motif. Trk/Ktr/HKT transporters play important roles in K^+ and or Na^+ transport and abiotic stress response. To date, the information regarding the characteristics that differentiates *E. coli* TrkG and TrkH, including their Na^+-dependence largely remain to be unknown. In this research, we evaluated the Na^+-dependence of both TrkG and TrkH and other factors that differentiate their K^+-transport activity in *E. coli*. To study the K^+-uptake activity of TrkG or TrkH without the interference of the other K^+ uptake system, we have created *E. coli* triple knockout K^+ transporter mutants and performed K^+-uptake measurement. We found some distinct characteristics and similarity of the transport activity between TrkG and TrkH.

potassium transporter, *Escherichia coli*, K^+ uptake

講演番号：3A06-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

細胞膜脂肪酸組成が大腸菌の Na^+/H^+アンチポーター活性に与える影響

Effect of membrane lipid fatty acid composition on activity of Na^+/H^+ antiporter from *E. coli*.

○堀 一将[1,2]、篠田 恵子[1,3]、浜本 晋[1,3]、氏原 哲朗[2]、川崎 寿[1,3]、富田 武郎[1,3]、西山 真[1,3]（[1]東大院・農生科・アグテック、[2]協和発酵バイオ、[3]東大・微生物連携機構）
○Kazumasa HORI[1,2], Keiko SHINODA[1,3], Shin HAMAMOTO[1,3], Tetsuro UJIHARA[2], Hisashi KAWASAKI[1,3], Takeo TOMITA[1,3], Makoto NISHIYAMA[1,3] ([1]Univ. Tokyo, [2]Kyowa Hakko Bio, [3]Univ. Tokyo CRIIM)

膜タンパク質はエネルギー生産や物質輸送などの重要な役割を担う。脂質二重膜で機能するという特性上、その活性は生体膜脂質の性質に影響を受けることが推察される。これまでに生体膜を構成するリン脂質のヘッドグループの組成により活性に影響があることが報告されているが、リン脂質のもう一つの構成因子である脂肪酸に着目した研究は少ない。我々は脂肪酸組成も膜タンパク質の活性に影響し得ると考え、大腸菌の Na^+/H^+アンチポーターをターゲットにその検証を行った。

不飽和脂肪酸合成酵素の遺伝子発現を制御する *fabR* 遺伝子、及びシクロプロパン脂肪酸合成に関わる *cfa* 遺伝子を破壊し、破壊株細胞膜の脂肪酸組成を飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、シクロプロパン脂肪酸に分けて解析した。その結果、*cfa* 遺伝子破壊によりシクロプロパン脂肪酸の消失と不飽和脂肪酸の増加が、*fabR* 遺伝子破壊により不飽和脂肪酸の増加および飽和脂肪酸の減少が観察された。破壊株の Na^+/H^+アンチポーター活性を測定したところ、その活性は破壊株によって異なり、飽和脂肪酸／シクロプロパン脂肪酸比と強い相関が認められた。さらに、脂肪酸組成の異なる Na^+/H^+アンチポーター発現株をアルカリ条件下で培養すると、アンチポーター活性に応じた生育の差が確認された。本結果は脂肪酸組成が膜タンパク質の活性を制御しうることを示している。

Membrane proteins are involved in various cellular processes including signal and energy transduction. Since membrane proteins function as imbedded in the lipid bilayers, their activities may be affected by the properties of membrane lipids. In fact, it is known that the composition of the head group of membrane phospholipids affects activities of some membrane proteins. Fatty acid, another constituent of phospholipids, also shows a variety in chain length or unsaturation; however, few studies have focused on the effect on fatty acid composition on membrane protein activities. Here, we analyzed the relationship between fatty acid composition and the activity of a membrane protein, Na^+ / H^+ antiporter in *E. coli*, using mutant strains, each with a knockout of fatty acid synthesis-related gene. We found change in the activity of Na^+ / H^+ antiporter depending on change in the fatty acid composition. Furthermore, the activity of Na^+ / H^+ antiporter shows a strong negative correlation with the ratio of cyclopropane fatty acid/ saturated fatty acid. These results suggest that the membrane protein activity can be regulated through the fatty acid composition in the cellular membrane.

fatty acid composition, Na^+/H^+ antiporter, cyclopropane fatty acid

講演番号：3A06-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

Na^+および K^+に着目した酸性ストレス下での大腸菌細胞内 pH 調節機構の解明

Mechanism of intracellular pH regulation in *E.coli* under acidic stress focusing on Na^+ and K^+

○臼田 隆亮[1]、須藤 雅己[2]、蓮池 祐紀[2]、安江 虹輝[3]、住田 和弥[2]、福田 紘子[3]、片岡 正和[2]([1]信大工、[2]信大院　総合理工　生命医工、[3]信大工　物質化学)
○ RYUUSUKE USUDA[1], MASAKI SUTO[2], YUKI HASUIKE[2], KOKI YASUE[3], KAZUYA SUMIDA[2], HIROKO FUKUDA[3], MASAKAZU KATAOKA[2] ([1]Fac. Eng., Shinshu Univ., [2]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., [3]Dep. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ.)

細菌の細胞内 pH は外部 pH が大きく変化しても厳密に制御されており、大腸菌の場合、pH7.2-7.8 の狭い範囲で調節されている。細胞内 pH の制御は、細胞培養や酵素反応を伴う生体プロセスにおいて、基本的ながら非常に重要なパラメータである。今日までの研究から、特に細胞内 pH がアルカリ化すると、その制御には Na^+/H^+アンチポーター（*nhaA*）の関与が示唆されている。本研究では、酸性条件下における定常期およびそれ以降の大腸菌の育ちによる外部環境変化への細胞内 pH 恒常性の違いを速度論的に描写することを目的とした。環境因子として重要な外部の塩に着目し、大腸菌を Na^+ 饑餓培地と K^+饑餓培地でそれぞれ育てた場合の外部 pH 変化に対する Na^+/H^+アンチポーターの応答速度変化を観察した。研究手法として先行研究で開発した pH 感受性蛍光タンパク質である RP2（Ratiometoric pHluorin2）を細菌内で発現させることにより、蛍光分光光度計を用いて非侵襲かつ連続的に細菌細胞内 pH を測定した。特に大腸菌 K-12 株及び Δ*nhaA* 株、Δ*nhaB* 株を対象とし、細胞内外に Na^+非存在環境下または K^+非存在環境下で外部 pH を pH6.0 へ急激に変化させた際の細胞内 pH の挙動をモニタリングした。その結果、NhaA が NhaB よりも大腸菌の細胞内 pH 調節に関与していることが明らかとなり、また NhaA の他に K^+を介した細胞内 pH 調節機構が存在することが示唆された。

In this study, we aimed to describe kinetically the differences in intracellular pH homeostasis in response to external environmental changes by growing *E. coli* during stationary phase and beyond under acidic conditions. We focused on external salt, which is an important environmental factor, and observed the kinetic changes in the response of Na^+/H^+ antiporter to external pH changes when *E. coli* were grown in Na^+ starvation medium and K^+ starvation medium, respectively. By expressing RP2 (Ratiometoric pHluorin2), a pH-sensitive fluorescent protein developed in a previous study, we measured intracellular pH non-invasively and continuously using a fluorescence spectrophotometer. In particular, we monitored the intracellular pH alternation of *E. coli* K-12, Δ*nhaA* and Δ*nhaB* strains when the external pH was rapidly changed to pH 6.0 in the absence of Na^+ or K^+ inside or outside the cells. The results showed that NhaA was more involved in the intracellular pH regulation of *E. coli* than NhaB, suggesting the existence of a K^+-mediated intracellular pH regulation mechanism in addition to NhaA.

Intracellular pH, Fluorescent proteins, pH homeostasis

発表責任者：臼田 隆亮（ryuusuke_u@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A06-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

酸性条件下における細胞内 pH 調節機構の解明

Elucidation of the intracellular pH regulation mechanism of E. coli in acidic condition

○福田 紘子[3]、須藤 雅己[2]、臼田 隆亮[1]、住田 和弥[2]、深田 悠太[2]、片岡 正和[2]([1]信州大工、[2]信州大院　総合理工　生命医工、[3]信州大工　物質化学)

○HIROKO FUKUDA[3], MASAKI SUTOU[2], RYUSUKE USUDA[1], KAZUYA SUMIDA[2], YUTA FUKADA[2], MASAKAZU KATAOKA[2] ([1]Fac. Eng., Shinshu Univ., [2]Dep. Bioeng., Grad Sch. Sci. tech., Shinshu Univ, [3]Dep. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ.)

大腸菌は代表的な好中性細菌である。大腸菌の細胞内 pH は、外部環境 pH が変化した際でも中性に維持されている。細胞内 pH の維持は、生化学反応が正常に起きるために必要不可欠な要素の一つである。先行研究より、細胞内 pH の調節に Na^+/H^+アンチポーター(NhaA, NhaB, ChaA)の関与が示唆されている。しかし、Na^+/H^+アンチポーター欠損株は、外部 pH が変化した際にも生育する。このことから別の細胞内 pH 調節機構が存在する可能性がある。そこで、本研究の目的を酸性条件下における大腸菌細胞内 pH 調節機構の解明とした。

本研究では、網羅的な探索のために大腸菌全遺伝子単一欠失株(Keio collection)と高精度菌体生育測定システム(Colony-live system)を用いた。Keio collection を酸性の寒天培地で生育させ、増殖動態を Colony-live system によって定量化した。結果、酸性条件下における細胞内 pH 調節候補遺伝子を選定することができた。

E. coli is a typical neutrophilic bacterium. The intracellular pH of E. coli is regulated to neutral although the pH of the external environment changes. The regulation of intracellular pH is one of the essential factors for habitual biochemical reactions. Previous studies have suggested the involvement of Na^+/H^+ antiporters (NhaA, NhaB, ChaA) is important for the regulation of intracellular pH. However, Na^+/H^+ antiporter-deficient strains can grow when the external pH is changed. This suggests that there may be another intracellular pH regulation mechanism. Therefore, the aim of this study was to elucidate the intracellular pH regulation mechanism of E. coli in acidic condition.

In this study, we could determine candidate genes for intracellular pH regulation under acidic conditions. We used single-gene knockout mutants (the Keio collection) and a high-throughput method for measuring microbial colony growth kinetics (the Colony-live system). Each strain of the Keio collection was grown in medium of acidic conditions, and the growth kinetics were quantified by the Colony-live system.

intracellular pH regulation mechanism, acidic condition, Colony-live system

講演番号：3A06-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

“Evaluation of the effect of cyclic-di-GMP inhibitors on biofilm formation of critical pathogens, Clostridium perfringens and Clostridioides difficile”

○SHAMMI AKTER, MEGUMI KISHIMOTO, RYO ITO, JIRO NAKAYAMA (Kyushu University)

Introduction: *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* are gram-positive pathogenic bacteria causing gas gangrene, enteritis, nosocomial gastrointestinal disorders respectively. They encode genes for di-guanylate cyclase (dgc) enzymes involved in the circulation of cyclic di-GMP as intracellular secondary messenger. The cellular concentration of cyclic di-GMP has a proportional relation with the biofilm formation. The purpose of this study is to screen and evaluate the cyclic-di-GMP inhibitors mitigating biofilm formation and virulence of *C. perfringens* and *C. difficile*.

Materials and Methods: Anti-cancerous drug, doxorubicin, and nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP), GTP, NaCl, and KCl which have been reported as cyclic di-GMP inhibitors were selected to evaluate the biofilm formation in *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* strains. Biofilm biomass is quantified using crystal violate staining method and the activity of diguanylate cyclase enzyme was analyzed by activity of DGC & PDE assays.

Results and Discussion: The results of quantification of biofilm biomass and PDE and DGC activities after the treatment of tested compounds suggest that doxorubicin decreases the cyclase activity of DGC and SNP increases the transcription of the gene encoding PDE, leading to a decrease in the c-di-GMP level and dispersal of biofilm formation in *C. perfringens.* Doxorubicin was found to induce the biofilm formation in *C. difficile* strains, while SNP, GTP, NaCl, & KCl obviously inhibited biofilm formation in hypervirulence strain, *C. difficile* R20291, but did insignificantly against less virulence strain, *C. difficile* 630.

These findings imply that the inhibition of cellular cyclic-di-GMP synthesis may influence biofilm development in *Clostridium perfringens*; nevertheless, there may be a link between virulence-related quorum sensing and cyclic-di-GMP in *Clostridium difficile* biofilm formation.

Biofilm, cyclic-di-GMP, Inhibition

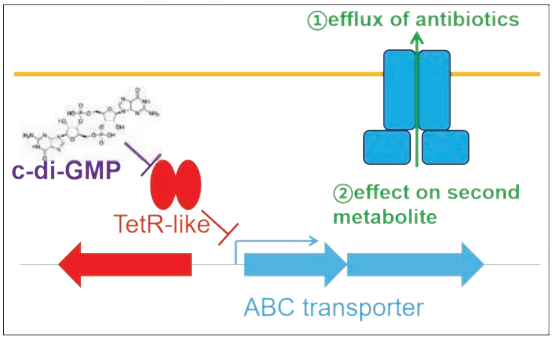
発表責任者：Nakayama Jiro（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A06-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

セカンドメッセンジャー・c-di-GMP を介した放線菌薬物排出機構の発見

Discovery of actinobacteria drug efflux mechanism mediated by second messenger c-di-GMP

○LEI YUKUN、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院・農）
○Yukun LEI, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka (The Univ. of Tokyo)



放線菌は卓越した特殊代謝能力を有するが、同じ土壌ニッチに生息する他放線菌が作る外来抗生物質からどのように防御しているかは未解明のままである。*Streptomyces* 属放線菌には TetR 様リプレッサー遺伝子と ABC トランスポーター遺伝子がセットで存在するオペロンが複数見出される。我々は *S. coelicolor* A3(2) において TetR 様リプレッサー遺伝子（*sco1718*）の破壊により ABC トランスポーターの発現が活性化され、放線菌の二次代謝産物生産が低下することを前回大会で報告した。その後の研究により、ABC トランスポーター高発現株は複数の外来抗生物質に対し耐性を獲得することが明らかになった。*S. coelicolor* A3(2)には三つの相同性を有する遺伝子カセット（*sco4358-60* と *sco5382-84*）が存在し、これらも抗生物質耐性に寄与することが明らかになった。広範囲の外来二次代謝産物に対して包括的に適合・制御する仕組みがあると予想し、セカンドメッセンジャーをリガンドとして認識するかを試験した。ゲルシフトアッセイを行った結果、c-di-GMP の添加により、TetR 様リプレッサー（SCO1718、SCO4358）は結合配列と解離することが明らかになった。c-di-GMP は、細菌のバイオフィルム形成、病原性、細胞分化などの多様なプロセスを制御する[1]。*Streptomyces* 属においては c-di-GMP はその濃度の減少を BldD が感知し形態分化を制御するが[2]、本研究において c-di-GMP は転写リプレッサーのリガンドとして薬剤排出ポンプの発現を直接的に制御し、外来抗生物質への耐性に寄与することや、また二次代謝制御にもの何らかの関与が存在することを示唆した。

We have previously reported the deletion of *sco1718*, a TetR-family transcription factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2), resulted in the high expression of ABC transporter and reduced production of secondary metabolite. Afterwards we investigated two more similar cassettes (*sco4358-60* and *sco5382-84*), and found all of them contributing to increased resistance against many antibiotics. *In vitro* EMSA assay revealed the dissociation of the two transcription factors and their binding sequence upon the addition of second messenger c-di-GMP, which has been reported to regulate various metabolic processes. Our results indicated the direct control by c-di-GMP on drug efflux pumps to regulate antibiotic resistance and secondary metabolite.

[1]Römling, U. *et al*. (2013). *Microbiol Mol Biol Rev*, **77**(1), 1-52. [2]Gallagher, K. *et al*. (2020). *Mol Cell*, **77**(3), 586-599.

Streptomyces coelicolor, drug resistance, second messenger

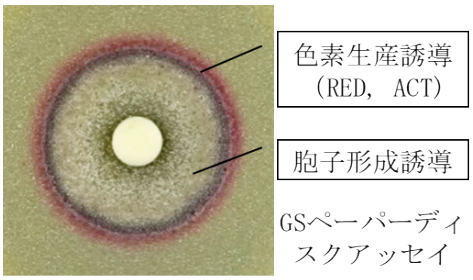
講演番号：3A06-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

放線菌に対して生育阻害や二次代謝・胞子形成誘導を起こすペプチド系抗生物質 goadsporin の作用機構解析

Analysis on mechanism of action of goadsporin, a peptide antibiotic targeting growth, secondary metabolism, and sporulation in actinomycetes

○河野 佐知子、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Sachiko KAWANO, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

Streptomyces sp. TP-A0584 から発見されたリボソーム翻訳後修飾型ペプチド goadsporin（GS）は、広範囲の放線菌に対して高濃度で生育阻害、低濃度で二次代謝及び胞子形成促進作用を示す（右図）[1]。GS は分泌及び膜蛋白質の局在化に関わるシグナル認識粒子（SRP）の主要因子である Ffh に対し、分泌シグナルとの競争阻害により、阻害作用を示すことが示唆されている[2]。



GSペーパーディスクアッセイ

SRP を標的とする阻害剤はこれまでに報告がなく、本研究では GS によって二次代謝が誘導される機構を明らかにするために、*ffh* に変異を持つ 5 株の GS 耐性株を取得し、遺伝子相補実験と GS アッセイを用いて変異型 Ffh と GS による色素生産誘導の関係を解析した。いずれの変異も Ffh のシグナルペプチド結合に関与する部位に存在し、野生型 Ffh を変異型 Ffh に変換した株の色素生産誘導の有無は株によって異なったことから、*ffh* 変異の種類によって GS と Ffh の親和性に差があることが示唆された。また、野生型 Ffh と変異型 Ffh が共存する株ではいずれも色素生産・胞子形成誘導が起こったことから、GS と Ffh の相互作用により SRP 機能が阻害されることが生育阻害のみならず色素生産・胞子形成誘導にも関与していることが明らかになった。現在、SRP 阻害によって起こる蛋白質分泌阻害及びリボソームにおける翻訳阻害がこれらの誘導を引き起こすという仮説の下、解析を行っている。

Goadsporin (GS) is a ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides which was isolated from *Streptomyces* sp. TP-A0584. GS not only inhibits growth but also promotes secondary metabolism and morphological differentiation in sublethal concentration against a broad range of actinomycetes. The molecular target of GS is indicated to be Ffh, a major component of SRP, which is essential for nascent protein localization. In this study, we screened GS resistant mutants and found five mutants with mutations in *ffh* gene. All the mutations were located proximal to the signal sequence binding groove. Our genetic studies suggested that formation of GS-Ffh complex leads to pigment production. Detailed mechanism whether involving secretion of protein or ribosome stalling for the pigment production is under investigation.

[1] H. Onaka et al. *J. Antibiot.* 54:1036-1044 (2001), [2] H. Onaka et al. *Microbiology*. 151:3923-3933 (2005)

antibiotics, secondary metabolism, mechanism of action

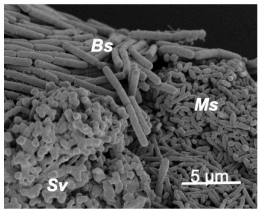
発表責任者：尾仲宏康（aonaka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

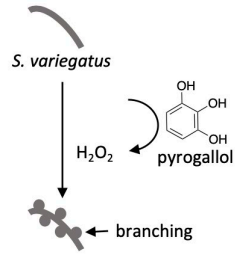
新規な放線菌分枝誘導物質の発見

Investigation of novel Streptomyces branching inducer

○加藤 愛美[1]、浅水 俊平[1,2]、尾仲 宏康[1,2] ([1]東大院農、[2]CRIIM)
○Manami KATO[1], Shumpei ASAMIZU[1,2], Hiroyasu ONAKA[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM)



三菌対峙面での*Sv*の分枝形成の発見



放線菌は菌糸状に生育し、不定期に分枝を形成する細菌である。放線菌 *Streptomyces variegatus* HEK138A (*Sv*) とミコール酸含有細菌 *Mycolicibacterium septicum* HEK138M (*Ms*)、枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 (*Bs*)の 3 者相互作用において、*Sv* の分枝が誘導されることを発見した。分枝形成は *Bs* が生産する 2,3-DHBA を *Ms* が変換することによって生じる pyrogallol によって誘導されることを前回大会で報告した。pyrogallol は自動酸化によって過酸化水素を発生することが知られており、分枝形成の誘導も過酸化水素が原因であることが考えられた。pyrogallol 存在下で catalase を加え、発生した過酸化水素を分解する条件において、*S. griseus* の分枝誘導はほぼ抑制され、また過酸化水素を添加すると pyrogallol 添加時と同様に分枝誘導されることが観察された。以上の結果から、pyrogallol による分枝形成の誘導が過酸化水素によることを明らかにした。過酸化水素は高濃度では細胞の損傷を引き起こすが、低濃度ではシグナル分子として働くことが知られており、放線菌には過酸化水素を感知して栄養菌糸のネットワークを分枝によって拡大する機構が存在することが示唆された。

We have intvestigated the interaction between *Streptomyces variegatus* HEK138A (*Sv*), *Mycolicibacterium septicum* HEK138M and *Bacillus subtilis*. We previously reported that significant hyphae branching are formed at the interaction area on *Sv* by triple culture. Pyrogallol was identified as one of the substance responsible for the hyphae branching. In this study we further investigated the mechanism of hyphae branching. Pyrogallol is known to produce hydrogen peroxide (H_2O_2) by its autooxidation. Therefore, we hypothesized that H_2O_2 is the substance for the induced hyphae branching. Catalase was added to the slide culture containing pyrogallol to breakdown the generated H_2O_2. Hyphae branching of *S. griseus* was tested and it showed normal growth with no induced hyphae branching. We then added H_2O_2 to the culture and *S. griseus* showed induced hypae branching comparable to the addition of pyrogallol. Our result revealed that H_2O_2 is the substance that induce hyphae branching. *Streptomyces* spp. mav developed response mechanism to expand filamentous network by H_2O_2 as environmental signal.

pyrogallol, hydrogen peroxide, bacterial communication

講演番号：3A06-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3 (2)におけるミコチオールを介した細胞内 NO の恒常性制御

MSH maintains NO homeostasis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)

○吉住 友希[1]、渋井 佑生子[2]、小川 卓矢[2]、伊藤 晋作[1,2]、矢嶋 俊介[1,2]、佐々木 康幸[1,2] ([1]東農大生命、[2]東農大農)
○ Tomoki YOSHIZUMI[1], Yukiko SHIBUI[2], Takuya OGAWA[2], Shinsaku ITO[1,2], Shunsuke YAJIMA[1,2], Yasuyuki SASAKI[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture - Life Science, [2]Tokyo Univ. of Agriculture - Agriculture)

放線菌は土壌中に生息するグラム陽性菌である。近年、我々は *Streptomyces coelicolor* A3 (2) M145 において、硝酸、亜硝酸、NO が循環する窒素酸化物循環経路を見出した。本経路で生産される NO は抗生物質生産のシグナル分子として働く。細胞内での NO の過剰濃度の蓄積は細胞障害等を引き起こすため、厳重に制御される必要があるが、本菌ではその詳細は不明である。放線菌は低分子チオール化合物であるミコチオール (MSH)を生産することが知られており、一般的にチオール基は NO とニトロソ体を形成するため、細胞内での NO と MSH の関係を検証した。

興味深いことに MSH 合成能欠失株 (Δ*mshC*) では、野生株に比べてタンパク質のニトロソチオール体が蓄積し、細胞内 NO 量が減少した。また、本菌は NO 依存性の二成分制御系を有しており、これは細胞内 NO 生産に関する遺伝子群を制御している。Δ*mshC* 株において、これらの遺伝子発現が低下しており、細胞内 NO の恒常性に異常が生じたことが考えられた。加えて抗生物質生産量も低下した。これらの結果は、本菌の正常な生活環を維持するために、MSH が細胞内 NO の恒常性を維持していることを示唆している。

Recently, we found the nitric oxide metabolic pathway, circulating nitrate, nitrite and NO, in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) M145. The generated NO induces to produce antibiotics. Since NO is high reactive molecule, cells must regulate the NO concentration strictly. It is known that actinomyces produce mycothiol (MSH), the low molecular weight thiol compound. Generally, thiol groups bind to NO easily. Therefore, we studied the relation between MSH and NO.

The Δ*mshC* strain, the strain lacking the MSH synthetic ability, accumulated the nitrosated protein and reduced intracellular NO compared to the wild type strain. This microorganism has a two-component regulatory system consisting of NO sensing sensor protein and its response regulator. The gene expression level controlled by this TCS was decreased, suggesting that the Δ*mshC* strain was unable to keep NO homeostasis. In addition, antibiotics production was decreased in the Δ*mshC* strain. These results suggest that MSH maintains NO homeostasis in *S.coelicolor* A3 (2).

homeostasis regulation, nitric oxide, Streptomyces coelicolor

講演番号：3A06-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)における、内在性 NO による鉄取り込み制御

Regulation of iron uptake by endogenous NO in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○杉本 聡、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸 (東農大院生命)
○Satoshi SUGIMOTO, Shinsaku ITO, Shunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of Agric.)

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株は、基底菌糸、気中菌糸、胞子を形成する複雑な形態分化と多様な二次代謝産物として抗生物質生産を行うグラム陽性細菌である。本菌は一酸化窒素ジオキシゲナーゼ（Fhb）、硝酸還元酵素（Nar）を介し、NO、硝酸、亜硝酸と変化する窒素酸化物循環経路をもつ。NO はシグナリング物質として用いられ、抗生物質生産と形態分化を制御することが示唆された。抗生物質生産と形態分化は多くの因子、環境中の微量物質が関わり、その一つに鉄（Fe）がある。本菌は環境中の鉄を獲得するため、キレート分子 Desferrioxamine（DFO）を生産する。

本研究において、細胞内 NO 濃度が上昇すると DFO 生産関連の遺伝子が発現上昇したことから、NO は DFO 生産を制御することが示唆された。また、DFO 非生産株では抗生物質生産が上昇し、形態分化が促進した。NO による DFO 生産制御は未だ解明されていないため本菌におけるこの機構の解明は重要である。そこで本菌おける内在性 NO とシデロフォア生産の関連性とその意義について検証した。

Actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145, gram positive bacterium, grow mycelium, develop spore and produce various antibiotics. *S. coelicolor* has nitrogen oxide cycle via nitric oxide dioxygenase (Fhb) and nitrate reductase (Nar). Our previous studies suggested that NO produced thorough the nitrogen oxide cycle act as a signaling molecule to regulate antibiotic production and morphological differentiation. Many environmental and trace substances are involved in secondary metabolism and morphogenesis. To acquire environmental iron, *S. coelicolor* produce chelate molecule Desferrioxamine (DFO).

In this study, we found that NO induced the gene expression level of DFO synthesis. In addition, a deletion of DFO synthesis gene affected on antibiotic production and morphological differentiation. These results suggest that NO regulates iron acquisition, and this mechanism is important to maintain cell life stages in *S. coelicolor* A3(2) M145.

Homeostatic regulation, Nitric oxide, Streptomyces

講演番号：3A06-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム A

コリネ型細菌が放出する膜小胞を介した鉄輸送の解析

Membrane vesicles-mediated iron transport in *Corynebacterium glutamicum*

○川島 花雪[1]、永久保 利紀[2,3]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3,4]([1]筑波大院・生物資源、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター、[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences (SunRiSE))
○ Kayuki KAWASHIMA[1], Toshiki NAGAKUBO[2,3], Nobuhiko NOMURA[2,3], Masanori TOYOFUKU[2,3,4] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Faculty of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability: MiCS Univ. Tsukuba, [4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences (SunRiSE))

多くの細菌は生体膜に由来する膜小胞(Membrane vesicle: MV)を細胞外に放出し、細胞間で様々な物質を伝達しながら生育している。MV の内容物は核酸やタンパク質など多種多様であり、抗生物質耐性の付与や宿主の免疫調節など受け取った細胞のさまざまな生物学的プロセスにおいて多様な機能を発揮する。MV による物質伝達は産生、運搬、伝達という一連の流れで生じる。これまでに、MV の形成や物質の運搬についてはグラム陰性菌・グラム陽性菌のモデル生物において理解が進んでいる。また、最近では、通常のグラム陽性菌とは大きく異なる複雑な細胞表層構造を有するミコール酸含有細菌においても、MV 形成に関する知見が蓄積されつつある。そこで、我々はミコール酸含有細菌のモデル生物の一種である *Corynebacterium glutamicum* を対象として、本菌の生産する MV が有する機能について解析を進めてきた。これまでに、我々は合成培地中で *C. glutamicum* が細胞外に外膜由来の MV を放出することを見出している(Nagakubo *et al. iScience* 2021)。加えて、この条件で産生される MV は、生命活動に必須な元素である鉄を吸着して菌体へと輸送できることを明らかにしてきた。そこで、*C. glutamicum* における MV を介した物質伝達のメカニズムの解明を目指して、次のような解析を行なった。MV を鉄溶液と混合し、密度勾配遠心によって鉄を吸着した MV を精製・分画した。その結果、密度の異なる MV 画分の間で鉄の吸着量に違いが見られたことから、MV の組成や構造が MV を介した鉄獲得に影響する可能性が示唆された。また、鉄を含む MV の添加に対する *C. glutamicum* 細胞の応答に関する種々の解析結果についても発表予定である。本研究で得られた知見は、微生物における MV 受け取りメカニズムの解明の一助となることが期待できる。

Membrane vesicles (MVs), which are mainly composed of lipid bilayers and proteins, have diverse biological functions such as bacterial communication, resistance to antibiotics and phages, and immunomodulation of the host. These functions have been well understood in Gram-negative and Gram-positive bacteria. In recent years, several MV functions have also been found in mycolic acid-containing bacteria (MCB) that are Gram-positive bacteria with distinct cell envelope structure including a thick cell wall and an outer-membrane (mycomembrane). We previously found that MVs produced by *Corynebacterium glutamicum*, one of the model organisms of MCB, can mediate iron acquisition from the extracellular space in this bacterium. In this study, we aimed at elucidating the mechanism of a MV-mediated iron acquisition in this bacterium. Our results suggest that compositions and structures of MVs affect the MV-mediated iron acquisition. Our findings would help elucidate the mechanism of MV functions in MCB and other bacteria.

membrane vesicles, mycolic acids-containing bacteria, iron acquisition

発表責任者：川島花雪（kawashima.u.tsukuba@gmail.com）

講演番号：3A08-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* における酸素耐性株の取得と解析
Isolation and characterization of oxygen-tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

○山本 裕司、磯 奏子、前田 一蕗、奥島 彩歌、喜島 真子、川口 祐果、柳 俊太朗、向井 孝夫（北里大獣）
○Yuji YAMAMOTO, KANAKO ISO, ICHIRO MAEDA, AYAKA OKUSHIMA, MAKO KIJIMA, YUKA KAWAGUCHI, SYUNTARO YANAGI, TAKAO MUKAI (Kitasato Univ.)

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* は、動物の消化管に棲息するビフィズス菌の中で酸素に耐性を示す数少ない菌種であり、そのストレス耐性の高さから生菌が必要とされるプロバイオティクスで広く利用されている。しかし、その高い有用性にも関わらずストレス耐性機構に関する知見は非常に限られている。本研究では、*B. lactis* JCM 10602 株の酸素耐性変異株を分離・解析することで、本菌の酸素ストレス耐性に関与している遺伝子の同定を試みた。

酸素耐性変異株の取得条件を検討した結果、変異剤（1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine）で処理後、微好気条件で寒天培地を用いて選抜を行うことで、微好気条件下でコロニーを形成できる酸素耐性株を 3 株取得することができた。取得した酸素耐性株は液体培地では好気的条件での増殖能が向上していなかったため、さらに同様の選抜方法を用い、液体培地でも酸素耐性能が向上した株を 2 株取得した。最初に分離した 3 株のゲノム解析を行った結果、2 株で共通して推定転写制御因子に変異が認められた。変異の位置は共通しており、終止コドンがトリプトファンに置き換わることでアミノ酸が 37 残基伸長していた。次に、この推定転写制御因子の変異が酸素耐性に関与しているか検討するため、野生型と変異型の推定転写制御因子を、pAM1-P_{GAP} を用いて、*B. lactis* の酸素耐性株に導入した。その結果、野生型の推定転写制御因子を導入した株は微好気条件での増殖が低下したが、変異型の推定転写制御因子を導入した株では、微好気条件下での増殖の向上が確認された。液体培地での酸素耐性能が向上した株でも 1 株では同じ推定転写制御遺伝子に変異が認められたことから、本推定転写制御因子は本菌の酸素耐性に関与していると考えられた。

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* is a few oxygen-tolerant species among animal-gut resident bifidobacteria, and widely used as probiotics due to its high tolerant ability to multiple stress. However, molecular mechanisms of tolerance to multiple stress including oxidative stress in *B. lactis* are mostly unknown. In this study, we tried to identify several gene(s) involved in oxygen tolerance of the bacterium using oxygen-tolerant mutants derived from *B. lactis* JCM 10602.

Bifidobacteria, Oxidative stress, Probiotics

発表責任者：山本裕司（yyamamot@vmas.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3A08-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

L. plantarum P1-2 株の酸化ストレス防御機構に関する研究

The mechanisms of anti-oxidative stress in *Lactobacillus plantarum* P1-2

鈴木 智典[1]、○奥山 貴人[1]、相本 健吾[1]、松永 一太[1]、渡邊 昭夫[1]、武田 晃治[1]、野村 佳歩[1]、阿部 晃[2]、新村 洋一[1]、内野 昌孝[1] ([1]東京農大、[2]ミシガン大)

Tomonori SUZUKI[1], ○ Takato OKUYAMA[1], Kengo AIMOTO[1], Itta MATSUNAGA[1], Akio WATANABE[1], Kouji TAKEDA[1], Kaho NOMURA[1], Akira ABE[2], Youichi NIIMURA[1], Masataka UCHINO[1] ([1]Tokyo University of Agricultute, [2]University of Michigan)

過酸化物は好気代謝を営む生物の生体内で生成され、様々な疾病、老化などの原因となる。以前、過酸化脂肪酸を還元する乳酸菌、*Lactobacillus plantarum* P1-2 株（*L. plan.* P1-2 株）を単離し、線虫、ラットに投与したところ、抗酸化ストレス効果が観察された(1)。本菌の過酸化物還元活性は加熱処理により消失し、ラットにおけるその生理活性は死菌体で消失することから、本菌の過酸化物還元活性は酵素に起因すると推定された。実際、過酸化水素もしくは過酸化脂肪酸を還元する 2 種の酵素が本菌から精製、単離された(2)。両酵素タンパクとも、NAD(P)H を電子供与体とし、過酸化物を還元するが酸化グルタチオンを還元しなかった。

L. plan. P1-2 株の同属同種でグルタチオン産生(Al-Madboly L. A.*et al.*, 2017) や glutathione peroxidase(Tang W. *et al.*, 2017)の報告がある。そこで本研究では、グルタチオンを含まない半合成培地を用いて *L. plan.* P1-2 株を好気振とう培養もしくは嫌気培養後、集菌、フレンチプレスにより無細胞抽出液を調製し、*L. plan.* P1-2 株のグルタチオン産生およびグルタチオン関連酵素に関する検討を行った。グルタチオン産生供試菌 *Saccharomyces cerevisiae* 小麦株を Wickerham 合成培地にて好気振とう培養、集菌、分析系比較対照として使用した。

Hydroperoxides are produced during aerobic metabolism, which cause of oxidative stress leading to several diseases. Previously, we successfully isolated the *Lactobacillus plantarum* P1-2 strain (*L. plan.* P1-2) that can efficiently reduce environmental alkyl hydroperoxides and fatty acid hydroperoxides to their corresponding hydroxy derivatives through a 2-electron reduction (1). We observed that *L. plan.* P1-2 inhibited internal oxidative stress in the oxygen-sensitive short-lived nematode mutant and also colonic mucosa lipid peroxidation in rats(1). *L. plan.* P1-2 had two types of NAD(P)H hydroperoxide reductases (2).

Glutathione production (Al-Madboly L. A.*et al.*, 2017) and glutathione peroxidase activity.(Tang W. *et al.* 2017) reported in the same genus and same species of the *L. plan.* P1-2 strain. In this study, we have investigated the glutathione production and its related enzyme activity of *L. plan.* P1-2. (1) Watanabe A. *et al.*, *PLOS ONE*, 2020. (2) Takanami T. *et al.*, *The 2020 Annual Meeting of JSBA*, 2019.

Lactobacillus plantarum, Hydroperoxide reducing activity, Glutathione peroxidase

講演番号：3A08-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

Lactobacillus plantarum における莢膜相変異を介した複合バイオフィルム形成によるストレス耐性獲得機構

Mixed biofilm formation via phase-variation of capsular polysaccharides enhances stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*

○澁澤 薫[1]、江橋 由夏[1]、安部 公博[2]、野村 暢彦[2,3]、尾花 望[3,4] ([1]筑波大学大学院生命環境科学研究科生物資源科学専攻、[2] 筑波大学生命環境系、[3] 筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター、[4]筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センター)

○ Kaori Shibusawa[1], Yuka Ehashi[1], Kimihiro Abe[2], Nobuhiko Nomura[2,3], Nozomu Obana[3,4] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability（MiCS）, University of Tsukuba, [4]Transborder Medical Research Center, Faculty of Medicine, University of Tsukuba)

乳酸菌の一種である *Lactobacillus plantarum* はバイオフィルムを形成することにより殺菌剤に対する高い耐性能を獲得している。食品変敗菌である本菌を制御するためには、本菌のバイオフィルム形成およびストレス耐性獲得機構の理解が重要である。*L. plantarum* 環境単離株を寒天培地上に塗布すると厚く黄色い Compact colony (Cc) と平たく赤い Mucoid colony (Mc)が出現する。これまでの解析の結果、Cc と Mc の出現は、莢膜合成遺伝子群 *cps2* オペロン上流のプロモーター領域の逆位に起因することが明らかとなった。両者は可逆的に出現することから、実環境中では Cc と Mc から構成される複合バイオフィルムを形成することが推測される。本研究では、複合バイオフィルム形成を介した本菌のストレス耐性獲得機構の解明を目的とした。共焦点レーザー顕微鏡によって Cc と Mc の単独バイオフィルムを観察すると Cc は Mc より物質表面に対する付着性が高く、高いバイオフィルム形成能を有していた。Cc と Mc を 1:1 で混合した複合バイオフィルムを観察した結果、複合バイオフィルム中では Mc は Cc に覆われて局在していた。また、Cc と Mc の単独および複合バイオフィルム中のストレス耐性を評価したところ、Mc の酢酸に対する耐性が、単独と比較して複合バイオフィルム中で上昇していた。以上より、複合バイオフィルムでは Cc が Mc を覆う構造をとることにより、Mc をバイオフィルム中に保持するとともにストレスに対する生存率上昇にも寄与していると考えられた。本菌はバイオフィルム中に異なる性質の細胞を保持し、殺菌剤に対する耐性を上昇させることで集団全体の生存率を高める生存戦略を有することが推測された。

We previously found the phase variation of capsular polysaccharide (cps) in environmental isolates of *Lactobacillus plantarum*. We revealed two types of cells in the *L. plantarum* population: low-cps-producing cells (Cc) and cps-overproducing cells (Mc). In this study, we investigated the impact of Cc-Mc mixed biofilms on their stress tolerance. In the mixed biofilm, Cc is more abundant than Mc and surround Mc. We compared the stress tolerance of Cc and Mc and found that Cc has a higher tolerance to acetic acid. In contrast, Mc has a higher stress tolerance to ethanol. We found that Mc showed a higher stress tolerance to acetic acid in the mixed biofilm than in the monoculture biofilm. These results suggest that Mc cells are covered by Cc cells in the mixed biofilm, protecting Mc from environmental stresses. We presume that the phase variation of cps retains the cells with different properties in the biofilm and serves as a survival strategy in actual environments where the cells are exposed to various stresses.

biofilm, phase variation, capsular polysaccharides

講演番号：3A08-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

Lactobacillus paracasei のカフェインに対するストレス応答
Stress response to caffeine of *Lactobacillus paracasei*

○佐藤 裕謙[1]、水木 徹[2]、三浦 健[3] ([1]東洋大学・生命科学、[2]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター、[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所)
○Hiroaki SATO[1], Toru MIZUKI[2], Takeshi MIURA[3] ([1]Graduate School of Life Science, Toyo Univ., [2]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo Univ., [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo Univ.)

コーヒーの成分として知られているカフェインは、病原性細菌だけでなく、発酵や食品加工などで利用されている乳酸菌に対しても生育を抑制することがわかっている。乳酸菌は pH、温度、圧力、化学物質などの様々なストレスによって生育や菌体の形態、膜の脂肪酸組成などに影響を受ける。しかし、カフェインが乳酸菌に及ぼす影響に関する報告はほとんどない。そこで本研究においては *Lactobacillus paracasei* に対するカフェインの影響とそのメカニズムを解明することである。

L. paracasei NBRC 15889^T をカフェイン含有 MRS 培地で培養し、生育、菌体表面および脂肪酸組成への影響を調べた。カフェイン濃度 0～1.0%における NBRC 15889^T の生存率を算定したところ、0～0.3%で大きく減少し、0.4～1.0%で緩やかに減少していた。また、1.0%において菌体表面に損傷が観察され、菌体の脂肪酸組成も変化していた。これらの結果よりカフェインが複数の機構に影響を与えている可能性が示唆された。現在、これらの影響のメカニズムを解明している。

Caffeine, is known as a component of coffee, has antibacterial activity against not only pathogenic bacteria but also against beneficial bacteria those are used for fermentation, food processing and other industrial use. Environmental stresses, such as pH, temperature, pressure and chemical substance have various effect on the viability, surface form and composition of membrane of lactic acid bacteria. However, there are few reports on the effects of caffeine. Therefore, the aim of this study is to elucidate the effect of caffeine on *Lactobacillus paracasei* and its mechanism.

L. paracasei NBRC 15889^T was cultured in caffeine-containing MRS medium to investigate the effects on growth, bacterial surface and fatty acid composition. The viability of NBRC 15889T at caffeine concentrations of 0 to 1.0% was calculated to be greatly decreased at 0 to 0.3% and slowly decreased at 0.4 to 1.0%. The surface of the fungus was damaged at 1.0%, and the fatty acid composition of the fungus was also changed. These results suggest that caffeine may affect multiple mechanisms. We are currently investigating the mechanisms of these effects.

Lactobacillus, caffeine, membrane

講演番号：3A08-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

カフェイン耐性 *Lactobacillus paracasei* におけるクロロゲン酸の影響

Effect of chlorogenic acid against caffeine-resistant *Lactobacillus paracasei*

○髙久 美鈴[1]、佐藤 裕謙[2]、水木 徹[4]、三浦 健[1,2,3]（[1]東洋大・生命科学、[2]東洋大院・生命科学、[3]東洋大・ ライフイノベーション研究所、[4]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）
○Misuzu TAKAKU[1], Hiroaki SATO[2], Toru MIZUKI[4], Takeshi MIURA[1,2,3] ([1]Toyo University, [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University, [4]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景・目的】カフェインはコーヒー等に含有されており、覚醒作用があることで知られているが、人の腸内において有用な乳酸菌等の微生物に対して生育抑制効果を示すことも報告されている。当研究室において、カフェインに耐性のある *Lactobacillus paracasei* YSAK1 株と YKP4 株の単離に成功した。また、コーヒーに着目すると含有成分であるクロロゲン酸によって乳酸菌の生育が向上したとの報告もされている。そこで、本研究では乳酸菌の生育を抑制するカフェインと乳酸菌の生育を向上させるクロロゲン酸の組み合わせによるカフェイン耐性乳酸菌の生育への影響を明らかにした。
【結果・考察】3-カフェオイルキナ酸（3-CQA）、4-カフェオイルキナ酸（4-CQA）及び 5-カフェオイルキナ酸（5-CQA）の 3 種類を用いて生存率を測定したところ、標準菌株、YSAK1 株では 3 種類全ての添加によって生存率の向上が見られた。YKP4 株では、3-CQA、4-CQA 添加によって生存率の向上が見られた。また、各 3 種類とカフェインの組み合わせにおいて生存率を測定したところ、3 株ともに 5-CQA 添加のみカフェイン条件下と比較して生存率の向上が見られた。そこで、クロロゲン酸がカフェインによる生育抑制効果を軽減している可能性が考えられた。現在はクロロゲン酸の代謝に着目し、カフェイン存在下において代謝産物が乳酸菌に与える影響について研究を行っている。
【Background and Purpose】Caffeine is contained in coffee, and is known for its stimulant effect, but it has also been reported to have an inhibitory effect on the growth of microorganisms such as lactic acid bacteria (LAB). So, *Lactobacillus paracasei* YSAK1 and YKP4 strains that are resistant to caffeine was isolated in our laboratory. In addition, chlorogenic acid contained in coffee has been reported to improve the growth of LAB. In this study, we clarified the effect of the combination of caffeine that suppresses growth and chlorogenic acid that improves growth on caffeine-resistant LAB.
【Result and Discussion】The survival rate of LAB was measured using 3-CQA, 4-CQA, and 5-CQA. Three chlorogenic acids improved the survival rate of NBCR strain and YSAK1. In the YKP4 strain, the survival rate was improved by adding 3-CQA and 4-CQA. Interestingly, only 5-CQA improved survival of 3 strains in combination with caffeine.
Currently, we are focusing on the metabolism of chlorogenic acid and studying the effects of its metabolites on LAB in the presence of caffeine.

Lactobacillus, caffeine, chlorogenic acid

講演番号：3A08-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

壺造り純米黒酢より単離した *Acetobacter pasteurianus* の MVs の免疫賦活作用

Immunostimulatory activity of MVs produced by *Acetobacter pasteurianus* isolated from *Kurozu*.

○相松 光太[1]、石田 隼斗[1]、木村 友希[1]、藤井 暁[2]、長野 正信[2]、今井 友也[3]、倉田 淳志[1]、上垣 浩一[1] ([1]近畿大農、[2]坂元醸造株式会社、[3]京都大生存研)
○ Kota AIMATSU[1], Hayato ISHIDA[1], Yuki KIMURA[1], Akira FUJII[2], Masanobu NAGANO[2], Tomoya IMAI[3], Atsushi KURATA[1], Koichi UEGAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Sakamoto Kurozu, Inc, [3]RISH, Kyoto Univ.)

壺造り黒酢は、多様な微生物によって醸造され、機能性食品として注目されている。細菌は、membrane vesicles（MVs、粒径 50～200 nm）という、タンパク質を含む小胞を生産する。我々は、TEM 観察で黒酢もろみ末から MVs 様の構造体を検出した。そこで黒酢細菌の MVs に注目し、免疫賦活作用を評価した。

黒酢から MVs 生産菌 *Acetobacter pasteurianus* WSS-15 を単離した。本 MVs によってマクロファージから炎症性サイトカイン IL-6 の産生が誘導された。宿主細胞の Toll 様受容体（TLR）2 によって本 MVs は認識された。一方、我々は乳酸菌由来の MVs のタンパク質が TLR2 に認識されることを見い出している。同様に WSS-15 の MVs のタンパク質を同定し、本 MVs の TLR2 リガンドを推定した。

Kurozu has attracted attention as a functional food. Most bacteria release MVs containing bacterial proteins. We detected MVs-like structures in *kurozu moromi* powder. So, we isolated a MV-producing bacterium from *Kurozu* and evaluated an immunostimulatory activity of MVs from the bacterial isolate.

We obtained a MVs-producing bacterium, *Acetobacter pasteurianus* WSS-15, from *Kurozu* bacterial flora. MVs are detected by TEM observation. The production of a pro-inflammatory cytokine IL-6 from macrophage was induced by the MVs. The MVs was recognized by Toll-like receptor (TLR) 2 on host cells. We found that proteins in MVs of lactic acid bacteria are recognized by TLR2. Thus, we identified the proteins in *A. pasteurianus* WSS-15 MVs and estimated TLR2 ligands in the MVs.

Membrane vesicles, Acetic acid bacteria, Immunostimulatory activity

発表責任者：倉田淳志（kurata090401@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A08-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

壺づくり黒酢から Jurkat 細胞の増殖抑制作用を示す MVs 生産細菌の探索
Exploration of MVs-producing bacteria involved in antiproliferative activity of Jurkat cells from pot vinegar.

○石田 隼斗[1]、相松 光太[1]、木村 友希[1]、藤井 暁[2]、長野 正信[2]、今井 友也[3]、倉田 淳志[1]、上垣 浩一[1] ([1]近大農、[2]坂元醸造株式会社、[3]京大生存研)
○ Hayato ISHIDA[1], Kota AIMATSU[1], Yuki KIMURA[1], Akira FUJII[2], Masanobu NAGANO[2], Tomoya IMAI[3], Atsushi KURATA[1], Koichi UEGAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Sakamoto Kurozu, Inc., [3]RISH, Kyoto Univ.)

壺づくり黒酢は微生物によって醸造されるが、黒酢の微生物が生産する機能性成分には不明な点が多い。細菌が放出する membrane vesicles（MVs）は、細胞膜から成る小胞（粒径 50–100 nm）であり、多様な代謝産物を含む。我々は、黒酢から MVs を検出できた。そこで MVs を生産する細菌を黒酢から探索して、本 MVs による Jurkat 細胞への影響を検討した。

50 種類の黒酢発酵液から MVs を生産する 7 種類の細菌群集を見出して、3 種類の単離株を得た。単離株の MVs は、Jurkat 細胞に対して増殖阻害率>75%を示した。16S rRNA 遺伝子配列から、これらの単離株は *Limosilactobacillus fermentum* に分類できた。本 MVs によって、Jurkat 細胞においてミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ 3/7 の活性化、核の形態変化を確認できたので、細胞死の誘発が示唆された。

Kurozu contains functional compounds that produced by microbial flora. Bacteria release membrane vesicles (MVs, size 50-100 nm) containing bacterial metabolites. We detected MVs in *Kurozu*, explored MVs-producing bacteria, and investigated a growth inhibitory effect on Jurkat cells.

Seven bacterial communities producing MVs were obtained from 50 *Kurozu* microbial floras. We found three bacterial isolates that have >75% growth inhibition effect against Jurkat cells and are identified as *Limosilactobacillus fermentum* by 16S rRNA gene analysis. We detected mitochondrial dysfunction, activation of caspase 3/7, and altered nuclear morphology, suggesting that cell death of Jurkat cells is induced in the presence of *L. fermentum* MVs.

Membrane vesicles, Lactic acid bacteria, Cell death

発表責任者：倉田　淳志（kurata090401@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A08-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

Lactobacillus sp. RD055328 によって生産される膜小胞の特性

Characterization of membrane vesicles produced by *Lactobacillus* sp. RD055328

○竹内 慎平[1]、安井 萌香[1]、田村 健人[1]、倉田 淳志[1]、山崎 思乃[2]、今井 友也[3]、上垣 浩一[1]([1]近畿大農、[2]関西大化生工、[3]京都大生存研)
○Shimpei Takeuchi[1], Moeka Yasui[1], Kento Tamura[1], Atsushi Kurata[1], Shino Yamasaki-Yashiki[2], Tomoya Imai[3], Koichi Uegaki[1] ([1]Kindai Univ., [2]Kansai Univ. of Fac. Chem. Mater. Bioeng., [3]RISH, Kyoto Univ.)

乳酸菌は、タンパク質を含む膜小胞（Membrane vesicles ; MVs、粒径 50 nm 程度）を生産する。我々は MVs 生産菌 *Lactobacillus* sp. RD055328 株を見いだした。本菌株の MVs を用いて免疫細胞の応答を検討した。
まず透過型電子顕微鏡で本菌株の MVs を検出して、ナノ粒子トラッキング分析により MVs の粒子数と粒径を測定した。MVs 中にはタンパク質、核酸を検出できた。本菌株の MVs によって、Raw264 細胞からサイトカイン IL-6 の産生、パイエル板細胞から抗体 IgA の産生が誘導された。本 MVs 中に特徴的なタンパク質を見いだし、GAPDH と同定できた。GAPDH の異種発現系を構築して、GAPDH を精製した。精製 GAPDH によって Raw264 細胞と THP-1 細胞から IL-6 の産生を確認できたので、本 MVs の GAPDH によって免疫細胞が刺激されることが示唆された。

Lactic acid bacteria release membrane vesicles (MVs, size ca. 50 nm) containing proteins. We found MVs-producing *Lactobacillus* sp. RD055328 and investigated effects of the MVs on immune cells. MVs from the strain were detected by TEM observation. Nanoparticle tracking analysis revealed numbers and sizes of particles in the MVs. The production of a cytokine IL-6 from RAW264 cells and IgA from Peyer's patch cells was induced by the MVs. The specific protein in the MVs was identified as GAPDH by MALDI-MS analysis. GAPDH was heterologously expressed and purified. IL-6 was inducibly produced from Raw264 and THP-1 cells by purified GAPDH, suggesting that GAPDH in the MVs activates immune cells.

Membrane vesicles, Lactic acid bacteria, GAPDH

発表責任者：倉田　淳志（kurata090401@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A08-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

Streptococcus mutans におけるクオラムセンシングを介したメンブレンベシクルの産生と機能解析
Membrane vesicles production triggered by quorum sensing in *Streptococcus mutans*

○伊藤 碧美[1]、山本 千佳[2]、永沢 亮[3]、尾花 望[4,6]、野村 暢彦[5,6]、豊福 雅典[5,6,7]([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境科学研究科、[3]産総研・生物プロセス、[4]筑波大・医学医療系、[5]筑波大・生命環境系、[6]筑波大・MiCS、[7]SunRiSE)
○Tamami ITO[1], Chika Yamamoto[2], Ryo Nagasawa[3], Nozomu Obana[4,6], Nobuhiko Nomura[5,6], Masanori Toyofuku[5,6,7] ([1]College of Agro-Biological Resource Sciences, University of Tsukuba, [2]Degree Program in Agro-bioresources Science and Technology, University of Tsukuba, [3]Bioproduction, AIST, [4]Department of Faculty of Medicine, University of Tsukuba, [5]Department of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [6]MiCS, [7]SunRiSE)

多くの細菌は生体膜に由来する直径 20～400 nm 程度の微少な膜小胞(membrane vesicle;MV)を産生することが知られている。MV は主に脂質二重膜で構成される粒子であり、タンパク質や DNA などの細胞由来成分を内包する。これらの内包物質は MV によって外部環境から保護され、周囲の細胞へ輸送されることから、細菌の集団中のコミュニケーションに利用される。これまでの研究から、グラム陽性菌の MV の産生は細胞死を介しても行われることが明らかになっている。

主要な口腔細菌の一種である *Streptococcus mutans* は、シグナル分子を用いた細胞密度依存的な細菌のコミュニケーションとして知られるクオラムセンシング(quorum sensing;QS)によってオートリシン遺伝子の発現が誘導され、集団中の一部で細胞死を起こすことが知られている。そこで、私たちは、*S. mutans* において、QS による細胞死を介して MV 産生が引き起こされると考え、これを検証することとした。

まず、*S. mutans* に QS のシグナル分子を添加し培養したところ、産生される MV 量が増加することが示された。また、シグナル分子の添加の有無によって、MV に含まれる内包物、特にタンパク質の種類や DNA 量が異なることも確認することができた。MV の内包物が異なることから、QS を介して産生された MV と QS を介さずに産生された MV では、その機能性が異なる可能性が考えられる。

Many bacteria are known to produce membrane vesicles(MVs). MVs consist of the cellular membrane, and contains proteins and DNA, and are involved in bacterial communication. These cargos are protected by MVs and transported to other cells.

Previous studies showed that MVs can be produced via cell death. *Streptococcus mutans*, one of the major oral bacteria, is known to regulate cell death via Quorum sensing(QS). Therefore, we hypothesized that *S. mutans* QS can trigger MV formation, and examined it in this study.

First, we quantified the amount of MVs, and we found that the production of MVs increased when signal molecules are added. Second, we checked the contents of the MVs, for example, proteins and DNA, and we confirmed the types of proteins and the amount of DNA in MVs are different between the QS induced and the non-induced ones. Our results suggest that the functions of MVs differ between the QS induced and the non-induced ones.

membrane vesicles, quorum sensing, cell death

講演番号：3A08-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

小腸組織内共生細菌アルカリゲネス菌の産生する膜小胞とその内容物同定

Identification of membrane vesicles and their contents produced by *Alcaligenes*, a commensal bacterium in the small intestine

○柴田 納央子[1]、安藤 正浩[1]、堀井 俊平[2,3]、Ashok Zachariah Samue[1]、竹山 春子[1,2,3,4] ([1]早大ナノライフ創新研、[2]早大院先進理工、[3]産総研-早稲田 CBBD-OIL、[4]早大先進生命動態研)
○ Naoko SHIBATA[1], Masahiro Ando[1], Shumpei Horii[2,3], Zachariah Samue Ashok[1], Haruko Takeyama[1,2,3,4] ([1]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

アルカリゲネス菌は、小腸における主要な免疫誘導組織であるパイエル板の組織内部に共生する細菌である。これまでに我々は、アルカリゲネス菌が、パイエル板内において樹状細胞の内部に共生し、IgA 抗体の定常的な産生促進に寄与する一方で、共生関係の破綻により全身炎症を誘導することを明らかにしてきた。しかしながら、アルカリゲネス菌由来の生理活性分子やその動態については未解明であった。

本研究では、測定試料内の多種類の分子を非標識で検出・識別可能な共焦点ラマン顕微鏡を用い、アルカリゲネス菌由来生理活性分子の網羅的探索を行った。その結果、アルカリゲネス菌が、細菌のシグナル輸送体として知られる膜小胞を産生していることや、アルカリゲネス菌が産生する膜小胞内部には、短鎖脂肪酸が高濃度で封入されていることが明らかになった。短鎖脂肪酸は、腸内細菌の代表的な生理活性分子として知られているが、それらが膜小胞内部に封入されていることを報告した例はこれまでにない。以上の解析結果から、アルカリゲネス菌由来生理活性分子が、膜小胞を介して宿主へ輸送される可能性が示唆された。

Alcaligenes is a symbiont in the Peyer's patches, one of the major gut-associated lymphoid tissues in the small intestine. We previously identified that *Alcaligenes* resides within dendritic cells and contribute to IgA production via the appropriate activation of dendritic cells, and the impaired symbiosis induces inflammatory responses. However, the bioactive molecules derived from *Alcaligenes,* and their dynamics remain to be investigated.
Raman spectroscopy is a spectroscopic technique that can detect biomolecules in a sample without labeling. We applied a confocal Raman microscope and conducted a comprehensive search for bioactive molecules derived from *Alcaligenes*.

We found that *Alcaligenes* produce membrane vesicles known as bacterial signal transporters. We also identified that short-chain fatty acids are enriched in the membrane vesicles of *Alcaligenes*. Although short-chain fatty acids are typical bioactive molecules derived from intestinal bacteria, no reports indicate that they are encapsulated in membrane vesicles. These results suggest that bioactive molecules from *Alcaligenes* can be transported to the host via membrane vesicles.

commensal bacteria, Peyer's patches, membrane vesicles

講演番号：3A08-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム A

宿主腸内で腸内細菌叢が産生する膜小胞の解析

Bacterial membrane vesicles produced by gut microbiota in the mammalian host intestine

○菊地 薫[1]、尾花 望[2,3]、野村 暢彦[3,4] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・医学医療系・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]筑波大・生命環境系)
○Kaoru Kikuchi[1], Nozomu Obana[2,3], Nobuhiko Nomura[3,4] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. TMRC, Medicine, Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

腸内細菌叢は、免疫応答、栄養摂取など、宿主の疾患や健康に重要な役割を果たしている。腸内細菌を含む多くの細菌は、メンブレンベシクル（MV）と呼ばれる直径 20～400 nm の球状膜構造体を細胞外に放出し、核酸やタンパク質など多様な菌体成分を輸送する。これまでに腸内細菌が産生する MV の機能がいくつか報告されており、腸内で産生された細菌由来の MV は宿主の生理機能を調節すると示唆されている。一方、実際の腸管内においてどのような細菌種がどのような活性を有する MV を産生しているかについては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、腸内細菌叢に由来する MV を単離し、その機能を明らかにすることを目的とした。
まず、マウス糞便から MV を単離する手法を確立し、精製した MV 画分に MV 様構造と細菌由来 DNA が含まれていることを確認した。DNase 処理後も MV 画分の DNA が検出されたことから、MV の内部に含まれる細菌性 DNA が精製されていることが示唆された。腸内で MV を産生する細菌を特定するため、16S rRNA アンプリコンシーケンスにより、糞便由来 DNA と MV 画分由来 DNA の細菌叢を比較した。その結果、MV 由来の DNA では、いくつかの細菌分類群の相対的存在量が高いことがわかった。さらに、マウスの異なる週齢、異なる栄養条件において特異的に MV 画分で検出される細菌群を同定した。これらの細菌群は腸管内で MV を産生している可能性があり、現在その MV の宿主に対する機能を解析している。

Many bacteria, including gut bacteria, release membrane vesicles (MVs)to transport diverse bacterial components. Gut bacteria have been considered to produce MVs in the host intestine to regulate host physiological functions. However, how complex microbiota-derived MVs affect host physiology and disease remains largely elusive. Therefore, in this study, we aim to isolate MVs derived from the gut microbiota to clarify their functions. First, we established a method to isolate MVs from murine feces and confirmed that the purified MV fraction contained bacterial DNA. Bacterial DNA in the MV fraction was detected even after DNase treatment, suggesting that the bacterial DNA is contained inside MVs. To identify the gut bacteria that produce MVs in the intestine, we compared the taxonomic diversity between fecal or MV-derived DNA by 16S rRNA amplicon sequencing. The results showed that the relative abundance of some bacterial taxa was higher in MV-derived DNA. This suggests that this bacterial group is the primary producer of MVs in the gut. This study expands our knowledge of the potential for MV-mediated host-gut microbiota interactions.

membrane vesicle, gut microbiota, bacteria-host interaction

発表責任者：菊地薫（kikuchi.u.tsukuba@gmail.com）

講演番号：3B02-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

呼吸鎖変異大腸菌株を用いたグルコースからの GABA の高生産

Improved fermentative GABA production from glucose by inactivation of respiratory chain components in Escherichia coli.

○若原 洋輝、溝越 拓哉、前田 智也、吹谷 智、横田 篤（北大農）
○ Hiroki WAKAHARA, Takuya MIZOKOSHI, Tomoya MAEDA, Satoru FUKIYA, Atsushi YOKOTA (Hokkaido Univ.)

γ-アミノ酪酸（GABA）は、医薬品原料や機能性食品の原料として工業的に用いられており、グルタミン酸（Glu）からグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）による一段階反応によって生合成される。我々は、大腸菌において、呼吸鎖酵素のうちプロトンポンプ機能を有する I 型 NADH 脱水素酵素（NDH-I）と、*bo* 型末端酸化酵素（Cytbo）の二重欠損株（ΔΔ株）が、Glu を異常生産（50 g/L のグルコースから約 7 g/L）することを見出している。本研究では、本株が有する特異な Glu 高生産能を活用することで、GABA 高生産株の育種を目指した。野生型 GAD は中性条件では不活性化してしまうため、中性 pH 付近でも活性を有する変異型 GadB（Glu89Gln/Δ452-466）を、大腸菌 W1485 株（野生株）と ΔΔ 株に導入し、フラスコ培養にて GABA 生産試験を行った。その結果、ΔΔ 株における GABA 生産量は約 1.5 倍に増加することが確認され、NDH-I と Cytbo の二重欠損変異が GABA の高生産に有用な変異であることが示された。現在、中性 pH 付近で活性を示す GABA/Glu アンチポーターである GadC の C 末欠損（1-470）、及び GABA 利用系である GABA トランスアミナーゼ（*gabT*）欠損の導入による GABA 生産への影響を、ジャーファーメンターを用いた発酵試験により検証している。

γ-Aminobutyric acid (GABA) is industrially used as a food additive, dietary supplement, and monomer for producing biodegradable plastic. In *Escherichia coli*, GABA is synthesized from L-glutamic acid (Glu) in a single step by glutamate decarboxylase A and B (GadA and GadB). We previously found that a double knockout of the two-respiratory chain components having proton pumping activities i.e. type I NADH dehydrogenase (NDH-I) and cytochrome *bo* terminal oxidase (Cyt*bo*) resulted in unusual production of Glu (approximately 7 g/L from 50 g/L glucose). In this study, we are trying to improve fermentative direct GABA production from glucose using the high Glu producing strain (ΔΔ strain). GadB is active only under acidic condition and loses activity at near-neutral pH, while a mutated GadB (Glu89Gln/Δ452-466) retain the activity at neutral pH (Thu et al. 2013; J. Biosci. Bioeng). Therefore, we introduced a plasmid expressing the mutated *gadB* gene (p*gadB*') into the ΔΔ strain and its parent strain (W1485). As a result, the ΔΔ strain carrying p*gadB*' showed approximately 1.5-fold increased GABA production when compared to the W1485 strain carrying p*gadB*', indicating the effectiveness of the ΔΔ mutation on GABA production. Currently, we are examining the effects of *gadC* mutation (1-470), which can increase Glu antiporter activity at near-neutral pH (Ma et al. 2012 Nature), and deletion of *gabT* encoding GABA transaminase on GABA production using a 2 L-jar fermenter.

GABA fermentation, respiratory chain, glutamate decarboxylase

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B02-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

微生物電気合成系を用いたグリセロールからの 1,3-プロパンジオール発酵系の構築

Construction of 1,3-propanediol fermentation system from glycerol using microbial electrosynthesis

○柳瀬 卓馬、井上 謙吾、吉田 ナオト、清 啓自（宮大院農）
○Takuma YANASE, Kengo INOUE, Naoto YOSHIDA, Keiji KIYOSHI (Miyazaki Univ.)

微生物電気合成系（MES）は、外部から還元力として電子を与えることで微生物の代謝バランスを変化させる技術として注目されている。*Citrobacter braakii* TB-96 株は、グリセロールからの 1,3-プロパンジオール（1,3-PD）生産能を有するが、副産物生成の多さが課題となっている。当株におけるグリセロールからの 1,3-PD 生産は多くの還元力を必要とすることから、MES は 1,3-PD 発酵効率の改善に寄与すると考えられる。そこで本研究では、TB-96 株における MES による副産物生産の抑制および 1,3-PD 生産の増強を試みた。

TB-96 株の電気活性をサイクリックボルタンメトリーによって調べたところ、電気活性はなかったことから、TB-96 株への電極からの直接的な電子の授与は難しく、メディエーターを介した培養系の構築が必要と明らかになった。そこでメディエーターとしてニュートラルレッドを使用したところ、副産物の生産が抑制され、当株でも MES での活用が可能と明らかになった。この条件において、SDS-PAGE によるタンパク質発現を比較したところ、開回路とバンドパターンに明確な差異が見受けられたことから、MES はタンパク質発現レベルで代謝に影響を与えることが示唆された。

上記と併せて、TB-96 株の代謝経路の遺伝子組み換え株を使用した際の MES の結果についても紹介する予定である。

Microbial electrosynthesis (MES) is a novel fermentation technique which changes the metabolism of microorganisms during fermentation by supplying electrons from the outside. The *Citrobacter braakii* strain TB-96 produces 1,3-propanediol (1,3-PD) from glycerol. However, this strain also produces a large amount of by-products. In this study, we attempted to suppress by-product production and enhance 1,3-PD production by MES in TB-96.

The electro activity of TB-96 was examined by cyclic voltammetry, but TB-96 had no electro activity. This indicates that TB-96 can't gain electrons from electrode directly, therefore MES of TB-96 required mediators. Addition of neutral red as a mediator in MES, the production of by-products was suppressed. This shows that MES system is able to be applied in TB-96. The protein expression pattern in this cultivate condition was compared by SDS-PAGE. The band patterns differ to that open circuit condition. That suggesting that MES affects metabolism at the protein expression levels.

We will also introduce the results of MES using the recombinant of TB-96.

microbial electrosynthesis, 1,3-propanediole, *Citrobacter*

講演番号：3B02-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌における長鎖脂肪酸排出輸送体の探索

An ABC transporter involved in free fatty acid efflux in *Corynebacterium glutamicum*

○佐藤 美奈子、村田 紀子、村松 哲広、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○Minako SATOH, Noriko MURATA, Tetsuhiro MURAMATSU, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

排出系は発酵生産菌育種の重要なターゲットである。しかし、脂肪酸については、排出系の実体はほとんど明らかになっていない。近年、ヒトでは脂溶性物質の膜輸送に ABC タンパク質が、大腸菌では多剤耐性ポンプが関与することが報告された。コリネ菌にもそれら遺伝子が多数存在することから、それら候補に焦点を当てて発現解析を行ったところ、脂肪酸高生産菌 [1)]で特異的に過剰発現している遺伝子を 4 種見いだした。その各遺伝子について、脂肪酸高生産菌での破壊を試みたところ、ABC タンパク質を担う一遺伝子の破壊株が生育不良を示した。その原因を解析した結果、破壊株はビオチン感受性を示すことがわかった。脂肪酸生産はビオチンに依存しているため、脂肪酸生産条件で生育悪化が起こることを示唆している。実際、野生株ベースでは同遺伝子を破壊してもビオチン感受性は見られなかった。我々は、この現象を脂肪酸の排出障害と捉えた。つまり、脂肪酸高生産菌の破壊株では脂肪酸が細胞内に蓄積しているという仮説である。その検証のため、破壊株を親株とともにビオチンを含む脂肪酸生産培地で培養試験に供した。しかし、破壊株は異常生育を示し、評価が困難であった。原因は、サプレッサー株の出現にあった。これらサプレッサー株は一様に脂肪酸生産能が低下していたことから、恐らくは、脂肪酸排出障害のストレスに起因して、脂肪酸生産能を損なう何らかのサプレッサー変異が入り、そのストレスが軽減された劣化株が優先増殖したものと考えられる。この問題を回避するため、宿主を脂肪酸の低生産株に変更して、同様な検証を試みた。その結果、もはや上記問題は顕在化せず、遺伝子破壊に伴って、予想通りの傾向、すなわち、脂肪酸の細胞内濃度の上昇と細胞外濃度の低下が認められた。以上から、同遺伝子にコードされた ABC タンパク質は長鎖脂肪酸の排出を担う輸送体であることが強く裏付けられた。

1) Appl Environ Microbiol **79**: 6776-6783 (2013)

Among the multiple ABC transporter and multidrug resistance genes on the genome, we identified four genes that were overexpressed in a fatty acid-producing mutant of *C. glutamicum*. Disruption of one gene among them conferred a biotin-sensitive growth phenotype on the fatty acid producer, but not on the wild-type strain, suggesting that impairment of the fatty acid excretion would lead to intracellular accumulation of the fatty acids. Analysis of the disruptant showed an increase and a decrease in intracellular and extracellular concentrations of fatty acids, respectively. These results indicate that the ABC transporter gene is responsible for fatty acid excretion.

Corynebacterium glutamicum, ATP-binding cassette (ABC) transporter, free fatty acid efflux

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌による中鎖脂肪酸生産への代謝工学

Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of medium-chain fatty acids

○村田 春樺、内藏 萌、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○Haruka MURATA, Moe KURA, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

我々は、コリネ菌で長鎖脂肪酸をグラムスケールで生産可能な菌株を育種している[1)]。もし、長鎖に向かう炭素を、需要が高まりつつある中鎖（C8～14）に変換できれば産業的な価値が高まる。しかし、中鎖型は微生物が本来つくる脂肪酸ではないため、現在まで実用的な発酵法は開発されていない。我々は、長鎖生産菌から自然変異でセルレニン耐性株を誘導するなかで、長鎖が大きく減少した変異株が得られること、さらにその中に、ごく微量ながら中鎖を生産する株を見いだした。その代表 2 株について、セルレニン耐性変異のシーケンス解析を行った結果、共に脂肪酸合成酵素 FasA の鎖長伸長を担うケトアシルシンターゼ（KS）ドメイン内に同一変異を有していたことから、本変異が原因変異と判断された。同変異は Thr よりもかさ高い Ile への置換であることから、この変異で長鎖が生産できなくなるのは KS ドメインが狭くなって鎖長伸長が進みにくくなったためと推察される。中鎖生成はその結果と説明できる。ではなぜ、長鎖が減少した分の中鎖が生成しないのか？我々は次の仮説を立てた。『上記の変異型 FasA では鎖長伸長が進みにくいので、中鎖-CoA が生成する。その CoA がチオエステラーゼ（Tes）によって切り離されなければ中鎖の生産は起こらないが、本菌種の Tes は恐らくはその活性が十分ではない。従って、中鎖-CoA の細胞内プールが高まり、これが脂肪酸合成をフィードバック阻害する。』 この仮説が妥当ならば、中鎖-CoA に活性をもつ Tes を発現させれば、中鎖を含む脂肪酸総量が相対的に増加するはずである。実際、中鎖-CoA にも活性を持つことが示唆されている異菌種の Tes 遺伝子を導入した結果、中鎖および脂肪酸総量が共に増加し、上記仮説の妥当性が支持された。以上から、長鎖生産菌ベースで、「FasA 内 KS ドメインの改変」と「中鎖-CoA 対応型 Tes の発現」の 2 要件を満たせば、コリネ菌で中鎖生産が可能になることが示された。

1) Appl Environ Microbiol **87**: e02469-20 (2021)

From among cerulenin-resistant mutants of a long-chain fatty acid-producing *C. glutamicum* strain, we found two mutants that generated a significant amount of medium-chain fatty acids in exchange for reduced production of long-chain fatty acids. Genome analysis of the two mutants identified the same specific mutation in the *fasA* gene, suggesting that the mutation is relevant to the phenotype. Expression of a heterologous medium-chain-adaptive thioesterase in the mutants resulted in increased production of fatty acids including medium-chain fatty acids. These results suggest that engineering of FasA and expression of a medium-chain-adaptive thioesterase would be requirements for production of medium-chain fatty acids in this organism.

type Ⅰ fatty acid synthase, medium-chain fatty acids, thioesterase

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌におけるリポ酸の炭素骨格 C8 供給経路の解明

Biosynthetic routes for the C8 carbon skeleton of lipoic acid in *Corynebacterium glutamicum*

○津久井 裕太、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○Yuta TSUKUI, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

コリネ菌は真核型の I 型脂肪酸合成酵素（Fas）を 2 種（FasA、FasB）有する。FasA は細胞膜の主成分であるオレイン酸の合成に、FasB は細胞表層のミコール酸の主成分であるパルミチン酸の合成に関わるが、パルミチン酸は FasA によっても合成されるため、FasB は余剰機能と考えられてきた。実際、FasB 破壊株は表現型が出ないとの報告がある（Radmacher et al. Microbiology **151**:2421-2427, 2005）。しかし、我々は、その FasB がリポ酸の前駆体オクタノイル CoA（C8）のデノボ合成に関わることを見出し報告した [1)]。その根拠は、FasB 破壊株がオクタン酸（C8）の要求性を示すことにある。しかし、同形質は完全要求性ではなく部分要求性（遅れて生育するリーキー形質）であることから、C8 供給にバイパスの存在が示唆された。FasA がバイパスとして C8 供給に関わっている可能性がある。その検証のため、FasB 破壊株から明確なオクタン酸要求性を示す変異株（ΔfasB#6 株）を誘導した。本株は FasB プラスミドで相補されるが、FasA プラスミドでも弱いながら相補されることがわかった。本結果は、C8 のデノボ合成に FasA も副次的に関わり得ることを示唆している。しかし、FasA が C8 を直接供給しているのか、それとも、FasA の最終産物である C18（オレオイル CoA またはオレイン酸）から開裂して C8 が生成しているのかは依然、不明である。その検証のため、FasB 破壊株からさらに FasA も破壊した FasAFasB 両破壊株を誘導し、その表現型を調べた。その結果、両破壊株は C18（オレイン酸）だけでは生育できず、C18（オレイン酸）と C8（オクタン酸）の二重要求性になることがわかった。本結果は、C8 が C18 からの開裂で生成するとの後者説では説明がつかず、FasA によって微弱ながら直接供給されるとの前者説を支持するものである。以上から、コリネ菌では、C8 供給を FasB が担うも、FasA もバイパスとして副次的に関わると結論した。生物界では C8 供給にもっぱら II 型 FAS が関与すると考えられているが（Cronan JE, Microbiol Mol Biol Rev **80**:429-450, 2016）、コリネ菌は I 型の関与もあり得ることを示す最初の例である。

1) Appl Environ Microbiol **83**: e01322-17 (2017)

We have reported that the C8 carbon skeleton of lipoic acid originates from the FasB route in *C. glutamicum*, because *fasB* disruption resulted in auxotrophy for octanoic acid (C8). However, since the *fasB* disruptant grew partially without octanoic acid, we raised the possibility of the involvement of FasA in the C8 supply. Through genetic analysis, we concluded that the C8 supply depends predominantly on FasB, but secondarily on FasA.

Corynebacterium glutamicum, type I fatty acid synthases, lipoic acid / octanoic acid

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

デオキシリボヌクレオチド生合成経路遺伝子を破壊した大腸菌の生育評価と代替経路導入の検証

Growth evaluation of Escherichia coli with knockout of deoxyribonucleotide synthetic pathway genes and verification of alternative pathway introduction

○出口 賢児[1]、斯 大勇[1]、堀之内 伸行[1]、小園 祥子[1]、竹内 道樹[1]、日比 慎[1,2]、M. POOLE Anthony[3]、小川 順[1] ([1]京大院農、[2]富山県立大工、[3]オークランド大学)

○ Kengo DEGUCHI[1], Dayong SI[1], Nobuyuki HORINOUCHI[1], Shoko KOZONO[1], Michiki TAKEICHI[1], Makoto HIBI[1,2], Anthony M. POOLE[3], Jun OGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]The Univ. of Auckland)

地球上のすべての生物は、ribonucleotide reductase (RNR) が触媒するリボヌクレオチドの還元反応により DNA の構成分子としてのデオキシリボヌクレオチドを酵素合成する。そのため、原始地球上に RNA が最初に存在したと仮定する RNA ワールド仮説では、RNA から DNA が誕生したとされている。しかし、我々は可逆的なヌクレオシド分解系として知られる DERA 経路の各酵素の機能を活用することで、RNR 経路を介することなくデオキシリボヌクレオシドの生合成が可能となることを見いだした。そのため、RNR を経由しない経路のみでデオキシリボヌクレオシドを、ひいては DNA を合成し、生育する生物を見出すことが出来れば、DNA は RNA からのみではなく独自に生合成されていた可能性を示すことができる。

現在、大腸菌をモデル生物として用い、大腸菌が有する三組の RNR 酵素遺伝子 (*nrdAB, nrdEF, nrdDG*) を全て破壊した 3Δ 株の構築に成功している。本 3Δ 株は生育において、デオキシリボヌクレオシドのうち、デオキシシチジンを要求し、さらに、数種のビタミン類を必要とすることが観察された。さらに栄養要求性を検討したところ、本 3Δ 株は種々のアミノ酸を必要とすることが判明した。現在、DERA 経路遺伝子を発現する 3Δ 株を用いて、デオキシリボヌクレオシド合成能について評価している。

All organisms on the earth enzymatically synthesize deoxyribonucleotides as constituent molecules of DNA by the reduction of ribonucleotides catalyzed by ribonucleotide reductase (RNR). Therefore, the RNA world hypothesis, which assumes that RNA first existed on the primitive earth, states that DNA was born from RNA. However, we have found that it is possible to biosynthesize deoxyribonucleosides without going through the RNR pathway by utilizing the function of enzymes in the deoxyribose-phosphate aldolase (DERA) pathway known as a nucleoside degradation system. Therefore, if we can find an organism that synthesizes deoxyribonucleotides only through a pathway that does not go through RNR and grows, it can suggest that DNA was de novo synthesized through original pathway, not only from RNA.

Currently, using *Escherichia coli* as a model organism, we have succeeded in constructing a 3Δ strain in which all three sets of endogenous RNR enzyme genes (*nrdAB, nrdEF, nrdDG*) of *E. coli* are disrupted. We found that this 3Δ strain required deoxycytidine as a nuceloside, together with some vitamins and various amino acids for its growth. Currently, we are evaluating the ability of 3Δ strain expressing of the DERA pathway genes to synthesize deoxyribonucleosides.

ribonucleotide redactase, deoxyribonucleoside, DERA

発表責任者：小川順（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B02-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌における“ビオチン再回収説”とその検証

Evidence indicating that the biotin-prototrophic *Corynebacterium glutamicum* strain takes up biotin after once excreting it extracellularly

○宮澤 萌、小林 央恒、横山 夏音、岡本 理瑚、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○ Moe MIYAZAWA, Hironobu KOBAYASHI, Natsune YOKOYAMA, Riko OKAMOTO, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

我々は、ビオチン要求性のコリネ菌からビオチンをデノボ合成できるようになった菌株を育種している[1)]。この菌株は、生育にビオチンを要求しないだけでなく、ビオチン分泌能も有する。このビオチン分泌株でビオチン取り込み系遺伝子（*bioY*）を破壊したところ、ビオチンを自ら合成できるにもかかわらず、再びビオチンの要求性を示すようになった。その理由は、合成したビオチンを細胞内に保持できないためではないかと考えられる。この仮説を検証するため、親株（ビオチン非要求性）とその *bioY* 破壊株（ビオチン要求性）で、細胞内外のビオチン濃度を比較した。親株では、予想通り、細胞内に一定濃度のビオチンが確認された。細胞外にもビオチンが検出されたが、濃度は細胞内の方が有意に高かった。一方、*bioY* 破壊株では細胞内にはビオチンはほとんど検出されず、細胞外にビオチンが局在していた。この現象は、自ら合成したビオチンを一旦、細胞外に排出し、それを BioY で再び取り込んで利用していると仮定しなければ説明がつかない。実際、ビオチン分泌株の培養に、ビオチン捕捉タンパク質のアビジンを添加すると生育が悪化し、大過剰のビオチン共添加で回復した。アビジンは細胞内には入らず、それ自体に細胞毒性はない。従って、アビジン添加による生育悪化は、自ら合成したビオチンを一旦排出して再回収し利用しているとの仮説を支持している。つまり、コリネ菌にはビオチンを細胞外に排出する何らかの仕組みがあると考えるべきである。この現象が大腸菌でも当てはまるのかどうかを調べるため、大腸菌 W3110 株でビオチン取り込み系遺伝子（*yigM*）を破壊し、細胞内ビオチンプールへの影響を調べた。その結果はコリネ菌とは異なり、細胞内外のビオチン濃度は破壊の有無にかかわらず、ほぼ一定であった。すなわち、本研究で見出したビオチンの排出と再取り込みに関する細胞の振る舞いは、コリネ菌に特有の現象である可能性がある。

1) Appl Environ Microbiol **79**: 4586-4594 (2013)

We have engineered naturally biotin-auxotrophic *C. glutamicum* into a biotin producer through heterologous expression of the biotin-biosynthetic genes. However, we encountered a puzzling phenomenon that disruption of the biotin uptake gene *bioY* in the biotin producer resulted in biotin auxotrophy. In this study, we reported evidence indicating that the biotin-prototrophic *C. glutamicum* strain takes up biotin after once excreting it extracellularly.

Corynebacterium glutamicum, biotin export, biotin reuptake

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌を用いた適応実験室進化による芳香族化合物発酵生産株の創製

Creation of aromatic-compound-producing strains by adaptive laboratory evolution in *Corynebacterium glutamicum*

○立川 千生、平沢 敬（東工大生命理工学院）
○Yukio Tachikawa, Takashi Hirasawa (Tokyo Tech)

微生物において、芳香族アミノ酸をはじめとした多くの芳香族化合物は、シキミ酸経路を経由することで生合成される。本研究では、アミノ酸の発酵生産に実績をもつコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* について、芳香族化合物の発酵生産を強化するために長期間の植え継ぎによる適応実験室進化実験を行った。フェニルアラニンのアナログである 4-フルオロフェニルアラニン (4FP)は、フェニルアラニンによるシキミ酸経路に対するフィードバック阻害と同様の機構でシキミ酸経路を阻害していると予想される。この 4FP を適応実験室進化実験における選択圧として培地に添加し、野生株を用いて 24 時間ごとの培養と植え継ぎ操作を繰り返したところ、4FP に耐性を示す適応進化株を複数取得した。これらの進化株では、シキミ酸経路や関連する遺伝子に変異が確認された。これらの変異の中には、芳香族化合物の発酵生産の向上に寄与するものが含まれると考えられる。本講演では、上記の研究における最新の研究成果に加え、および芳香族化合物生産のためのプラットフォームの構築について紹介する。

Many aromatic compounds including aromatic amino acids are synthesized via shikimate pathway in microorganisms. In this study, adaptive laboratory evolution experiments based on long term repetitive serial transfers of cultures were performed in *Corynebacterium glutamicum*, which has contributed to amino acid fermentation for more than half a century, to enhance production of aromatic compounds via shikimate pathway. In the adaptive laboratory evolution experiments, 4-fluorophenylalanine, an analog of phenylalanine, was used as a selective pressure because it is expected to inhibit reactions in shikimate pathway, similarly to feedback inhibition of shikimate pathway by phenylalanine. A wild-type strain of *C. glutamicum* was cultured with 4FP and transferred to new medium every 24 h, and adapted strains which could grow well in the presence of 4FP were obtained. Some mutations related to shikimate pathway and other aromatic compound metabolism were found in the genome of the obtained mutants. In this presentation, our latest results and plan to construct platform for production of aromatic compounds will be introduced.

Adaprive laboratory evolution, *Corynebacterium glutamicum*, Aromatic compound

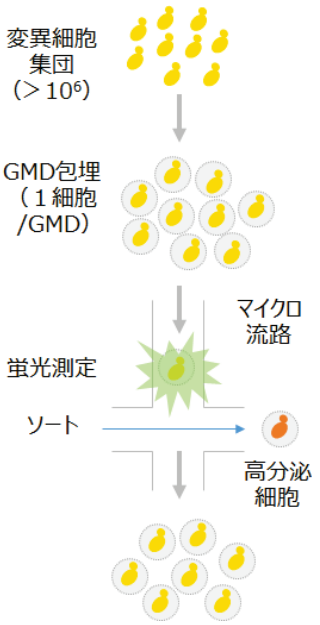
発表責任者：平沢　敬（thirasawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3B02-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

GMD による酵素生産向上変異株の高速スクリーニング

High throughput screening of mutants of enhanced enzyme productivity by GMD

○町田 雅之[1]、佐野 元昭[1]、北川 治恵[1]、佐藤 春華[1]、阿部 敬悦[2]、石井 智子[2] ([1]金工大ゲノム、[2]東北大院農)
○Masayuki Machida[1], Motoaki Sano[1], Harue Kitagawa[1], Shunka Sato[1], Keietsu Abe[2], Tomoko Ishii[2] ([1]KIT, [2]Tohoku Univ.)



GMD（ゲルマイクロドロップ）はアガロース等で作製した直径 50～100 μm の微粒子であり、1 個の GMD に 1 個の微生物細胞を封入し、培養して物質生産を行う。この時、生産された物質量に応じた蛍光強度を持つようにすることで、マイクロ流路型セルソーター（On-chip Sort, On-chip Biotechnologies）を用いて高生産微生物の高速で低コストなスクリーニングが可能である。本研究では一例として、β ガラクトシダーゼ（beta-gal）を分泌生産する酵母を作製して GMD に封入し、Lactose の分解を蛍光強度でモニターすることで、beta-gal の高生産酵母の分離を試みた。評価実験として、数倍程度の生産量の異なる 2 種類の酵母株を作製して混合し、これを封入した 10^5 程度の GMD をソートすることにより、1 回のスクリーニングで 50～100 倍の濃縮が可能であることが示された。このソートは 1 時間以内であり、2 回のソートで 1,000 倍程度の以上の濃縮が可能である。現在、10^6 程度の beta-gal 生産酵母を UV 照射し、数倍程度以上に生産量が向上した酵母を安定的に分離する実証を進めている。この方法は、beta-gal 以外の酵素や化合物を生産する微生物への応用も可能であり、アミノ酸などを中心とした性能評価も進めている。

GMD (Gel Micro Droplet), an agarose bead of 50-100 μm in size, can be prepared to have a single microbial cell inside and to detect materials secreted by the cell. We prepared GMDs emitting fluorescence in response to amount of the target material and realized high throughput and low-cost screening of cells of enhanced productivity using a cell sorter (On-chip Sort, On-chip Biotechnologies). As one of examples, we encapsulated two yeast strains secreting different amount of beta-galactosidase (beta-gal) in GMDs. By measuring conversion of lactose inside GMDs, we successfully enriched the higher production strain by 50-100 times within 1 h, expecting >1,000 times enrichment by screening twice. We are now screening yeast mutants of enhanced beta-gal production and are applying the technology to screen microbes having high productivity of other enzymes and chemicals such as amino acids.

high throughput screening, enzyme, gel micro droplet

発表責任者：町田雅之（m.machida@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3B02-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 変異株のゲノム比較解析による新規油脂生産関連遺伝子の同定
Identification of a novel gene involved in lipid production by comparative genome analysis of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi starkeyi* mutants

○佐藤 里佳子[1]、森 一樹[2]、荒 学志[3]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[4]、小笠原 渉[4]、矢追 克郎[5]、荒木 秀雄[3]、田代 康介[6]、石谷 孔司[5]、油谷 幸代[2]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]不二製油グループ本社、[4]長岡技科大・工、[5]産総研・生物プロセス、[6]九州大・院農)
○Rikako SATO[1], Kazuki MORI[2], Satoshi ARA[3], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[4], Wataru OGASAWARA[4], Katsuro YAOI[5], Hideo ARAKI[3], Kosuke TASHIRO[6], Koji ISHIYA[5], Sachiyo ABURATANI[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]AIST-Waseda Univ. CBBD-OIL, [3]FUJI OIL HOLDINGS Inc., [4]Nagaoka Univ. Tech., [5]AIST BPRI, [6]Kyushu Univ. Fac. Agri.)

近年の世界人口増加や新興国の成長に伴い，様々な産業で汎用性の高いパーム油の需要は増加している。一方，アブラヤシ農園は，環境・社会面で問題を抱えるため，需要に対応できる代替油脂生産技術開発は重要な課題である。その油脂手段としてパーム油と類似した油脂を生産する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の活用の期待は高い。しかし，実用化へ向けた油脂生産性向上の改変対象遺伝子情報など，油脂生産機構に関する知見は不十分である。本研究では，油脂高蓄積変異株のゲノム比較から油脂高生産遺伝子の同定・解析を行い，油脂生産機構解明に繋がる知見を得ることを目的とした。

我々は，取得した油脂高蓄積変異株のうち複数株で共通遺伝子 Transcript Id:110315 (110315) に変異があることを見出した。そこで，野生型 110315 を変異型 110315 に置換した結果，油脂生産量が向上した。すなわち，110315 は *L. starkeyi* の油脂生産に寄与する新たな因子であることが明らかとなった。今後，110315 の機能解析が，本遺伝子の油脂生産機構への寄与を明らかにし、産業利用に向けた油脂高生産株の創製に貢献すると考えられる。本研究の一部は NEDO の支援を受けている。

Palm oil is versatile in its uses in the food and chemical industries. In recent years, the increasing world population and developing emerging countries cause increasing palm oil production. Development of oil production technology is important issues because of having environmental and social problems in oil palm plantation. Oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is an attractive lipid producer, which can produce lipid with a fatty composition similar to palm oil. To improve the productivity of lipid with a view to industrialization, the elucidation of lipid production mechanism in *L. starkeyi* is effective. Therefore, the purpose of this study was to obtain new knowledge on the mechanism of lipid production in *L. starkeyi*.

By comparative genomic analysis, we found that mutations occurred in a common gene (Transcript Id:110315 gene) in several mutant strains. The site-directed mutagenesis at 110315 gene locus demonstrated improving lipid productivity, and it reveals that 110315 gene is a novel gene involved in lipid production. Future functional analysis of 110315 will reveal how it is involved in lipid production mechanism. It will also contribute greatly to the creation of high-producing lipid strain for industrial use.

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：3B02-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム B

Trichoderma virens PS1-7 株を用いたスクアレン高産生条件の検討
Study on culture conditions for high squalene production using *Trichoderma virens* PS1-7
○須波 和、崎浜 靖子、橋本 誠、橋床 泰之（北大院農）
○ Kazu SUNAMI, Yasuko SAKIHAMA, Makoto HASHIMOTO, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

スクアレンは抗酸化作用や抗がん作用が報告され、化粧品として利用されるトリテルペンである。主要な供給源は深海ザメの肝油であるが、スクアレンの需要の増加に伴う乱獲や海洋汚染により、絶滅が危惧されている。そこで、新規供給源としてテルペン類を産生する糸状菌に着目した。これまでに我々は、スクアレン代謝阻害剤であるブテナフィン塩酸塩を培地に添加した際、培養 7 日間で 0.34 g/L の高いスクアレン産生能を持つ糸状菌 *Trichoderma virens* PS1-7 を見出した。今回の発表では、*T. virens* PS1-7 について、さらなるスクアレン増産に向け、培養条件を検討した。

T. virens PS1-7 をブテナフィン塩酸塩を含む potato dextrose 培地を用いて温度 15~40℃、pH 3.0~7.0 で振盪培養後、培養ろ液と菌体に分け、それぞれ有機溶媒で抽出しスクアレンを HPLC で定量した。その結果、最適培養温度及び pH はそれぞれ 25℃, 5.0 であった。また、培養日数を 7 日から 21 日まで延長し、培地にグルコースを追加することで、7 日間の培養時と比較して約 1.8 倍のスクアレンが得られた。さらに現在は、通気条件等の培養条件検討に加えて、ブテナフィン塩酸塩添加時のメバロン酸経路関連遺伝子の解析を行い、さらなるスクアレンの増産を試みている。

Squalene is a triterpene that has been reported to have antioxidant and anticancer effects. The main source of squalene is liver oil from deep-sea sharks, but it is threatened with extinction because of overfishing and ocean pollution. Therefore, we focused terpenes accumulation of filamentous fungi as a new source. Previously, we found *Trichoderma virens* PS1-7, which accumulated 0.34 g/L of a high squalene producing fungus in 7 days by butenafine hydrochloride, an inhibitor of squalene metabolizing enzyme, treatment. In this presentation, we examined the culture conditions of *T. virens* PS1-7 for further squalene accumulation.

T. virens PS1-7 was cultured in potato dextrose medium containing butenafine hydrochloride with shaking under different temperature (15~40℃) and pH (3.0~7.0) conditions. After cultivation, squalene was extracted from the culture filtrate and mycelium, respectively, and quantified using by HPLC. The optimum temperature and pH were 25℃ and 5.0, respectively. In addition, the amount of squalene increased about 1.8 times by extending the culture period from 7 to 21 days and adding glucose to the medium. Further studies on analysis of culture conditions and genes related to mevalonate pathway are underway.

terpene, filamentous fungi, lipid

発表責任者：須波　和（suwave_kazu@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B04-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

Streptomyces 属放線菌における休眠遺伝子発現活性化を指向した塩基編集システムの開発

Development of an efficient base-editing system for activation of cryptic gene clusters in *Streptomyces*

○大塚 遼[1]、佐藤 悠[1]、岡野 憲司[1,2]、本田 孝祐[1,2]、木谷 茂[1,2]（[1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]阪大・先導学研機）
○Ryo Otsuka[1], Yu Sato[1], Kenji Okano[1,2], Kohsuke Honda[1,2], Shigeru Kitani[1,2] ([1]ICBiotech, Osaka University, [2]OTRI, Osaka University)

放線菌は、多様な生理活性物質を生産する能力を持つが、その生合成遺伝子群の約 9 割が休眠状態にある。この休眠遺伝子を発現活性化できれば、新たな生理活性物質を取得できる。本研究では、放線菌休眠遺伝子群の発現覚醒を目指して、シトシンデアミナーゼを用いた塩基編集システムの開発を目的とした。最初に、放線菌用にコドン最適化したデアミナーゼ遺伝子を、自律複製型 pCRISPR-dCas9 に挿入し、pCRISPR-CDA を構築した (Nishida *et al.*, 2016) 。次に、pCRISPR-CDA による塩基編集システムの有効性を評価するため、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)株における色素系抗生物質アクチノロージンの生合成遺伝子を塩基編集することにした。ポリケタイド合成遺伝子 *actI-ORF2* を標的とするガイド RNA を pCRISPR-CDA に組み込んだプラスミド pTarget-ACT を構築し、*S. coelicolor* A3(2)株を形質転換した結果、標的部位の塩基置換に伴い、アクチノロージン生産が消失した形質転換体を取得した。したがって、pCRISPR-CDA により DNA 塩基の編集が可能であることが示唆された。現在、本塩基編集システムにより、翻訳制御遺伝子を含む各種 DNA 領域を改変し、休眠遺伝子の発現覚醒を目指している。

Streptomyces spp. produce a wide variety of bioactive compounds as secondary metabolites. However, most of the genes for the biosynthesis of secondary metabolites remain “cryptic”. Activation of the expression of these cryptic genes may lead to the discovery of new bioactive compounds. Here, we aimed to develop a base-editing system using a cytosine deaminase to activate the cryptic genes of streptomycetes. First, the codon-optimized cytosine deaminase gene in *Streptomyces* was cloned into the self-replicating plasmid pCRISPR-dCas9 to yield pCRISPR-CDA (Nishida *et al.*, 2016) . Next, to investigate whether pCRISPR-CDA could be applied to base-editing, we attempted to use this plasmid to introduce base mutations into the biosynthetic gene of a pigment antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). The transformants harboring pTarget-ACT, which contains the region encoding the guide RNA for the base mutation of *actI-ORF2*, showed a loss of pigment production. These results suggested that this system with pCRISPR-CDA is capable of editing the DNA base of *S. coelicolor* A3(2). We are currently using this system to modify various DNA regions to awaken the expression of cryptic genes.

Actinomycetes, Secondary metabolites, Base-editing

発表責任者：大塚遼（ryo_otsuka@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3B04-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

SARP 型転写活性化因子 SRO_3163 の過剰発現によるシクロヘキセン含有エナミド化合物の生産
Overexpression of the SARP-type transcriptional activator SRO_3163 led to accumulate a novel cyclohexene-containing enamide

○見崎 裕也[1]、ニンディタ ヨシ[1]、藤田 昂大[1]、ファウジ アミルディン アフマド[2]、荒川 賢治[1,2]
([1]広島大院・統合生命、[2]広島大院・先端研)
○Yuya MISAKI[1], Yosi NINDITA[1], Kota FUJITA[1], Amirudin Akhmad FAUJI[2], Kenji ARAKAWA[1,2]
([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.)

Streptomyces 属放線菌で見出されている SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein) 型活性化因子は，抗生物質生産の活性化に関与している。*Streptomyces rochei* 7434AN4 株の染色体上には 12 個の SARP 型活性化遺伝子がコードされており，本研究では，SARP 遺伝子の一つ SRO_3163 に注目し，強制発現を施すことで二次代謝遺伝子の活性化を試みた。

チオストレプトン誘導型 *tipA* プロモーターを保有するプラスミド pIJ8600 に *SRO_3163* 遺伝子を連結し，プラスミド pYMR3163 を構築した。構築したプラスミドを *S. rochei* KA20 株（抗生物資非生産株）に形質転換し *S. rochei* KA20/pYMR3163 株を取得した。本菌株の代謝プロファイルを解析したところ，UV 活性化合物（YM3163-A）の存在が確認された。*S. rochei* KA20/pYMR3163 を 10 L 培養し，各種精製を施すことで，YM3163-A を単離した。ESI-MS 解析の結果から $C_8H_{11}NO$ の示性式であることが推定された。NMR の結果を考慮することで，YM3163-A の構造は 2-(cyclohex-2-en-1-ylidene)acetamide であることが分かった。

The production of secondary metabolites in *Streptomyces* species is regulated by various regulatory proteins. *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARPs) are characterized as transcriptional activators for secondary metabolites. *Streptomyces rochei* 7434AN4 harbors 12 SARP genes on its chromosome. Some SARP genes were cloned into an expression vector pIJ8600, and their recombinants were cultivated. The recombinant of SARP gene, *SRO_3163*, accumulated a UV-active compound YM3163-A, which was not observed in the parent strain. Its molecular formula was confirmed to be $C_8H_{11}NO$. In addition, NMR analysis revealed that YM3163-A is a novel enamide, 2-(cyclohex-2-en-1-ylidene)acetamide.

Streptomyces , regulatory gene, SARP

講演番号：3B04-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

Comprehensive metabolome analysis to explore the biologically active metabolites in *Streptomyces rochei*.

○Mingge ZHANG, Rikito NISHIURA, Kenji ARAKAWA (Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

[Introduction]

Streptomyces sp. is a kind of filamentous gram-positive bacteria. Their linear chromosome (ca. 8Mb) contains more than 30 secondary metabolite biosynthesis gene clusters (BGCs) including anticancer, antimicrobial and antifungal agents. However, most of BGCs (80-90％ per strain) are poorly expressed or are not expressed at all under normal culture condition. Recently, we found that *S. rochei* 7434AN4 carries at least 35 secondary metabolic BGCs on its chromosome, however, most of them are cryptic. Our group focused on natural product discovery from *S. rochei* 7434AN4 by genome mining approaches, including large-scale chromosome deletion, heterologous expression, and comparative metabolites analysis.

[Method and Results]

Comparative metabolites analysis was performed on *S. rochei* 7434AN4 and its mutants (51252, K3A12, YN-P7, YN-P145, 2-39) through LC-MS, HPLC, and TLC analyses. Their cultures were sequentially fractionated by ethyl acetate, 1-butanol, and water. In LC-MS analysis of ethyl acetate extracts, a distinct molecular ion peak was observed only in the YN-P7 strain, and this peak was then identified as anthranilic acid by ^{1}H-NMR. In addition, in HPLC analysis of 1-butanol extracts, remarkable UV spectrum was observed around 13 minutes in the extracts of strain 2-39. Lastly, water layer was tested by α-glucosidase assay to evaluate the function of pseudooligosaccharide BGC. The inhibitory activity against α-glucosidase was detected in the culture medium of all test strains except for strain 2-39, which may be related to the absence of pseudooligosaccharide BGC in strain 2-39. More details will be described in this paper.

genome mining, *Streptomyces*, secondary metabolites

講演番号：3B04-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

糸状菌の休眠遺伝子を覚醒するハイグロマイシン B を利用した新規天然活性物質の探索

Search for a novel naturally active compound using hygromycin B that awakens the cryptic gene of filamentous fungi

○加藤 翔[1]、渡邊 善洋[1]、渡部 実加[2]、石川 春樹[2]、岩月 正人[1]、野中 健一[1]([1]北里大・大村研、[2]北里大・理)
○Sho KATO[1], Yoshihiro WATANABE[1], Mika WATABE[2], Haruki ISHIKAWA[2], Masato IWATSUKI[1], Kenichi NONAKA[1] ([1]Kitasato Univ., Omura Inst., [2]Kitasato Univ.)

【背景】近年の糸状菌ゲノム情報の進展により、実験室環境下で利用できる二次代謝産物生合成遺伝子は 1～2 割程度しか活用できておらず、ほとんどが休眠状態であることが明らかとなってきた。発表者はタンパク質合成阻害剤ハイグロマイシン B が遺伝子発現レベルで二次代謝産物の生産を誘導することを発見している。本研究ではハイグロマイシン B が二次代謝生産誘導を示す糸状菌の範囲を解明し、代謝物分析や生物活性評価によって新規化合物を発見することを目的とした。
【結果】ハイグロマイシン B が二次代謝生産誘導を示す糸状菌の範囲を明らかにする為、糸状菌 400 株に対しハイグロマイシン B を添加し培養した結果、約 70%の菌株において色素や形態に変化が観察された。そのうち、*Phialemoniopsis pluriloculosa* FKI-10220 株においてハイグロマイシン B（10 μg/mL）添加培養時で新規デカリン系ポリケチド化合物、並びに gabusectin およびその新規類縁体の生産が誘導された。また、化合物報告のない真菌に属する複数の菌株においても同様に推定新規化合物が生産誘導された。以上のことから、ハイグロマイシン B は幅広い糸状菌に対して二次代謝生産誘導を促すことが明らかとなり、新規化合物を発見するための有用なツールであることが示唆された。

【Introduction】Recent progress of fungal genomics, secondary metabolites biosynthesis gene cluster are almost silencing in laboratory culture conditions. We focused on the induction of secondary metabolism by treatment of hygromycin B and aimed to analyze general versatility and identify new compounds.
【Results】When hygromycin B was added to 400 fungal strains and cultured in order to clarify the range of filamentous fungi in which hygromycin B was effective, pigment production and morphological changes were observed in about 70% of them. In *Phialemoniopsis pluriloculosa* FKI-10220, the production of a novel decalin-based polyketide compound, gabusectin and its new analog compound was induced at the time of culture with the addition of hygromycin B at a dose of 10 μg/mL. Metabolite production was also altered for several rare fungi with no compound reports, and the induction of many new compounds was observed. From the above, it was clarified that hygromycin B promotes the induction of secondary metabolic production against a wide range of filamentous fungi, suggesting that it is a useful tool for discovering new compounds.

secondary metabolite, microbial communication, new natural product

発表責任者：加藤翔（shokato@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3B04-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌における異種テルペノイド生産に資する代謝経路の解明
Elucidation of metabolic pathways that contribute to heterologous production of terpenoids in *Aspergillus oryzae*

○齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[3]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理)
○ Naoya SAITOH[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、近年異種天然物生産の宿主として利用されている。産業利用に向けた高い生産性を実現するためには、異種経路へつながる一次代謝経路の特性を踏まえた効率的な代謝改変が必要である。我々はこれまでに担子菌由来のジテルペン pleuromutilin を異種天然物のモデルとして用い、テルペン生合成経路に直接つながるメバロン酸経路の増強が生産量増加に寄与することを明らかにした[1)]。本研究では、基質供給に関わるより上流の一次代謝に着目し、異種テルペン生産量の増加に資する経路の解明を目的とした。

テルペン生産の基質であるアセチル CoA について、細胞質においてピルビン酸・アセトアルデヒド・酢酸を経て供給される可能性を考え、各中間体の代謝酵素をコードする遺伝子の破壊による pleuromutilin 生産量の変化を調べた。その結果、各遺伝子破壊株で生産量の低下は見られず、ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 *pdc* 破壊株では生産量が 1.9 倍に増加した。また、*pdc* 破壊株ではエタノール生成の消失など、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adh* の破壊と同様の表現型が見られた。これにより、これらの酵素が *A. oryzae* においてアセチル CoA の供給ではなくエタノール生成に関与し、その破壊によって他の経路へのアセチル CoA 供給が強化されたことが示唆された。現在、アセチル CoA の供給が TCA 回路を介したものであると考え、関連する代謝経路の遺伝子改変を行っている。

1) 齋藤ら、日本農芸化学会 2021 年度大会講演要旨集 2B04-03

Aspergillus oryzae is used as a host for heterologous production of natural products. For improving the productivity, optimal engineering based on the metabolic feature of *A. oryaze* is needed. We previously succeeded in improved production of antibacterial diterpene pleuromutilin by multigene metabolic engineering of mevalonate pathway. In this study, to uncover the flux of upstream metabolic pathway for productivity enhancement of heterologous production, we investigated the metabolic changes caused by deletion of genes encoding acetyl-CoA suppliers. In the pathway converting cytoplasmic pyruvate to acetic acid, the deletion of pyruvate decarboxylase gene *pdc* increased the productivity by 1.9-fold, which lost ethanol production similar to the deletion of alcohol dehydrogenase gene *adh*. In contrast, the deletion of other downstream genes did not change pleuromutilin production. These results indicate that the supply of acetyl-CoA for pleuromutilin production is independent of the pathway converting cytoplasmic pyruvate to acetic acid, and that ethanol production is metabolically competitive in *A. oryzae*.

Aspergillus oryzae, genome editing, secondary metabolism

発表責任者：丸山　潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B04-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヒストンシャペロン HirA のコウジ酸生産への関与

Involvement of the histone chaperone HirA in the production of kojic acid in *Aspergillus oryzae*

○工藤 駿斗[1]、荒川 弦矢[1]、白井 沙夜[1]、小川 真弘[2]、進藤 斉[1]、穂坂 賢[1]、徳岡 昌文[1]([1]東農大院農、[2]野田産研)
○Hayato KUDO[1], Gen-ya ARAKAWA[1], Saya SHIRAI[1], Masahiro OGAWA[2], Hitoshi SHINDO[1], Masaru HOSAKA[1], Masafumi TOKUOKA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Noda Inst. Sci. Res.)

コウジ酸(KA)は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の代表的な二次代謝産物であり、その誘導体を含め、化粧品、医薬品、食品、農業などの分野で広く利用されているが、KA 生産を制御する基礎的な分子機構は不明である。糸状菌は抗生物質やカビ毒など様々な二次代謝産物を生産するため、*A. oryzae* の二次代謝産物生産の制御機構の解明は、有用な生理活性物質の発見や醸造食品の安全性の向上に繋がる。

本研究では、KA 生産の新規制御因子探索を目的に *A. oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、ヒストンシャペロン HIR 複合体のサブユニットである HirA をコードすると予想される遺伝子を見出した。HIR 複合体は酵母からヒトに至るまでの真核生物に進化的に保存されており、ヒストン転写制御、遺伝子サイレンシング、細胞老化などへの関わりが示されているが、二次代謝への関与は報告されていない。麹菌 *hirA* 破壊株の KA 生産量は、液体培養では減少したが、平板培養では増加した。遺伝子発現解析により、KA 生産量の減少/増加は、推定 KA 生合成酵素遺伝子 *kojA* とその制御因子遺伝子 *kojR* の発現量の変化と一致することが確認された。以上より、*A. oryzae* HirA は *kojR* の転写制御を介して KA 生産に関与するが、液体培養と平板培養では KA 生産における役割が異なることが示唆された。

Kojic acid (KA) is a typical secondary metabolite of *Aspergillus oryzae*, but the regulatory mechanism of KA production is unknown. Since filamentous fungi produce a variety of secondary metabolites such as antibiotics and fungal toxins, elucidation of the regulatory mechanism of secondary metabolite production in *A. oryzae* will lead to the discovery of useful bioactive substances and improvement of the safety of brewed foods.

In this study, we screened a library of *A. oryzae* transcription factor disruption strains to discover novel regulators of KA production, and found a gene predicted to encode HirA, a subunit of the histone chaperone HIR complex. The HIR complex is evolutionarily conserved in eukaryotes from yeast to humans and has been shown to be involved in transcriptional regulation, gene silencing, and cellular senescence, but its involvement in secondary metabolism has not been reported. The KA production of *hirA*-disrupted strains was decreased in liquid culture but increased in plate culture. Gene expression analysis confirmed that this decrease/increase in KA production was consistent with changes in the expression levels of the putative KA biosynthetic enzyme gene and its regulator gene, *kojR*. These results suggest that *A. oryzae* HirA is involved in KA production through transcriptional regulation of *kojR*, but that HirA role in KA production differs between liquid and plate cultures.

Aspergillus oryzae, kojic acid, histone chaperone

発表責任者：徳岡 昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：3B04-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

Yeastcidin 生産に関わる麹菌遺伝子の探索

Screening of genes involved in production of Yeastcidin derived from *Aspergillus oryzae*

○橋本 純[1]、雲林院 正喜[3]、清水 美里[3]、数岡 孝幸[1]、小川 真弘[2]、穂坂 賢[1]、進藤 斉[1]、徳岡 昌文[1] ([1]東農大院応生、[2]野田産研、[3]東農大応生)
○ Jun HASHIMOTO[1], Masaki UJII[3], Misato SHIMIZU[3], Takayuki KAZUOKA[1], Masahiro OGAWA[2], Masaru HOSAKA[1], Hitoshi SHINDO[1], Masafumi TOKUOKA[1] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Noda Inst. Sci. Res., [3]Tokyo Univ. of Agric.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の一部の株は、酵母の生育を抑制する Yeastcidin(Yc)を生産する。清酒醸造に適した酵母が Yc 非感受性を示す例があることから、自然界からの清酒醸造用酵母の選抜に利用されている。しかし、Yc 発見から 50 年経った現在も、単離・精製が困難なことから構造が不明であり、生合成経路や作用機序についても明らかになっていない。そこで、本研究では構造や生合成経路解明の手掛かりとすることを目的に、Yc 生産に関わる転写因子を探索した。麹菌転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリー351 株培養液を用い、Yc 感受性及び非感受性酵母の生育を指標とした 2 回のスクリーニングを行った結果、破壊により Yc 生産能が顕著に低下する 11 遺伝子を見出した。この 11 遺伝子には、クロマチンリモデリングに関わると予想される 5 遺伝子が存在し、二次代謝の包括的制御因子である LaeA の遺伝子が含まれたことから、Yc は典型的な二次代謝物として生産が制御されていると予想された。一方、周辺遺伝子の情報からは、二次代謝物の生合成に関わる遺伝子クラスターは見出されなかった。現在、高発現株を作製し Yc 生産能を調べている。

Some strains of *Aspergillus oryzae* produce Yeastcidin (Yc), which inhibits the growth of yeast. Since yeast strains for sake brewing show non-susceptibility to Yc, Yc has been used to select yeast for sake brewing from the natural environment. However, although 50 years after the discovery of Yc, its structure, the biosynthetic pathway and the mode of action have not been clarified due to difficulties in its isolation and purification. In this study, we searched for transcriptional factors involved in Yc production in *A. oryzae* to obtain clues for determination of the structure and the biosynthetic pathway. Using a gene disruption strain library of *A. oryzae*, genes associate with Yc production were searched. As a result of two rounds of screening 11 genes were found to associate with Yc production. These genes included 5 genes predicted to be involved in chromatin remodeling and a gene for LaeA that is a pivotal regulator for secondary metabolism, suggesting that Yc production is regulated as a typical fungal secondary metabolite. On the other hand, no possible gene cluster for secondary metabolite biosynthesis was predicted around the screened genes. We are now preparing high-expression strains of the screened genes and evaluating their Yc production.

Aspergillus oryzae, secondary metabolite, Yeastcidin

発表責任者：橋本純（10520019@nodai.ac.jp）

講演番号：3B04-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

天然由来抗菌物質により誘導される *Penicillium* 属菌二次代謝の解析
Secondary metabolism activated by natural antibiotics in *Penicillium* spp.
○波形 匠[1]、老木 紗予子[2]、二宮 章洋[2,3]、矢口 貴志[4]、浦山 俊一[2,5]、萩原 大祐[2,5] ([1]筑波大院・生命地球、[2]筑波大・生命環境、[3]東大院・農、[4]千葉大・MMRC、[5]筑波大・MiCS)
○Takumi NAMIKATA[1], Sayoko OIKI[2], Akihiro NINOMIYA[2,3], Takashi YAGUCHI[4], Syun-ichi URAYAMA[2,5], Daisuke HAGIWARA[2,5] ([1]Deg. Prog. in Life & Earth Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. of Life & Env. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]Grad. Sch. Agric. & Life Sci., The Univ. of Tokyo, [4]MMRC, Chiba Univ., [5]MiCS, Univ. of Tsukuba)

【緒言】糸状菌の二次代謝遺伝子の大部分は通常の実験室環境で発現しない休眠遺伝子である。これらを発現誘導する手法の確立は、新たなケミカルスペースへのアクセスを可能にし、有用な新規化合物の取得につながる。本研究では、自然環境中での生物間の化学的な相互作用に着目し、多様な二次代謝遺伝子を有する *Penicillium* 属菌 12 種 80 株を、柑橘類の精油成分である farnesol (FOH)、植物ホルモンの salicylic acid (SA)、*Pseudomonas* 属菌が産生する pyocyanin (PYO)および pyrrolnitrin (PN)の 4 種の抗菌物質で処理し、その化学応答を体系的に解析した。化合物を新たに産生する条件で RNA-seq 解析を実施し、抗菌物質処理により誘導される化合物生合成遺伝子クラスターを同定した。
【結果】80 株の *Penicillium* 属菌を PDB 液体培養し、各種抗菌剤処理の有無による培養液の抽出試料を HPLC で比較解析した。その結果、抗菌物質処理により出現した新規ピーク数の平均は FOH で 1.64 本、SA で 1.70 本、PN で 1.39 本であった (n=80)。PYO では新規ピーク数の平均は 18.7 本 (n=11)と大きく変化したが、いずれのピークも PYO の分解/修飾産物であることが示唆された。*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性、およびバナナ表層への傷害活性試験では、複数の培養液抽出物が FOH、SA 処理時に新たな活性を示した。スケールアップ培養して同様の化合物産生誘導が確かめられた株を対象に RNA-seq 解析を行い、その結果、*P. brasilianum* が保有する acetoxydehydroaustin 生合成遺伝子クラスター (*aus'*) が、FOH に応答して活性化する事を初めて明らかにした。生物間の化学的相互作用による糸状菌の休眠二次代謝の活性化が実証できたことから、本手法を広く適用することで新たな化合物の取得が可能になると期待される。

Most secondary metabolite genes of filamentous fungi are silent in laboratory conditions. To test if the fungal silent secondary metabolisms are waken by addition of natural antibiotics, 80 strains of *Penicillium* spp. were treated with farnesol (FOH), salicylic acid (SA), pyocyanin (PYO) or pyrrolnitrin (PN). When treated with FOH or SA, HPLC analysis revealed that new peaks were appeared in the culture extract of 57 or 58 strains, respectively. The 7 or 6 FOH/SA-treated culture extracts showed antibacterial activity against *B. subtilis*, whereas those treated with SA showed inhibitory activity to banana in 41 strains. When we cultured these strains in larger scale, they showed same activity. Interestingly, we found that FOH activated the metabolite pathway of acetoxydehydroaustin (*aus'*) in *P. brasilianum*. These results suggest that filamentous fungi in a natural environment, their secondary metabolism can be activated by chemical interaction with other organisms.

filamentous fungi, natural antifungal, secondary metabolism

発表責任者：萩原 大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B04-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

海洋無脊椎動物由来細菌における化学相互作用による抗生物質生産への影響調査

Chemical interactions between marine invertebrate-associated bacteria evaluated by culture-based method

○松原 雄太[1]、ウラノバ ダナ[2] ([1]高知大院、[2]高知大)
○Yuta MATSUBARA[1], Dana Ulanova[2] ([1]Grad. Sch. Integr. Art. Sci. Kochi Univ., [2]Kochi Univ.)

微生物は、お互い及び宿主と天然物の交換によって相互作用を行っている。つまり、多くの天然物は微生物の純粋培養で生産されていないため、これらの化合物の発見は困難になりつつある。そして、異なる微生物種を一緒に培養して相互作用を引き起こし、新規天然物の生産活性化を試みようとする共培養法がある。現状として共培養法には海洋環境由来細菌を用いた報告例は土壌細菌の例よりも少ないことが挙げられる。また、海洋無脊椎動物の体内に生息する共生微生物の多様性は高いことが報告されており、体内で様々な相互作用が行われていることが推測される。本研究の目的は、海洋無脊椎動物由来細菌をモデルとし、海洋細菌間の化学相互作用の解析である。高知県土佐市沖にて採集した海洋無脊椎動物から細菌 43 株(Actinobacteria　25 株　Firmicutes 11 株 Proteobacteria 7 株)を単離した。その後、共培養を行い、相互作用による抗菌活性物質生産の変化を調査した。結果として、抗菌活性がグラム陽性菌に対しては約 31%の相互作用は抑制され、約 10%は活性化された。一方でグラム陰性菌に対して、約 22%は抑制され、約 11%は活性化された。発表では共培養法の詳細を報告する。

Microorganisms often use natural products (NPs) to interact to each other. For this reason, many NPs are not produced by pure microbial cultures. Thus, it is becoming increasingly difficult to discover novel NPs using conventional microbial cultivation methods. Co-cultivation of two and more microbial strains enable to analyze microbial interactions under laboratory conditions. Many interactions and antibiotics from soil bacteria have been reported by this method, but there are only few examples using marine bacteria. Marine invertebrates are inhabited by diverse microorganisms, which are expected to be interacting actively. In this study, we investigated shifts in bioactive NP production occurring in co-cultures of marine invertebrate-derived bacteria. Marine sponge and sea squirt samples were collected offshore Kochi Prefecture, Japan. A total of 43 bacterial strains (Actinobacteria (25 strains), Firmicutes (11 strains) and Proteobacteria (7 strains)) were isolated and used in co-culture assays. In 31% and 10% of co-cultures, the activity suppression and induction against Gram-positive bacteria was observed, respectively. On the other hand, the activity against Gram-negative bacteria was suppressed in 22% of co-cultures, and in 11% the activity was induced. Furthermore, we were able to discover microbial interaction pairs that have never been reported in the past. In our presentation, we will report the details of the co-culture method.

Marine bacteria, Antibiotic production, Co-culture

発表責任者：松原雄太（b21m6h47@s.kochi-u.ac.jp）

講演番号：3B04-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

細胞性粘菌種間で保存されたポリケタイド合成酵素による細胞シグナリングの進化発生学的解析

Evolutionary-developmental analysis of cellular signalling by a polyketide synthase conserved throughout cellular slime molds

○山﨑 大樹[1]、成田 隆明[2] ([1]千葉工大・院・工、[2]千葉工大・先進工・生命)
○Daiki Yamasaki[1], Takaaki Narita[2] ([1]Grad. sch. of Eng., Chiba Inst. Technol., [2]Dept. of Life Sci., Chiba Inst. Technol.)

細胞性粘菌は数多くのポリケタイド合成酵素（PKS）を持つことで知られるが，そのほとんどは種特異的に進化してきたと考えられている．しかし，ハイブリッド型 PKS である SteelyA は，細胞性粘菌種間で保存されている数少ない PKS である．SteelyA は *Dictyostelium discoideum* において二次代謝産物 MPBD を合成し，細胞集合および胞子成熟を制御することが分かっているが，他の細胞性粘菌種における SteelyA の機能は全く不明である．本研究では，*D. discoideum* とは異なるグループに属する *Polysphondylium violaceum* における SteelyA の機能を解析し，二次代謝産物による細胞シグナリングの機能進化について理解することを目的としている．その第一歩として，*P. violaceum* における SteelyA 遺伝子破壊株 (*Pv-stlA*$^-$ mutant) を作製し，現在その表現型の解析を進めている．*P. violaceum* は，*D. discoideum* とは異なるメカニズムで細胞集合が制御されているにも関わらず，*Pv-stlA*$^-$ mutant は *D. discoideum* よりも顕著な細胞集合欠損が見られることを確認した．また，*Pv-stlA*$^-$ mutant の細胞集合欠損は，MPBD によって相補されることも確認した．このことから，*P. violaceum* においても SteelyA は MPBD を合成しており，細胞集合という細胞性粘菌種間共通の生命現象を制御している物質であると考えられる．本発表では、現在得られている *Pv-stlA*$^-$ mutant の解析結果について紹介する．

Cellular slime molds (Dictyostelids) are known for possessing many polyketide synthases (PKSs). Although most of them are thought to be species-specifically evolved, a hybrid type PKS, SteelyA, is conserved throughout Dictyostelids. SteelyA is known to synthesise a secondary metabolite, MPBD, and it regulates cell aggregation and spore maturation in *Dictyostelium discoideum*. However, the function of SteelyA in other Dictyostelid species is unknown. In this study, we analysed the function of SteelyA in *Polysphondylium violaceum*, which belongs to a different group from *D. discoideum*, to understand the functional evolution of cellular signalling by secondary metabolites. As the first step, we created gene disruptants of SteelyA in *P. violaceum* (*Pv-stlA*$^-$ mutants). *Pv-stlA*$^-$ mutants were more defective in cell aggregation than that in case of *D. discoideum*, although its mechanism was quite different between *D. discoideum* and *P. violaceum*. Further, the defective cell aggregation in *Pv-stlA*$^-$ mutants was restored by MPBD addition. These results are suggesting that also in *P. violaceum*, SteelyA synthesises MPBD and it regulates cell aggregation that is a common life process between *P. violaceum* and *D. discoideum*. In this presentation, we present our current results of the analysis of *Pv-stlA*$^-$ mutants.

Polyketide, Hybrid type polyketide synthase, Cellular slime mold

発表責任者：成田 隆明（takaaki.narita@p.chibakoudai.jp）

講演番号：3B04-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム B

鉄酸化細菌 *Leptothrix cholodnii* が作る鞘状酸化鉄の in-situ 多形分析
In situ crystal polymorphism analysis of iron oxyhydroxides (FeOOH) deposited in the *Leptothrix cholodnii* sheath
○宮前 靖弘[1]、久能 樹[2]、重藤 真介[1] ([1]関西学院大院・理工、[2]筑波大・生命環境系)
○Yasuhiro MIYAMAE[1], Tatsuki KUNOH[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Kwansei Gakuin Univ., [2]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

鉄酸化細菌である *Leptothrix* 属細菌は，菌体表面から分泌される有機ナノ繊維が絡み合ったチューブ状の構造を形成し，そこに酸化鉄ナノ粒子が沈着することで鞘状の酸化鉄を形成する。これまでに電子顕微鏡や X 線回折などを用いた観察は盛んに行われてきたが，水中での化学的なキャラクタリゼーションは乏しいのが現状である。そこで本研究では，顕微ラマン分光法を用いて鉄酸化細菌 *Leptothrix cholodnii* SP-6 が形成する鞘状酸化鉄を *in situ* で分析し，オキシ水酸化鉄（FeOOH）の結晶多形とその経時変化に関する新たな知見を得ることを目的とした。
FeOOH は褐色を呈するため，532 nm（緑色）のレーザー光で励起することで，共鳴ラマン効果と呼ばれる現象により，極めて高感度に検出することが可能である。このようにして得られた *L. cholodnii* SP-6 細胞およびその凝集体のラマンスペクトルは，Fe 存在下での培養初期段階ではフェリハイドライトに由来するピークを示すが，培養時間の経過に伴って γ-FeOOH（レピドクロサイト）に由来するピークが現れるのが確認された。これはフェリハイドライトが準安定相であり，γ-FeOOH に多形転移したことを示唆している。また，*L. cholodnii* SP-6 が生成する γ-FeOOH のラマンスペクトルパターンが，鉄をイオンまたは固体のどちらの形態で与えるかによって有意に異なることが明らかとなった。

Leptothrix spp. are iron-oxidizing bacteria that produce extracellular, microtubular, iron-encrusted sheaths. Although those iron oxides have been observed with electron microscopy, chemical characterization in water is still scant. In this study, we used Raman microspectroscopy to analyze *in situ* iron oxyhydroxides (FeOOH) in *Leptothrix cholodnii* SP-6 sheaths and to gain new insights into their crystal polymorphism.
The resonance Raman spectra of *L. cholodnii* SP-6 cells and their aggregates exhibited peaks attributable to ferrihydrite in the initial stage of cell culture in the presence of Fe, but additional peaks attributable to γ-FeOOH (lepidocrocite) with increasing culture time. This finding suggests that ferrihydrite was a metastable phase and hence underwent a polymorphic transformation to γ-FeOOH. Furthermore, we found that there are small but significant differences in the Raman spectra of *L. cholodnii* SP-6 at longer culture times, depending on whether iron was provided as Fe^{2+} or solid.

Raman microspectroscopy, Iron-oxidizing bacteria, Polymorphs

講演番号：3B07-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

強化された CoA 生合成による組換え大腸菌での PHB 生産

PHB production in recombinant *Escherichia coli* by improved CoA biosynthesis

○工藤 大嵩、朝山 宗彦、西原 宏史、長南 茂（茨城大農）
○Hirotaka KUDO, Munehiko ASAYAMA, Hirofumi NISHIHARA, Shigeru CHOHNAN (Ibaraki Univ.)

【目的】当研究室では CoA 生合成経路の鍵酵素であるパントテン酸キナーゼ（CoaA）を強化することにより、*Escherichia coli* の細胞内アセチル-CoA レベルの上昇に成功している。今回は、*Microcystis aeruginosa* 由来ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子（Pha）と *Pseudomonas putida* 由来 CoaA 遺伝子を *E. coli* で共発現させ、ポリヒドロキシ酪酸（PHB）生産におけるアセチル-CoA 増産の有効性を解析したので報告する。
【方法】グルコースを含む最少培地で形質転換体を 48 時間振とう培養した。PHB 生産量はメタノリシス処理で生成した 3-ヒドロキシ酪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで測定した。
【結果・考察】IPTG 添加により Pha 単独発現株および Pha と CoaA の共発現株の PHB 含量はいずれも減少したが、IPTG 無添加条件下では、30°C と 37°C のどちらの培養温度においても CoaA 遺伝子導入による PHB の増産が確認された。CoA 生合成経路の出発物質であるパントテン酸添加は、両形質転換体の PHB 蓄積を促進し、37°C 培養の CoaA 共発現株では添加効果が非常に高かった。このように、外来 CoaA 遺伝子導入による細胞内アセチル-CoA レベルの上昇は PHB 生産に有効であった。

[Objective] Pantothenate kinase (CoaA) is a key enzyme in CoA biosynthetic pathway. *Escherichia coli* with CoaA gene from *Pseudomonas putida* successfully increased intracellular acetyl-CoA level. In this study, the technique was applied to poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production in the recombinant *E. coli* introducing polyhydroxyalkanoate synthase (Pha) gene from *Microcystis aeruginosa*.
[Methods] The recombinants were cultivated in mineral salts medium for 48 h with shaking. PHB production was analyzed by gas chromatography with flame ionization detection after methanolysis of PHB in the cells.
[Results & Discussion] PHB accumulation in *E. coli* cells possessing the Pha gene alone or both Pha and CoaA genes declined in the presence of IPTG, whereas the transformant co-expressing the exogenous CoaA gene clearly accumulated larger amounts of PHB in the absence of IPTG compared to the strain with *pha* alone. Addition of pantothenate which is a starting material of CoA biosynthesis was highly effective to produce PHB especially in the cells with the exogenous *coaA* at 37°C-cultivation. Thus, the cellular acetyl-CoA level elevated by introducing the additional *coaA* effectively accelerated PHB accumulation.

PHB, Acetyl-CoA, *Escherichia coli*

講演番号：3B07-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

組換え *Cupriavidus necator* による乳酸ベースバイオプラスチックの生合成

Biosynthesis of lactate-based bioplastics by recombinant *Cupriavidus necator*

○板倉 真優[1]、岡本 沙樹[2]、河原 あい[2]、田中 賢二[3]、田口 精一[4]、松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県大・環境共生、[2]熊本県大院・環境共生、[3]近畿大・産理工、[4]東農大・生命科学）
○Mahiro ITAKURA[1], Saki OKAMOTO[2], Ai KAWAHARA[2], Kenji TANAKA[3], Seiichi TAGUCHI[4], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Fac. Humanity-Oriented Sci., Eng., Kindai Univ., [4]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【背景および目的】微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性プラスチックの 1 つであるが、一般に PHA は不透明であり、使用用途は制限される。一方、乳酸（LA）および 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニットからなる共重合ポリエステル P(LA-*co*-3HB)は、LA 分率を 15～30 mol%に高めると透明性を有するため、食品包装やペットボトルなど幅広い用途での実用化が期待される。本研究では、水素細菌 *Cupriavidus necator* を宿主とした組換え株を作製し、LA ベースポリマーP(LA-*co*-3HB)を合成することを目的とした。
【方法および結果】*C. necator* H16 の短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子（*phbC*）を破壊した H16dC 株および *phbC* を *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA 重合酵素改変体遺伝子 [*phaC1(STQK)*] に置換した H16C1STQK 株を宿主として、LA ユニットを供給するプロピオニル CoA 転移酵素遺伝子（*pct*）および D-乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhD*）、そして、*phaC1(STQK)*遺伝子を導入した組換え株を作製した。これらの組換え株を、糖を唯一の炭素源として培養した結果、P(LA-*co*-3HB)を合成した。現在、導入遺伝子発現量の調査、ポリマー鎖中の LA 分率を向上させるための分子育種、そして組換え株の培養条件の検討を行っている。

Polyhydroxyalkanoate (PHAs), which are one of the biodegradable plastics, are synthesized and accumulated in various bacteria. Since PHAs are generally opaque, their use are limited. On the contrary, the P(LA-*co*-3HB) copolymers consisting of lactate (LA) and 3-hydroxybutyrate (3HB) units are transparent when the LA fraction is 15~30 mol%. It is expected to be used in a wide range of applications such as food packaging or PET bottles. The aim of this study is to produce the recombinant strains of *Cupriavidus necator* synthesizing P(LA-*co*-3HB). *C. necator* H16dC strain, in which the short-chain length-specific PHA polymerase gene (*phbC*) was disrupted, and *C. necator* H16C1STQK strain, in which *phbC* was replaced with the modified PHA polymerase gene [*phaC1(STQK)*] from *Pseudomonas* sp. 61-3, were used as hosts. The recombinant strains, into which the genes encoding propionyl-CoA transferase (Pct), D-lactate dehydrogenase (LdhD), and PhaC1(STQK) were introduced, synthesized P(LA-*co*-3HB) from sugar as the sole carbon source. We are now investigating the expression levels of the genes introduced into the recombinant strains, and are considering the molecular breeding of *C. necator* to increase the LA fraction in the polymer chain and the culture conditions of the strains for polymer production.

biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, lactate-based bioplastics

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3B07-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

An alternative biosynthetic route for P(3HB-*co*-4HB) in *Ralstonia eutropha* H16 via expression of O2-tolerant 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from Archaea

○KAI HEE HUONG, ORITA IZUMI, FUKUI TOSHIAKI (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 4259 Ngatsuta, Midori-ku,　Yokohama 226-8591, Japan.)

Polyhydroxyalkanoate (PHA) has received considerable attention as useful bioplastics. Its structural diversity and excellent biodegradability have rendered its potential as alternative to petroleum-based material used in various applications. Of these PHAs, P(4HB)/P(3HB-*co*-4HB) is regarded as practical and high-value PHA owing to its usefulness in medical and biopharmaceutical fields. Bioproduction of P(3HB-*co*-4HB) is conventionally achieved by cost-ineffective structurally related carbon sources; or strategized by engineering *E. coli* to utilize non-structurally related carbon source such as glucose mediated by SucD-Gbd (4HB dehydrogenase)-CoA transferase-phaC route, extended from TCA cycle. This research investigated an alternative TCA-cycle independent biosynthetic route for P(3HB-*co*-4HB) production from glucose.

O_2-tolerant 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (4HBD) from archaeon *Nitrosophumilus maritimus* was expressed in PHA-producing *Ralstonia eutropha*, which offers a direct intermediate conversion from crotonyl-CoA to 4HB-CoA prior to polymerization. A glucose-utilizable strain of *R. eutropha* NSDG-GG ΔB1 harboring the archaeal gene resulted in accumulation of PHA composed of 4HB ~2.3 mol% 4HB. To date, microaerobic cultivation was effective to cater such “oxygen-tolerant yet sensitive to an extent” enzyme. Upon prolonged cultivation, the 4HB fraction was found to be increased to ~5.4 mol%. On the other hand, the effect of *gbd* deletion from the host strain was conditional, such that it increased the 4HB incorporation in the presence of structurally related γ-butyrolactone but not for the case of production system using glucose. The uniqueness of O_2-tolerant 4HBD has made a new biosynthetic route for P(3HB-*co*-4HB) production under oxygenated bioprocess possible. Despite of that, further engineering is still demanded for better 4HB incorporation.

Biodegradable plastics, 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase, oxygen-tolerant enzyme

発表責任者：TOSHIAKI FUKUI（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3B07-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

組換え *Ralstonia eutropha* によるポリヒドロキシアルカン酸ブロック共重合体の生合成
Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate block copolymer by engineered *Ralstonia eutropha*

○石原 静流[1]、折田 和泉[1]、松本 謙一郎[2]、福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工、[2]北大院工)
○Shizuru ISHIHARA[1], Izumi ORITA[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Hokkaido Univ.)

【背景と目的】微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は生分解性に優れる材料であり，多様な PHA の開発・社会実装が望まれている．近年，*Ralstonia eutroha* および *Aeromonas caviae* に由来する PHA 重合酵素(PhaC)のキメラタンパク質 $PhaC_{AR}$ を発現した組換え大腸菌が，2-ヒドロキシブタン酸(2HB)添加培養において，3-ヒドロキシブタン酸(3HB)と 2HB からなるブロック共重合体を生合成することが報告された(Matsumoto et al.,Biomacromolecules 19:662-671,2018)．本研究では PHA 生産能が高い *R. eutropha* に $PhaC_{AR}$ を導入し，その PHA 生合成能を評価した．
【方法と結果】*R. eutropha* 染色体上の *phaC* を $phaC_{AR}$ に置換し，2HB モノマー供給経路関連酵素遺伝子群を染色体上に導入した改変株を構築した．この改変株はグルコース単一炭素源培養で少量の 2HB を含む PHA 共重合体を生合成した．2HB 添加培養では 2HB による強い生育阻害を受けたが，Val またはピルビン酸の添加により生育が回復し，最大 30 mol%の 2HB を含む PHA 共重合体を生合成した．2HB 添加条件で培養した菌体から抽出した精製 PHA の溶媒分別処理により，ホモポリマーのブレンド体ではないこと，および ^{1}H-NMR 解析において 2HB，3HB のホモセグメントが存在することが強く示唆された．現在，精製 PHA から作製したフィルムについて，熱的および機械的性質の測定を進めている．

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are promising biodegradable polyesters. Recently, it was reported that PHA block copolymers composed of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 2-hydroxybutyrate (2HB) was synthesized by *Escherichia coli* harboring $PhaC_{AR}$, a chimeric enzyme of PHA synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae*. In this study, PHA-producing *R. eutropha* was applied as a host of $PhaC_{AR}$. A strain of *R. eutropha* having $phaC_{AR}$ and genes for 2HB-CoA synthesis on chromosome accumulated PHA containing very small amount of 2HB unit from glucose. Although 2HB supplemented into the medium caused severe growth inhibition, the impaired growth was restored by adding pyruvate and/or Val along with 2HB. PHA copolymers composed of 2HB unit up to 30 mol% was produced under the optimized conditions. The solvent fractionation and ^{1}H-NMR analysis of the extracted polymer strongly suggested the presence of homo-segments of each monomer in the polymer chain. The thermal and physical properties of this polyester are in progress.

Bioproduction, Biodegradable plastics, Polyhydroxyalkanoate

発表責任者：福居　俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3B07-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

バイオポリマー生産系を駆動力とした膜小胞（MV）の微生物合成

Controllable secretion of membrane vesicle (MV) driven by biopolymer production system

○高 相昊[1]、佐藤 道夫[2]、臼倉 雄紀[3]、豊福 雅典[3]、野村 暢彦[3]、田口 精一[1]([1]東農大、[2]明治大、[3]筑波大)
○Sangho KOH[1], Michio Sato[2], Yuki Usukura[3], Masanori Toyofuku[3], Nobuhiko Nomura[3], Seiichi Taguchi[1] ([1]TUA, [2]Meiji Univ., [3]Tsukuba Univ.)

多くの細菌は、球状の膜小胞 (membrane vesicle, MV) を細胞外に放出することが知られている。MV は、遺伝子の伝搬、細胞間相互作用、抗生物質耐性などに関与する媒体として機能し、ワクチン開発を指向したドラッグデリバリーシステムとしても注目されている。これら多彩な MV の機能に対して、その形成メカニズムに関する知見は乏しい。今回、我々は意図せずにバイオポリマー (ポリヒドロキシ酪酸, PHB) を生産させる大腸菌において、その内圧により MV が分泌生産していることを発見した。特に、MV の生産がグルコース濃度に依存した形で精密に調節可能である点が優れている。本講演では、MV であることを多面的に実証し、その発生が PHB の細胞内生産に起因することを明らかにし、発生メカニズムを示すモデル（Polymer Intracellular Accumulation-triggered system for MV Production, PIA-MVP）を提唱した。本 MV の新しい発生機構に基づいたより効率的なバイオポリマーの微生物生産系の展開が期待できる。

In this study, we have discovered that the biogenesis of MV took place in the recombinant cell of *Escherichia coli* BW25113 strain that intracellularly accumulates bacterial polyester, polyhydroxybutyrate (PHB). This PHB intracellular accumulation-triggered MV biogenesis was proved by multiple analysis. The release of MVs was observed just after PHB production. Also, there was a good correlation between MV formation and PHB production level that can be finely regulated by varying glucose concentrations, suggesting the causal relationship in both macromolecules. Notably, the frequency of MV secretion was governed through the morphological change of the *E. coli* cells caused by the glucose-concentration dependent PHB intracellular accumulation. Based on a hypothesis of internal-pressure dependent envelope-disorder induced MV biogenesis, here we propose a new Polymer Intracellular Accumulation-triggered system for MV Production (designated “PIA-MVP”) with presenting a mechanistic model for MV biogenesis.

membrane vesicle, biopolymer, bioproduction

発表責任者：高 相昊（sk207739@nodai.ac.jp）

講演番号：3B07-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

PET 加水分解酵素の異種発現による Paracoccus denitrificans へのプラスチック分解能の付与
Heterologous expression of a PET hydrolase confers plastic degrading capacity on Paracoccus denitrificans

○松場 匠哉[1]、中井 忠志[1,2] ([1]広島工大院、[2]広島工大)
○ Shouya MATSUBA[1], Tadashi NAKAI[1,2] ([1]Hiroshima Institute of Techonology, [2]Hiroshima Institute of Technology)

ポリエチレンテレフタラート（PET）は加水分解が困難なプラスチックであるが、2005 年に初めて PET 加水分解酵素が発見されて以来、この酵素を利用した研究が世界中で進められている。本研究では、排水処理にも用いられる脱窒菌 *Paracoccus denitrificans* に PET 加水分解酵素遺伝子を導入することでプラスチック分解能を付与することを目的としている。PET 加水分解酵素には、剪定枝葉堆肥（Leaf-branch compost）クチナーゼ（LCC）を用いた。酵素を分泌させるために、ペリプラズム移行シグナル（sig2）を N 末端に融合させた LCC 遺伝子を合成し、広宿主域ベクターpRK415 誘導体（pRK-P_{A800}）のブチルアミンプロモーター（P_{A800}）の下流にクローニングして、発現プラスミド pRK-P_{A800}-sig2-LCC を構築した。また、sig2 を除いた pRK-P_{A800}-LCC も構築し、両者の活性を比較した。各プラスミドを大腸菌 S17-1 株に導入した後、接合伝達により *P. denitrificans* に導入した。得られた *P. denitrificans* の形質転換体を、*n*-ブチルアミンを炭素源とする最少培地で 3 日間培養した後、培養上清、ペリプラズム画分、細胞質画分を調製し、それらの酵素活性を測定した。その結果、培養上清では、sig2 が存在しない場合のみ活性が認められた。ペリプラズム画分では、sig2 の有無によらず活性が認められたが、sig2 のない場合の方が高活性であった。細胞質画分では、sig2 のない場合のみ活性が認められた。これらの結果から、今回用いた sig2 シグナルは、LCC の細胞質からペリプラズムへの移行は促進するが、ペリプラズムから細胞外への漏出は抑制されることが示唆された。

Polyethylene terephthalate (PET) is a plastic that is difficult to hydrolyze, but since the discovery of the first PET hydrolase in 2005, research using this enzyme has been conducted worldwide. In this study, we have introduced a PET hydrolase (LCC) gene into *Paracoccus denitrificans*, in order to confer plastics degrading capacity on the bacterium. In order to secrete the enzyme, a LCC gene with a periplasmic transition signal (sig2) fused to its N-terminus was synthesized, and cloned into the downstream of the butylamine promoter (P_{A800}) of a broad host range vector pRK415 derivative (pRK-P_{A800}) to construct the expression plasmid pRK-P_{A800}-sig2-LCC. We also constructed the signal-less plasmid pRK-P_{A800}-LCC. Each plasmid was introduced into *E. coli* S17-1 and then into *P. denitrificans* by conjugative transfer. The resulting transformants were cultured for 3 days in minimal medium with *n*-butylamine as the carbon source. The culture supernatant, periplasmic and cytosolic fractions were prepared and their enzyme activities were measured. The results showed that in the culture supernatant, activity was observed only in the absence of sig2. In the periplasmic fraction, activity was observed regardless of the presence or absence of sig2, but the activity was higher in the absence of sig2. In the cytosolic fraction, activity was observed only in the absence of sig2. These results suggests that the sig2 signal promotes the transfer of LCC to the periplasm, but inhibits the leakage to the extracellular space.

PET hydrolase, cutinase, Paracoccus denitrificans

講演番号：3B07-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

Pseudoxanthomonas sp. TN-N1 由来生分解性プラスチックナイロン 4 分解酵素の諸性質解明

Characterization of nylon4-degrading enzyme from *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1

○佐々浪 由梨香[1]、本田 正義[2]、外村 彩夏[3]、阿部 英喜[4]、山田 美和[1,5] ([1]岩手大院・総合科学、[2]東京理科大・工、[3]東海大・農、[4]理研 CSRS、[5]岩手大・農)
○ Yurika SASANAMI[1], Masayoshi HONDA[2], Ayaka HOKAMURA[3], Hideki ABE[4], Miwa YAMADA[1,5] ([1]Iwate Univ. Grad. Sch., [2]Tokyo Univ. of Sci, [3]Tokai Univ., [4]RIKEN CSRS, [5]Iwate Univ.)

【目的】繰り返し構造内に 4 つの炭素を持つポリアミドの一種であるナイロン 4 は、バイオマス由来のグルタミン酸から得られる 2-ピロリドンをモノマーとするバイオベースポリマーであり、高い生分解性を持つ。さらに、高い融点と耐久性を持つことから、現在注目されている素材である。しかし、ナイロン 4 の分解酵素の特定は未だ行われておらず、ナイロン 4 の分解メカニズムも不明であった。我々はこれまでに、ナイロン 4 分解菌 *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 を土壌から単離し、本菌が分泌するナイロン 4 分解活性を有する酵素の精製系を構築した（2021 年度日本農芸化学会大会にて発表）。そこで、本研究では、本ナイロン 4 分解酵素について、さらなる諸性質解析を行うことを目的とした。
【方法】まず、*Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 を 0.5%ナイロン 4 含有培地(pH 7.0)において、30ºC で 3 日間振盪培養した。その後、得られた培養液上清 400 mL を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE-Toyopearl)とゲルろ過クロマトグラフィー(Toyopearl HW-55)の組み合わせにより、目的酵素を電気泳動上単一に精製した。ナイロン 4 分解活性は、酵素液とバッファーを加えたナイロン 4 エマルションの 600 nm の吸光度減少を測定し、1 時間当たりの吸光度減少値を 1 Unit として算出した。
【結果・考察】精製酵素のナイロン 4 分解活性は、pH7.5、35℃で最大となり、pH6.0-7.0、35℃の範囲で活性が 80%以上残存し安定であった。また、精製酵素は、分子量 90 kDa の単量体または二量体であると推定された。さらに、エチレンジアミン四酢酸の添加によって酵素活性が大幅に阻害されたため、酵素活性における金属イオンの寄与が示唆された。本酵素とナイロン 4 の反応生成物を LC-MS と NMR によって分析した結果、二~四量体の γ-アミノ酪酸(GABA)オリゴマーが検出された。よって、本酵素は、ナイロン 4 のアミド結合部分を加水分解していることが示唆された。一方で、本菌を培養したナイロン 4 含有培地からは、GABA と二量体の GABA オリゴマーのみが検出されたことから、本菌は今回精製した酵素の他にも複数種の分解酵素を分泌し、ナイロン 4 を分解して資化している分解メカニズムが推測された。

Polyamide4 (PA4) is a bioplastic with superior properties and high biodegradability. Although some PA4-degrading microorganisms have been isolated from various environments, no enzymes that play a role in PA4 degradation have yet to be identified. In this study, we characterized enzymatic properties of purified enzyme exhibiting PA4-degrading activity from *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 and showed that the enzyme hydrolyzes the amide bonds of PA4 into γ-aminobutyric acid oligomers (2–4 mers).

Biodegradable plastic, Polyamide4, degradation enzyme

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3B07-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に特異的に吸着したポリエステラーゼ CutL1 の可視化方法の構築

Visualization of polyesterase CutL1 on Langmuir membrane of hydrophobin RolA from *Aspergillus oryzae*

○齋藤 有美[1]、寺内 裕貴[2]、吉見 啓[3]、田中 拓未[4]、石崎 裕也[5]、三ツ石 方也[5]、藪 浩[6,7]、阿部 敬悦[1]([1]東北大院農、[2]京大院地球環境学堂、[3]京大院農、[4]農研機構・農環研、[5]東北大院工、[6]東北大 WPI-AIMR、[7]東北大多元研)

○YUMI SAITO[1], YUKI TERAUCHI[2], AKIRA YOSHIMI[3], TAKUMI TANAKA[4], YUYA ISHIZAKI[5], MASAYA MITSUISHI[5], HIROSHI YABU[6,7], KEIETSU ABE[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ. [2]Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]NARO, [5]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [6]WPI-AIMR, Tohoku Univ., [7]IMRAM, Tohoku Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RolA は界面に集合・吸着し自己組織化する[1]。また，RolA は生分解性ポリエステルの一種である PBSA に吸着後，polyesterase CutL1 とイオン的相互作用することで PBSA 表面に CutL1 をリクルートし，PBSA 分解を促進する[1, 2]。しかし，CutL1 が RolA 吸着層の下にある PBSA 表面へ到達する分子機構は不明である。本研究では自己組織化モデルとして Langmuir 膜(L 膜)法[3]で作製した RolA L 膜に CutL1 を反応させ，L 膜上に結合した CutL1 を可視化する方法を構築した。まず，RolA L 膜転写基板を CutL1 溶液に浸漬し，その後発色基質 *p*NP-butyrate と反応させた。CutL1 に浸漬した基板のみで基質分解による *p*NP 発色が認められ，L 膜への CutL1 吸着を確認できた。RolA L 膜転写親水基板に CutL1 を反応させた試料を原子間力顕微鏡(AFM)観察すると，L 膜上に無数の粒子が新たに付着していた。この粒子が CutL1 かどうか確認するため，FITC 修飾 CutL1 を RolA L 膜と反応後，蛍光顕微鏡観察したところ，L 膜上に FITC の蛍光が観察された。また，NaCl を添加した CutL1 溶液に RolA L 膜転写基板を浸漬したところ，発色基質分解による吸光度上昇幅は小さくなり，AFM 観察では L 膜への粒子付着が捉えられなかった。以上の結果から，L 膜上の粒子は，イオン的相互作用で吸着した CutL1 であることが示唆された。一方，CutL1 吸着 RolA L 膜転写基板を NaCl を含む緩衝液で洗浄しても，AFM 観察で粒子の付着が観察された。即ち，RolA L 膜転写親水化基板に吸着した CutL1 は，イオン的吸着から安定的な複合体へと移行している可能性が示唆された。

Hydrophobin RolA is adsorbed on solid surfaces such as biodegradable PBSA and forms self-assembled membrane[1, 2]. RolA adsorbed on PBSA recruits polyesterase CutL1 via an ionic interaction[2, 3], however, the mechanism how CutL1 reaches PBSA is unclear. We have tried to detect CutL1 attachment to the Langmuir membrane of RolA. Enzymatic assay using *p*NP-butyrate suggested CutL1 was adsorbed on the RolA membrane. AFM showed many particles were adsorbed on the RolA membrane. The particles were suggested to be CutL1 via following analyses; 1) The particles were not adsorbed on the RolA membrane when CutL1 was incubated under NaCl existing, 2) FITC fluorescence was detected on the RolA membrane when FITC-labeled CutL1 was used instead of non-labeled CutL1. Meanwhile, those were observed after the CutL1-adsorbed RolA membrane was washed with NaCl containing buffer. Therefore, it was suggested CutL1 was adsorbed to RolA membrane via an ionic interaction, then shifted to stable complex formation. [1]Terauchi Y. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.(2020); [2]Takahashi T. et al., Mol. Microbiol.(2005); [3]Takahashi T. et al., Mol. Microbiol.(2015).

hydrophobin, polyesterase, protein interaction

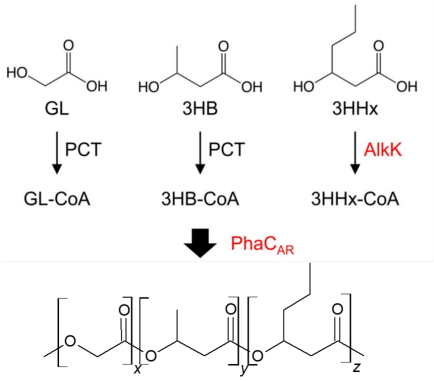
発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：3B07-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

中鎖モノマー導入による軟質性・配列制御型グリコール酸ポリマーの生合成

Biosynthesis of sequence-regulated and flexible glycolate-containing polymer by medium-chain-length monomer introduction.

○田中 聖也[1]、冨田 宏矢[2]、佐藤 圭悟[1]、Nomura Christopher[3]、松本 謙一郎[2]([1]北大総合化、[2]北大院工、[3]Univ. of Idaho)
○SEIYA TANAKA[1], HIROYA TOMITA[2], KEIGO SATOH[1], Christopher Nomura[3], KEN’ICHIRO MATSUMOTO[2] ([1]CSE Hokkaido Univ., [2]Emg.Hokkaido Univ., [3]Univ. of Idaho)



ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は微生物が生産する生分解性プラスチックであり、PHA 合成酵素 PhaC により合成される。以前我々は改変型酵素 PhaC$_{AR}$ と基質となるヒドロキシアシル CoA 供給酵素 PCT を発現した大腸菌を用い、天然モノマーの 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）と非天然モノマーのグリコール酸（GL）を含む共重合体 P(GL-*co*-3HB) の合成を報告した。[1]GL ポリマーは高い加水分解性と生体適合性を示すため、この共重合体の応用が期待されたが、その非常に硬い物性の改善が求められた。本研究では、中鎖ヒドロキシアルカン酸の CoA 体合成酵素 AlkK を加えて発現させ、中鎖モノマーである 3-ヒドロキシヘキサン酸（3HHx）の導入を試みた。NMR 分析の結果、3HHx が含まれた三元共重合体 P(GL-*co*-3HB-*co*-3HHx) の合成が確認された。3HHx は 3HB とランダムに混在しているのに対し、GL は不均一に分布しており、ポリマー全体の GL 分率に比べて高い局所的 GL 分率を示すセグメントが含まれることが分かった。また機械的・熱的特性を調べた結果、NMR の結果が支持された。さらに期待通り P(GL-*co*-3HB) と比べて 3HHx の導入によって柔軟性が顕著に向上したことが明らかとなった。[2]

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a microbial biodegradable plastic and is biosynthesized by PHA synthases PhaCs. We previously reported the synthesis of the copolymer P(GL-*co*-3HB) composed of a natural monomer 3-hydroxybutanoate (3HB) and an unnatural monomer glycolate (GL) using *Escherichia coli* expressing the engineered enzyme PhaC$_{AR}$ and the hydroxyacyl-CoA- supplying enzyme PCT. To improve its stiff property, we here additionally introduced a medium-chain-length (MCL) monomer 3-hydroxyhexanoate (3HHx). 3HHx-CoA was supplied using the MCL hydroxyalkanoate CoA ligase AlkK. By NMR analysis, we found that 3HHx was incorporated and the novel terpolymer P(GL-*co*-3HB-*co*-3HHx) was obtained. 3HHx units were randomly introduced, whereas GL units were heterogeneously distributed. The GL-rich fragment showed a higher local GL fraction than that of the whole polymer. Furthermore, as expected, the introduction of 3HHx significantly enhanced the flexibility of the polymer compared to P(GL-*co*-3HB).

[1] Arai, Sakakibara, Mareschal, Ooi, Zinn, and Matsumoto. ***Front. Bioeng. Biotechnol.*** (2020)
[2] Tomita, Satoh, Nomura, and Matsumoto. ***Biosci. Biotechnol. Biochem.*** (2021)

polyhydroxyalkanoate, block copolymer, glycolate

講演番号：3B07-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

セルロース生産能を有する新規酢酸菌の同定

Identification of novel acetic acid bacteria with cellulose-producing ability

○水野 正浩、田川 聡美、天野 良彦（信大工）
○Masahiro MIZUNO, Satomi TAGAWA, Yoshihiko AMANO (Shinshu Univ.)

【緒言】酢酸菌が産生するバクテリアセルロース (BC) の特徴は、数十～数百 nm の繊維径を有するナノセルロースであることと、それらの繊維が網目状の構造体 (BC ペリクル) を形成する点である。BC ペリクルは湿潤状態での機械強度が高く、生体適合性が高いことから、現在は人工血管や細胞培養基板などの医療分野での利用が進められている。一般に、酢酸菌は SH 培地と呼ばれるグルコースを主成分とする培地で培養されるが、循環型の物質生産プロセスの開発が求められる昨今、農業残渣や食品残渣などの未利用バイオマスを利用した安価な培地で効率よく物質生産する酢酸菌株が望まれる。そこで、本研究では、BC の実現的な利用を目指して、酢酸菌の標準菌株および新規の酢酸菌株のセルロース合成能と遺伝子配列を調べ新規酢酸菌株の同定を行った。

【実験】標準菌株としては *Gluconacetobacter xylinus* AY201 及び NQ5、新規の酢酸菌株として、食酢の製造過程で単離した菌株 Sp1 及び Sp2 を用いた。各菌株を 5 mL の SH 培地で試験管内にて培養して得られたペリクルを、セルラーゼを添加した SH 培地 200 mL に移し、30 ℃、180 rpm で 3 日間前培養を行った。その後、前培養液から菌体を遠心分離で回収したのち、一定の菌体濃度に調製し 500 mL の SH 液体培地に播種した。28 ℃ で 7 日間静置培養したのちに得られたペリクルを、2 % NaOH 水溶液で 2 時間煮沸し、中性になるまで脱イオン水で洗浄することで培地成分や菌体を除去した。精製後のペリクルはワーリングブレンダーで破砕、解繊し、得られたスラリーの含水率を測定することで、BC 生産量を算出した。SH 培地にはエタノールを添加したものも用いた。酢酸菌株の同定は、16S rRNA の配列情報を用いて行った。

【結果と考察】いずれの菌株も標準 SH 培地において BC ペリクルを生産した。しかし、生産量は、Sp1＞NQ5＞Sp2＞AY201 と菌株ごとに違いがみとめられ、Sp1 は AY201 の約 5.1 倍、NQ5 の約 1.2 倍の BC を生産した。3 %のエタノールを添加した SH 培地条件においては、標準菌株の生産量が著しく減少した (0.2~0.3 倍)。一方、食酢の製造過程で単離された Sp1 株、Sp2 株においては、生産量の減少は認められるものの、標準菌株ほどの減少はみとめられなかった (0.6 倍)。以上の結果より、新規酢酸菌株 Sp1 は、SH 培地においてセルロース生産産量が高いだけでなく、培地条件に対しても柔軟なセルロース生産能を示す菌株である可能性が示唆された。また、今回取得した Sp1 株については、セルロース生産能が高い菌株として知られている *Gluconacetobacter xylinus* BPR2001 などとも近縁であることが明らかとなった。

Bacterial cellulose (BC) produced by acetic acid bacteria is unique in that it forms a 3D-gel like structure (BC pellicle) of nanocellulose. BC pellicles are currently being used in medical applications such as artificial blood vessels and cell culture substrates due to their high mechanical strength and biocompatibility. In general, acetic acid bacteria are cultivated in a glucose-based medium called SH medium, but with the recent demand for the development of a circular material production process, a new strain with the ability to efficiently produce materials in an economic medium using unutilized biomass have been desired. In this presentation, we will introduce the identification results of a new acetic acid bacteria strains, which were isolated in the vinegar production process, by examining the cellulose synthesizing ability and gene sequences.

本研究の一部は、ムーンショット農林水産研究開発事業 (MS508) によって実施された

bacterial cellulose, acetic acid bacterium, *Komagataeibacter xylinus*

発表責任者：水野正浩（m-mizuno@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B07-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム B

Leuconostoc citreum KD3 株に由来する難消化性菌体外多糖の性状解析

Characterization of indigestible exopolysaccharides (EPS) from *Leuconostoc citreum* KD3

○吉田 健太郎[1]、田中 裕大[1]、巻田 春香[1]、栗山 亘[2]、阿部 秀飛[2]、本多 裕司[1]、松本 健司[1]、小柳 喬[1] ([1]石川県立大 生資環、[2]サンエイ糖化)
○kentaro yoshida[1], yudai tanaka[1], haruka makida[1], wataru kuriyama[2], shuto abe[2], yuji honda[1], kenji matsumoto[1], takashi koyanagi[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]San-ei Sucrochemical Co.)

石川県産の漬物から分離された乳酸菌 *Leuconostoc citreum* KD3 株が産生する菌体外多糖 (EPS) は主に α-1,6 グリコシド結合で構成されており、その他 α-1,3 結合および α-1,2 結合も存在する。α-1,2 結合を含むオリゴ糖について過去にプレバイオティクス効果や糖質の吸収を穏やかにする効果が報告されており、本 EPS にも同様の効果や将来の食品添加物等への利用が期待される。本研究では α-1,2 結合を有する EPS の産業利用を進める目的で KD3 株由来 EPS について性状解析を行った。

本 EPS をマウスに投与したところ (0.5 g/kg 体重) 、グルコースおよびコーンスターチ投与群と比較して投与 30 分後の血糖値上昇が有意に低かったことから、難消化性多糖としての機能が示唆された。ウベローデ粘度計を用いて決定した本 EPS の粘度平均分子量 M_v は約 230,000 であった。走査型電子顕微鏡を用いて表面構造を確認したところ、本 EPS に多孔質のシート状構造が観察された。本 EPS 合成酵素を推定するため KD3 株培養上清 (MRS 液体培地使用) を SDS-12% (w/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、スクロース誘導性のタンパク質バンドが複数確認され、本 EPS の生合成酵素に相当することが示唆された。

The exopolysaccharide (EPS) produced by the lactic acid bacterium *Leuconostoc citreum* KD3 strain isolated from pickles produced in Ishikawa Prefecture is mainly composed of α-1,6 glycosidic linkages, with α-1,3 and α-1,2 linkages also present. Oligosaccharides containing α-1,2 linkages have been reported to have prebiotic effects and to moderate the absorption of carbohydrates, and KD3 EPS is expected to have similar effects and to be used as a food additive in the future. In this study, we analyzed the properties of KD3 EPS to promote the industrial use of EPS with α-1,2 linkage.

When this EPS was administered to mice (0.5 g/kg body weight), the increase in blood glucose level 30 minutes after administration was significantly lower than that in the glucose and cornstarch groups, suggesting that EPS functions as an indigestible polysaccharide. The viscosity-averaged molecular weight (M_v) of this EPS was about 230,000. When the surface structure was confirmed using a scanning electron microscope, a porous sheet-like structure was observed. In the supernatant of the MRS liquid culture of KD3 strain, several sucrose-inducible protein bands were identified by SDS-12% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis, suggesting that it corresponds to the biosynthetic enzyme of this EPS.

exopolysaccharide, Lactic acid bacteria, *Leuconostoc citreum*

講演番号：3B09-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

レスベラトロール位置選択的配糖化酵素の探索と機能解析

Screening and analysis of regioselective glycosyltransferase of resveratrol

○木許 翔太[1]、竹内 道樹[2]、板垣 優大[3]、岸野 重信[1]、岡田 奈津実[1]、原 良太郎[2]、上田 誠[2,3]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]小山高専物質工学科)

○Shota KIMOTO[1], Michiki TAKEUCHI[2], Yudai ITAGAKI[3], Shigenobu KISHINO[1], Natsumi OKADA[1], Ryotaro HARA[2], Makoto UEDA[2,3], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]National Institute of Technology, Oyama College)

レスベラトロールはポリフェノールの一種であり、抗酸化作用や抗老化作用、記憶力の改善作用などが報告されている。そのため、健康補助剤などの機能性成分として使用されているが、レスベラトロールは水溶性が低く、pH や温度条件によっては不安定であるため、配糖化による利用の拡大が期待されている。特に、レスベラトロール-4′-*O*-配糖体は 3-*O*-配糖体よりも抗酸化活性が高いため、4′位選択的配糖化酵素の取得が求められていた。そこで本研究では、4′位選択的な配糖化に有用な微生物酵素の探索に取り組み、取得した微生物の 4′位選択的配糖化酵素の機能解析を行った。探索の結果、当研究室で保有する 1200 株以上の保存菌株から、*Rhizobium pusense* JCM16209^T が最も高い 4′位選択性（3 位：4′位=3：97）と優れた配糖化活性を有することを見出した。

さらに、本菌が有するα-glucosidase 遺伝子を発現する形質転換大腸菌を構築し、機能解析を行ったところ、元菌と同様の 4′位選択性を確認した。現在は、そのα-glucosidase を用いて、レスベラトロール-4′-*O*-配糖体の合成に最適な反応条件と、他のポリフェノール基質に対する特異性や位置選択性について評価している。

Resveratrol is a polyphenol that has antioxidant, anti-aging, and memory-enhancing effects. Therefore, resveratrol is used as a functional ingredient in health supplements. Since resveratrol has low water solubility and instability under pH and temperature conditions, it is expected to expand its use by glycosylation. In particular, because resveratrol-4′-*O*-glucoside has higher antioxidant activity than 3-*O*-glucoside, 4′-selective glycosyltransferase is needed. In this study, we screened microbial enzymes useful for 4′- selective glycosylation and analyzed the function of the enzyme. As a result of the screening toward more than 1200 strains conserved in our laboratory, we found that *Rhizobium pusense* JCM16209^T had the highest 4′-selectivity (3:4′=3:97) and higher activity.

Furthermore, we constructed *Escherichia coli* expressing the α-glucosidase of *R. pusense* JCM16209^T. As a result, the α-glucosidase showed the same 4′-selectivity as the original strain. Currently, we have evaluated the optimal reaction conditions for the synthesis of resveratrol-4′-*O*-glucoside using the α-glucosidase, as well as its specificity and regioselectivity for other polyphenol substrates.

Resveratrol, Glycosylation, Rhizobium pusense

発表責任者：小川　順（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B09-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

第三級テルペンアルコールへの配糖化反応に関する研究

Evaluation of transglucosylation to tertiary alcohols

○板垣 優大[1]、三塚 海渡[1]、竹内 道樹[2]、原 良太郎[2]、小川 順[3]、上田 誠[1,2]（[1]小山高専物質工学科、[2]京大院農・産業微生物、[3]京大院農・応用生命）
○Yudai ITAGAKI[1], Kaito MITSUTSUKA[1], Michiki TAKEUCHI[2], Ryotaro HARA[2], Jun OGAWA[3], Makoto UEDA[1,2] ([1]National Institute of Technology, Oyama College, [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

テルペンアルコールは様々な生理活性が報告されているが、水溶性や安定性の低さなどから適用範囲が制限されている。配糖化反応はこれらの問題を解決する有力な手段であり、ヒドロキノンやアスコルビン酸などは微生物の酵素反応により工業的に配糖体が生産されている。

グリコシダーゼなどを用いた糖転移反応は、工業的に利用しやすい方法であるが、第三級アルコールに対しては立体障害により困難とされ、報告例も限られていた。そこで本研究は、第三級テルペンアルコールであるリナロールに対して高い糖転位活性を有する *Rhizobium pusense* JCM16209^T を用いて、リナロールに対する配糖化反応の性質について検討した。洗浄菌体を用いた配糖化反応では、(−)-リナロールに対して 21.8% のモル収率で配糖体を合成し、ラセミ体のリナロールに対して (−)-リナロール配糖体が 21.0% 過剰と弱い選択性を示した。さらに、本菌の α-glucosidase 遺伝子(Gene ID: 61453890)を発現させた組換え大腸菌においても、リナロールに対する高い配糖化活性を有することが認められた。現在は、形質転換大腸菌由来の酵素を用いて、リナロールに対する反応の性質、最適な条件、他の第三級アルコールに対する反応特異性について評価を行っている。

Terpene alcohols offer industrial applications as pharmaceuticals, cosmetics, and perfumes, however, its instability and low solubility in water often limit its potential applications. Glycosylation of non-sugar compounds is a useful technique for improving their properties, such as water solubility and instability. The enzymatic glucosylation of various alcohol is a well-known technique in industrial applications, however, its reaction for tertiary alcohol is few reported.

In this study, we investigated the glucosylation activity of *Rhizobium pusense* JCM16209^T against tertiary alcohols such as linalool. The molar yield of (−)-linalyl- α -D-glucopyranoside produced from (−)-linalool by the strain was 21.8% . The enantioselectivity for the glucosyl transfer toward (±)-linalool was 21.0% *ee* for the (−)-isomer. Furthermore, transglucosylation activity toward tertiary alcohols was also observed in *Escherichia coli* expressing an α-glucosidase gene(Gene ID: 61453890) of *R. pusense* JCM16209^T. Currently, characteristics of the enzyme from transformed *E. coli* are evaluated as to optimal reaction conditions and reaction specificity toward various tertiary alcohols.

Linalool, Glycosylation, Rhizobium pusense

発表責任者：上田誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：3B09-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

アラビトール生産菌 *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 の糖アルコール生産経路

Metabolic pathway of sugar alcohol production by arabitol producing yeast *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1

○岩田 寛[1]、眞榮田 麻友美[2]、柏木 豊[2]、前橋 健二[1,2]、吉川 潤[2]([1]東農大院応生、[2]東農大応生)
○Kan IWATA[1], Mayumi Maeda[2], Yutaka Kashiwagi[2], kenji Maehashi[1,2], Jun Yoshikawa[2] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

糖アルコールは、低カロリーや非う蝕性などの有用性から機能性甘味料として広く利用されており、これまでにも耐浸透圧性酵母による複数の生産例が知られている。これまで、未殺菌のハチミツから糖アルコールの一種であるアラビトールを生産する酵母 *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 株を新たに発見している。本菌種による糖アルコール生産の報告例が未だないことから、アラビトール生産代謝を解析していくことを目的とした。

これまでの研究から、*Z. siamensis* kiy1 株はグルコースを炭素源とした時に約３０％の収率でアラビトールを生産することと、培養初期にはグリセロールを生産し、その後アラビトールの生産に代謝が切り替わることが確認された。より詳細に調べるため、本菌株のゲノム解析を行い、糖アルコール生産に関連する酵素について調べた。近縁種（*Z. rouxii*）のゲノム配列より遺伝子予測を行い、糖アルコール関連酵素の存在を確認した。関連酵素のうち、アラビトール脱水素酵素の活性を測定したところ、培養１日目よりもアラビトール生産が旺盛となる培養４日目に高活性を示した。さらに、リアルタイム PCR によりこれら関連酵素遺伝子の発現量を測定することで生産代謝をより解析していく予定である。

Sugar alcohols are widely used as functional sweeteners because of low calorie and non-cariogenicity. Several studies on the production of sugar alcohols by osmotolerant yeasts have been known. Previously, we newly discovered *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 which produces arabitol, a kind of sugar alcohol, from non-pasteurized honey. In this study, we investigated about the metabolism of arabitol production in the yeast.

When *Z. siamensis* kiy1 was grown on a high glucose concentration medium, arabitol production by the yeast was confirmed later than glycerol, and the production yield to consumed glucose was about 30%. Enzymes related to sugar alcohol production were estimated in the genome sequence of strain kiy1. Arabitol dehydrogenase (ArDH) activity in the log phase was higher than that in the lag phase. In addition, we will analyze about the expression of ArDH gene and will clarify the metabolic pathways to produce arabitol in this yeast.

Zygosaccharomyces siamensis, arabitol, osmotolerant yeast

発表責任者：吉川 潤（jy207183@nodai.ac.jp）

講演番号：3B09-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

ビフィズス菌抽出液を用いた非遺伝子組換え酵素によるラクト-*N*-ビオース I の生産

Production of lacto-*N*-biose I using non-recombinant enzymes extracted from bifidobacterial cells

○町田 峻太郎[1,3]、齋藤 勝一[1]、西本 完[1]、北岡 本光[1,2]([1]農研機構食品研、[2]新潟大農、[3]宇部高専)
○Shuntaro MACHIDA[1,3], Katsuichi SAITO[1], Mamoru NISHIMOTO[1], Motomitsu KITAOKA[1,2]
([1]Food Research Institute, NARO, [2]Niigata Univ., [3]NIT, Ube college)

ラクト-*N*-ビオース I（LNB）はビフィズス菌の選択的増殖因子であり、ヒトの腸内環境改善等の健康機能性が期待されるオリゴ糖である。これまでにビフィズス菌由来の 4 種の遺伝子組換え酵素(スクロースホスホリラーゼ、UDP-グルコース:ガラクトース 1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、UDP-グルコース 4-エピメラーゼ、1,3-β-ガラクトシル-*N*-アセチルヘキソサミンホスホリラーゼ)を用いて、スクロースおよび N-アセチルグルコサミンを出発原料とした LNB 合成技術を開発してきた。本研究では LNB の食品分野での利用を視野に入れ、遺伝子組換え酵素を使用せずに LNB を効率よく生産する技術の開発を目的とした。ビフィズス菌抽出液には LNB 合成に必要な 4 つの酵素だけでなく、LNB 合成阻害要因となる低分子化合物や LNB 合成阻害酵素（主にホスホグルコムターゼ、フルクトース 6-リン酸ホスホリラーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼ）が含まれている。これらの阻害要因を除去するため、(1)膜ろ過による低分子化合物除去、(2)ブタ膵液由来のプロテアーゼ・パンクレアチン処理による阻害酵素の選択的不活化、(3)グルコアミラーゼ処理によるグリコーゲンホスホリラーゼの反応基質除去、をビフィズス菌抽出液に施した。本処理済ビフィズス菌抽出液を用いた反応（100 mL）において、反応開始 21 日後の LNB 濃度が 288 mM（110 g/L）に達し、本技術が非遺伝子組換え酵素による効率的な LNB 生産に有用であることが示唆された。

Lacto-*N*-biose I (LNB) is supposed to be a bifidus factor in human milk oligosaccharides. We have established the practical production method of LNB using four recombinant enzymes from bifidobacteria. To aim the use of LNB for a food ingredient, we here report the production of LNB without using recombinant enzymes. The bifidobacterial crude extracts contain the all four enzymes for LNB synthesis, but also inhibitory factors, low-molecular-weight compounds and interfering enzymes. We tried to remove these inhibitory factors from the crude extracts by the following treatments. (1) Removal of low-molecular-weight compounds by membrane filtration. (2) Selective inactivation of interfering enzymes by using protease “pancreatin”. (3) Removal of the substrate of interfering reaction by using glucoamylase. As a result of a 100-mL scale reaction using the treated extract, LNB concentration reached 288 mM (110 g/L) after 21 days. This result suggests that LNB can be efficiently produced using the treated extract of bifidobacterial cells as a non-recombinant enzyme source.

lacto-*N*-biose I, human milk oligosaccharides, bifidus factor

発表責任者：西本　完（manishi@affrc.go.jp）

講演番号：3B09-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

新奇菌体外ラクターゼ生産菌の探索とそのラクターゼの酵素化学的特徴
Screening of extracellular lactase producing bacteria and characterization of enzymatic properties for the lactase

○丹羽 由樹[1]、中村 浩平[1,2]、川﨑 信治[3]、島田 昌也[1,2]、堀口 博文[4]、中川 智行[1,2] ([1]岐阜大院自然科学、[2]岐阜大応生、[3]東京農大生命、[4]合同酒精株式会社)
○Yoshiki NIWA[1], Kohei Nakamura[1,2], Shinji Kawasaki[3], Masaya Shimada[1,2], Hirofumi Horiguchi[4], Tomoyuki Nakagawa[1,2] ([1]Gifu Univ. Nat Sci, [2]Gifu Univ., [3]Tokyo Univ. Agric., [4]Godo Shusei Co. Ltd.)

【目的】β-ガラクトシダーゼ（ラクターゼ）は、乳製品等に含まれる乳糖の加水分解、さらにはガラクトオリゴ糖の生産に利用されている産業用酵素の一つである。現在、*Kluyveromyces lactis* や *Bacillus* 属細菌由来など様々なラクターゼが産業化されているが、菌体外にラクターゼを生産する報告例は数少ない。本研究では、自然界から菌体外にラクターゼを生産する微生物を探索し、その酵素科学的諸性質を示すことを目的とした。
【結果・考察】X-Gal の分解能を指標に菌体外にラクターゼ活性が認められる菌株をスクリーニングした結果、*Paenibacillus* sp. NY-1 株を獲得した。NY-1 株の培養上清からラクターゼを精製し、酵素科学的諸性質を観察したところ、最適温度は 40 ºC、至適 pH は 7.5 であった。また、本酵素の ONPG に対する V_{max} および K_m はそれぞれ 116 U/mg および 0.978 mM であったが、乳糖に対する V_{max} および K_m はそれぞれ 36.6 U/mg および 186 mM であった。また本酵素は Mg と Mn により強力に活性化された。一方、現在のところ本酵素が分泌型であるかは同定できていない。

【 Introduction 】β-galactosidase (lactase) is one of the major industrial enzymes used for hydrolyzing lactose contained in dairy products and for producing galactooligosaccharides. Currently, various lactases such as those derived from *Kluyveromyces lactis* and *Bacillus* strains have been utilized in several industries, but there are few reports about bacterial extracellular lactases. In this study, we tried to screen bacteria, which produce novel type of extracellular lactase, and to demonstrate its enzymatic properties.
【Results and Discussion】Bacteria strains producing extracellular lactase were screened using the X-Gal degradative activity. As a result, we obtained *Paenibacillus* sp. strain NY-1 as extracellular lactase producing bacterium, and enzymatic property of purified lactase from strain NY-1 was characterized. Optimum temperature and pH of the lactase were 40ºC and 7.5, respectively. Its V_{max} and K_m for ONPG were 116 U/mg and 0.978 mM, respectively, although those for lactose were 36.6 U/mg and 186 mM. The lactase was also activated by Mg an Mn ions. On the other hand, we could not identify how the enzyme localized in extracellular fraction.

β-galactosidase, *Paenibacillus*, extracellular enzyme

発表責任者：中川智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B09-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

α-1,3-グルカン結合ドメインと 4 量体赤色蛍光タンパク質からなる融合タンパク質の構築と特性評価
Construction and characterization of a fusion protein consisting of α-1,3-glucan binding domains and tetrameric red fluorescent protein
○大塚 唯、古澤 宏幸、今野 博行、矢野 成和（山形大院理工）
○Yuitsu OTSUKA, Hiroyuki FURUSAWA, Hiroyuki KONNO, Shigekazu YANO (Yamagata Univ. Grad. Sch. of Sci. and Eng.)

【緒言】*Bacillus circulans* KA-304 由来の α-1,3-グルカン加水分解酵素 Agl-KA は、非常に高い基質結合能力を持つ結合ドメイン群を有している。先行研究では、Agl-KA の 3 つの基質結合ドメイン（DS1,CB6,DS2）と単量体緑色蛍光タンパク質 AcGFP を融合したタンパク質 DCD-monoGFP が作製され、カビ細胞壁表層中の α-1,3-グルカンの蛍光標識プローブとして利用できることが示された。本研究ではより高性能な蛍光標識プローブの開発を目指し、Agl-KA の 3 つの結合ドメインを 4 量体赤色蛍光タンパク質 DsRed-Express2 と融合したタンパク質 DCD-tetraRFP を作製し、結合能を評価した。

【結果】DCD-monoGFP が 3 つの基質結合ドメインを持つのに対し、DCD-tetraRFP は水溶液中で 4 量体を形成するため 1 つの複合体に 12 個の基質結合ドメインを含んでいる。したがって、α-1,3-グルカンへの結合力が高く、0.01%の α-1,3-グルカンに対する結合量は DCD-monoGFP の約 2 倍であった。また、DCD-tetraRFP は 1 つの複合体に 4 本の立体的に配置された結合ドメイン群をもつため、基質を架橋し凝集を引き起こした。この凝集を応用し 24 穴シャーレ内でカビバイオフィルム形成を 80%阻害することに成功した。本講演では新規融合タンパク質 DCD-tetraRFP の結合特性についても報告する。

【Introduction】Agl-KA, an alpha-1,3-glucan hydrolyzing enzyme from *Bacillus circulans* KA-304, has three binding domains(DS1, CB6, DS2; DCD) with very high substrate-binding activity. In our previous study, DCD-monoGFP, a fusion protein composed of DCD domains of Agl-KA and a monomeric green fluorescent protein (AcGFP), was shown to be a fluorescent probe for α-1,3-glucan in the surface layer of fungal cell-wall. In this study, we constructed DCD-tetraRFP by fusing the DCD domains of Agl-KA with a tetrameric red fluorescent protein DsRed-Express2.

【Result】DCD-tetraRFP forms a tetramer in aqueous solution and contains 12 substrate-binding domains in one complex. Therefore, DCD-tetraRFP strongly bound α-1,3-glucan, and the amount of DCD-tetrRFP binding to 0.01% α-1,3-glucan was about twice that of DCD-monoGFP. Since DCD-tetraRFP has four binding domains arranged in different directions in one complex, DCD-tetraRFP cross-linked the substrate and caused aggregation. In addition, DCD-tetraRFP decreased fungal biofilm formation by 80% in a 24-well dish.

α-1,3-glucan, Fungal cell wall, Glucan binding domain

発表責任者：矢野成和（shige-y@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3B09-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

茶殻から生成する過酸化水素を利用したシトクロム P450 酸化反応プロセスの確立

Cytochrome P450-catalyzed oxidation reactions using hydrogen peroxide generated from tea leaf residues

○川名 秀明[1]、本田 裕樹[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大院理工、[2]奈良女子大理)
○Hideaki Kawana[1], Yuki Honda[2], Toshiki Furuya[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Fac. Sci., Nara Women’s Univ.)

【背景・目的】シトクロム P450 の一種である P450 ペルオキシゲナーゼは、過酸化水素を酸化剤として多様な有機化合物の酸化反応を触媒できることから、工業化学品や医薬品の製造プロセスへの応用に期待が寄せられている。過酸化水素は現在、アントラキノン法により製造されており比較的安価ではあるが、その生産には多くのエネルギー消費を伴うことなどから、環境調和性に優れた製造方法が世界中で研究されている。我々はこれまでに、未利用バイオマス資源のコーヒー滓に残存するポリフェノールを電子供与体として分子状酸素と反応させることにより、過酸化水素を生産できることを明らかにした。さらに、生産した過酸化水素を P450 ペルオキシゲナーゼに供給することにより、酸化反応を進行させることに成功した[1)]。本研究では、コーヒー滓と同様にポリフェノールを多く含む茶殻の利用を試みた。
【方法・結果】市販の茶葉から調製した緑茶と、その際に得られた茶殻を、純水もしくは pH 7.4 のリン酸緩衝液に添加して 24 時間振とうした。その結果、いずれの場合もリン酸緩衝液を用いた場合に過酸化水素の生成が確認された。さらに、茶殻をリン酸緩衝液中で 24 時間振とうした溶液を、*Bacillus subtilis* 由来の P450 ペルオキシゲナーゼ CYP152A1 を含む溶液と混合し、2 種類の基質 4-メトキシ-1-ナフトールおよびスチレンの変換を試みた。その結果、どちらの基質も効率的に酸化され、Russig’s blue およびスチレンオキシドの生成が確認された。これより、茶殻を過酸化水素の供給源として CYP152A1 による酸化反応を進行させることができた。
1) 川名秀明、他、第 73 回日本生物工学会大会（講演番号 G2H3-0102）、2021 年 10 月.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is an important and versatile industrial compound that finds use in numerous applications. Industrial H_2O_2 production is mainly by the anthraquinone process, although many researchers have been extensively studying environmentally benign methods. Here, we found that H_2O_2 was effectively produced from tea leaf residues (TLRs) by reacting this waste biomass with O_2 in sodium phosphate buffer. These results indicate new applications of TLRs as sources of H_2O_2.We further attempted to synthesize valuable chemicals by supplying the resulting H_2O_2 for the oxidation biocatalyst CYP152A1. We demonstrated that the TLR-derived H_2O_2 promoted the CYP152A1-catalyzed synthesis of Russig's blue and styrene oxide.

P450, Tea, Biomass

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

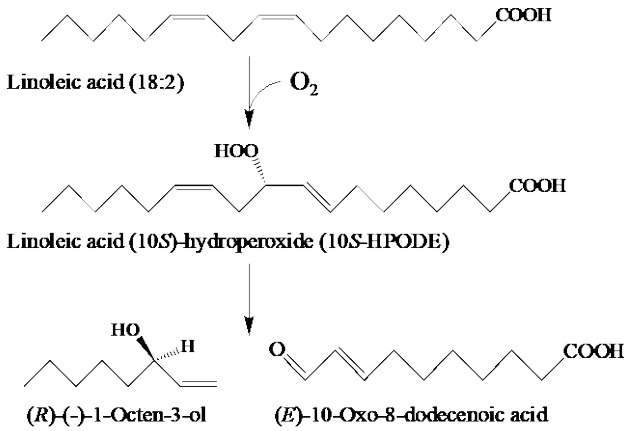
講演番号：3B09-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

担子菌ジオキシゲナーゼはキノコ主要香気成分であるマツタケオール生成に必須である

Basidiomycete dioxygenase is essential for forming Matsutake alcohol, a major volatile of mushrooms

○手嶋 琢[1]、府内 里紗[1]、中沢 威人[2]、内海 俊彦[1]、伊藤 隼哉[3]、向井 裕美[4]、仲川 清隆[3]、本田与一[2]、松井 健二[1]([1]山大院・創成、[2]京大院・農、[3]東北大院・農、[4]森林総研)
○Takuya TESHIMA[1], Risa Funai[1], Takehito Nakazawa[2], Toshihiko Utsumi[1], Junya Ito[3], Hiromi Mukai[4], Kiyotaka Nakagawa[3], Yoichi Honda[2], Kenji Matsui[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Tohoku Univ., [4]FFPRI)

香りの放散は生物の生存戦略の一翼を担っている。菌類も香りを放散するがその生理生態学的意義は未解明である。1-オクテン-3-オールは, マツタケオールの慣用名を持つ菌類の主要香気成分の 1 つである。しかし, その生合成経路が提唱されて約 40 年経過した今でもその関連酵素は未同定のままである。



担子菌ウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) で, 子嚢菌リノール酸酸素添加酵素遺伝子 *PpcC* と相同性がある *CcDOX1* 遺伝子を見出した。当該遺伝子の遺伝子破壊株 (*ΔCcDOX1*) では 1-オクテン-3-オールの生成が抑制された。また, 昆虫細胞を用いて発現させた組換え CcDOX1 はリノール酸に効率よく酸素添加し, リノール酸 10(*S*)ヒドロペルオキシド (10*S*-HPODE) を高い特異性で生成した。更に *C. cinerea* 粗酵素溶液に 10*S*-HPODE を添加するとほぼ化学量論的に 1-オクテン-3-オールに変換された。これらの結果から CcDOX1 が菌類 1-オクテン-3-オール生合成に関与する脂肪酸酸素添加酵素であることが始めて明らかとなった。現在, 本菌での 1-オクテン-3-オールの生理生態学的意義解明のため *ΔCcDOX1* を用いてキノコバエなどの菌食者との相互作用観察を進めている。

1-Octen-3-ol is one of the most abundant volatile organic compounds for the mushroom flavor and called Matsutake alcohol. The enzymes involved in the biosynthetic pathway have not been identified since the pathway was proposed for 40 years. *C. cinerea* has *CcDOX1*, showing substantial homology to *Aspergillus PpoC* that catalyzes dioxygenase reaction on linoleic acid. When *CcDOX1* was disrupted, the ability to form 1-octen-3-ol was suppressed. The recombinant CcDOX1 protein formed 10*S*-hydroperoxide from linoleic acid. When the hydroperoxide was added to the solution prepared from *C. cinerea*, it was efficiently converted into 1-octen-3-ol. In summary, CcDOX1 encodes a dioxygenase responsible for the oxygenation reaction in the 1-octen-3-ol biosynthetic pathway in the basidiomycete. To elucidate the ecophysiological significance of 1-octen-3-ol in this fungus, we are currently examining the behavior of fungivores with the gene-disrupted strain.

1-octen-3-ol, Matsutake alcohol, dioxygenase

発表責任者：手嶋　琢（a002wfu@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3B09-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム B

p-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素ファミリーに属する新たなタンパク質の同定と機能解析
Identification and characterization of novel proteins belonging to *p*-hydroxybenzoate hydroxylase family.

○勝木 希[1]、桝尾 俊介[1,2]、高谷 直樹[1,2]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS）
○ Nozomi Katsuki[1], Shunsuke Masuo[1,2], Naoki Takaya[1,2] ([1]University of Tsukuba, [2]MiCS, University of Tsukuba)

【背景】*p*-ヒドロキシ安息香酸（*p*HBA）水酸化酵素（PobA）は、FAD を介した NADPH 依存的な *p*HBA の酸化反応を触媒しプロトカテク酸（PCA）を生成する酵素であり、フラビン含有水酸化酵素のモデルとして古くから研究されてきた。本研究では、PobA ファミリーの中で新規なサブファミリーを形成する推定 PobA 酵素群を同定し、その機能を解析した。
【結果】既知の PobA とアミノ酸配列の相同性が 50%以下である推定 PobA をデータベースから探索した結果、*Xylophilus ampelinus* 由来 PobA（XaPobA）がこれと 70%程度の相同性を持つ推定 PobA とともに、既知の PobA とは異なる新たなサブファミリーを形成することを見出した。これらの推定 PobA 酵素には、既知の PobA の活性中心に保存されているチロシン残基が保存されておらず、代わりにトリプトファンやフェニルアラニン残基を有することがアミノ酸配列の比較解析から明らかとなった。XaPobA の組換え酵素を調製し、反応速度論的解析を行ったところ、*p*HBA に対する k_{cat} 値は $0.079 \pm 0.022\ s^{-1}$ であり、PCA に対するそれは $1.6 \pm 0.1\ s^{-1}$ であった。本サブファミリーに属する他の酵素についても PCA に対する反応速度の方が *p*HBA に対するそれより高かったことから、これらの酵素は *p*HBA よりも PCA を良い基質とすることが明らかとなった。また、XaPobA を PCA と反応させたところ、PCA の 5 位が水酸化され没食子酸が生成されることが見出された。以上の結果から、本研究よって新たに見出された PobA サブファミリーに属する酵素は PCA を水酸化し没食子酸を生成する新たな酵素群であることが示された。

p-Hydroxybenzoate hydroxylase (PobA) catalyzes the redox reaction between NADPH and *p*-Hydroxybenzoic acid (pHBA) to form protocatechuic acid (PCA) and is one of the best-studied flavin-containing hydroxylases. This study identified proteins of novel PobA subfamily that belongs to known PobA family and characterized their kinetic properties. Phylogenetic analysis revealed that PobAs from *Xylophilus ampelinus* and other bacteria constituted novel subfamily within the PobA family. Two tyrosines in the active center of known PobAs were absent in these PobAs, instead tryptophan or phenylalanine replaced this conserved tyrosine. The steady-state kinetic analysis showed that k_{cat} value of XaPobA was 20 times higher for PCA than for *p*HBA. Reaction product of XaPobA and PCA was determined by HPLC, and found that the reaction hydroxylated 5'-position of PCA to generate gallic acid. This study discovered the novel PobAs that hydroxylate PCA.

flavin monooxygenase, oxidoreductase, β-ketoadipate pathway

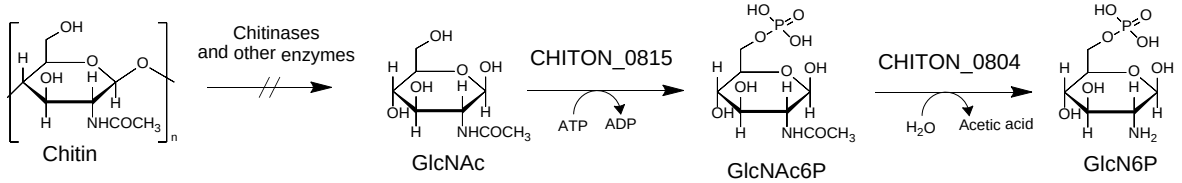
講演番号：3C01-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* における新たなキチン資化経路の発見

Identification of a second chitin assimilation pathway in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*

○渡邉 侑[1]、宮本 大暉[1]、金井 保[1,2]、跡見 晴幸[1] ([1]京大院工、[2]富山県立大工)
○Yu WATANABE[1], Hroki MIYAMOTO[1], Tamotsu KANAI[1,2], Haruyuki ATOMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Toyama Prefectural Univ.)

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)からなる天然多糖であり，セルロースに次いで多く存在するバイオマスである。*Pyrococcus chitonophagus*（旧称 *Thermococcus chitonophagus*）はキチンを主炭素源とする培地で単離された超好熱性アーキアである。ゲノム解析の結果，本菌には近縁の *Thermococcus kodakarensis* がもつ GH18 型キチナーゼ ChiA などのキチン分解・資化系遺伝子群の全ホモログが存在することから，同様のキチン代謝経路の存在が予想された。さらに本菌は膜局在型キチナーゼ ChiC や GH23 型キチナーゼ ChiD をも有することから，より多様なキチン代謝系の存在が示唆された。私達は *N*-acetyl-D-glucosamine 6-phosphate (GlcNAc6P) deacetylase とアノテーションされている CHITON_0804 に着目して，大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製した結果，実際に GlcNAc6P deacetylase 活性をもつことが判明した。さらに“Kinase similar to eukaryotic-like GlcNAc kinase”とアノテーションされた CHITON_0815 についても同様の解析を行った結果，本タンパク質が GlcNAc kinase 活性を示すことが判明した。したがって本菌では，GlcNAc から glucosamine 6-phosphate (GlcN6P)への変換において，通常の脱アセチル化反応後にリン酸化する経路に加え，リン酸化反応後に脱アセチル化する新たな経路も有していることが強く示唆された。



Chitin is a natural polysaccharide composed of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). The hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus* harbors a complete set of homologs corresponding to the chitin degradation pathway identified in the closely related *Thermococcus kodakarensis*. In this pathway, GlcNAc is first deacetylated, followed by phosphorylation to form glucosamine 6-phosphate (GlcN6P). However *P. chitonophagus* possesses additional genes; CHITON_0804 [GlcNAc 6-phosphate (GlcNAc6P) deacetylase] and CHITON_0815 (Kinase similar to eukaryotic-like GlcNAc kinase). The recombinant proteins displayed the activities predicted in their annotations. The results suggest that the archaeon has a second pathway for the conversion of GlcNAc to GlcN6P, in which the phosphorylation reaction precedes the deacetylation reaction.

Archaea, Hyperthermophile, Chitin

講演番号：3C01-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における新規 2-PG 代謝経路の同定
Discovery of a novel glycolate pathway in a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*
○道盛 裕太、井崎 力久、三輪 有哉、濱北 宗太郎、下坂 天洋、牧野 勇樹、竹野 領、佐藤 喬章、別府 春樹、金井 保、跡見 晴幸（京大院工）
○Yuta MICHIMORI, Rikihisa IZAKI, Yuya MIWA, Sotaro HAMAKITA, Takahiro SHIMOSAKA, Yuki MAKINO, Ryo TAKENO, Takaaki SATO, Haruki BEPPU, Tamotsu KANAI, Haruyuki ATOMI (Kyoto Univ.)

代表的な炭酸固定システムである Calvin-Benson-Bassham（CBB）回路の鍵酵素 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（Rubisco）は、carboxylase 反応の基質である CO_2/H_2O の代わりに O_2 分子を用いることで、ribulose 1,5-bisphosphate を酸化・開裂させる oxygenase 活性も有する。この反応で生じる 2-phosphoglycolate を細胞内から除去する機構として、酸素発生型光合成生物は光呼吸経路を利用している。Type III Rubisco を有する超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は O_2 を利用できない絶対嫌気性菌であるが、微好気条件下においても生育することが知られており、本菌も 2-phosphoglycolate の蓄積を回避する何らかの代謝機構を有していると考えられる。本菌の無細胞抽出液を用いて、既知の光呼吸系路を構成する酵素に対応する活性を測定した。その結果、2-phosphoglycolate phosphatase、glycolate dehydrogenase、alanine:glyoxylate aminotransferase の活性が検出され、本菌が 2-phosphoglycolate から glycine までの変換系路を有することが示唆された。さらにこれらの活性を担う酵素遺伝子を探索し、それぞれについて複数の候補遺伝子を大腸菌により異種発現させ、得られた組換え型タンパク質の生化学的解析を行った。また、glycine cleavage system H-protein 候補遺伝子を加えたそれぞれの遺伝子破壊株を作成し、各遺伝子が細胞中の活性に与える影響を遺伝学的に解析した。以上により、既知の光呼吸経路と化学的に類似するものの、系統的に全く異なる酵素を介した、新規な 2-phosphoglycolate 代謝経路を発見した。

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is a key enzyme in the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle, which is a typical carbon dioxide fixation system. In addition to its carboxylase activity using CO_2/H_2O, the enzyme also exhibits an oxygenase activity using O_2. Oxygenic phototrophs utilize the photorespiratory pathway to remove the 2-phosphoglycolate generated by the oxygenase reaction. *Thermococcus kodakarensis* is a hyperthermophilic archaeon that harbors a Type III Rubisco. Although the organism is an obligate anaerobe, it has been shown to display growth under microaerobic conditions. This raises the possibility that *T. kodakarensis* has some kind of mechanism to avoid the accumulation of 2-phosphoglycolate. In this study, we identified 2-PG phosphatase, glycolate dehydrogenase, alanine:glycolate aminotransferase, and glycine cleavage system H-protein in this organism. Along with a previously identified pathway, these enzymes may constitute a novel pathway for 2-phosphoglycolate salvage.

Archaea, Hyperthermophile, 2-Phosphoglycolate

講演番号：3C01-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

分裂酵母におけるセラミド合成酵素 Lag1 と Lac1 の機能解析

Functional analysis of ceramide synthases Lag1 and Lac1 in fission yeast

○花岡 和樹、池田 敦子、船戸 耕一（広島大生生）
○Kazuki Hanaoka, Atsuko Ikeda, Koichi Funato (Hiroshima Univ.)

セラミドはスフィンゴイド塩基を骨格とするスフィンゴ脂質の中心的脂質であり、様々な細胞機能と深く関わっていることが知られている。出芽酵母では LCB（Long Chain Base）である phytosphingosine（PHS）や dihydrosphingosine（DHS）がセラミド合成酵素 Lag1 と Lac1 により、それぞれフィトセラミド（PH-Cer）とジヒドロセラミド（DH-Cer）へと変換される。その後、セラミドは複合スフィンゴ脂質（イノシトールリン酸セラミド : IPC、マンノシル IPC : MIPC）へと変換される。分裂酵母（*S.pombe*）も同様に Lag1 と Lac1 の遺伝子を有するが、機能は明らかになっていない。放射性トリチウムで標識されたセラミドの前駆体「^{3}H」DHS や「^{3}H」*myo*-inositol を用いて、*S.pombe* の WT、*lag1*Δ、*lac1*Δのスフィンゴ脂質の量を測定した。その結果、*S.pombe* の *lag1*Δでは DH-Cer の合成量は減少したが、*lac1*Δでは野生株と比べて増加した。また、*lac1*Δでは、IPC の合成量も増加したが、MIPC の合成量は減少した。これらの結果から、*S.pombe* の Lag1 と Lac1 はセラミド合成において違った役割を果たしていることが示唆された。

Ceramide is the central intermediate in metabolism of sphingolipids, which are composed of sphingoid bases and is essential for various cellular functions. In budding yeast, LCBs phytosphingosine (PHS) and dihydrosphingosine (DHS) are converted by the ceramide synthases Lag1 and Lac1 to phytoceramide (PH-Cer) and dihydroceramide (DH-Cer), respectively. Then, their ceramides are converted into complex sphingolipids (inositol phosphate ceramide: IPC, mannosyl IPC: MIPC). On the other hand, fission yeast (*S.pombe*) also has genes encoding Lag1 and Lac1, but their functions have not been studied. By using the ceramide precursors [^{3}H] DHS and [^{3}H] myo-inositol labeled with radioactive tritium, we measured the amount of sphingolipids in WT, *lag1*Δ, and *lac1*Δ of *S.pombe*. The results showed that the amount of DH-Cer synthesis was decreased in *lag1*Δ of *S.pombe*, but increased in *lac1*Δ compared to the wild strain. In addition, IPC was increased in *lac1*Δ, but MIPC was decreased. These results suggest that Lag1 and Lac1 of *S.pombe* play different roles in ceramide synthesis.

lipid, membrane, genetics

発表責任者：b186822@hiroshima-u.ac.jp（b186822@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C01-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

緑膿菌の相同な硝酸イオン／亜硝酸イオントランスポーター群の機能的差異

Functional difference of three nitrate/nitrite transporters in *Pseudomonas aeruginosa*

○岡本 洸彰[1]、亀谷 将史[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2] ([1]東大農、[2]東大微生物連携機構)
○Hiroaki OKAMOTO[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Masaharu ISHII[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2] ([1]Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo)

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は自然界に広く分布するグラム陰性細菌である。日和見感染性を持ち、院内感染の原因として問題視されている。本研究では、緑膿菌の環境遍在性に寄与する NO_3^-/NO_2^-代謝に注目し、反応の進行に不可欠である膜輸送体（トランスポーター）の機能を解析した。

緑膿菌は NO_3^-/NO_2^-トランスポーターとして、互いに相同な 3 つのタンパク質 NasA、NarK1、NarK2 を持つ。NasA は、NO_3^-を窒素源として利用する代謝（硝酸同化）の際、細胞内に NO_3^-を取り込む。一方 NarK1 と NarK2 は、嫌気条件下で NO_3^-を電子受容体とする呼吸（脱窒）の際、NO_3^-を取り込み NO_2^-を排出する。各トランスポーターの詳細な機能解析を行うため、*nasA*、*narK1K2* および関連遺伝子を欠失した多重破壊株 Δ*nasA*Δ*narK1K2*Δ*nap*Δ*PA1854*（Δ4）を作製し、これに *nasA*、*narK1*、*narK2* のいずれかひとつを相補した（Δ4+*nasA*、Δ4+*narK1*、Δ4+*narK2*）。これらの株を硝酸同化または脱窒が必須となる条件で培養したところ、異なる生育を示した。硝酸同化条件では Δ4+*narK2* が増殖せず、脱窒条件では Δ4+*nasA* と Δ4+*narK2* が増殖しなかった。この結果から、NasA は NO_3^-取り込みが可能で NO_2^-排出が不可能、NarK1 は NO_3^-取り込みと NO_2^-排出がともに可能、NarK2 は NO_3^-取り込みが不可能で NO_2^-排出能は不明、ということが示唆された。すなわち、*in vivo* の実験により、緑膿菌の互いに相同なトランスポーターNasA、NarK1、NarK2 間に明確な機能的差異があることが確認された。

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium, which lives ubiquitously in the environment and causes nosocomial infection as an opportunistic pathogen. Its adaptability to nitrogen starvation or anaerobic condition comes from its nitrate assimilation/respiration metabolism, for which transporters are indispensable.

P. aeruginosa has three homologous NO_3^-/NO_2^- transporters: NasA, NarK1, and NarK2. It is predicted that NasA imports NO_3^- for nitrate assimilation, whereas NarK1 and/or NarK2 imports NO_3^- and exports NO_2^- for nitrate respiration. Quadruple mutant Δ*nasA*Δ*narK1K2*Δ*nap*Δ*PA1854* (Δ4) and complementary strains (Δ4+*narK1*, Δ4+*narK2*, and Δ4+*nasA*) were constructed and their growth profiles were investigated. Under nitrate assimilation condition, Δ4+*narK2* didn't grow. Under nitrate respiration condition, Δ4+*nasA* and Δ4+*narK2* didn't grow. These results suggested that NasA imports NO_3^- but doesn't export NO_2^-, NarK1 both imports NO_3^- and exports NO_2^-, and NarK2 doesn't import NO_3^-. These *in vivo* experiments of this study clearly indicate the difference in the transport mechanisms of these homologous transporters.

Pseudomonas aeruginosa, transporter, nitrate

発表責任者：岡本洸彰（ut-agri-olk38@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C01-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成におけるタンパク質間相互作用に関する研究

Studies on the interaction between lysine biosynthesis proteins in *Thermus thermophilus*

○森田 裕太郎[1]、叶 思言[1]、吉田 彩子[1,2]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2]([1]東大院農、[2]東大・微生物連携機構)
○Yutaro MORITA[1], Siyan YE[1], Ayako YOSHIDA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2]([1]UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において、リジンは LysW というアミノ基キャリアタンパク質を用いる特徴的な経路で生合成される。LysW は生合成中間体である α-aminoadipic acid (AAA)に共有結合することで AAA の α-アミノ基の保護基となると同時に、各生合成酵素(LysX、LysZ、LysY、LysJ、LysK)と静電相互作用し、効率的なリジン生産を可能にするキャリアタンパク質として機能する。*T. thermophilus* のリジン生合成遺伝子クラスターには、リジン生合成に必須な遺伝子以外にも機能未知遺伝子 *lysV* が存在する。*lysV* 破壊株ではリジン要求性を示さない一方で、LysV は LysW と類似した構造及び特徴(表面電荷が酸性)を持つと推測される。この特徴から LysV は、静電的に各酵素と相互作用し、代謝酵素複合体形成に関わることで、リジン生合成を調節すると予想した。本研究では LysV が各生合成酵素反応に対して与える影響を調べ、LysV の機能を明らかにすることを目的とした。実験の結果、LysV が５つすべての生合成酵素と相互作用することや、一部の酵素反応に影響を与えることが分かった。これらの結果から、LysV を介したリジン生合成酵素メタボロンの形成や、それによるリジン生合成の調節機構が存在する可能性が高まった。

In a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, lysine is biosynthesized through a unique pathway using an amino-group carrier protein called LysW. LysW is covalently bound to α-aminoadipic acid (AAA), working as a protecting group of the α-amino group of AAA, and also functions as a carrier protein to efficiently produce lysine by interacting with biosynthetic enzymes (LysX, LysZ, LysY, LysJ, and LysK) via electrostatic interaction. In the lysine biosynthesis gene cluster of *T. thermophilus*, there is a function-unknown gene, *lysV*, in addition to the genes for lysine biosynthesis. Disruptant of *lysV* does not show lysine auxotrophy, while LysV is predicted to have structure and characteristics (acidic surface charge) like LysW. From these characteristics, LysV was predicted to regulate lysine biosynthesis by electrostatically interacting with each enzyme and possibly involved in the formation of metabolic enzyme complexes. In this study we aimed to examine the effect of LysV on each biosynthetic enzyme reaction and clarify the function of LysV. Result showed that LysV interacted with all five biosynthetic enzymes and affected some enzyme reactions. These results are consistent with the hypothesis that LysV is involved in the formation of lysine biosynthesis metabolon to regulate lysine biosynthesis.

Thermus thermophilus, Lysine biosynthesis, protein-protein interaction

発表責任者：西山真（umanis@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C01-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

グラム陽性メチロトローフ細菌 *Arthrobacter* sp. YM1 のランタノイド依存的メタノール生育に関する研究

Lanthanide-dependent methylotrophic growth in gram-positive bacterium *Arthrobacter* sp. YM1

○森田 翔太[1]、八木 茜[1]、矢野 嵩典[1]、谷 明生[2]、中川 智行[3]、阿野 嘉孝[4]、三井 亮司[1]([1]岡山理大理、[2]岡山大植物研、[3]岐阜大応生科、[4]愛媛大農)
○ Shota MORITA[1], Akane YAGI[1], Takanori YANO[1], Akio TANI[2], Tomoyuki NAKAGAWA[3], Yoshitaka ANO[4], Ryoji MITSUI[1] ([1]Okayama Univ. of Sci., [2]Okayama Univ., [3]Gifu Univ., [4]Ehime Univ.)

グラム陽性細菌 *Arthrobacter* sp. YM1 はメタノールを炭素源として生育する際にランタノイド(Ln)を必要とする新奇なメチロトローフ細菌として土壌より分離された。私たちはこれまでにこの *Arthrobacter* sp. YM1 の C_1 代謝系および関与する酵素について検討を行ってきた。*Arthrobacter* sp. YM1 のメタノール代謝は PQQ を補酵素とする Ln 依存型メタノールデヒドロゲナーゼ (MDH)による酸化に始まり、生じたホルムアルデヒドをリブロースモノリン酸経路により資化することが明らかになっている。*Arthrobacter* sp. YM1 をメタノールと Ln 存在下で生育させた菌体より MDH を精製し、PMF 解析により相当する遺伝子を探索した。その結果、オペロンを形成する *lxaF* および *lxaI* と名付けた 2 つの遺伝子に MDH はコードされており、遺伝子より推定したタンパク質の一次構造はこれまでに知られている Ln 依存型の MDH のいずれとも異なるものであった。今回 *lxaFI* をはじめとする C_1 代謝に関与する遺伝子のメタノール生育における生理的役割を明らかにするため、遺伝子破壊株の作製に向けて薬剤耐性マーカーのスクリーニングと *Arthrobacter* sp. YM1 への遺伝子導入法について検討を行った。各種濃度の抗生物質を添加したプレート上でコロニー形成の有無により感受性の評価を行った。その結果、カナマイシンには高い耐性を示すものの、アンピシリン、テトラサイクリン及びクロラムフェニコールに感受性を示した。また、*lxaFI* に薬剤耐性マーカーを挿入して破壊するための相同組換え用ベクターを作製し、エレクトロポレーション法および接合伝達法により遺伝子の導入を試みた。

A gram-positive Ln-dependent methylotrophic bacterium, *Arthrobacter* sp. YM1 was isolated from soil. This strain requires lanthanides (Ln) when grown on methanol as a carbon source. Ln-dependent MDH was purified from methanol-grown cells and analyzed enzymatic properties. MDH genes which were named *lxaF* and *I* were identified in the *Arthrobacter* sp. YM1 genome by PMF analysis of the purified enzyme. The deduced amino acid sequence from *lxaFI* was different from that of any known Ln-dependent MDH. In this study, the gene disruption method of *Arthrobacter* sp. YM1 was attempted to analyze the physiological role of enzymes in Ln dependent methanol growth. We examined the sensitivity of some antibiotics for *Arthrobacter* sp. YM1 growth. And the homologous recombination vector for making null mutant of *lxaFI* was constructed, and introduction of the vector to *Arthrobacter* sp. YM1 was tried by the electroporation and transconjugation method.

methanol dehydrogenase, *Arthrobacter*, Lanthanide

発表責任者：三井　亮司（rmitsui@dbc.ous.ac.jp）

講演番号：3C01-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

微生物分解を介した葉酸の新たな環境動態

Environmental dynamics of folate via bacterial metabolism

○土肥 裕希[1,2]、前田 典歩[1,2]、高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Yuki Doi[1,2], Norifumi Maeda[1,2], Naoki Takaya[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ. MiCS)

【背景】葉酸（ビタミン B_9）はアミノ酸や核酸の生合成に必須な補因子である。葉酸の生合成・再利用経路は様々な生物で明らかにされているが、生分解についてはほとんど解明されていない。本研究では環境土壌における葉酸の微生物分解とそれを介した葉酸の環境動態に着目した。
【結果】土壌に添加された葉酸（FA）は、最初はプテロイン酸（PA）、プテリン-6-カルボン酸（PT6C）を経て分解され、後にデアミノ葉酸（DFA）、デアミノプテロイン酸（DPA）、ルマジン-6-カルボン酸（LA6C）を経て分解された。メタ 16S 解析によって、FA、DFA、PA、または DPA を添加した土壌では *Paraburkholderia* 属細菌（主に *P. terrae*）、次いで *Variovorax* 属細菌（主に *V. paradoxus*）の占有率が大きく増加し、PT6C または LA6C を添加した土壌では *Variovorax* 属細菌の占有率のみが大きく増加することが示された。同土壌から FA を唯一の炭素源として生育可能な細菌 314 株を単離・同定した結果、231 株が *Burkholderia* 目に分類され、そのうちの 169 株が *Variovorax* 属細菌であった。しかしながら、*Paraburkholderia* 属細菌は単離されなかった。*V. paradoxus* の基準株と比較して、*P. terrae* の基準株は FA を単一炭素源として資化する能力に乏しく、さらに PT6C・LA6C を資化できなかった。これらの結果は、根粒を形成する *Paraburkholderia* 属細菌が植物体から他の栄養素と共に FA の供給を受け、その資化で生じた PT6C や LA6C を *Variovorax* 属細菌が資化し、最終的に生じた NH_3 を植物体が窒素源として再利用するという新たな葉酸の環境動態の存在を示唆した。

−***Background***− Folate (vitamin B_9) is an important cofactor to biosynthesize amino- and nucleic-acids. The folate biosynthesis and salvage pathway have been well-investigated whereas its biodegradation pathway is fairly understood. This study reports the bacterial folate utilization pathway and its environmental dynamics.
−***Results***− Folate (FA) in soil was decomposed via pteroate (PA) and pterin-6-carboxylate (PT6C) (early phase) or deaminofolate (DFA), deaminopteroate (DPA), and lumazine-6-carboxylate (LA6C) (late phase). Meta 16S analysis showed that *Paraburkholderia* (mainly *P. terrae*) and then *Variovorax* (mainly *V. paradoxus*) are significantly increased in the presence of FA, DFA, PA, or DPA while only *Variovorax* is increased in the presence of PT6C or LA6C. The 314 FA-utilizing bacteria isolated from the soil were mostly classified into *Burkholderiales* (231/314), which is consisted of *Variovorax* (169/231) and the others, but not contained *Paraburkholderia*. *P. terrae* type strain could not efficiently utilize FA as an only carbon source, whereas *V. paradoxus* type strain could well-utilize not only FA but also PT6C and LA6C as an only carbon source. These results propose novel environmental dynamics on FA that plant's FA is co-utilized by *Paraburkholderia* forming nodule and *Variovorax* and the finally generated NH_3 is re-used by the plant as nitrogen source.

vitamin, folate, microbiome

発表責任者：土肥 裕希（doi.yuki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C01-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

水素細菌による CO2 由来バイオポリマー高生産メカニズムの解析

Metabolic mechanism for biopolymer production from CO2 in hydrogen bacterium

○山本 将大[1]、亀谷 将史[1,2]、新井 博之[1,2]、石井 正治[1,2] ([1]東大院 農生科 応生工、[2]東大微生物連携機構)
○Masahiro YAMAMOTO[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2], Masaharu ISHII[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 株は好熱性水素細菌の一種で、水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として独立栄養的に生育する。本菌は窒素飢餓状態でポリヒドロキシ酪酸（PHB）を蓄積することが知られており、菌体質量比で最大約 35-50%が PHB へ変換されるが、このような急速な蓄積のメカニズムは明らかになっていない。

窒素飢餓時の isocitrate dehydrogenase（ICDH)活性の低下が PHB 蓄積に寄与する可能性が過去に示唆されていた。そこで、これを制御する ICDH kinase/phosphatase 遺伝子 *aceK* の破壊株を作製した。破壊株では ICDH 活性変化が見られなくなり、AceK が実際に ICDH を制御していることが示された。一方、非破壊株と同等の PHB の蓄積がみられ、本制御が PHB 蓄積に必須な要因ではないことが示唆された。また、メタボローム解析では窒素飢餓時にクエン酸など TCA 回路代謝物が増加し、TCA 回路に変化が起きていることが示唆された。

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 is a thermophilic hydrogen bacterium that grows autotrophically using hydrogen as an energy source and carbon dioxide as a carbon source. TH-1 accumulates polyhydroxybutyrate (PHB) under nitrogen-starved conditions, converting about 35-50% of the bacterial mass to PHB.

Previous studies suggested that the repression of ICDH activity during nitrogen starvation may cause the PHB accumulation. When ICDH kinase/phosphatase (AceK) was deleted, the decrease in ICDH activity disappeared, indicating ICDH is posttranscriptionally repressed during PHB accumulation. Meanwhile, the amount of PHB accumulated was not significantly affected, suggesting that this regulation is not essential for PHB accumulation. Metabolomic analysis showed a significant increase in metabolites in the TCA cycle, such as citrate, was observed. This suggests that some metabolic change occurs in the TCA cycle.

Polyhydroxybutyrate (PHB), isocitrate dehydrogenase (ICDH), carbon fixation

講演番号：3C01-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム C

Cupriavidus sp. LA-1 株によるルマジン分解機構の解明
Lumazine utilization pathway found in *Cupriavidus* sp. LA-1.
○前田 典歩[1,2]、土肥 裕希[1,2]、高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Norifumi MAEDA[1,2], Yuki DOI[1,2], Naoki TAKAYA[1,2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【背景】ルマジン化合物は、生体内で蛍光タンパク質やリボフラビン生合成の中間体として存在しており、葉酸や昆虫色素の微生物分解によっても生産されることが知られている。このことから、ルマジン化合物は自然環境中に広く存在していると考えられるが、その生分解経路は未解明である。本研究では、環境土壌からルマジン資化性菌の単離し、そのルマジン分解経路の同定を目的とした。
【結果】ルマジンを添加した土壌をメタ 16S 解析に供した結果、環境土壌におけるルマジン分解は主に *Cupriavidus* 属細菌が担っていることが示された。そこで、同土壌からルマジン資化性菌の単離を行い、菌叢解析と同様に *Cupriavidus* 属に分類される LA-1 株を得た。LA-1 株のルマジン資化プロセスの 1 段階および 2 段階目を担う酵素の発現はいずれもルマジン誘導性であり、その反応産物は 7-ヒドロキシルマジン、次いで 6, 7-ジヒドロキシルマジンであった。LA-1 株のトランスクリプトーム解析では、ルマジン存在下で発現量が 100 倍以上増加する遺伝子クラスター（GM003301-3310）が見出され、そこには Xanthine dehydrogenase（Xdh）をコードする *xdhABC* 遺伝子が含まれていた。これらから、LA-1 株のルマジン資化プロセスの最初の 2 反応は、この Xdh による NAD^+依存的な酸化反応によって触媒されることが示唆された。

[Background] Lumazine compounds known as intermediate of the fluorescent protein's cofactor and riboflavin biosynthesis are also produced by microbial degradation of folic acid and insect pigments. Therefore, lumazine compounds widely present in environment, but their biodegradation pathways are still unknown. In this study, we isolated a lumazine-utilizing bacterium from environmental soil and identified its lumazine degradation pathway.
[Result] Meta-16S and metabolite analysis showed *Cupriavidus* genus is significantly increased accompanied by lumazine consumption, which suggested that lumazine degradation in environmental soil was mainly carried out by *Cupriavidus* bacterium classified into *Burkholderiales*. The strain LA-1 isolated from the soil as lumazine-utilizing bacterium was classified as *Cupriavidus* found in meta-16S analysis. Gene expression encoding the enzymes for a first and a second step on lumazine utilization process of LA-1 were both lumazine-inducible, and those reaction products were identified as 7-hydroxylumazine (1'st) and 6, 7-dihydroxylumazine (2'nd) by LC/MS/MS. In transcriptome analysis of LA-1 by using RNA-seq, we found a gene cluster (GM003301-3310) containing Xanthine dehydrogenase (Xdh) component gene (GM003305-3303, *xdhABC*) was increased more than 100-folds in the presence of lumazine. These suggested that the first 2 reactions on the lumazine utilization process in LA-1 were performed by NAD^+-dependent Xdh encoded by GM003305-3303.

lumazine, pterin, Cupriavidus

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C03-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

Ashbya gossypii のリボフラビン生産とミトコンドリアフラビンタンパク質の関係

Correlation of the riboflavin production with flavoproteins in *Ashbya gossypii*

○加藤 竜也[1,2,3]、横森 愛美[3]、朴 龍洙[1,2,3] ([1]静岡大農、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡大院・総合科技)
○Tatsuya Kato[1,2,3], Ami Yokomori[3], Enoch Y. Park[1,2,3] ([1]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ .)

Ashbya gossypii はリボフラビン（ビタミン B2）を生産する糸状菌として知られており、現在工業的なリボフラビン生産に利用されている。以前の研究で、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を補酵素とするミトコンドリアのフラビンタンパク質であるコハク酸脱水素酵素の阻害剤であるマロン酸を培地中に添加すると、*A. gossypii* のリボフラビン生産量が減少することを見出だしている。本研究では、*A. gossypii* においてミトコンドリアに存在するフラビンタンパク質とリボフラビン生産との関係を解析することを目的とした。

コハク酸脱水素酵素のサブユニットをコードする *AgSDH1* および *AgSDH2* 遺伝子遺伝子破壊株構築を試みたところ、グルコースを炭素源とする培地でホモカリオン遺伝子破壊株を得ることができなかった。このことから、これら遺伝子は生育に必須であることが示された。同じくミトコンドリアに存在する FAD を補酵素とする NADH 脱水素酵素（AgNDI1）をコードする遺伝子（*AgNDI1*）についても、ホモカリオン遺伝子破壊株を同様に得ることができなかった。したがって、それぞれの遺伝子に対してヘテロカリオン遺伝子破壊株（ht*AgSDH1*Δ, ht*AgNDI1*Δ）を YD 培地（1%グルコース、1%酵母エキス、pH 6.8）で培養したところ、ht*AgNDI1*Δ 株は野生株に比べてリボフラビン生産量に変化がなかったが、ht*AgSDH1*Δ 株では約 47%減少していた。また、炭素源をグリセロールにしたところ、グルコースの時と同様に ht*AgSDH1*Δ 株の菌糸の黄色が薄くなっていた。これらの結果から、コハク酸脱水素酵素が炭素源に関わらずリボフラビン生産に関係していることが明らかとなった。

Ashbya gossypii is a natural riboflavin producer, and has been utilized for the industrial riboflavin production in the world. In our previous study, we showed that malonate, which is a succinate dehydrogenase (SDH) inhibitor, reduces the riboflavin production in *A. gossypii*. In this study, we investigated the relationship of the riboflavin production with mitochondrial flavoproteins.

We tried to disrupt *AgSDH1* and *AgSDH2* genes, which code subunits of SDH, respectively, but we were not able to isolate homokaryotic gene-disrupted mutant. Then, we investigated the riboflavin production in heterokaryotic *AgSDH1* gene-disrupted (ht*AgSDH1*Δ) strain. In the glucose-based medium, the riboflavin production in ht*AgSDH1*Δ strain was lower by 47% than that in the wild type strain. Additionally, the color of the mycelia of ht*AgSDH1*Δ strain turned pale yellow in glycerol-based media. These results indicate that SDH is involved in the riboflavin production in *A. gossypii*.

Ashbya gossypii, Riboflavin, Flavoprotein

発表責任者：加藤竜也（kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C03-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

Ashbya gossypii サーチュイン遺伝子破壊株の解析

Analysis of *Ashbya gossypii* sirtuin gene disruption strains

○狩野 麻衣[1]、畔上 純也[1]、朴 龍洙[1,2,3]、加藤 竜也[1,2,3]（[1]静岡大院・総合科技、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡大農）
○Mai Kano[1], Jyunya Azegami[1], Enoch Y. Park[1,2,3], Tatsuya Kato[1,2,3] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ.)

Ashbya gossypii はリボフラビン（ビタミン B_2）を生産する糸状菌で、リボフラビンの工業的生産に利用されている。本研究室では、以前にサーチュイン遺伝子（*AgHST1* および *AgHST3*）を破壊することで、リボフラビン生産が上昇することを見出だした[1]。本研究はそれらの遺伝子破壊株 *AgHST1*Δ株および *AgHST3*Δ株のさらなる解析を目的とした。

以前の研究において、*AgHST1*Δ株および *AgHST3*Δ株は野生株に比べて約 4.3 および 2.9 倍リボフラビン生産量が上昇することが明らかになっている。それぞれの遺伝子破壊株においてリボフラビン生合成遺伝子（*AgRIB1, AgRIB2, AgRIB3, AgRIB4, AgRIB5, AgRIB7*）発現を確認したところ、両遺伝子破壊株ですべてのリボフラビン生合成遺伝子発現が約 2～40 倍上昇していた。また両遺伝子破壊株では、野生株に比べて胞子形成能とミトコンドリア膜電位の減少が認められたが、NAD^+/NADH 比は *AgHST1*Δ株では野生株の約 40%まで低下しているのに対し、*AgHST3*Δ株ではわずかながら上昇していた。ヒストン脱アセチル化酵素活性を測定したところ、*AgHST1*Δ株では野生株に比べて上昇が認められたのに対し、*AgHST3*Δ株では野生株と同程度であった。これらの結果から、それぞれのサーチュイン遺伝子破壊はリボフラビン生合成遺伝子発現上昇によりリボフラビン生合成を上昇させるが、細胞内で異なる代謝変化を引き起こすことが明らかになった。

1. Kato *et al*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 105(20), 7813-7823, 2021.

Ashbya gossypii is a natural riboflavin producer and has been utilized for the industrial riboflavin production. In this study, we investigated the metabolic changes of *AgHST1*Δ and *AgHST3*Δ strains which have the disruption of sirtuin genes (*AgHST1* and *AgHST3*), respectively.

In *AgHST1*Δ and *AgHST3*Δ strains, the overexpression of all riboflavin biosynthetic genes (*AgRIB1, AgRIB2, AgRIB3, AgRIB4, AgRIB5, AgRIB7*) were observed. Additionally, the number of spores and mitochondrial membrane potential in both strains were decreased compared to those in WT strain. However, NAD^+/NADH ratio was lower in *AgHST1*Δ strain than that in WT and *AgHST3*Δ strains and histone deacetylase activity was higher in *AgHST1*Δ strain than that in WT and *AgHST3*Δ strains. These results indicate suggest that the overexpression of all riboflavin biosynthetic genes leads to the overproduction of riboflavin in *AgHST1*Δ and *AgHST3*Δ strains, but different metabolic changes are caused by the disruption of *AgHST1* or *AgHST3*.

Ashbya gossypii, Riboflavin, Sirtuin

発表責任者：狩野 麻衣（pj272536@cii.shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C03-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

土壌培養と液体集積培養の違いによる L-glucose 資化菌の菌叢変化

Change in microbiome of L-glucose assimilating bacteria due to difference between soil culture and liquid enrichment culture

○濱 彰人[1]、土肥 裕希[1,2]、中村 顕[1,2] ([1]筑波大　生命環境、[2]筑波大 MiCS)
○Akito HAMA[1], Yuki DOI[1,2], Akira NAKAMURA[1,2] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【目的】D-glucose の鏡像異性体である L-glucose は自然界に存在していないとされており、その代謝についても知られていなかった。これまでに、当研究室では門レベルで異なる L-glucose 資化菌の存在が明らかとなっており、その L-glucose 代謝機構に多様性があることが確認されている。そこで本研究では、環境中から L-glucose 資化能を有する微生物を網羅的に見出し、それらを単離することを目的とした。
【方法】筑波大学・つくば機能植物イノベーション研究センターの実験圃場から採取した土壌を用いて土壌培養と液体集積培養の二つの条件下で培養を行った。いずれも経時的にサンプルを回収し、試料中の L-glucose 濃度は DNS 法を、菌叢は total DNA を鋳型とした 16S amplicon 解析を用いて解析した。
【結果】土壌培養中では、L-glucose 濃度は培養日数の経過に伴って減少していき、それに伴って *Alphaproteobacteria* 綱の *Rhizobiales* 目に属する細菌が有意に増加していた。これに対して、土壌懸濁液を用いた液体集積培養では、集積培養液中の L-glucose 濃度に経時的な減少が観察され、*Cohnella* 属(*Firmicutes* 門)と *Luteolibacter* 属(*Verrucomicrobia* 門)に属する細菌が顕著に増加していた。これら 2 つの培養条件由来のサンプルから菌株の単離を行ったところ、*Labrys* 属菌株が 4 株、*Agrobacterium* 属菌株が 5 株、*Mesorhizobium* 属菌株が 2 株、*Bosea* 属菌株を 1 株取得した。これらの菌株はすべて *Rhizobiales* 目に属しており、*Rhizobiales* 目細菌がこの培養環境中での L-glucose 資化に大きく寄与していることが示唆された。

L-glucose, an enantiomer of D-glucose, is presumably not present in nature and its metabolism was unknown. We have previously isolated two L-glucose assimilating bacteria, which belong to different phyla, and their L-glucose metabolisms were elucidated. The purpose of this study is to reveal microorganisms with L-glucose assimilating ability in the environment and to isolate them. A soil sample collected from the field of the Tsukuba-Plant Innovation Research Center was used for culturing under two conditions: soil culture and liquid enrichment culture. In each case, samples were collected over time, and the L-glucose concentration in the samples was measured by using the DNS method, and the microbiome was analyzed by 16S amplicon sequencing. In the soil culture, the L-glucose concentration decreased over culturing time, and bacteria belonging to the order *Rhizobiales* increased significantly. In the liquid enrichment culture, L-glucose concentration also decreased over time, and bacteria belonging to the *Cohnella* (*Firmicutes*) and *Luteolibacter* (*Verrucomicrobia*) significantly increased. In addition, we isolated 12 L-glucose utilizing bacteria from the two cultures, which were classified into four different genera in the order *Rhizobiales*.

L-glucose, rare sugar, microbiome

講演番号：3C03-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

Shewanella oneidensis の発酵能力の検証

Investigation of the fermentative growth of *Shewanella oneidensis* on sugars

○池田 壮汰、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Sota IKEDA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Shewanella oneidensis MR-1 株は異化的金属還元細菌であり、糖を発酵する能力を持たないことが知られている。一方、本株はグルコースの取り込みとリン酸化に必要な遺伝子（*galP* および *glk*）を欠損しているものの、これら以外の解糖系および乳酸合成遺伝子は有しており、*galP* と *glk* を導入しさえすれば代謝経路上はグルコースから乳酸を生成して発酵的に生育可能なように思われる。しかし、先行研究において *galP* と *glk* を導入した MR-1 株 [MR-1(pBBR-*glk-galP*)] は呼吸条件下ではグルコース最少培地（GMM）で生育したが、電子受容体非存在下（発酵条件下）では生育できないことが示され、なぜ本株は発酵条件下で生育できないのかに興味が持たれた。そこで本研究では発酵条件下では生育に必須な遺伝子の発現が抑制されているという仮説を立て、この仮説を呼吸条件下と発酵条件下のトランスクリプトーム解析により検証した。その結果、発酵条件では TCA サイクルやアミノ酸合成に関与する遺伝子の発現量が有意に減少しており、MR-1(pBBR-*glk-galP*) 株はアミノ酸の欠乏により GMM では生育できないことが示唆された。そこで、アミノ酸源として 0.1% (w/v) のトリプトンもしくはアミノ酸混合溶液を添加した GMM で本株を培養したところ、これらのアミノ酸源の存在下では発酵的にグルコースが代謝され生育することが明らかになった。これらの結果から、MR-1 株に解糖に必要な遺伝子（*galP* と *glk*）を導入し、アミノ酸源を添加すれば、発酵条件下でも生育可能になることが示された。

An engineered strain of *Shewanella oneidensis* MR-1 expressing *galP* and *glk*, MR-1(pBBR-*glk-galP*), can grow in glucose minimal medium (GMM) in the presence of electron acceptors, but cannot grow in the absence of electron acceptors. These observations raise a question why MR-1(pBBR-*glk-galP*) is incapable of fermentative growth on sugars despite that this strain has a complete pathway for glucose fermentation. We hypothesized that the expression of essential genes is repressed under fermentative conditions and examined it by comparing transcriptome profiles in the presence and absence of an electron acceptor. The analysis revealed that the expression of some TCA cycle genes was markedly downregulated under the fermentative condition, suggesting that MR-1(pBBR-*glk-galP*) cannot grow in GMM under fermentative conditions owing to the lack of amino acids. To examine this hypothesis, we cultivated MR-1(pBBR-*glk-galP*) in GMM containing 0.1% (w/v) tryptone as an amino acid source and found that the addition of tryptone enabled fermentative growth of this strain on glucose. These results show that MR-1(pBBR-*glk-galP*) can ferment glucose and grow if amino acids are supplied.

Shewanella oneidensis, Fermentation, Amino acid synthesis

発表責任者：池田 壮汰（s177003@toyaku.ac.jp）

講演番号：3C03-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

低電位電極存在下における *Aeromonas hydrophila* の代謝発現変動

Changes of metabolic expression in *Aeromonas hydrophila* in the presence of low-potential electrodes

○土屋 美愉、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Miyu TSUCHIYA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

電気制御発酵とは、電極を用いて細胞内の酸化還元反応を制御しながら発酵を行う技術である。従来の発酵法では生産の難しい化合物の生産や、電極からの電子により生成される NADH や ATP を供給しながらの物質生産が可能になると期待されている。電気制御発酵においては細胞外電子伝達系をもつ電気化学活性細菌を用いる必要があるが、最近の研究で、グルコースを基質とした発酵代謝を行う *Aeromonas hydrophila* が細胞外電子伝達系をもつことが発見された。そこで我々は *A. hydrophila* が電気制御発酵のホストに適していると考え、この細菌の代謝特性や電子受容能力の調査を行った。この菌をグルコース含有培地(M9Y グルコース)において低電位電極を挿入した電気化学セル内で培養したところ、培養開始から 150 時間を過ぎたころから急激な電流が流れ始めた。そこで、電流生成前後におけるトランスクリプトーム解析を行なったところ、カソード電流生成に伴い一部の遺伝子の発現が変動した。中でも、コハク酸デヒドロゲナーゼ(*sdhD*)の発現が上昇し、ギ酸デヒドロゲナーゼ(*fdhD*)の発現が抑制されていた。これらの結果から、発酵代謝産物が電子受容体となりカソード電流が促進されたと考えられる。引き続きカソード電流生成を引き起こす因子を調査し、*A. hydrophila* の電気化学特性の解明に寄与したい。

Electro-fermentation (EF) is a technology that utilizes electrodes for controlling intracellular redox balances during fermentation. EF is expected to be applicable to the production of chemicals that are difficult to be synthesized by conventional fermentation and to the supply of NADH and ATP to biosynthesis pathways. We have considered that, in terms of its abilities for glycolytic fermentation and extracellular electron transfer, *Aeromonas hydrophila* is suitable as a host for EF, and this work investigated the metabolic characteristics and electron-accepting capacity of this bacterium. When *A. hydrophila* was cultured in bioelectrochemical cells in the presence of low-potential electrodes in M9Y-glucose medium, cathodic currents were increased 150 hours after the start of cultivation. Transcriptome analysis before and after the current generation showed that the expression of succinate dehydrogenase (sdhD) was up-regulated and that of formate dehydrogenase (fdhD) was down-regulated. It is suggested that fermentation products received electrons from the electrode and promote the generation of cathodic current. We will continue identifying triggers for cathodic current generation and attempting to elucidate the electrochemical properties of *A. hydrophila*.

Aeromonas hydrophila, electro-fermentation, transcriptome analysis

発表責任者：土屋美愉（s168045@toyaku.ac.jp）

講演番号：3C03-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

好熱菌 *Bacillus smithii* S-2701M 株におけるレボグルコサン代謝の全容解明
Uncovering the levoglucosan metabolism in a thermophile, *Bacillus smithii* S-2701M
栗谷 祐矢[1]、○矢野 真里絵[1]、佐藤 浩平[1]、道羅 英夫[2]、梅村 征一郎[3]、北岡 本光[4]、伏信 進矢[5]、吉田 信行[1] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研、[3]日本食品化工（株）、[4]新潟大農、[5]東大院・農生科)
Yuya KURITANI[1], ○Marie YANO[1], Kohei SATO[1], Hideo DOHRA[2], Seiichiro UMEMURA[3], Motomitsu KITAOKA[4], Shinya FUSHINOBU[5], Nobuyuki YOSHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., RIGST, [3]Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd., [4]Fac. Agr., Niigata Univ., [5]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo)

レボグルコサン(1,6-アンヒドロ-β-D-グルコース, LG)は無水糖の一種であり，植物系バイオマスの燃焼や熱分解によって生じることが知られている．私たちは LG を効率よく分解する好熱菌 *Bacillus smithii* S-2701M 株を自然界から単離し，LG の分解あるいは有効利用の可能性を検討してきた．酵母，糸状菌においては特異的キナーゼによって LG がグルコース 6-リン酸に変換されることが明らかとなっているが，バクテリアにおいては，LG 脱水素酵素(LGDH)が見いだされているのみであり，その代謝は不明のままであった．今回 S-2701M 株の LG 代謝の全容を明らかにしたので報告する．

S-2701M 株のゲノム上において，LGDH をコードする遺伝子(*lgdA*)の周辺に LG 代謝への関連が予想される酵素遺伝子が 3 つ存在していた(*lgdB1*, *lgdB2*, *lgdC*)．*lgdA* を含めた 4 つの遺伝子を大腸菌で発現させ，それぞれの精製タンパク質を用いて酵素反応条件を検討した．その結果，NAD^+, Mn^{2+} 存在下で 4 つの酵素タンパク質全てを添加した時に，LG から D-グルコースへの変換が確認できた．代謝中間体の同定などの検討により，① LG の C3 酸化による 3-ケト LG への変換，② β脱離による 1,6-グルコシド結合の開裂，③ 水和による 3-ケト-D-グルコースへの変換，④ C3 還元による D-グルコースへの変換，という 4 つの酵素反応からなる LG 代謝経路を明らかにすることができた．このうち，②③は新規な酵素反応と考えられる．

Levoglucosan (LG) is an anhydrosugar produced through glucan pyrolysis and is widely found in nature. We previously isolated an LG-utilizing thermophile, *Bacillus smithii* S-2701M, and suggested that this bacterium may have a metabolic pathway from LG to glucose, initiated by LG dehydrogenase (LGDH). Here, we completely elucidated the metabolic pathway of LG involving three novel enzymes in addition to LGDH. In the S-2701M genome, three genes expected to be involved in the LG metabolism were found in the vicinity of the LGDH gene locus. These four genes including LGDH gene (*lgdA, lgdB1, lgdB2,* and *lgdC*) were expressed in *Escherichia coli* and purified to obtain functional recombinant proteins. The enzyme reactions with the combination of the four proteins elucidated the following metabolic pathway: LgdA (LGDH) catalyzes 3-dehydrogenation of LG to produce 3-keto-LG, which undergoes β-elimination of 3-keto-LG by LgdB1, followed by hydration to produce 3-keto-d-glucose by LgdB2; next, LgdC reduces 3-keto-D-glucose to glucose.

levoglucosan, ß-elimination, Bacillus smithii

発表責任者：吉田信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C03-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

微生物生態系におけるルミクロム分解機構の解明

Elucidation of the mechanism of lumichrome degradation in microbial ecosystems

○鈴木 麻菜美[1]、前田 典歩[1]、土肥 裕希[1,2]、高谷 直樹[1,2]（[1]筑波大・生命環境、[2]微生物サステナビリティ研究センター（MiCS））
○Manami SUZUKI[1], Norifumi MAEDA[1], Yuki DOI[1,2], Naoki TAKAYA[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]MiCS)

【目的】リボフラビン（ビタミン B_2、RF）の生分解については、*Microbacterium* 属などの細菌が RF の五単糖部位を資化し、ルミクロム（LC）を生産することが知られている。しかし、LC を分解する微生物やその分解機構についての知見は少ない。本研究では、微生物生態系における RF の環境動態を明らかにすると共に、LC の微生物分解経路を同定することを目的とした。
【方法・結果】RF または LC を添加した土壌をメタ 16S rRNA 解析に供したところ、RF 添加土壌では *Microbacterium* 属細菌が、LC 添加土壌では *Nocardioides* 属細菌が顕著に増加することが示された。また、同土壌からは RF 分解菌として *M. paraoxydans*、LC 分解菌として *N. simplex* の 16S rRNA 遺伝子と最も高い相同性を示す細菌がそれぞれ分離培養され、それらの基準株は低濃度（< 20 μM）の RF または LC を分解した。これらのことから、土壌中の RF は *Microbacterium* 属細菌と *Nocardioides* 属細菌によって LC を介して分解されると考えられた。分離された LC 分解菌 *Rhodococcus* sp. LC-2 株のトランスクリプトーム解析によって、LC 存在下で発現量が 100 倍以上増加する遺伝子クラスターを見出した。この遺伝子クラスターにコードされた推定 Hydantoinase（Hyd）の組換え酵素は LC と反応して生成物 1 を、Hyd の下流にコードされた推定 Amidohydrolase の組換え酵素は生成物 1 と反応して生成物 2 を生成した。よって、この遺伝子クラスターにコードされている酵素が LC 分解に寄与していることが示唆された。

−*Background*− *Microbacterium* and other bacteria can utilize D-ribose within riboflavin (RF) and generate lumichrome (LC), but their LC-metabolizing mechanism is fairly understood. Our studies indicated RF/LC dynamics in the soil ecosystem and identified partial bacterial pathway degrading lumichrome.
−*Results*− Meta-16S rRNA analyses of soil with added riboflavin (RF) or lumichrome (LC) indicated that RF increased *Microbacterium* while LC increased *Nocardioides* bacteria. Riboflavin- and LC-degrading bacteria were isolated from the soil and identified as *M. paraoxydans* and *N. simplex* by 16S rRNA gene analysis, respectively. These bacteria degraded a low concentration (< 20 μM) of RF and LC, suggesting that they cooperatively degrade RF via LC. Transcriptome analysis of the LC-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. LC-2 revealed that LC up-regulated expression of a gene cluster containing of putative 27 genes. Hydantoinase (Hyd) gene was predicted in this gene cluster, and corresponding recombinant protein reacted with LC to produce product 1. The product 1 was converted to product 2 by the recombinant protein of amidohydrolase-family protein encoded by a gene located at downstream of the Hyd gene. These results indicated that this gene cluster is involved in the bacterial LC degradation.

Lumichrome, Riboflavin, Actinobacteria

講演番号：3C03-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

凍結乾燥きのこ子実体における加水自己消化反応のメタボローム解析

Metabolome analysis of hydro-autolytic reaction in freeze-dried mushrooms

○大沼 広宜[1,2]、門脇 里恵[1]、佐藤 美夢[1]、若山 正隆[1]([1]慶應義塾大学 先端生命科学研究所、[2]公益財団法人 庄内地域産業振興センター)
○Hiroki ONUMA[1,2], Rie KADOWAKI[1], Miyu SATO[1], Masataka WAKAYAMA[1] ([1]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ., [2]Shonai Regional Ind. Promotion Ctr.)

きのこ子実体における酵素機能の探索は、自己消化などの代謝プロセスの理解に重要である。本研究では、きのこ自己消化による酵素反応の詳細な理解への一助として、乾燥粉末化した市販きのこの加水処理によって変化する構成成分をメタボローム解析により評価した。市販のシイタケ、ブナシメジ、エノキタケ、マイタケ子実体を材料に、それぞれ傘および柄（上部、中部、下部）に分離し凍結乾燥を行った。乾燥完了後、気相状態での破砕により粉末試料とした。これらの試料に対し、Milli-Q 水を浸漬させ、自己消化反応を 24℃で静置することによって行った。一定時間ごと(0、30、60、120、360、720 分)に回収し、メタノールを加えることで反応を停止させた。水溶性成分を CE-MS および LC-MS を用いて測定し、多変量解析等により構成成分の特徴を解析した。

主成分分析および階層型クラスター解析の結果より、品種特性がエノキタケとその他 3 品種に区分され、次いで浸漬時間ごとで大きく区分された。構成成分においては、アミノ酸類、ジペプチド類、コリン類、糖類、ヌクレオチド類は反応 720 分まで対数関数的に増加し、有機酸類はほとんど変化しない傾向を示した。対して糖リン酸類においては指数関数的に減少する傾向が見られ、シイタケとマイタケで顕著であった。上記の結果より、きのこ凍結乾燥粉末へ水を浸漬することにより、自己消化に関連する酵素系が品種ごとに機能していることが示唆された。

Exploring the enzymatic functions in mushrooms are important for understanding metabolic processes including autolysis. Here, we evaluated the metabolite changes induced by water treatment of freeze-dried mushroom powder. Commercially available mushroom fruiting bodies of *Lentinula edodes*, *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola frondosa* were separated into a pileus and stipes, and lyophilized. After completion, samples were immersed into liquid nitrogen, and disrupted to make powder samples. Samples were hydrolysis-reacted by adding Milli-Q water at 24°C, and stopped the reaction by adding MeOH at 0, 30, 60, 120, 360 and 720 min. Water-soluble metabolites were analyzed by CE-MS and LC-MS.

Using the principal component analysis and hierarchical cluster analysis, *F. velutipes* and the other species were mainly classified, and secondary classified by reaction time. Amino acids, dipeptides, cholines, sugars, and nucleotides were increased logarithmically up to 720 min, and organic acids kept stable concentrations. Sugar phosphates were decreased exponentially; especially in *L. edodes* and *G. frondosa*. Those data suggested that the freeze-dried mushroom powder has autolytic enzyme functions, depending on mushroom species.

edible mushrooms, metabolome analysis, autolytic reaction

講演番号：3C03-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム C

酸素制限条件におけるコリネ型細菌のアミノ酸代謝についてのメタボローム解析
Metabolome analysis of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum* cells under oxygen limitation

○川口 秀夫[1]、蓮沼 誠久[2]、大西 康夫[3]、佐塚 隆志[4]、荻野 千秋[5]、近藤 昭彦[1,5]([1]神戸大院科技イノベ、[2]神戸大先端バイオ、[3]東大院農、[4]名古屋大生物機能開発セ、[5]神戸大院工)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Tomohisa HASUNUMA[2], Yasuo OHNIHSI[3], Takashi SAZUKA[4], Chiaki OGINO[5], Akihiko KONDO[1,5] ([1]Kobe Univ., STIN, [2]Kobe Univ., EGBRC, [3]Univ. Tokyo, [4]Nagoya Univ., [5]Kobe Univ. Eng.)

【目的】これまでに我々は、超耐熱性バイオプラスチックの出発化合物となる芳香族化合物 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA) の発酵が、溶存酸素 (DO) 制限により促進することを見出した。そこで本研究では、DO 制限による代謝促進作用を明らかにするために、メタボローム解析を行った。
【方法・結果】3,4-AHBA 生合成経路を導入した遺伝子組換え *Corynebacterium glutamicum* を DO 制御条件で培養した結果、3,4-AHBA の比生産速度は DO と負の相関関係を示し、酸素供給律速である DO = 0 ppm で好気条件 (DO ≥2.66 ppm (33%飽和酸素濃度)) の 8 倍に増加した。酸素制限による代謝シフトと 3,4-AHBA 生産促進効果の作用機序を調べるため、DO = 0 ppm と 2.66 ppm における代謝プロファイルを比較した結果、酸素制限条件では好気条件と比べて補酵素 $NAD(P)^+$ 再生系が低下しており、またピルビン酸が蓄積してアミノ酸代謝が著しく変動していることを明らかにした。さらに、この結果に基づいて DO 制限条件に適した代謝経路を設計することによって、DO 制限条件における細胞あたりの 3,4-AHBA 生産速度が、親株の 3.6 倍に増加した代謝改変株を得ることができた。
【謝辞】本研究は JST CREST (JPMJCR13B3), 未来社会創造事業 (JPMJMI17EG), JSPS 科研費 基盤研究(B) (19KT0009)の支援を受けて実施した.

[Background] The specific productivity of 3,4-AHBA increased with decreasing levels of dissolved oxygen (DO) and was 8-fold higher under oxygen limitation (DO = 0 ppm) than under aerobic conditions (DO ≥2.6 ppm) in a recombinant *C. glutamicum* strain KT01 expressing *griH* and *griI* genes derived from *Streptomyces griseus*.
[Results] Metabolic profiles during 3,4-AHBA production were compared at three different DO levels (0, 2.6, and 5.3 ppm) using the DO-stat method. Results of the metabolome analysis revealed metabolic shifts in both the central metabolic pathway and amino acid metabolism at a DO of <33% saturated oxygen.
[Conclusions] Our results revealed changes in the metabolic state in response to DO concentration and provided insights into oxygen supply during fermentation and the rational design of metabolic pathways for improved production of related amino acids and their derivatives.

Corynebacterium glutamicum, Metabolome, Metabolic engineering

発表責任者：川口 秀夫（kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3C05-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

希少糖 D-アルロース生産が可能な *Shinella zoogloeoides* NN6 由来 L-リブロース 3-エピメラーゼの基質複合体の構造解析

X-ray structure analysis of recombinant L-ribulose 3-epimerase from *Shinella zoogloeoides* NN6 in complex with D-allulose

○吉田 裕美[1,3]、吉原 明秀[2,3]、鈴木 琢磨[2]、森本 兼司[2,3]、神鳥 成弘[1,3]（[1]香川大・医・総合生命研究セ、[2]香川大・農、[3]香川大・国際希少糖研究教育）
○ Hiromi YOSHIDA[1,3], Akihide YOSHIHARA[2,3], Takuma SUZUKI[2], Kenji MORIMOTO[2,3], Shigehiro KAMITORI[1,3] ([1]Life Sci. Res. Center & Fac. Med., Kagawa Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Int'l Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ.)

Shinella zoogloeoides NN6 株は希少糖 D-アルロース（D-プシコース）と D-アロースの生産が可能であり、D-アルロースの生産が可能な酵素として、これまでに 2 つのケトース 3-エピメラーゼが報告されている。熱安定性の高いケトース 3-エピメラーゼは L-リブロース 3-エピメラーゼであることが確認され、ゲノム解析から L-リブロース 3-エピメラーゼのアミノ酸配列情報も確定された。本研究では、*S. zoogloeoides* NN6 株由来 L-リブロース 3-エピメラーゼについて合成遺伝子を用いて組換え体を発現させ、基質複合体の構造解析を行ったので報告する。

Shinella zoogloeoides NN6 (*S. zoogloeoides* NN6) was isolated as a strain that is capable of producing rare sugars, D-allulose and D-allose. Two ketose 3-epimerases were found as candidate enzymes for D-allulose production, and one of them was thermostable L-ribulose 3-epimerase. In this study, a recombinant L-ribulose 3-epimerase from *S. zoogloeoides* NN6 (SzLRE) was expressed and its X-ray structure in complex with substrate was determined.

The recombinant SzLRE was expressed as C-terminal His-tagged protein and purified by affinity chromatography. The purified enzyme showed enzymatic activities toward not only L-ribulose but D-allulose, and was used for crystallization study. X-ray diffraction data were collected at Photon Factory PF BL5A (Tsukuba).

The crystal structure of SzLRE in complex with D-allulose was determined and refined at 1.64 Å. The overall structure of SzLRE is similar to the previously known structure of L-ribulose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* (MlLRE) that shows little activity toward D-allulose. In comparison with the structure of MILRE, a mobile loop region of SzLRE is supposed to be involved in substrate specificity in the entrance of active site.

L-ribulose 3-epimerase, rare sugar, X-ray structure

発表責任者：吉田裕美（yoshida.hiromi@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3C05-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

メラノーマ細胞におけるオリゴシアル酸転移酵素 ST8Sia6 の機能

The function of oligosialyltransferase ST8Sia6 in melanoma cells

○畑中 理菜[1,2]、荒木 映莉乃[1,2]、羽根 正弥[1,2]、呉 迪[1,2,3]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大農、[2]名大生物機能セ、[3]iGMED and iGCORE)
○Rina HATANAKA[1,2], Erino ARAKI[1,2], Masaya HANE[1,2], Di Wu[1,2,3], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Nagoya Univ., [2]Biosc. Biotech. Center, Nagoya Univ., [3]iGMED and iGCORE)

細胞表面はタンパク質や脂質に結合した糖鎖（糖タンパク質・糖脂質）で覆われている。細胞表面の糖鎖構造は正常細胞が癌化すると、大きく変化する。癌化による糖鎖構造の特に顕著な変化として、シアル酸修飾が増加することが知られている。シアル酸は 1 位の炭素に負電荷をもつ酸性 9 炭糖であり、通常は糖鎖末端に monoSia（重合度 1）として存在するが、まれに糖鎖末端シアル酸の上にさらにシアル酸が結合し、oligoSia（重合度 2~7）・polySia （重合度 8~）として存在する場合がある。このような oligoSia・polySia を生合成する糖転移酵素を ST8Sia といい、哺乳類では ST8Sia1～6 の報告がある。ST8Sia6 は oligoSia 転移酵素であり、データベース解析結果から乳癌やメラノーマなどで高発現することが明らかとなり、癌との関連性が見出されている。しかしながら、ST8Sia6 の酵素学的性質、細胞内局在性、生物学的機能に関しての詳細な解析は行われていない。そこで本研究では ST8Sia6 が形成する oligoSia を介した悪性形質獲得機構の解明を目的として研究を行った。
マウスメラノーマ B16 細胞の ST8Sia6 野生型、ST8Sia6 変異型（低活性）、Mock 遺伝子導入安定発現細胞株を用いて癌の悪性形質の評価を行った。その結果、細胞増殖能、足場非依存性増殖能、浸潤能について、ST8Sia6 の発現により有意な増加がみられた。しかしながら、その形質には oligoSia 依存的な悪性化と非依存的な悪性化がみられた。oligoSia 非依存的悪性化の原因を探るため、蛍光免疫染色法による ST8Sia6 の細胞内局在を観察したところ、通常のシアル酸転移酵素と異なり、小胞体上に染色が見られた。以上より、ST8Sia6 の発現はマウスメラノーマ細胞の癌形質の悪性度の増加に寄与するが、癌形質の悪性化には ST8Sia6 が生合成するオリゴシアル酸構造あるいは ST8Sia6 の未知機能が関与することが示唆される。

The increase of sialic acid (Sia) in cancer has been well observed. The sialyltransferase ST8Sia6, a responsible enzyme for the biosynthesis of oligoSia, is highly expressed in several cancers. However, its involvement in cancer properties is still unknown. To clarify this, we investigated relationships between oligoSia expression and malignant phenotypes of mouse melanoma cells. Our results suggest that ST8Sia6 expression promotes malignancy of melanoma cells through oligoSia biosynthesized by ST8Sia6, or an unknown function of ST8Sia6 other than the glycosyltransferase activity.

Cancer, Sialic acid, Glycosyltransferase

発表責任者：畑中理菜（hatanaka.rina@j.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C05-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

Xanthomonas campestris WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA による alkyl α-D-glucopyranosides の酵素的生産

Enzymatic Synthesis of Alkyl α-D-Glucopyranosides by XgtA, a Glucosyl Transfer Enzyme Derived from *Xanthomonas campestris* WU-9701

○曹 偉[1]、渡邉 理沙[1]、石井 義孝[2]、桐村 光太郎[1,2] ([1]早大・先進理工・応化、[2]早大・理工研)
○Wei CAO[1], Risa WATANABE[1], Yoshitaka ISHII[2], Kohtaro KIRIMURA[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Waseda Res. Inst. Sci. Eng.)

Alkylglucosides には整肌作用や保湿作用、抗菌作用などが認められており、alkyl α-D-glucopyranosides (α-AGs)は有用化合物として期待されている。さらに、長鎖のアルキル基から生成するα-AGs は生分解性界面活性剤としての用途も期待できる。しかし、有機合成法ではα-AGs の選択的生産は困難であり、酵素的合成法の開発に期待が寄せられている。演者らは、α-AGs の酵素的生産を目的として、*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素 XgtA[1, 2)]を用いた反応について検討した。マルトースをグルコース供与体、C3- C10 の直鎖アルコール (1-propanol から 1-decanol) を受容体としたグルコース転移反応で生成物が得られ、α-AGs の酵素的合成が可能なことを確認した。マルトトリオースなどのオリゴ糖の副生もなかった。また、octyl α-D-glucopyranoside (α-OG)の酵素的生産について経時変化を調べ、96 h の反応で 71.1 g･L^{-1} の生産に成功した。以上より、XgtA を使用したα-AGs の選択的生産が可能なことを明らかにした。

1) T. Sato, *et al*., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **80**, 20-27 (2012).
2) R. Watanabe, *et al*., Biochem. Biophys. Res. Commun., **526 (3)**, 580-585 (2020).

Alkylglucosides show skin conditioning and moisturizing effects, and antibacterial activity. Alkyl α-D-glucopyranosides (α-AGs) are promising compounds showing specific and biological effects. Moreover, α-AGs might be available as non-ionic surfactants. However, selective synthesis of α-AGs is difficult by conventional organic synthesis method, and enzymatic synthesis method might be suitable for the synthesis. With the objective to selectively synthesize α-AGs, we examined the enzymatic reactions by XgtA, an α-glucosyl transfer enzyme (XgtA) of *Xanthomonas campestris* WU-9701. We used maltose as a glucosyl donor and linear alkyl alcohols (C3-C10) as glucose acceptors and confirmed that α-AGs were enzymatically synthesized from the corresponding linear alkyl alcohols through the reactions by XgtA. No by-product such as maltotriose and maltotetraose was formed in the reaction mixture. Time course of octyl α-D-glucopyranoside (α-OG) synthesis from maltose and octyl alcohol was examined, and 71.1 g･L^{-1} α-OG was produced by XgtA in 96 h reaction. In summary, we revealed that XgtA is useful for the selective and enzymatic synthesis of α-AGs.

Alkyl glucoside, α-glucosidase, transglucosylation

講演番号：3C05-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

ヒト腸内細菌 *Bacteroides cellulosilyticus* による海藻多糖 β-1,3-キシランの資化機構 － 菌体内 β-1,3-キシロシダーゼの機能解析 －

Assimilation system of seaweed polysaccharide β-1,3-xylan in the human gut bacterium *Bacteroides cellulosilyticus* - Functional characterization of intracellular β-1,3-xylosidase -

長縄 真以[1]、○岡﨑 文美[2] ([1]三重大生資、[2]三重大院生資)
Mai NAGANAWA[1], ○Fumiyoshi OKAZAKI[2] ([1]Fac. Bioresour., Mie Univ., [2]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

【目的】β-1,3-キシロシダーゼ(1,3-β-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.72)は、β-1,3-キシランおよび β-1,3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生ずるエキソ型の酵素であり、エンド型で作用する β-1,3-キシラナーゼ(1,3-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.32)と共に、海藻特有の多糖である β-1,3-キシランの資化に必要な酵素である。これまでに酵素機能が明らかにされた β-1,3-キシロシダーゼ遺伝子は 2 遺伝子のみであり、ヒト腸内細菌由来酵素の報告は無い。我々はヒト腸内細菌 *B. cellulosilyticus* のゲノム配列中に推定 β-1,3-キシラン資化遺伝子クラスターを見出した。本研究では、同遺伝子クラスター中の推定 β-1,3-キシロシダーゼ遺伝子(*xlo43H*)の酵素機能を解析することを目的とした。
【方法および結果】 目的遺伝子(*xlo43H*)を大腸菌により発現し、組換え酵素 *Bc*Xlo43H を得た。本酵素は β-1,3-キシランおよび β-1,3-キシロオリゴ糖に特異的に作用してキシロースのみを生じたことから、β-1,3-キシロシダーゼであることが明らかとなった。本酵素の至適温度は 35 ℃付近、至適 pH は 6.5 付近であった。合成基質 pNP-β-D-xylopyranoside に対する K_m は 0.45 mM、V_{max} は 49.71 μmol min^{-1} mg^{-1} であり、既報酵素よりも高い酵素活性を示した。本酵素は、同一クラスター内に存在する 2 種類の β-1,3-キシラナーゼが β-1,3-キシランから生成した β-1,3-キシロオリゴ糖に作用し、キシロースを生成した。これらの結果は、ヒト腸内における優勢菌群である *Bacteroides* 属細菌が、海藻特有の多糖である β-1,3-キシランの資化経路を有することを示すものであり、海藻食とヒトの健康に関する新たな知見を与えるものと考えられる。

β-1,3-Xylan is a homologous polymer of β-1,3-linked D-xylose units that are found only in the cell walls of red algae and green algae. β-1,3-Xylanases (1,3-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.32) and β-1,3-xylosidases (1,3-β-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.72) required for complete breakdown of β-1,3-xylan are useful tools for production of D-xylose. To date, there have been only two reports on β-1,3-xylosidases that is able to hydrolyze β-1,3-linked xylooligosaccharides to D-xylose. In this study, we characterized the enzymatic properties of putative β-1,3-xylosidase (*Bc*Xlo43H) from a human gut bacterium, *Bacteroides cellulosilyticus*. The *Bc*Xlo43H gene has been cloned and expressed as a soluble protein in *Escherichia coli*. The recombinant enzyme showed specific hydrolytic activity against β-1,3-linked xylooligosaccharides and released D-xylose. It displayed maxium activity at 35 ºC at pH 6.5. This is the first report of the expression and characterization of β-1,3-xylosidase from human gut microbes, and the substrate specificity of *Bc*Xlo43H imply that the human gut *Bacteroides* species have unknown β-1,3-xylan utilization pathway.

β-1,3-xylosidase, β-1,3-xylan, human gut bacteria

発表責任者：岡崎　文美（okazaki@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3C05-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

可逆的脱炭酸酵素 UbiD の探索システムの構築

Construction of a search system for various reversible decarboxylase UbiDs

土井 淳平、村瀬 諒太、○笹原 遥介、市村 遼、青野 陸、木野 邦器（早大先進理工応化）
Junpei Doi, Ryota Murase, ○ Yosuke Sasahara, Ryo Ichimura, Riku Aono, Kuniki Kino (Sci.Adv.Sci.Eg.,Waseda Univ)

芳香族カルボン酸は機能性ポリマー原料としても有用であり、カーボンニュートラルの実現に向けて化石資源に依存しないバイオマス資源からのバイオ生産法の開発に大きな期待が寄せられている。微生物由来の非酸化的な可逆的脱炭酸酵素は二酸化炭素を化合物に固定して対応するカルボン酸を合成することができる。この酵素群は Amidohydrolase family と UbiD family に分類され、前者は主にサリチル酸骨格を基質として認識して酵素単独で活性を発現するが、後者は prenylated FMN (prFMN) を補酵素とするため、prFMN の合成を担う UbiX と協働することで活性を発現する。しかし、広範な基質特異性やカルボン酸の導入位置が多様であるなど、その工業的利用価値は高い。

そこで、本研究では当該酵素によって合成可能なカルボン酸の拡張を目的として、多様な UbiD の探索を可能とするシステムの構築を検討した。具体的には、遺伝子組換えツールが整備されている大腸菌を宿主として､探索候補となる UbiD の活性発現を保証するだけの prFMN 供給を可能とする UbiX 高発現株の開発を行った。prFMN は FMN と DMAP あるいは DMAPP から合成されるが、DMAPP を利用する大腸菌由来 UbiX を高発現させた株での prFMN 供給が確認できたため、この UbiX 発現系を採用し、その発現条件の最適化も検討した。2-furoic acid から 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) を合成する可逆的脱炭酸酵素 [1]など既知酵素を含むいくつかの UbiD の活性評価による検証を行い、本 UbiD 探索システムの有用性を確認することができた。

1) Kawanabe, K., Aono, R., and Kino, K., *J. Biosci. Bioeng.*, **130**, 18-24 (2021).

The UbiD family of reversible decarboxylase, which has prFMN as a cofactor, expresses its activity by cooperating with its synthase, UbiX. And the UbiD family is highly useful for industrial applications due to its broad substrate specificity and diverse carboxylic acid incorporation positions. Therefore, we aimed to construct a UbiD search system to expand the range of carboxylic acids that can be synthesized by this enzyme. We compared UbiX from *Pseudomonas aeruginosa* which synthesizes prFMN from DMAP using prenol as a raw material, and UbiX from *E. coli* that synthesizes prFMN from FMN and DMAPP. As a result, we constructed a UbiD search system with high expression of UbiX from *E. coli*, and confirmed its usefulness.

reversible decarboxylase, UbiD family, prenylated FMN

発表責任者：木野邦器（kkino@akane.waseda.jp）

講演番号：3C05-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

タンパク質架橋酵素活性の制御剤探索に向けた新規 FRET プローブの開発

Development of FRET probes to screen for compounds that regulate the activity of protein cross-linking enzyme

○青山 瑠里子、辰川 英樹、人見 清隆（名大院・創薬科学）
○Ruriko AOYAMA, Hideki TATSUKAWA, Kiyotaka HITOMI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】トランスグルタミナーゼ（TG）は Ca^{2+}依存的にタンパク質中のグルタミン（Gln）残基とリジン（Lys）残基間のイソペプチド結合を形成する反応を触媒する酵素である。ヒトにおいては 8 つの TG アイソザイムが存在し、特徴的な局在分布を介して多彩な生命現象に関わる。TG1 および TG2 は主要な TG アイソザイムとして知られており、これらの活性異常は皮膚形成異常を示す魚鱗癬、自己免疫疾患のセリアック病など様々な疾患発症の原因とされ、メカニズム解明や新規治療法の開発が必要とされている。しかしながら、TG1 および TG2 の特異的な制御因子の報告例は少ないため、本制御因子の探索を目的とした新規酵素活性測定系の開発を行った。
【方法・結果】蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を利用して TG1 および TG2 による架橋反応を捉えるプローブの開発を試みた。これまでに当研究室では TG の各アイソザイムに特異的に反応する、Gln 残基を含む基質ペプチド配列を同定しており、この情報に基づき FITC 標識した同ペプチドおよび Lys 残基を含む Rhodamine B 標識した基質ペプチドを作製した。TG により 2 種のペプチドの Gln–Lys が架橋されると、FITC と Rhodamine B の距離が近づくため、FRET が起こることを期待したが、実際には予想に反して架橋反応依存的に FITC の蛍光強度が顕著に減少した。開発したプローブの Gln 残基側の基質配列を変化させることにより、アイソザイム特異的な架橋酵素活性に依存して FITC 蛍光強度の減少が明確に確認されたことから、迅速で簡便な新規酵素活性測定系の開発に成功した。今後は、同プローブを用いて 384 well プレートによる化合物スクリーニングを実施し、アイソザイム選択的な架橋活性の新規制御因子を探索する予定である。
Transglutaminase (TG) is an enzyme that catalyzes the isopeptide bonds between glutamine and lysine residues of proteins. The major TG isozymes, TG1 and TG2, have been implicated in the pathogenesis of various diseases such as ichthyosis and celiac disease, respectively. Since there are few reports on specific regulators of TG1 and TG2, we developed a new assay system that can measure isozyme-specific TG activity for screening of regulatory compounds. Here, we showed the development of a rapid and simple system for measuring TG activity using two fluorescently labeled peptides cross-linked by TG in isozyme-dependent manner. In the future, we plan to conduct chemical compounds screening using these probes in 384 well plates to screen for novel compounds that regulate isozyme-specific cross-linking activity.

Transglutaminase, Activity, FRET probe

発表責任者：青山 瑠里子（rurikoaoyama17@gmail.com）

講演番号：3C05-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

葉面常在菌由来のクチナーゼ様酵素はクチナーゼ活性を持つ

Cutinase-like enzymes which degrade biodegradable plastic from phylloplane yeasts have cutinase activity.

○植田 浩一[1]、田端 純[2]、勢〆 康代[1]、正木 和夫[3]、山下 結香[1]、北本 宏子[1]([1]農研機構・農環研、[2]農研機構・植防研、[3]酒総研)
○ HIROKAZU UEDA[1], JUN TABATA[2], YASUYO SESHIME[1], KAZUO MASAKI[3], YUKA SAMESHIMA-YAMASHITA[1], HIROKO KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]NIPP, [3]NRIB)

Pseudozyma 属と *Cryptococcus* 属の葉面常在菌酵母は、生分解性プラスチック（生プラ）分解酵素を分泌する。これらの酵素は、触媒部位がクチナーゼと似ているため、クチナーゼ様酵素（CLE）と呼ばれるが、糸状菌クチナーゼ全体との類似性は 30%以下で、クチナーゼ活性は調べられていなかった。
本研究ではまず、比較的低温の開放環境で生プラ製品を分解する菌を得るために、15℃で生プラフィルム分解菌を単離し、CLE を得た。次に、他の単離同定済の複数の CLE と共に、クチナーゼ活性を調べた。
13 種の植物葉から単離した分解真菌 60 株のうち 17 株を *C. magnus* と同定した。
クチナーゼ活性は、トマト葉のクチンを調製し、*Cryptococcus* 属 3 種（*C. magnus*、*C. flavus*、*C. laurentii*）、*Pseudozyma antarctia* の CLE（PaE）、および既知糸状菌のクチナーゼで測定した。反応物の GC-MS 解析から、クチンモノマーである 10,16-ジヒドロキシヘキサデカン酸を検出した。その活性はいずれも大きな差が無く、CLE のクチナーゼ活性を見出した。大量に調整した PaE を用いたクチン分解物の薄層クロマトグラフィー分析から、モノマーだけでなくオリゴマーも検出され、PaE がエンド型酵素であることが示された。

Phylloplane yeast genera *Pseudozyma* and *Cryptococcus* secrete biodegradable plastic (BP)-degrading enzymes, termed cutinase-like enzymes (CLEs). Although, CLEs contain highly conserved catalytic sites, the whole protein exhibits ≤30% amino acid sequence homology with cutinase. The aim of this study was to isolate microorganisms and their enzymes that can efficiently degrade BP products under relatively low temperature open environments and to analyze whether CLE exhibits cutinase activity. Seventeen *Cryptococcus magnus* strains, which degrade BP at 15°C were isolated from leaves, and one of the CLE DNA sequence was identified. Cutin was prepared from tomato leaves and treated with CLEs from three *Cryptococcus* species and *Pseudozyma antarctia* (PaE). A typical cutin monomer was detected in extracts of the reaction solution via GC-MS, showing that cutin was indeed degraded by CLEs. Separation of the product treated with PaE by TLC revealed detected high-molecular-weight products, indicating that PaE is an endo-type enzyme.

本研究は生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

cutinase, cutinase-like-enzyme, phylloplane yeast

発表責任者：植田浩一（hiueda@affrc.go.jp）

講演番号：3C05-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

サツマイモ塊根由来の粗酵素と緑茶浸出液を用いた効率的なテアフラビン合成

Efficient synthesis of theaflavin using crude enzyme extracted from tuberous roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and green tea infusions

○廣實 咲紀、松田 寛子、奈良井 朝子（日獣医大院・応生科）
○Saki Hirozane, Hiroko Matsuda, Asako Narai (G.S.N.V.L.U.)

紅茶の赤橙色色素であるテアフラビン（TF1）は、紅茶製造中の発酵工程で茶葉内のエピカテキン（EC）とエピガロカテキン（EGC）が内在性酵素であるポリフェノールオキシダーゼ（PPO）によって酸化的に縮合した二量体である。TF1 は様々な生理活性を有することが報告されているものの、紅茶葉から抽出・精製される量は少なく、作用機構や構造活性相関などの研究の進展が妨げられている。そこで、カテキンとカテキン酸化酵素の反応を利用した TF1 合成が試みられてきた。演者らは前年度本大会にて、サツマイモ塊根から硫安塩析法により調製した粗酵素が TF1 生成ならびにその構成成分である EC の酸化に対して高い反応性を示すことを発表した。今大会では、本粗酵素を用いて簡便且つ安価に TF1 を合成するため、精製されたカテキン標品ではなくカテキンを豊富に含む緑茶浸出液を基質として用いる TF1 合成反応について調べた結果を発表する。

緑茶浸出液を用いると、標品を基質とした反応に比べて TF1 の生成量が少なく、解析の結果、緑茶浸出液中の没食子酸（GA）が TF1 合成反応を阻害することが示唆された。陰イオンまたは陽イオン交換樹脂による緑茶浸出液の処理方法を検討し、GA を分離・除去することができた緑茶浸出液にサツマイモ粗酵素を作用させると TF1 の生成量が増加した。

Theaflavin (TF1) is a characteristic, polyphenolic pigment of black tea infusion, which is synthesized during the fermentation process of tea production by a series of reactions involving the enzymatic oxidation of catechins and the non-enzymatic condensation of two oxidized catechins. Although TF1 has been known to have various biological activities, its content in black tea infusion is low. Thus, the aim of this study is to establish the easy, practical reaction system allowing the efficient synthesis of TF1 to be used by researchers.

We have extracted the crude enzyme from tuberous roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*) as a source of polyphenol oxidases. And then, the crude enzyme was added to the catechin-rich instant green tea infusion (IGT), which was used as a reaction substrate instead of purified catechins. As a result, the synthetic reaction proceeded slowly and the TF1 yield was not so as high as expected. Removal of GA from IGT with ion-exchange resins before the reaction successfully improved the TF1 yield.

theaflavin, sweet potato, polyphenol oxidase

発表責任者：奈良井朝子（a-narai@nvlu.ac.jp）

講演番号：3C05-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

腸内細菌における葉酸生合成遺伝子の同定

Identification of the gene involved in folate biosynthesis in the intestinal bacterium

○佐藤 喬章、加地 楓、跡見 晴幸（京大院工）
○Takaaki SATO, Kaede KACHI, Haruyuki ATOMI (Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ.)

ヒトの腸内では多様な細菌が腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢の構成については、加齢と共に変化することやそのバランスを保つことでヒトの健康にとって良い影響を与えることなどが分かってきている。悪玉菌や善玉菌に特異的な代謝酵素を同定できれば、悪玉菌の増殖のみを抑制する、もしくは善玉菌の増殖のみを活性化するなどして腸内細菌叢をコントロールできるようになる可能性がある。そこで、我々は個々の腸内細菌の代謝の理解を目指して研究を進めている。

葉酸はビタミン B 群の一つで、その還元体は 1 つの炭素を代謝中間体へ付加することによってアミノ酸や核酸の生合成に寄与する補酵素である。ヒトは葉酸を生合成できず、腸内細菌が生合成するものを利用していることが知られている。善玉菌とされる乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* は既知の葉酸生合成遺伝子のほとんどをゲノム上に有しているが、生合成中間産物である 7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate (DHNTP)を代謝する酵素が存在しない。そこで本研究では乳酸菌 *L. reuteri* における DHNTP 代謝酵素を同定し、葉酸生合成機構を解明することを目的とした。ゲノム情報から候補遺伝子を選抜し、その組換え型タンパク質を大腸菌で調製し、各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製組換え型タンパク質を解析したところ、DHNTP 代謝活性を示すことが明らかとなった。さらに、反応温度や pH の依存性、金属イオン要求性など各種酵素学的特性の解析も行った。

Various intestinal bacteria form the human gut microbiota. It has been known that the microbiota change with age and to maintain the microbiota composition is important for human health. If we can identify enzymes specifically present in bacteria which provide a negative or positive effect to human, it may enable us to control the gut microbiota by inhibiting or activating the enzymes.

Folate is one of the vitamin Bs and its reduced form is involved in the biosynthesis of several amino acids and nucleic acids by supplying C1 units to metabolic intermediates. Although the lactic acid bacterium *Lactobacillus reuteri* possesses almost all genes involved in folate biosynthesis, homologous gene(s) encoding enzyme(s) which metabolize an intermediate, 7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate (DHNTP), cannot be found on its genome. The purpose of this study is to identify the enzyme(s) metabolizing DHNTP in *L. reuteri*. We selected a candidate gene based on its genomic information, heterologously overexpressed in *Escherichia coli*, and purified the recombinant protein. The purified recombinant protein was found to display activity metabolizing DHNTP. In addition, we carried out experiments to characterize its enzymatic properties.

intestinal bacteria, folate, biosynthesis

発表責任者：佐藤喬章（takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C05-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

活性型ビタミン D の生産に向けた CYP105A1 とその変異体の安定性の比較

Comparison of the stability of CYP105A1 and its variants engineered for production of active forms of vitamin D

○滝田 禎亮[1]、安田 佳織[2]、榊 利之[2]、保川 清[1]([1]京大農、[2]富山県大工)
○Teisuke Takita[1], Kaori Yasuda[2], Toshiyuki Sakaki[2], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Toyama Pref. Univ.)

【目的】*Streptomyces griseolus* 由来シトクロム P450 の CYP105A1 は、ビタミン D3 を活性型 1α,25-ジヒドロキシビタミン D3 に変換する。本酵素は活性部位周辺に 4 つのアルギニン残基（R73, R84, R89, R193）をもつ。変異 R73A/R84A の導入により、ビタミン D3 に対する 1α 位 および 25 位水酸化活性は上昇したが、ビタミン D2 に対する 1α 位水酸化活性は非常に低いままであった。しかし、後者の活性は M239A 変異により上昇した。本研究ではこれらの変異の酵素の安定性と凝集性への効果を調べた。
【方法】1. CYP105A1 調製：大腸菌で発現させ、超音波破砕物遠心上清から Ni アフィニティーカラムを用い精製した。2. 安定性の評価：精製直後と 4℃で一週間保存後に、酵素活性と CO 結合差スペクトルを測定した。CD 昇温実験から T_m 値を得た。タンパク質蛍光を指標に 50-60℃で変性速度定数（k_{den}）を得た。8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸の蛍光を指標に 30℃で凝集速度定数（k_{agg}）を得た。
【結果と考察】すべての酵素（WT, R73A/R84A, M239A, R73A/R84A/M239A（TriA））が CO 結合に起因する 450 nm のピークを示したが、4℃で一週間保存後には M239A と TriA ではピークは消失し、その酵素活性も大きく低下した。これらの CD スペクトルは WT と R73A/R84A に比べ 210-230nm で小さな値を示した。WT と R73A/R84A の T_m 値は 43℃、M239A と TriA の T_m 値は 38℃であった。これらは、M239A 変異により CYP105A1 の安定性が低下することを示した。すべての酵素で k_{den} は同程度であり、M239A と TriA の k_{agg} は WT に比べ増加していた。非変性 PAGE では、M239A と TriA に顕著なオリゴマーが観察された。

[Purpose] CYP105A1, a cytochrome P450 enzyme from *Streptomyces griseolus*, has both 1α- and 25-hydroxylation (OH) activities for vitamin D3 (D3), and converts D3 to its active form 1α,25(OH)$_2$ D3. Four Arg residues (R73, R84, R89, R193) exist in and around the active site. R73A/R84A mutation enhanced both 1α- and 25-OH activities for D3, but not marginal 1α-OH activity for D2. However, the 1α-OH activity for D2 was enhanced by M239A. In this study, we examined the effects of these mutations on the stability of the enzyme.
[Methods] CO-difference spectra, CD spectra, CD thermal denaturation profiles (T_m), and residual activity during storage were measured. Denaturation rate constants (k_{den}) were estimated with the protein fluorescence, while aggregation rate constants (k_{agg}) were estimated by using 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid fluorescence.
[Results and Discussion] All enzymes (WT, R73A/R84A, M239A, R73A/R84A/M239A (TriA)) showed a CO-binding peak at 450 nm. The peaks of M239A and TriA disappeared after 1 week at 4°C, consistent with large decreases in the residual activity. In CD spectra, M239A and TriA showed smaller values at 210-230 nm. T_m values were: 43°C for WT and R73A/R84A; 38°C for M239A and TriA. These indicated that M239A mutation decreases the enzyme stability. All enzymes showed comparable k_{den}, while M239A and TriA showed higher k_{agg}.

cytochrome P450, vitamin D, enzyme stability

発表責任者：滝田禎亮（takita.teisuke.2r@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C05-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム C

アセトアミノフェン酸化代謝物 N-acetyl-p-benzoquinone の硫酸化
Sulfation of an acetaminophen oxidized metabolite, N-acetyl-p-benzoquinone

○瀬川 浩志[1]、黒木 勝久[1]、Ming-Cheh Liu[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1] ([1]宮崎大農、[2]トレド大薬)
○KOSHI SEGAWA[1], Katsuhisa Kurogi[1], Ming-Cheh Liu[2], Masahito Suiko[1], Yoichi Sakakibara[1] ([1]Miyazaki Univ., [2]Toledo Univ.)

硫酸転移酵素(SULTs)は解毒代謝機構の第二相反応を触媒する酵素である。SULT はヒドロキシ基やアミノ基に硫酸基を転移する反応を触媒する。SULT1 ファミリーはフェノール性化合物に特異的な硫酸化を行い、その中でも SULT1A1、SULT1A3、SULT1C4 はアセトアミノフェンの硫酸化を触媒することが報告されている。N-acetyl-p-benzoquinone(NAPQI)は、CYP450 によるアセトアミノフェンの酸化で生じる代謝産物であり、肝毒性を引き起こすことが知られている。最近、我々は硫酸化の第三の標的官能基としてα,β-カルボニル基を同定しており、NAPQI も硫酸化の標的となることが考えられている。そこで本研究では、SULT による NAPQI の硫酸化の検討を行った。

放射性同位体 ^{35}S 標識 PAPS(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)を硫酸供与体として NAPQI の硫酸化を行ったところ、SULT1A1 および SULT1A3 が NAPQI に対して硫酸化活性を示すことがわかった。この結果より、アセトアミノフェンだけでなく、その酸化代謝物の代謝にも硫酸化が機能することが明らかになった。現在、質量分析を用いた NAPQI の硫酸体の検出を目指しており、NAPQI の硫酸化による毒性軽減作用などについても検討する。

Sulfotransferases (SULTs) are enzymes that catalyze phase II reactions in detoxification metabolism of endogenous and xenobiotic compounds. SULTs catalyze the transfer of sulfonate groups to hydroxy and amino groups. The SULT1 family performs specific sulfation of phenolic compounds, and SULT1A1, SULT1A3, and SULT1C4 play a pivotal role in the sulfation of acetaminophen. N-acetyl-p-benzoquinone (NAPQI) is a metabolite produced during the oxidation of acetaminophen by CYP450 and is known to cause hepatotoxicity. In the present study, we investigated the sulfation of NAPQI by SULT.

Sulfation of NAPQI was performed using a radioisotope ^{35}S-labelled PAPS(3'-phosphoadenoshine 5'-phosphosulfate) as a sulfonate donor. SULT1A1 and SULT1A3 exhibited the sulfation activity toward NAPQI. Therefore, sulfation may play a role in the analysis of chemical form of sulfated NAPQI by as well as the parent form, acetaminophen.

We have now embarked on the analysis of chemical form of sulfated NAPQI by mass spectrometry. In the future, we will investigate the effects of sulfation on the metabolism and cytotoxicity of NAPQI with human hepatocarcinoma cells.

SULT, acetaminophen, N-acetyl-p-benzoquinone

発表責任者：黒木勝久（katsu1982@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3C06-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

メチオニン生合成酵素 MetX と MetW の相互作用領域の探索

Investigation of the interaction region between methionine biosynthetic enzyme MetX and MetW

○長谷部 文人、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大院・生物資源）
○Fumihito HASEBE, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

細菌のメチオニン生合成において、MetX は Homoserine *O*-acyltransferase として知られる。これまでに我々は、緑膿菌の有する機能未知タンパク質 MetW(PaMetW)が MetX(PaMetX)と相互作用し、その触媒活性を制御することを明らかにした。しかし、PaMetW と PaMetX の相互作用に重要な領域/残基は未知である。そこで本研究では、PaMetW と PaMetX の変異体解析による相互作用に重要な領域の探索を行った。

PaMetX/PaMetW の C 末欠損体を各々作製し、大腸菌 BL21(DE3)を用いて共発現させ、組換え体を Ni-NTA カラムに供して共精製を試みた。精製画分を SDS-PAGE に供し、ImageJ を用いて各々のバンド強度の面積値を比較することで相互作用の評価を行った。その結果、PaMetW の N 末端側の 110 残基までの truncate 体でも野生型と同様に共精製され、当該領域内に PaMetX との相互作用に重要な領域があることが示唆された。一方で、PaMetX の C 末端 21 残基の欠損体では、共精製される PaMetW の面積比が 0.4 程度まで低下したことから、PaMetX では当該領域が PaMetW との相互作用に重要な領域であることが示唆された。

In bacterial methionine biosynthesis, the enzyme MetX function as a homoserine *O*-acyltransferase. Recently, we elucidated that the MetW from *Pseudomonas aeruginosa* (PaMetW) interacted with the MetX from *P. aeruginosa* (PaMetX) and regulated the enzymatic *O*-succinyltransferase activity of PaMetX. However, region/residue responsible for the interaction between PaMetW and PaMetX remains unclear. In the present study, we investigated the region/residue involved in the interaction between PaMetW and PaMetX using C-terminal truncated variants.

C-Terminal truncated PaMetW (PaMetW*) or PaMetX (PaMetX*), was co-expressed with PaMetX or PaMetW* and applied to Ni-NTA column. The eluate fraction was applied to the SDS-PAGE, and the stained gels were analyzed using ImageJ. PaMetW* (-F110; up to the F110) were co-purified with PaMetX, as well as PaMetW. This result suggested that the N-terminal region (M1-F110) was necessary for the interaction between PaMetW and PaMetX. On the other hand, in the experiment with PaMetX*(-A358; truncated C-terminal 21 residues), the co-purified PaMetW*(-F110) was decreased, and the band-area ratio [Area(PaMetW*(-F110))/Area(PaMetX*)] was decreased to approximately 0.4, suggesting that the C-terminal region of PaMetX (F359-V379) played an important role in the interaction.

amino acid, methionine biosynthesis, protein-protein interaction

発表責任者：長谷部文人（ufhasebe@fpu.ac.jp）

講演番号：3C06-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

分子進化系統解析により見出した新規 PLP 非依存型オルニチンラセマーゼ

Novel PLP-independent ornithine racemase discovered through comparative evolutionary analysis

○奥野 雄大、老川 典夫、山中 一也（関西大化工）
○Yudai OKUNO, Tadao OIKAWA, Kazuya YAMANAKA (Kansai Univ.)

我々は、放線菌 *Streptoalloteichus hindustanus* が二次代謝産物として生産する γ-poly-2,4-diaminobutyric acid（Poly-D-Dab）の生合成から、先例のない PLP 非依存型の Dab（C4 ジアミノ酸）特異的ラセマーゼ（DabR）を見出している。当該酵素の三次元構造モデルは、ジアミノピメリン酸（C6 ジアミノ酸）エピメラーゼ（DapF）の三次元構造と極めてよく一致したことから、両者の進化的関連性が強く示唆された。この結果は、未発見の PLP 非依存型 C5 ジアミノ酸ラセマーゼ、すなわちオルニチンラセマーゼ（OrnR）の存在を強く示唆するものであったことから、本研究では微生物ゲノムデータベースに登録される膨大な数の推定 PLP 非依存型セマーゼ遺伝子から潜在的な OrnR を探索し、その機能を検証することを目的として研究を行った。

DabR のアミノ酸配列をクエリーとした BLAST 検索を行うことでそのホモログ酵素遺伝子を網羅的に選抜し、系統樹解析したところ、放線菌 *Lentzea flava* のゲノムにおいて *dapF* とアノテーションされる遺伝子遺伝子産物が、DabR と DapF の中間クレードに紐づけされることを見出した。更に当該遺伝子は複数のオルニチン代謝関連酵素遺伝子とオペロンを形成していたことから、当該遺伝子産物（*Lf*-OrnR）が OrnR である可能性が強く示唆された。そこで、大腸菌を宿主とした異種発現系を用いて *Lf*-OrnR を組み換えタンパク質として調製し、各種ジアミノ酸に対するラセミ化活性を評価したところ、期待した通り補酵素非依存的に Orn のラセミ化を触媒することが判明した。本酵素は PLP 非依存的に Orn のラセミ化を触媒する初の酵素である。

We have reported the identification and characterization of the first PLP-independent 2,4-diaminobutyric acid racemase (DabR) involved in an actinobacterial D-amino acid homopolymer biosynthesis. Despite the low levels of sequence similarity, a phylogenetic analysis of DabR catalyzing racemization of C4 diamino acid indicated its particular relevance to DapF that stereoinverts the particular C6 diamino acid, among PLP-independent racemases/epimerases. This finding motivated us to explore an undiscovered PLP-independent racemase for the C5 diamino acid, ornithine, from a vast number of uncharacterized racemase genes pooled in the genomic database. Among the *dabR* homolog genes found through a BLAST search, a homolog coding gene in *Lentzea flava* (*lf-ornR*), which has been annotated as *dapF*, caught our attention, since its protein product was shown to be phylogenetically intermediate between DapFs and DabRs. The critical finding that the *lf-ornR* gene was translationally coupled with genes responsible for ornithine metabolism let us decided to generate recombinant *Lf*-OrnR for functional analysis with high confidence. As expected, the recombinant *Lf*-OrnR indeed catalyzed racemization of ornithine in the cofactor independent manner *in vitro*. This is the first report on the PLP-independent ornithine racemase.

PLP-independent, racemase, amino acid

発表責任者：山中一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3C06-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* がもつ二つのアラニン脱水素酵素の機能解析
Functional analysis of two alanine dehydrogenase from *Geobacillus kaustophilus*
○前野 美久[1]、大島 敏久[1,2]、大森 勇門[1,2] ([1]大阪工大・院工・生命工学、[2]大阪工大・工・生命工学)
○Miku MAENO[1], Toshihisa OHSHIMA[1,2], Taketo OHMORI[1,2] ([1]Grad. Sch. appl. Chem., environ., & Biomed Eng., Osaka Inst. Tech., [2]Dept. Biomed. Eng., Osaka Inst. Tech.)

【背景】NAD 依存性のアラニン脱水素酵素(AlaDH, EC 1.4.1.1)は L-アラニンをピルビン酸とアンモニアへ分解する反応を可逆的に触媒する酵素である．*Bacillus subtilis* において本酵素は芽胞形成時のエネルギー供給や発芽後一回目の分裂である Outgrowth において重要な役割を果たしていることが報告されている．我々は *Bacillus* 属菌の近縁種である好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* に二つの AlaDH 遺伝子(*GK2752* と *GK3448*)が存在し，それらが互いに異なる生育段階において特異的に発現していることを見出している．本研究では大腸菌を用いて発現させた GK2752 と GK3448 の酵素化学的特徴を明らかにすることを目的とした．
【方法と結果】常法に従い，大腸菌 BL21(DE3)で両酵素をそれぞれ発現させ，細胞抽出液から熱処理(70°C, 30 min)と色素リガンドクロマトグラフィーにより両酵素を均一に精製し，酵素化学的特徴の解析を行った．その結果，組換え GK2752 および GK3448 酵素の酸化的脱アミノ反応における L-Ala に対する K_m はそれぞれ 6.7，4.8 mM，触媒効率(k_{cat}/K_m)は 31，49 $mM^{-1}・s^{-1}$ であった．また両酵素は基質である L-Ala により顕著な基質阻害を受け，その阻害は GK2752 酵素においてより顕著であった．さらに両酵素の酸化的脱アミノ反応は Gly 存在下でのみ，生成物であるピルビン酸による著しい阻害を受けることが判明した．以上の結果から，*G. kaustophilus* の 2 種の AlaDH の酵素化学的特徴が明らかになった．

Alanine dehydrogenase (AlaDH, EC 1.4.1.1) catalyzes NAD-dependent oxidative deamination of L-Ala to pyruvate. *Bacillus subtilis* AlaDH has been reported to function for the energy supply in the spore formation, and be necessary for the normal sporulation and germination. We have already found that *Geobacillus kaustophilus* have two AlaDH genes (*GK2752* and *GK3448*) in its genome, and two AlaDHs are expressed at different growth stages. We succeeded in overexpression of the two recombinant proteins in *Escherichia coli*, and examined the enzymatic properties. Each recombinant AlaDH expressed in *E. coli* BL21 (DE3) was purified to homogeneity by heat-treatment and the following dye-linked affinity chromatography. Kinetic analysis in L-Ala deamination showed that the K_m values for L-Ala of GK2752 and GK3448 were 6.7 and 4.8 mM, and k_{cat}/K_m values were 31 and 49 $mM^{-1}・s^{-1}$, respectively. Both the AlaDHs were inhibited by the substrate L-Ala, and specifically inhibited by pyruvate in the presence of glycine.

alanine dehydrogenase, *Geobacillus kaustophilus*, spore

発表責任者：大森　勇門（taketo.omori@oit.ac.jp）

講演番号：3C06-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

リジン生合成の強化による大腸菌への高温ストレス耐性の付与

Enhancement of lysine biosynthesis confers high-temperature stress tolerance on *Escherichia coli* cells

○磯貝 章太、高木 博史 (奈良先端大バイオ)
○Shota Isogai, Hiroshi Takagi (NAIST Bio)

リジンは、栄養学的に重要な必須アミノ酸であり、植物や微生物において環境ストレスへの適応や耐性に関わっている。これまでにストレスに応答したリジンの蓄積や、リジン添加がストレス耐性の向上に寄与することが報告されているものの、リジン生合成能の強化がストレス耐性に与える影響については明らかになっていない。我々は、リジンの添加により大腸菌に高温ストレス耐性が付与されること、またリジンを高生産する大腸菌の変異株も同様に高温条件における生育が改善することを見出した。本研究は、この変異株のリジン高生産機構や高温ストレス耐性向上機構の解明を目的とした。

リジン高生産変異株の全ゲノム解析を行った結果、リジンやスレオニンの生合成に関わる aspartate kinase/homoserine dehydrogenase をコードする *thrA* 遺伝子に、Gly474Asp(G474D)および Cys554Tyr(C554Y)のアミノ酸置換を伴う変異を見出した。各 ThrA 変異体 (G474D, C554Y) を発現させた大腸菌では、細胞内のリジン含量が顕著に向上するとともに、リジン高生産変異株と同様に高温条件における生育が有意に改善された。さらに、G474D 変異体の酵素学的解析から、Gly474Asp のアミノ酸置換によりホモセリン合成活性が低下し、基質であるアスパラギンセミアルデヒドが蓄積することでリジンの生合成量が増加したものと考えられた。以上の結果から、リジン生合成系の強化により、大腸菌に高温ストレス耐性が付与されることが明らかになった（本研究の一部は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（ＮＥＤＯ）の委託業務で行われた)。

Lysine (Lys), a nutritionally important essential amino acid, is involved in adaption and tolerance to environmental stresses in various organisms. However, the effect of enhancement of lysine biosynthesis on stress tolerance has yet to be elucidated. In this study, we analyze the mechanism for high production of lysine and enhancement of high-temperature stress tolerance in Lys-overproducing mutants of *Escherichia coli*.

We identified novel mutations with amino acid substitution (Gly474Asp and Cys554Tyr) in the *thrA* gene of Lys-overproducing mutant. The Gly474Asp and Cys554Tyr variants of ThrA induced lysine accumulation and conferred high-temperature stress tolerance on *E. coli* cells. In addition, enzymatic analysis revealed that the Gly474Asp substitution in ThrA reduced HSDH activity. These results demonstrated that the enhancement of lysine biosynthesis improved the high-temperature stress tolerance in *E. coli* cells.

Lysine, Bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase, High-temperature stress tolerance

発表責任者：磯貝 章太（s-isogai@bs.naist.jp）

講演番号：3C06-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

高熱性古細菌 *Pyrococcus abyssi* 由来 *N*-acyl-D-amino 酸加水分解酵素の生化学的特性の解明

Characterization of an *N*-acyl-D-amino acid amidohydrolase form *Pyrococcus abyssi*.

○米田 菜織[1,2]、氷見山 幹基[2]、長澤 壯柄[1,2]、佐々本 康平[2,3]、加塩 健悟[1]、大嶋 真紀[2]、倉田 淳志[1]、中村 努[2]、上垣 浩一[1]（[1]近大院農、[2]産総研、[3]摂南大院理工）
○Naori YONEDA[1,2], Tomoki Himiyama[2], Souhei Nagasawa[1,2], Kohei Sasamoto[2,3], Kengo Kashio[1], Maki Oshima[2], Atsushi Kurata[1], Tsutomu Nakamura[2], Koichi Uegaki[1] ([1]Kindai Univ., [2]AIST., [3]Grad. School Sci. Eng. Setsunan Univ.)

【目的】従来 D アミノ酸は高等生物内に存在しないと考えられていた。しかし統合失調症、美肌効果、旨味成分などの機能が判明し D アミノ酸への注目が高まっている。好熱性古細菌 *Pyrococcus abyssi* 由来の *N*-アセチル- D -アミノアシラーゼ(*Pab_ndaD*)は *N*-アセチル- D -アミノ酸に作用し D -アミノ酸を生産する。また超好熱性古細菌由来のため、耐熱性が優れており長期間の保存にも耐えることができるので、光学分割に利用できる産業用酵素としての可能性を秘めている。本発表では *Pab_ndaD* の構造機能相関解明のため生化学的特徴付けと結晶化を試みたので報告する。

【実験･結果】HIS タグを付加した *Pab_ndaD* を *Escherichia coli* を用いて発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによって *Pab_ndaD* の精製を行った（参考文献１）。基質特異性や至適条件等の活性測定は反応に伴い遊離する酢酸を定量する事で行った。その結果、最適基質は *N*-アセチル- D -メチオニン、至適 pH は 9.0 付近、温度は 90℃以上であり、Zn が活性に必要であった。

参考文献: Nakamura, T., *et al.*, *Application of chromosomal gene insertion into Escherichia coli for expression of recombinant proteins. J. Biosci. Bioeng.*, **126**. 266-272 (2018)

【Purpose】D-amino acids have been attracting attention for their usefulness as therapeutic drugs and foods. The *N*-acyl-D-aminoacylase from *Pyrococcus abyssi* (*Pab_ndaD*) catalyzes the conversion of *N*-acetyl-D-amino acids to D-amino acids and acetic acids. This enzyme have considerable potential for the optical resolution of D-amino acids due to its thermostability and long-term storage. We report the characterization and crystallization of this enzyme.

【Result】The characterization of *Pab_ndaD* was performed using a purified recombinant protein. The activity was examined by the amount of liberated acetic acid by enzymatic reaction. As a result, the most preferable substrate was *N*-acetyl-D-Met and the optimum pH and temperature was around 9.0 and 90℃, respectively. The metal requirement for the activity was investigated using ICP-MS. The result showed that Zn was necessary for the activity. However, excess Zn was inhibited the deacetylase activity that suggested an existence of second Zn binding site which inhibited the enzyme activity.

D-aminoacylase, characterisation, substrate specifity

発表責任者：上垣浩一（k-uegaki@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3C06-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

L-メチオニン脱炭酸酵素の活性中心に存在する Tyr196 残基の機能解析

Functional analysis of the Tyr196 residue in the active site of L-methionine decarboxylase

○大川 敦司[1]、井上 朝晶[2]、尾上 友基[2]、志波 智生[2]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]京工繊大院・応生)
○Atsushi OKAWA[1], Tomoaki INOUE[2], Yuki ONOUE[2], Tomoo SHIBA[2], Michiko NEMOTO[1], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ, [2]Grad. Sch. Sci. and Tech., Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. of Tech.)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素(MetDC)は L-メチオニンの脱炭酸反応を触媒し補酵素としてピリドキサール 5'リン酸(PLP)を有するビタミン B_6 酵素である[1)]。我々は MetDC が L-メチオニン飢餓による抗腫瘍性酵素や L-メチオニン定量用酵素として応用可能であることを明らかにしてきた[2)]。さらに世界で初めて MetDC の X 線結晶構造解析に成功し，活性中心残基を明らかにした[3)]。本研究では活性中心残基であり，活性に重要なループ構造(C-Loop)と連動して動く Tyr196 の機能解析を目的とした。【方法】変異導入は Quick Change 法を用いた。精製には TALON metal affinity を用いて精製を行った。活性測定は反応で生産されるアミンをアミン酸化酵素とペルオキシダーゼを併用し 4-アミノアンチピリンフェノール法による過酸化水素定量により行った。L-メチオニン定量にはフェノールの代わりに新規トリンダー試薬である TOOS と 4-アミノアンチピリンを用いた。【結果及び考察】これまで結晶構造解析の報告があるアミノ酸脱炭酸酵素と MetDC を比較したところ Tyr196 残基に位置する残基は保存性が低かったが，対応する残基が Tyr である酵素群には，活性が高い傾向がみられた。この Tyr 残基が活性の強さに関与している可能性を検討するため， Tyr196 残基を, Phe, Ser 等に変異させた。その結果, Y196F 変異酵素では基質を L-メチオニンとした時の k_{cat} 値が野生型酵素 56.2 s^{-1} に対して 2.7 s^{-1} と 1/20 となり，k_{cat}/K_m が野生型酵素の 1/100 まで低下したのに対し, Y196S 変異酵素は k_{cat} 値が 6.4 s^{-1} となり約 1/9 に低下したが, K_m 値が 0.34 mM まで大きく低下したため k_{cat}/K_m が野生型の約 2 倍となった。このことから Tyr196 残基は反応性と基質親和性に関与していることが示唆された。この基質親和性が向上した MetDC Y196S 変異酵素を用いて L-メチオニン定量を行ったところ，従来の野生型 MetDC を用いた方法と比較して定量に必要な時間が短縮し，定量限界濃度が TOOS を用いたことで 1 μM まで低下した。これにより，従来の方法では難しかった正常値の血中 L-メチオニン濃度が定量可能となった。現在, Tyr196 と C-Loop の開閉や K_m 値の変化について結晶構造解析などによって詳しく解析している。

L-methionine decarboxylase (MetDC) from *Streptomyces* sp.590 catalyzes decarboxylation of L-methionine[1)]. We succeeded in X-ray crystallographic analysis of MetDC and clarified the active site residue. In this study, we focused on Tyr196 residue, and analyzed its function. The activities of the Y196F, S mutants were decreased, whereas MetDC Y196S mutant resulted in a decrease in K_m value. We investigated the determination of L-methionine using the MetDC Tyr196S mutant, that was produced during functional analysis. When the MetDC Y196S mutant was used for L-methionine determination, the reaction time and quantification rage were improved in determination of L-methionine using Y196S mutant as compared to using wild-type MetDC.

1) Hayashi *et.al.*, *J. Biochem.*, **161**, 389 (2017), 2) Okawa *et.al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 927 (2020),
3) Okawa *et.al.*, *Protein Sci.* **30**, 663 (2021)

Pyridoxal-5'-phosphate, L-methionine decarboxylase, L-methionine determination

発表責任者：大川敦司（pn2b9nr4@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C06-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

Grimontia hollisae コラゲナーゼの立体構造解析

Structural analysis of collagenase from *Grimontia hollisae*

○安本 瑞貴[1]、池内 健晃[1]、滝田 禎亮[1]、水谷 公彦[1]、三上 文三[2,3]、田中 啓友[4]、服部 俊治[4]、保川 清[1] ([1]京大院農、[2]京大生存研、[3]京大エネ研、[4]株式会社ニッピバイオマトリクス研究所)
○Mizuki Yasumoto[1], Takeaki Ikeuchi[1], Teisuke Takita[1], Kimihiko Mizutani[1], Bunzo Mikami[2,3], Keisuke Tanaka[4], Shunji Hattori[4], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Inst. for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ., [3]Inst. Advanced Energy, Kyoto Univ., [4]Nippi Research Institute of Biomatrix）)

【目的】*Grimontia*（*Vibrio*）*hollisae* 1706B のコラゲナーゼ（Ghcol）は、高い活性と安定性を有し、細胞分散剤として使用されており、用途拡大が期待されている [1)]。本酵素は亜鉛結合モチーフ $H^{492}EYVH^{496}$ をもつ。我々は活性の pH、温度依存性から酸性側の活性解離基は E493 と推定した。一方、塩基性側は Tyr と考えられたが不明であった [2)]。さらに、変異体の解析により、Y568 が触媒活性に重要であることを示した [3)]。本研究では Ghcol の触媒機構を調べるために、X 線結晶構造解析を行った。
【方法】1. Ghcol の調製：Ghcol（Ala88-Thr646）を *Brevibacillus* で発現させ、培養上清から硫安分画と陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。2. X 線結晶構造解析：結晶化は蒸気拡散法にて行った。回折データは大型放射光施設 SPring-8 で収集した。この回折データとタンパク質構造予測プログラム AlphaFold2 で得たモデル構造を用いて分子置換を行った。モデルの修正は COOT を使い、PHENIX を用いて 2.3Å分解能で構造の精密化を行った。
【結果と考察】Ghcol は *Clostridium* 属コラゲナーゼと同様に、活性化ドメインとペプチダーゼドメインから成り、両ドメインはαヘリックスを多く含んだ。活性部位には金属亜鉛と 3 個のチロシン残基（Y476、Y555、Y564）が存在した。現在、Y476A, Y555A, Y564A の変異体の解析を行っている。
【文献】 1. N. Teramura et al. (2010) J. Bacteriol. 193, 3049-305; 2. T. Takita et al. (2018) J. Biochem. 163, 425-431; 3. K. Hayashi et al. (2020) J. Biochem. 168, 385-392

[Purpose] Collagenase from the *Grimontia hollisae* strain 1706B (Ghcol) is a highly active and stable zinc metalloproteinase with the zinc-binding motif $H^{492}EXXH^{496}$. [1)] We previously examined the pH and temperature dependencies of Ghcol activity; E493 was thought to contribute acidic pK_a, while no residue was assigned to contribute alkaline pK_a. [2)] We analyzed the variants and found that Y568 is involved in catalytic activity. Here, we made crystallographic analysis.
[Methods] 1. Ghcol preparation: Ghcols were expressed in *Brevibacillus* and purified from the supernatant. 2. Crystallographic analysis: Diffraction data were collected using synchrotron radiation on beamlines BL26B1 at Spring-8, Hyogo, Japan,
[Results and Discussion] Crystallographic analysis revealed that Ghcol consists of the activate domain and peptidase domain and that a zinc ion and three Tyr residues (Y476, Y555, Y564) are located in the active site. Characterization of Y476A, Y555A, Y564A is currently underway.
[References] 1. N. Teramura et al. (2010) J. Bacteriol. 193, 3049-305; 2. T. Takita et al. (2018) J. Biochem. 163, 425-431; 3. K. Hayashi et al. (2020) J. Biochem. 168, 385-392

Collagenase, Crystallographic analysis, *Grimontia hollisae*

発表責任者：安本瑞貴（yasumoto.mizuki.56s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C06-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

エカルディーグティエール症候群の患者で同定された変異をもつリボヌクレアーゼ H2 を発現する動物細胞の性状解析

Characterization of mammalian cells expressing ribonuclease H2 with a mutation identified in the patients with Aicardi-Goutières syndrome

○原 晴佳[1]、神田橋 眞子[1]、鴨田 佳奈[2]、矢野 晴菜[2]、小川 紗央里[1]、姫田 康平[1]、馬場 美聡[1]、滝田 禎亮[1,2]、保川 清[1,2] ([1]京大院・農、[2]京大・農)
○ Haruka Hara[1], Mako Kandabashi[1], Kana Kamoda[2], Haruna Yano[2], Saori Ogawa[1], Kohei Himeda[1], Misato Baba[1], Teisuke Takita[1,2], Kiyoshi Yasukawa[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】リボヌクレアーゼ H2（RNase H2）は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA を加水分解する酵素で、真核生物では 3 つのサブユニット（A、B、C）からなる。RNase H2 はゲノム DNA に取り込まれたリボヌクレオチド（R）の除去に関与し、本酵素の遺伝性変異は神経疾患エカルディーグティエール症候群（AGS）を引き起こす。我々は AGS 患者で同定された変異をもつ組換え RNase H2 の活性と安定性を解析した[1)]。本研究では、本変異をもつ RNase H2 を発現させた動物細胞の性状解析を行った。
【方法と結果】1. A のノックアウト（KO）と発現：我々が以前樹立した A が KO されたマウス線維芽細胞 NIH3T3[2)] に A の変異体 G37S、N213I、R293H を一過性に発現させた。G37S を発現させた細胞の抽出液は 1 塩基の R を含む 12 bp の二本鎖 DNA を切断しなかった。N213I または R293H を発現させた細胞の抽出液はこれを切断した。このことから、A に変異 N213I、R293H をもつ RNase H2 は細胞内では活性を有するが、AGS を引き起こす変異であることから、ゲノム中の R の除去には関与しない可能性が示唆された。2. C の KO と発現：同様の解析を行うため、C が KO された NIH3T3 とヒト胎児腎細胞 HEK293 の樹立を現在行っている。
【文献】1. Nishimura T. et al. (2019) J. Biochem. 166, 537-545
2. Tsukiashi M. et al. (2019) J. Biochem. 165, 249-256

[Purpose] Ribonuclease H2 (RNase H2) hydrolyzes the RNA of RNA/DNA hybrid. Eukaryotic RNase H2 is a trimer consisting of three different subunits (A, B, and C). RNase H2 is involved in the removal of ribonucleotides (R) embedded in genomic DNA. In human, the mutation of RNase H2 gene causes a neuroinflammatory disorder Aicardi-Goutières syndrome (AGS). We previously characterized recombinant RNase H2 variants with an AGS-causing mutation.[1)] Here, we characterized mammalian cells in which these variants were expressed.
[Method and Results] The transient expression of A subunit variant G37S in the A-subunit knockout mouse NIH3T3 cells[2)] did not exhibit the RNase H2 activity in the cellular extract. The transient expression of A subunit variant N213I or R293H exhibited the activity.
[References] 1. Nishimura T. et al. (2019) J. Biochem. 166, 537-545
2. Tsukiashi M. et al. (2019) J. Biochem. 165, 249-256

RNase H2, NIH3T3, genomic DNA

発表責任者：原 晴佳（hara.haruka.23a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C06-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼとそのホモログの結晶構造解析による触媒機構と機能分化様式の解析

Catalytic mechanism and functional differentiation revealed by crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from *Thermus thermophilus* and the homolog

○富田 武郎[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大院農生科・アグテック、[2]東大・微生物連携機構)
○Takeo Tomita[1,2], Makoto Nishiyama[1,2] ([1]AgTech, The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ APRT はプリンサルベージ経路の酵素で、アデニンと PRPP を連結し、AMP とピロリン酸を生成する反応を触媒する。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のゲノム上には APRT とアノテーションされた遺伝子が 2 つ並んで存在している。我々のこれまでの研究から、上流側の TTC1250 がコードする酵素が真の APRT であること、下流側の TTC1249 は APRT 活性は持たず、グルタミン酸脱水素 GDH と相互作用することで、AMP 結合のアロステリックシグナルを伝達し GDH の活性制御を担うことが明らかになり、TTC1249 は APRTh と名付けられた。*T. thermophilus* 由来の TtAPRT と TtAPRTh は 41%と比較的高いアミノ酸配列相同性を有しており、その機能分化の分子機構に興味が持たれた。また、TtAPRT は他の生物由来の APRT で高度に保存されている触媒に必須な Glu 残基がアミノ酸置換を受けており、その触媒機構についても興味が持たれた。そこで本研究では TtAPRT・アデニン複合体および TtAPRT(E159L)/PRPP/Mg^{2+}複合体、TtAPRTh の結晶構造解析を行い、その解明を目指した。その結果、他の生物由来の APRT が持っていない Glu159 が TtAPRT の触媒活性に必須であることが明らかになった。また、TtAPRTh は TtAPRT とよく似た立体構造であったが活性中心様ポケットにおいて 159 番残基は Gln に置換を受けており、これが触媒活性を持たない主要因であることが明らかとなった。その一方で AMP 結合に関わるアミノ酸残基の多くは保存されていたことからこのポケットに AMP が結合するものと考えられる。

Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) is an enzyme involved in the purine salvage pathway that catalyzes the reaction to produce AMP and pyrophosphate from adenine and PRPP. The genes annotated as APRT exist side by side in the genome of Thermus thermophilus. Based on our previous studies, the enzyme encoded by TTC1250 is the true APRT, while TTC1249, which was named APRTh, does not show catalytic activity but interact with glutamate dehydrogenase (GDH), and senses AMP as an allosteric signal, and regulates GDH activity. Here, we performed crystal structure analysis to elucidate the catalytic mechanism of TtAPRT and the molecular basis of functional differentiation between TtAPRT and TtAPRTh. From the results, we elucidated that an unique Glu159 residue of APRT plays key role in the catalytic mechanism. TtAPRTh possesses very similar overall structure but undergoes several substitutions in the active site-like pocket, suggesting that AMP is recognized with this pocket.

adenine phosphoribosyltransferase, Thermus thermophilus, crystal structure

発表責任者：富田　武郎（uttomi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C06-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

活性型組換えヒトチロシナーゼの調製とその酵素学的性質の解明

Preparation of active recombinant human tyrosinase and elucidation of its enzymatic properties

○柴田 陽樹[1]、矢内 あすか[2]、田中 孝明[1,2]、谷口 正之[3]、落合 秋人[1,2]（[1]新潟大院自然科学研究科、[2]新潟大工、[3]新潟青陵大人間総合学科）
○Haruki SHIBATA[1], Asuka YANAI[2], Takaaki TANAKA[1,2], Masayuki TANIGUCHI[3], Akihito OCHIAI[1,2] ([1]graduate school of Niigata Univ., [2]Niigata Univ., [3]Niigata Seiryo Univ.)

チロシナーゼはメラニン合成における律速酵素である。近年、チロシナーゼ阻害剤が黒皮症などの皮膚疾患の治療薬候補として注目されており、その研究が盛んに行われている。一方で、組換えヒトチロシナーゼの大量生産は未だに困難であるため、阻害剤の試験標的には一般的にマッシュルームチロシナーゼが代用される。そこで本研究では、ヒト胎児腎細胞の発現系を用いた組換えヒトチロシナーゼ(rHsTyr)の大量生産と精製、およびその特性の解明を目的とする。

これまでの研究において、ヒト胎児腎細胞の発現系を用いて活性型 rHsTyr の発現系を構築した。本研究では、まず発現および精製条件を検討することにより、240 mL の細胞培養液から約 8 mg の精製 rHsTyr を得た。次に、得られた rHsTyr に対して L-Dopa を基質とするジフェノラーゼ活性測定を行い、最適 pH、最適温度、および熱安定性などの諸性質を決定し、さらに反応速度論解析を行った。また、過去に当研究室で見出したマッシュルームチロシナーゼ阻害剤 CT-2 [1)]と TH10 [2)]の rHsTyr に対する阻害効果を検証した。

Tyrosinase is the rate-limiting enzyme in melanin synthesis. In recent years, tyrosinase inhibitors have attracted attention as potential therapeutic agents for skin diseases such as melasma, and their research has been actively conducted. On the other hand, since it is still difficult to overexpress recombinant human tyrosinase (rHsTyr), mushroom tyrosinase is generally used as a test target for inhibitors. In the current study, we aim to construct overexpression system for rHsTyr using human fetal kidney cells and characterize it.

In our previous study, an expression system of active rHsTyr using human fetal kidney cells has been constructed. In this study, about 8 mg of purified rHsTyr was obtained from 240 mL of cell culture by adjusting the expression and purification conditions. Next, various enzyme properties such as optimum pH and temperature, and thermal stability were investigated by measuring the diphenolase activity of the obtained rHsTyr using L-Dopa as a substrate. Subsequent kinetics analysis was also performed. Furthermore, we verified the inhibitory effects of the mushroom tyrosinase inhibitors CT-2 [1)] and TH10 [2)] found in our laboratory against rHsTyr.

1) Ochiai A. et al., Journal of Bioscience and Biotechnology 121 (2016) 607-613
2) Ochiai A. et al., Journal of Natural Products 79 (2016) 2545-2551

human tyrosinase, tyrosinase inhibitory peptide, kinetics

発表責任者：柴田陽樹（f21b013a@mail.cc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3C06-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム C

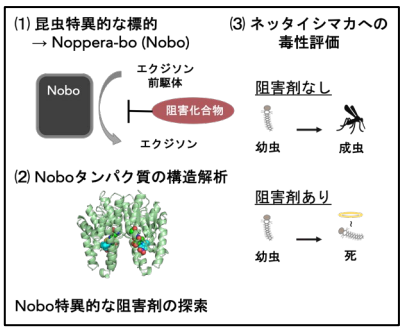
ネッタイシマカの脱皮ホルモン生合成経路を標的とした新規殺虫剤の研究

Novel Insecticides Targeting the Molting Hormone Biosynthetic Pathway in Aedes aegypti

○海老原 佳奈[1]、稲葉 和恵[1]、小祝 孝太郎[2]、髙谷 大輔[3]、渡邉 千鶴[3]、安孫子 ユミ[1]、今村 理世[4]、岡部 隆義[4]、小島 宏建[4]、佐久間 知佐子[5]、嘉糠 洋陸[5]、藤川 雄太[6]、井上 英史[6]、本間 光貴[3]、千田 俊哉[2]、丹羽 隆介[1] ([1]筑波大学、[2]高エネルギー加速器研究機構、[3]理化学研究所、[4]東京大学創薬機構、[5]東京慈恵会医科大学、[6]東京薬科大学)

○Kana EBIHARA[1], Kazue INABA[1], Kotaro KOIWAI[2], Daisuke TAKAYA[3], Chiduru WATANABE[3], Yumi ABIKO[1], Riyo IMAMURA[4], Takayoshi OKABE[4], Hirotatsu KOJIMA[4], Chisako SAKUMA[5], Hirotaka KANUKA[5], Yuuta FUJIKAWA[6], Hideshi INOUE[6], Teruki HONMA[3], Toshiya SENDA[2], Ryusuke NIWA[1] ([1]University of Tsukuba, [2]High Energy Accelerator Research Organization KEK, [3]RIKEN, [4]University of Tokyo, Drug Discovery Initiative, [5]The Jikei University School of Medicine, [6]Tokyo University of Pharmacy and Life sciences)

本研究は、感染症を媒介する蚊（ネッタイシマカ）に選択的に作用する新規殺虫剤開発を目指す。蚊が媒介する感染症による死者は年間 70 万人にものぼる[1]。そのため、蚊を適切に駆除することは世界的に重要な課題である。黄熱やデング熱、そしてジカ熱などの重篤な感染症を媒介するネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）に対し、現在、有効な殺虫剤がある。しかし、これらの既存殺虫剤に対して抵抗性を示すネッタイシマカの出現が確認されている[2]。したがって、既存薬剤とは化学構造や標的が異なる、新規殺虫剤の開発が強く望まれている。



この問題を解決するために我々は、昆虫の発生・成長に必須のエクジソン生合成に着目し、ネッタイシマカにおけるこの過程を阻害する薬剤の同定を目指している。エクジソンは、ネッタイシマカを含む節足動物の発育には必須だが、人などを含むそれ以外の生物では機能しない。昆虫でエクジソン生合成に関わる必須酵素は複数あるが、中でもグルタチオン S 転移酵素に属する Noppera-bo (Nobo)[3,4] に注目している。Nobo は、進化的に蚊を含むハエ目昆虫とチョウ目昆虫のみに保存されているため、選択的殺虫剤のターゲットとして期待できる。現在までに我々は、ショウジョウバエ Nobo の阻害剤と作用機序解析で成果を挙げた[5,6,7]。今回の発表では、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* の Nobo の活性を抑制する化合物の阻害剤探索の成果を報告する。

Our goal is to develop insecticides that act on mosquitoes. Mosquitoes kill as many as 700,000 people a year from infectious diseases. Thus, the mosquito control has become an important issue worldwide. There are effective insecticides against the mosquitoes *Aedes aegypti*, which transmit serious infectious diseases such as yellow fever, dengue fever, and Zika fever. However, the mosquitoes show the resistance to these insecticides has already existed. Therefore, we need to develop new insecticides that have chemical structures and different targets, unlike the existing insecticides.

To solve this problem, we focused on ecdysone biosynthesis and tried identifying compounds that inhibit this process in *A. aegypti*. Ecdysone is essential for the development of insects but does not function in other organisms. There are some essential enzymes involved in ecdysone biosynthesis. We especially focus on the glutathione *S*-transferase Noppera-bo (Nobo). As Nobo is conserved only in Diptera and Lepidoptera, it can make a good inhibitor target for specific species. Here, we conducted to characterize the chemical structure of *A. aegypti* Nobo inhibitors and to test the insecticidal activity.

参考文献:[1] World Health Organization and UNICEF (2017) Global Vector Control Response 2017–2030, WHO and UNICEF. [2] Moyes et al. (2017) *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:1-20. [3] Enya et al. (2014) *Sci. Rep.* 4:6586. [4] Enya et al. (2015) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61:1-7. [5] Fujikawa et al. (2015) *Chem. Commun.* 51:11459-11462. [6] Koiwai et al. (2020) *J. Biol. Chem.* 295:7154-7167. [7] Koiwai et al. (2021) *J. Pestic. Sci.* 46:75-87.

X-ray crystal structure analysis, Aedes aegypti, Glutathione S-transferase

発表責任者：海老原佳奈（5315010e@gmail.com）

講演番号：3C08-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

ドリコール生合成に寄与する *cis* 型プレニルトランスフェラーゼのリン酸化修飾による活性制御

Phosphorylation-mediated regulation of eukaryotic *cis*-prenyltransferases contributing to dolichol biosynthesis

○高橋 朋宏、山家 史大、酒井 勇貴、皆川 知歩、和氣 駿之、中山 亨、高橋 征司 (東北大院・工)
○Tomohiro TAKAHASHI, Fumihiro YANBE, Yuki SAKAI, Chiho MINAKAWA, Toshiyuki WAKI, Toru NAKAYAMA, Seiji TAKAHASHI (Tohoku Univ.)

ドリコールは小胞体膜における糖鎖合成に必須な担体脂質であり，その基本骨格は，*cis* 型プレニルトランスフェラーゼ （cPT） によるイソペンテニル二リン酸の重合反応により生成される．真核生物では，触媒残基を持たない cPT 様タンパク質（cPTL）との相互作用が cPT の活性発現に重要であることが報告されている．一方，ドリコールレベルの調節に関わる cPT の活性制御機構は未解明の点が多い．リン酸化プロテオミクスデータより，ヒト cPT (HDS)は一部の残基がリン酸化されていることが示されたが，修飾残基の一部は，cPTL と相互作用する cPT で高度に保存されているため，リン酸化による活性制御機構の存在が示唆された．本研究では，ドリコール合成の制御機構の包括的な解明を目的として，シロイヌナズナおよびヒト由来 cPT のリン酸化による活性への影響を解析した．まず，HDS においてリン酸化が検出された Ser/Thr 残基を Asp に置換した擬似リン酸化体を作製したところ，複数のリン酸化残基のうち，一つの残基の Asp 置換で活性が著しく低下した．また，シロイヌナズナの cPT についても，対応残基の Asp 置換による活性低下が見出された．さらに，ヒトおよびシロイヌナズナの各 cPT は，同じファミリーに属するリン酸化酵素と相互作用することが示されたことから，真核生物間で保存されたドリコール生合成制御機構の存在が示唆された．

Dolichol is an essential lipid for N-glycosylation, and its basic skeleton is produced via sequential condensation reaction of isopentenyl diphosphate with *cis*-prenyltransferase (cPT). In eukaryotes, cPT-like protein (cPTL) that interacts with cPT is important for the functional expression of the cPT activity. However, precise regulation mechanism for the cPT activity to regulate the dolichol levels is still unclear. Phosphoproteomics has revealed that some residues of a cPT from *Homo sapiens* (HDS) are phosphorylated. These modified residues are conserved among eukaryotic cPTs that interact with cPTL, suggesting existence of a conserved regulation mechanism of the cPT activity via phosphorylation. In this study, we investigated effects of modifications of HDS and cPTs from *Arabidopsis thaliana* (AtcPT) that interact with cPTL. At first, we substituted Ser and Thr residues of HDS, shown to be phosphorylated, with Asp, and found that the phosphor-mimic substitution of one residue caused a marked decrease in the activity. Interestingly, the Asp substitution of a residue at the corresponding position in AtcPTs also caused a decrease in the cPT activity. Furthermore, kinases that interact with HDS and AtcPTs, respectively, belong to the same enzyme family. These results suggest that phosphorylation of cPT might be involved in the regulation of the dolichol biosynthesis.

cis-prenyltransferases, dolichol, isoprenoid

講演番号：3C08-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

Caenibacillus caldisaponilyticus B157^T 株由来の組換えホスホリパーゼ A (rPlaA) の諸性質解析と触媒残基の同定

Molecular characterization of recombinant phospholipase A from *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T

○木村 風香、辻本 善之、渡部 邦彦（京府大院・生命環境）
○Soyoka KIMURA, Yoshiyuki TSUJIMOTO, Kunihiko WATANABE (Kyoto Pref. Univ.)

ホスホリパーゼ A (PLA) はリン脂質を加水分解する酵素で、油脂の精製やリゾリン脂質の製造等で産業利用される。しかし、既存の PLA は宗教的問題や病原性、大量調製の困難さから代替酵素が求められている。我々は、新規 PLA (PlaA) を産生する好熱性細菌 *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株を単離した。PlaA は C 末端側に pro 配列を持つ不活性型 (PlaA-Cpro) として分泌され、細胞外で活性型へとプロセシングされる。また、PlaA は一次構造中に触媒残基 Ser を含む典型的なリパーゼモチーフ GxSxG に似た AxSxG 配列を持つ。そこで本研究では、rPlaA の諸性質解析と触媒残基の同定を試みた。

我々は、大腸菌で発現させた rPlaA-Cpro を精製し、Proteinase K で処理後、TOYOPEARL Butyl-650S 疎水性クロマトグラフィーに供することで、組み換え PlaA (rPlaA) の大量精製に成功した。rPlaA は、基質として卵黄ホスファチジルコリンを用いた活性測定で、60℃ (1 h) まで安定で 50-75℃ で高い活性を示し、pH 2-12 (24 h) の広範囲で安定で pH 6-11 で高い活性を示すことを明らかにした。次に、セリン残基修飾剤を用いて活性測定を行った。その結果、プロテアーゼ阻害剤 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) では活性は変化しなかったが、リパーゼ阻害剤 Orlistat と哺乳類 PLA 阻害剤 methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) では活性が阻害された。また、モチーフ中の触媒残基 Ser を置換した変異体では活性が見られなかった。我々は、さらにモチーフ中の Ala 残基に注目し、作製した変異体を用いて活性への影響を調査中である。

PLA hydrolyses phospholipids and is used in industry for oil purification and lyzophospholipid production. It is important to find alternative PLAs, because the use of commercially available PLAs is limited due to their pathogenesis and the difficulty of large-scale preparation. We isolated a novel PLA (PlaA) from a thermophilic bacterium, *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T. The PlaA is secreted as an inactive form with C-terminal propeptide (PlaA-Cpro) and processed to active form. The sequence AxSxG is similar to a typical lipase motif, including the catalytic residue Ser, GxSxG. In this study, we try to identify the catalytic residue by use of rPlaA.

The PlaA-Cpro was expressed in *E. coli* and processed by Proteinase K. The resultant active form was purified with a hydrophobic column chromatography. We revealed that rPlaA was stable and highly active at wide ranges of temperatures and pHs. Then, we measured the effect of inhibitors (PMSF, Orlistat, and MAFP), specific Ser residue, on the activity of rPlaA and detected the inhibitions by Orlistat and MAFP. In addition, the mutant replacing Ser in the motif with Ala showed no activity. We are also focusing on the Ala in the motif and researching the effect on the activity of rPlaA with the mutant replacing the Ala with Gly.

phospholipase, phospholipid

講演番号：3C08-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

放線菌 Amycolatopsis sp. NT-119 株由来酸性リン脂質特異的ホスホリパーゼの精製と諸特性解析

Purification and property analysis of an acidic phospholipid-specific phospholipase A2 from Amycolatopsis sp. NT-119

○渡辺 修平、板倉 海統、杉森 大助（福島大）
○SHUHEI WATANABE, KAITO ITAKURA, DAISUKE SUGIMORI (Fukushima Univ.)

【背景・目的】ホスホリパーゼ A_2（PLA_2, EC 3.1.1.4）はグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合の加水分解を触媒する酵素であり、細胞内シグナル伝達など様々な生理作用に関与している。既知 PLA_2 はホスファチジルエタノールアミン（PE）やホスファチジルコリン（PC）に作用する酵素が多いことが知られている。本研究ではカルジオリピン（CL）特異的ホスホリパーゼを放線菌から探索した結果、*Amycolatopsis sp*. NT-119 株の培養上澄液から酸性リン脂質（AcPL）に特異性を示す PLA_2（AcPL-PLA_2）を見出した。本発表では、AcPL-PLA_2 の精製と諸特性解析について報告する。

【方法・結果と考察】NT-119 株の培養上澄液から陰イオン交換、疎水性相互作用、パルミトイルセルロースアフィニティークロマトグラフィーを用いることで電気泳動的に単一となるまで目的酵素 AcPL-PLA_2 を精製した。本酵素は分子質量 32 kDa のポリペプチド鎖からなる酵素であり、pH 6.0, 60℃で最大活性を示した。基質特異性試験の結果、ホスファチジン酸（PA）に対する活性が最も高く、CL とホスファチジルグリセロールに対する相対活性は約 70%、ホスファチジルセリンに対して約 30%、PC、PE、ホスファチジルイノシトールに対して 20%以下であった。この結果から、NT-119 株由来 PLA_2 は AcPL に対する特異性が高い酵素であることが明らかとなった。また、AcPL-PLA_2 は 1 mM EDTA 存在下でも活性が低下しなかったことから、金属非要求性 PLA_2 であると考えられる。また、様々な金属イオンの存在下で基質特異性が大きく変化し、特に Ni^{2+}存在下では PA と PS に対する活性のみ約 30%低下した。以上のような特性を示す PLA_2 の報告例はないことから、本酵素は新規 PLA_2 と結論づけた。

【Summary】A novel acidic phospholipid-specific phospholipase A_2 (AcPL-PLA_2) has been found in the culture supernatant of an actinomycete, *Amycolatopsis sp*. NT-119. The molecular mass of AcPL-PLA_2 was estimated by SDS-PAGE analysis as 32 kDa. The maximum activity of AcPL-PLA_2 was found at pH 6.0 and 60°C. AcPL-PLA_2 preferred AcPLs: phosphatidic acid (PA, 100%), phosphatidylglycerol and cardiolipin (~70%), phosphatidylserine (PS, ~30%), phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol (<20%). Since the activity showed no decrease even in the presence of 1 mM EDTA, we concluded AcPL-PLA_2 would be metal ion-independent PLA_2. The substrate specificity changed remarkably in the presence of metal ions. Especially, the activities toward PA and PS decreased by ~30% in the presence of 1 mM Ni^{2+}.

Acidic phospholipids, Phospholipase A2, Purification and characterization

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：3C08-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

異種組換え発現ホスファチジルグリセロール特異的ホスホリパーゼ C の諸特性解析

Characterization of Heterologous Recombinantly Expressed Phosphatidylglycerol-Specific Phospholipase C

○川嶋 俊輔[1]、梶山 聖人[2]、松本 悠歩[1]、松井 萌[2]、杉森 大助[1,2]([1]福島大学、[2]福島大学大学院)
○ Shunsuke Kawashima[1], Kiyoto Kajiyama[2], Yuho Matumoto[1], Megumi Matui[2], Daisuke Sugimori[1,2] ([1]Fukushima Univ., [2]Fukushima Graduate school)

近年,ミトコンドリアの質が老化や疾患に関与することがわかりはじめ,ミトコンドリア内膜に局在するホスファチジルグリセロール (PG) が関係することが報告されている.そのため,PG を簡便かつ選択的に定量する酵素法の開発が期待されている.我々は,これまでに放線菌 *Amycolatopsis* sp. NT115 が分泌生産する PG 特異的ホスホリパーゼ C (PG-PLC) を見出し、その異種組換え発現検討と機能解析をすすめてきた.本発表では放線菌発現系 *Streptomyces lividans*/pUC702 を用いて PG-PLC を分泌発現させ,His タグ精製した酵素 (rPG-PLC) の諸特性解析の結果を報告する.rPG-PLC は pH 6.5,55℃で最大活性を示した. rPG-PLC の基質特異性は WT と同様にパルミトイルオレオイル PG 以外のリン脂質には作用せず,リゾ PG やアシル鎖が異なるジパルミトイル PG にも作用しなかった.このことから本酵素は基質ヘッドグループだけでなくアシル鎖も認識すると考えられる.また,1 mM Mn^{2+}あるいは 0.1% デオキシコール酸 Na 添加でいずれも 2.5 倍活性が向上した.さらに,N 末欠失体 (Δ220 aa) は WT と比較し 10 倍活性が増加したが、安定性が顕著に低下した.

It has been reported that the quality of mitochondria would be involved in aging and diseases, and that phosphatidylglycerol (PG) localized in the inner mitochondrial membrane is deeply involved in them. Thus, the development of a simple enzymatic method for PG determination has been strongly anticipated. We have found a PG-specific phospholipase C (PG-PLC) secreted by an actinomycete, *Amycolatopsis* sp. NT115, and investigated its heterologous recombinant expression and characterization. In this presentation, we will report properties of recombinant PG-PLC (rPG-PLC) extracellularly produced by *Streptomyces lividans*/pUC702 with His-tag purification. rPG-PLC showed maximum activity at pH 6.5 and 55° C.rPG-PLC did not act on phospholipids other than *sn*-1-palmitoyol-2-oleoylPG, nor on lysoPG or dipalmitoylPG with different acyl chains,suggesting PG-PLC probably recognize not only the substrate headgroup but also the acyl chain. The activity of rPG-PLC was enhanced 2.5-fold in the presence of 1 mM Mn^{2+} and by the addition of 0.1% sodium deoxycholate, respectively. In addition, N-terminal deletion mutant (Δ220 aa) exhibited 10-fold higher activity than full-length enzyme; however, the stability was markedly decreased.

Phospholipase C, Phosphatidylglycerol, Characterization

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：3C08-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

パラゴムノキの天然ゴム生合成酵素複合体におけるタンパク質間相互作用ドメインとその機能的意義の解析

Identification and functional analysis of interaction domains of rubber transferase protein complex from Hevea brasiliensis

○Nadia NUR SHAZANA BINTI ABU TALIB KHAN[1]、廣森 美樹[1]、和氣 駿之[1]、山下 哲[2]、戸澤 譲[3]、山口 晴彦[4]、宮城 ゆき乃[4]、中山 亨[1]、高橋 征司[1]([1]東北大院、[2]金沢大院・自然科学、[3]埼玉大院・理工、[4]住友ゴム工業（株））
○NUR SHAZANA BINTI ABU TALIB KHAN Nadia[1], MIKI HIROMORI[1], TOSHIYUKI WAKI[1], SATOSHI YAMASHITA[2], YUZURU TOZAWA[3], HARUHIKO YAMAGUCHI[4], YUKINO MIYAGI[4], TORU NAKAYAMA[1], SEIJI TAKAHASHI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Natural Sci. Tech., Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., [4]Sumitomo Rubber Ind., Ltd.)

パラゴムノキ由来の天然ゴム（NR）は分子量 10^6 を超えるポリイソプレノイドであり，タイヤ製造などに必須な天然材料として，現在その工業的な需要が増加している．遺伝子工学的手法による NR 高生産のためにはその生合成機構の解明が必要であるが，未だに未解明の点が残されている．NR 合成はラテックス内のゴム粒子上で進行するが，これまでの研究で，ゴム粒子膜上の *cis*-prenyltransferase (cPT)である HRT1 が NR 生合成酵素の本体であること，そして，cPT-like protein (cPTL)ファミリーである HRBP と相互作用していることが明らかにされた. 一般に, 真核生物の小胞体膜上では cPT- cPTL 複合体が必須ポリイソプレノイドであるドリコール（~C_{100}）の基本骨格を合成している．パラゴムノキには HRT1 を含め 5 つの cPT が存在するが，唯一の cPTL である HRBP は全ての cPT と相互作用するため，NR 合成だけでなくドリコール合成への寄与も想定されている．しかし，生成物サイズや細胞内局在性が異なる cPT と HRBP との相互作用の様式や酵素機能における意義の詳細は不明であった．そこで本研究では，ドリコール生合成関連 cPT である HbCPT5 と HRT1 について，HRBP との相互作用部位を比較解析した．その結果，HRT1 の N 末端側領域は HRBP と相互作用する一方，C 末端側領域はそれを抑制すること，また，HbCPT5 の N 末端側領域も HRBP と相互作用するが，C 末端側領域はそれを安定化させることが分かった．本発表では，それらの領域が酵素活性，生成物鎖長に与える影響も併せて考察する．

Natural rubber (NR) derived from latex of *Hevea brasiliensis* is an essential polyisoprenoid for manufacturing rubber products such as tires, leading to high industrial demand for NR. Metabolic engineering for enhanced NR production in plants are needed to meet these demands. For this purpose, it is necessary to elucidate the NR biosynthetic mechanism. In our previous studies, HRT1, a *cis*-prenyltransferase on rubber particles (RPs), has been shown to be the critical enzyme for the NR biosynthesis, and interact with HRBP, a cPT-like protein (cPTL) family. In eukaryote, cPT-cPTL protein complexes on the endoplasmic reticulum play an indispensable role in synthesizing the basic backbone of essential polyisoprenoids, dolichols (~C_{100}). HRBP also interacts with other cPTs not expressed in latex, suggesting that HRBP may also function in the dolichol biosynthesis. To understand precise roles of HRBP that interacts with different cPTs in the syntheses of NR and dolichols, we performed comparative analyses of cPT-cPTL complexes, HRBP-HRT1 and HRBP-HbCPT5, a cPT predicted to be participate in the dolichol biosynthesis in *H. brasiliensis.*

Natural rubber, Cis-prenyltransferase, Polyisoprenoid

講演番号：3C08-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

リパーゼ超誘導発現システムの機構解明

Elucidation of the mechanism of lipase superinduced expression system

○桂木 脩[1]、工藤 悠紀野[1]、立野 光[1]、伊藤 春陽[1]、大塚 拓[1]、神田 有希[1]、齋藤 彩[1]、堀越 愛[1]、井上 香織[1]、赤沼 元気[2]、牛尾 一利[3]、石塚 盛雄[1] ([1]中央大・理工・応化、[2]学習院大・理・化学、[3]新居浜高専・生物応化)

○Shu KATSURAGI[1], Yukino KUDO[1], Hikaru TACHINO[1], Haruhi ITO[1], Taku OTSUKA[1], Yuki KANDA[1], Aya SAITO[1], Mana HORIKOSHI[1], Kaori INOUE[1], Genki AKANUMA[2], Kazutoshi USHIO[3], Morio ISHIZUKA[1] ([1]Department of Applied Chemistry, Chuo University, [2]Department of Life Science, Gakushuin University, [3]Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Niihama National College)

グラム陰性好気性真性細菌 *Ralstonia* sp. NT-80 は、誘導剤を添加する事でリパーゼを生産する。当研究室では、一般的な誘導剤である olive oil を添加した時に比べ、高級アルコールの stearyl alcohol(StOH)を添加すると約 17 倍のリパーゼが生産されることが見出された。本システムには、NT-80_0820 タンパク質が亜鉛依存的アルコール脱水素酵素(ADH)と高相同性で、StOH の代謝及びリパーゼの生産に関与している可能性があると示唆された。そこで、野生株(NT-80)から *0820* 遺伝子を欠損した破壊株(NT-80 Δ*0820*)を作製したほか、破壊株に再度 *0820* 遺伝子を相補させた相補株(NT-80 Δ*0820* ::*0820*)を作製した。3 つの菌株におけるリパーゼ活性測定の結果、破壊株は他 2 つの菌株と比べて大きく差が見られた。また、相補株は野生株レベルに活性が回復したことにより、0820 の「リパーゼ超誘導発現システム」への関与を証明できたが、どのような働きなのかは不明である。本研究では、0820 が ADH である事を示すとともに、本システムに重要な遺伝子の転写活性機能を明らかにすることで、リパーゼ超誘導発現システムのさらなる解明を目的とした。

Ralstonia sp. NT-80, a Gram-negative aerobic eubacterium, produces lipase by adding an inducer. In our laboratory, it was found that the addition of stearyl alcohol (StOH), which is a higher alcohol, produces about 17 times more lipase than the addition of olive oil, which is a general inducer..It was suggested that the NT-80_0820 protein is highly homologous to zinc-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) and may be involved in the metabolism of StOH and the production of lipase in this system. The results of lipase activity assay of the three strains showed that the disruptant strain was significantly different from the other two strains. The results of the lipase activity assay of the three strains showed that the disrupted strain differed significantly from the other two strains. The results of the lipase activity assay of the three strains showed that the activity of the disruptive strain was significantly different from that of the other two strains, and the complementary strain recovered its activity to the level of the wild-type strain, demonstrating the involvement of 0820 in the "lipase superinduction expression system,but it is unclear how it works.In this study, we aimed to further elucidate the lipase super-induced expression system by showing that 0820 is ADH and clarifying the transcriptional activity function of genes important for this system.

Gram-negative aerobic eubacteria *Ralstonia* sp. NT-80, Alcohol dehydrogenase, Lipase activity

発表責任者：桂木　脩（a17.yfx4@g.chuo-u.ac.jp）

講演番号：3C08-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

*Staphylococcus pisciferm*entans、*Staphylococcus condimenti*、*Staphylococcus epidermidis* 由来イソロイシン 2-エピメラーゼホモログの機能解析

Characterization of isoleucine 2-epimerase homologs from *Staphylococcus pisciferm*entans, *Staphylococcus condimenti*, and *Staphylococcus epidermidis*

○牟田口 祐太、梅津 光、春日 和（秋田県大生資）
○Yuta MUTAGUCHI, Hikari UMETSU, Kano KASUGA (Akita Pre. Univ.)

本研究では、乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* 由来 isoleucine 2-epimerase (ILEP)のアミノ酸配列に基づいた相同性検索から、いくつかの *Staphylococcus* 属細菌のゲノム中に ILEP と 50%以上の同一性を示すタンパク質遺伝子が存在することを見出した。そこで、特に高い同一性を示すタンパク質遺伝子をもつ *Staphylococcus pisciferm*entans JCM 6057 と *Staphylococcus condimenti* JCM 6074、及びヒト常在菌である *Staphylococcus epidermidis* JCM 20345 について、ILEP の生成物である D-分岐鎖アミノ酸生産を調べた。その結果、*S. condimenti* の培養上清では D-*allo*-Ile、D-Leu、D-Val が顕著に増加していた。一方、*S. pisciferm*entans と *S. epidermidis* の培養上清では、D-Leu のみが顕著に増加していた。次に、同 3 株の ILEP ホモログタンパク質の ILEP 活性を調べた。ILEP 推定遺伝子の組換えタンパク質を大腸菌で発現後、Ni キレートカラムを用いて精製した。調製した 3 種の組換えタンパク質はいずれも、Ile 対するエピメラーゼ活性と、Leu、Val に対するラセマーゼ活性を示した。以上の結果より、D-分岐鎖アミノ酸の代謝に関与する可能性がある ILEP が *Staphylococcus* 属細菌にも分布することが示唆された。

Homology search based on amino acid sequences of isoleucine 2-epimerase (ILEP) from *Lactobacillus buchneri* revealed that some of *Staphylococcus* species have a gene of protein showing more than 50% identity with the *L. buchneri* enzyme. This study showed that *Staphylococcus condimenti* JCM 6074 markedly produced D-*allo*-Ile, D-Leu, and D-Val in the growth medium, and that *Staphylococcus pisciferm*entans JCM 6057 and *Staphylococcus epidermidis* JCM 20345 did only D-Leu. In addition, each of the putative ILEP genes in these strains was expressed in recombinant *Escherichia coli,* and then the expressed protein was purified to homogeneity. The three kinds of the purified protein showed ILEP activity including racemase activities toward Leu and Val. These results suggest that ILEP broadly distributes in *Staphylococcus* species, and may be involved in the metabolism of D-branched-chain amino acids.

D-amino acid, racemase, Staphylococcus

発表責任者：牟田口祐太（y-muta@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3C08-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-threonine aldolase 変異酵素の作製と性質

Construction and characterization of D-threonine aldolase mutant enzymes from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○金澤 諒[1]、西村 克史[1,2]、谷川 実[1]、東 翔子[1]、後藤 勝[3]、平戸 祐喜[3] ([1]日大理工、[2]日大短大、[3]東邦大理)

○Ryo KANAZAWA[1], Katsushi NISHIMURA[1,2], Minoru TANIGAWA[1], Shoko HIGASHI[1], Masaru GOTO[3], Yuki HIRATO[3] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior Coll., [3]Toho Univ.)

D-スレオニンアルドラーゼ (DTA) は D 型の β-ヒドロキシ-α-アミノ酸の分解及び合成を触媒する酵素である。DTA は基質アミノ酸の α 位の立体を厳密に認識するが，側鎖 (β 位) に対する特異性は低い。そのため，さまざまな側鎖を持つ β-ヒドロキシ-α-アミノ酸の光学分割 (D 型の分解)に利用できるが，合成反応においては，β 位の両異性体の混合物を生産するという欠点を持つ。本研究では，緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 DTA (CrDTA) を不斉合成に応用することを目的として，耐熱化と β 位の厳密な立体選択性の獲得を目指し，変異酵素を作製しそれらの性質を調べた。耐熱性の向上のため，石川の耐熱化候補選択法によって 14 の候補アミノ酸残基を見出した。部位特異的変異法を用いて CrDTA の耐熱化候補変異体 A40P と K64P を作製し，酵素タンパク質を精製した。現在その耐熱性を測定中である。β 位の厳密な立体特異性を示す DTA の設計において，CrDTA とほぼ同じ活性中心構造を持ち，かつ, β 位の厳密な特異性を持つ酵素である D-*threo*-3-hydroxyaspartate dehydratase と構造を比較した。その結果を基に CrDTA の基質特異性を変化させる候補として H216Y-Y210H 変異酵素を作製し精製した。現在，変異酵素の酵素活性の変化や基質特異性の変化を調べている。

D-Threonine aldolase (DTA) is an enzyme that catalyzes the degradation and synthesis of D-β-hydroxy-α-amino acids. DTA strictly recognizes α-position of the substrate amino acid, but the specificity for the side chain (at β-carbon) is low. Therefore, DTA can be used for the optical resolution (degradation of D-type) of β-hydroxy-α-amino acids with various side chains, but it has the disadvantage of producing a mixture of both diastereomers at the β-position in the synthetic reaction. In this study, we prepared mutant enzymes of DTA from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CrDTA) and investigated their properties in order to obtain thermostability and strict stereoselectivity at the β-position for asymmetric synthesis. In order to improve the thermostability, 14 amino acid residues were identified by Ishikawa method. The thermostable candidate mutants of CrDTA, A40P and K64P, were prepared and the enzyme proteins were purified. Their thermostability is now being measured. In order to design a DTA with strict stereospecificity at the β-position, we compared the structure of the DTA with that of D-*threo*-3-hydroxyaspartate dehydratase, an enzyme with the same active center structure as CrDTA but with strict specificity at the β-position. Based on the results, we prepared and purified the H216Y-Y210H mutant enzyme as a candidate for changing the substrate specificity of CrDTA. We are now investigating the changes in enzyme activity and substrate specificity of the mutant enzyme.

Chlamydomonas reinhardtii, D-threonine aldolase, D-amino acid

講演番号：3C08-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

好酸性鉄酸化細菌 Acidithiobacillus ferrooxidans 由来 D-アミノ酸脱水素酵素の性質

Properties of D-amino acid dehydrogenase from the acidophilic iron-oxidizing bacterium Acidithiobacillus ferrooxidans

○松崎 勇之介[1]、谷川 実[1]、鈴木 里菜[1]、東 翔子[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○Yuunosuke MATSUZAKI[1], Minoru TANIGAWA[1], Rina SUZUKI[1], Shoko HIGASHI[1], Katsushi NISHIMURA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior Coll.)

好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) は主に Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化することによりエネルギーを得ている独立栄養化学合成細菌であり，その最適生育温度 28℃，最適生育 pH は 2.0 である．本菌は D-アミノ酸を 2-オキソ酸に変換する D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) を有する．細菌において D-アミノ酸は，細胞壁などの限られた構成成分である．pH 2 という極限環境下で生育する本菌の DAD が他の環境で生育する生物の DAD と異なる点は解明されていない． 本研究では，*A. ferrooxidans* 由来 DAD の性質解明を目的とした．本菌由来 DAD の最適温度は 28℃であり，最適 pH は 6.5 であった．D-アラニンに対して最も高い活性を示した．また，DAD によって D-アミノ酸から生じた電子がどの経路に伝達されるのかを調べた結果，NAD^+ へ伝達されることがわかった．

The acidophilic iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*) is an autotrophic chemosynthetic bacterium that obtains energy mainly by oxidizing Fe^{2+} to Fe^{3+}, with an optimum growth temperature of 28°C and an optimum growth pH of 2.0. This bacterium possesses D-amino acid dehydrogenase (DAD), which converts D-amino acids to 2-oxo acids. In bacteria, D-amino acids are a limited component such as cell wall. It has not been clarified how the DAD of this bacterium, which grows in the extreme environment of pH 2, differs from that of organisms growing in other environments. In this study, we aimed to elucidate the characteristics and roles of DAD from *A. ferrooxidans*. The optimum temperature and pH of this enzyme were 28°C and 6.5, respectively. The highest activity was observed for D-alanine. In the case of addition of D-alanine to the cell free extract of *A. ferrooxidans*, reduction of NAD^+ was observed, suggesting the electron transfer from DAD to NAD^+.

D-amino acid dehydrogenase, Acidithiobacillus ferrooxidans

講演番号：3C08-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム C

カイコセリンラセマーゼの同定と酵素学的性質の解析

Identification and characterization of serine racemase from silkworm, *Bombyx mori*

○田中 優衣、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹（名大院・生命農）
○Yui TANAKA, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

D-セリンは哺乳動物脳内において、*N*-メチル-D-アスパラギン酸レセプターのコアゴニストとして機能し、記憶や学習など、脳の高次機能に関わることが知られている。また、チョウやガなどの鱗翅目の昆虫においても内因性の遊離 D-セリンが高濃度存在することが古くから知られている。カイコでは、卵から幼虫、蛹、成虫へと変態していく過程で、一過的に D-セリン量比が一過的に変動する。D-セリンがカイコの発生・発達過程で何らかの生理機能を有する可能性が示唆されているが、その合成機構を含めた詳細は、ほとんど明らかではなかった。

我々はカイコゲノムのデータベースから、哺乳類 D-セリン合成酵素であるセリンラセマーゼ（SR）と約 35%の相同性を示すタンパク質（BmSR）が、D-セリン合成活性を有することを見出した。BmSR は既報の SR とほぼ同等のピリドキサール 5'-リン酸（PLP）依存的なセリンのラセミ化活性に加え、デヒドレーション活性を示す二機能酵素であった。BmSR は、SR の活性化因子として知られる二価金属イオンや核酸などに非感受性であり、既報の SR に存在しない推定調節ドメインを有するなど、既報の SR とは異なる特徴を有していた。

The pupae of lepidopteran insects contain high concentration of endogenous D-serine. In the silkworm, the amount of D-serine transiently increases during metamorphosis. It has been suggested that in the silkworm D-serine may have some physiological functions during development, but the details including its metabolism have been remained unknown.

We have identified an enzyme that produces D-serine from L-serine, serine racemase (SR), from the silkworm *Bombyx mori*. This enzyme (BmSR) catalyzes pyridoxal-5'-phosphate (PLP) -dependent racemization of both isomers of serine, with the catalytic efficiency comparable to that of previously reported SR. BmSR also catalyzes dehydration of D-, and L-serine. BmSR has unique characteristics: it has a putative regulatory domain that is absent in known SRs and the activity was not affected by divalent metal ions and/or nucleic acids, which are known activators of SRs.

D-amino acid, serine racemase, *Bombyx mori*

講演番号：3D02-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

gamma-HCH 脱塩化水素酵素 LinA による DDT の分解
Degradation of DDT by gamma-HCH dehydrochlorinase LinA

○伊藤 蓮[1]、カファヤ ユスフ[1]、宮内 啓介[2]、大坪 嘉行[1]、永田 裕二[1]([1]東北大院・生命科学、[2]東北学院大・工学部)
○Ren ITO[1], Yusuf KAFAYAT[1], Keisuke MIYAUCHI[2], Yoshiyuki OHTSUBO[1], Yuji NAGATA[1] ([1]Tohoku Univ, [2]Togaku Univ)

Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) は、代表的な有機塩素系殺虫剤であり、環境汚染物質として問題となっているが、その微生物分解および分解酵素に関する知見は乏しい。本研究では、γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株由来のγ-HCH dehydrochlorinase LinA の DDT 分解活性について検討を行った。LinA およびその変異型酵素を発現する大腸菌の DDT 分解活性を GC (ECD) で検討したところ、活性のある LinA を発現する株で DDT の減少と DDT の脱塩化水素産物である DDE の蓄積が観察された。さらに、精製酵素での解析により、ある変異型酵素は野生型酵素より強い活性を示すことが明らかになった。しかし、LinA を構成的に発現する UT26 株では、GC (ECD)、および遊離塩素イオン濃度比色定量法で明瞭な DDT 分解活性は検出されなかった。そこで、UT26 株の *linA* 欠失株である YO5 株に LinA およびその変異型酵素発現用のプラスミドを導入したところ、活性のある LinA が高発現している株で、DDT の分解と DDE の蓄積が観察された。以上、LinA が DDT 分解活性を有することを明示した一方で、その活性は極めて弱く、有効な DDT 分解菌の育種には LinA の高発現と機能改変が必要であることが明らかになった。

Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) is a representative organochlorine pesticide and notorious as environmental pollutant, but microorganisms and enzymes for its degradation are rarely known. In this study, we investigated the DDT-degradation activity of γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) dehydrochlorinase LinA from γ-HCH-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* strain UT26. *Escherichia coli* expressing active LinA and its mutant enzymes showed DDT degradation and accumulation of DDE, a dehydrochlorinated product of DDT. Furthermore, assay using purified enzymes demonstrated that some mutant enzymes have higher DDT-degradation activity than wild-type enzyme. However, strain UT26 expressing LinA constitutively did not show the obvious DDT-degradation activity by GC (ECD) and colorimetric assay of released chlorine ion concentration. Therefore, we introduced plasmids for expression of LinA and its mutants into strain YO5, a *linA*-deletion mutant of UT26, and the strains expressing active LinA at high level showed DDT degradation and DDE accumulation. In summary, we demonstrated that (i) LinA has DDT-degradation activity but its activity is extremely weak, and (ii) high expression and functional improvement of LinA are necessary for breeding effective DDT-degrading bacteria.

environmental pollutant, DDT, dehalogenase

発表責任者：伊藤蓮（to.ren.t7@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3D02-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

ポリエチレンを食む虫からのアルカン分解菌

Alkane-degrading bacteria from polyethylene-chewing worms

○太田 貴将[1]、海老名 芹紗[1]、下浦 穂貴[1]、宮本 憲二[2]、寺本 真紀[1] ([1]高知大農林海洋、[2]慶應大理工)

○ Takamasa OOTA[1], Serisa EBINA[1], Hodaka SHIMOURA[1], Kenji MIYAMOTO[2], Maki TERAMOTO[1] ([1]Kochi Univ., [2]Keio Univ.)

プラスチックによる海洋汚染が深刻な問題となっている。生分解性プラスチックの開発も進められているが、現在普及している難分解性プラスチックと比較して耐久性が劣るという欠点を持つ。そこで本研究では、最も生産量の多い難分解性プラスチックであるポリエチレン（PE）を高効率で分解する細菌を単離することを目的とした。

PE フィルムを食むことで知られるハチノスツヅリガの幼虫から、PE の部分構造を持つヘキサデカン（直鎖アルカン、C_{16}）を分解する細菌を C_{16} で集積培養した。その結果、*Acinetobacter courvalinii* と *Acinetobacter pittii* にそれぞれ近縁な細菌株（Bh10 株、Bh12 株）が得られた。そして、4 週間の原油分解実験を行なって、この 2 株が様々な長さの直鎖アルカンを分解することが明らかとなった（C_{12}-C_{32} を検出）。Bh10 株では分岐アルカンの分解も示唆され、Bh12 株は高温（42°C）でも直鎖アルカンを分解できた。また、両株で PE 分解が示唆された。他の研究では、ハチノスツヅリガやノシメマダラメイガの幼虫（この虫も PE を食む）から PE 分解菌として *Acinetobacter* 属細菌は単離されていない。

Plastics are polluting marine environments seriously. Biodegradable plastics have been developed, but they have the disadvantage of inferior durability compared to the currently popular plastics such as polyethylene (PE), which is plastic with the highest production. In this study, we aimed to obtain the bacteria that can degrade PE at high efficiency.

Bacteria degrading hexadecane (linear alkane, C_{16}), which has a partial structure of PE, were enriched on C_{16} from larvae of *Galleria mellonella*. They are known to chew PE films. As a result, strains Bh10 and Bh12, which were closely related to *Acinetobacter courvalinii* and *Acinetobacter pittii*, respectively, were obtained. A 4-week crude oil degradation experiment revealed that the 2 strains degraded linear alkanes with various lengths (C_{12}-C_{32} detected). Strain Bh10 was indicated to degrade branched alkanes, and strain Bh12 could degrade linear alkanes even at high temperature (42°C). Both strains were suggested to degrade PE. In other studies, *Acinetobacter* sp. bacteria have never been isolated as PE-degrading bacteria from larvae of *G. mellonella* and *Plodia interpunctella* (another PE-chewing worm).

Galleria mellonella, Polyethylene, *Acinetobacter*

発表責任者：寺本真紀（maki.teramoto@kochi-u.ac.jp）

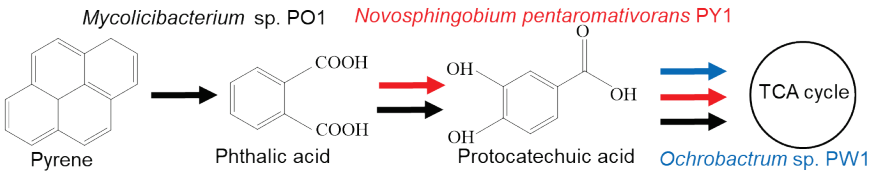
講演番号：3D02-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

Emerging interspecific relationships on PAH degradation of the pyrene-degrading consortia

○ Yuanhao ZHU[1], Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Onruthai PINYAKONG[3], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTech. Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chulalongkorn Univ.)

[Background and objectives] Enhanced degradation of pyrene, a ubiquitous polyaromatic hydrocarbon pollutant, was previously obtained by a bacterial consortium composed of *Mycolicibacterium* spp. PO1 and PO2, *Novosphingobium pentaromativorans* PY1, *Bacillus subtilis* FW1 and *Ochrobactrum* sp. PW1, which were originally isolated from mangrove sediments in Thailand (Wanapaisan P et al. 2018. J. Hazard. Mater. 342). Draft genome and metatranscriptome sequence analyses suggested that the synergistic metabolism of pyrene and degradation intermediates is the key factor explaining degradation enhancement (Laothamteep N et al. 2021. Environ. Pollut. 277). In nature, however, negative interspecies interactions (e.g., predation, competition) can often result in a lower-than-expected pollutant degradation efficiency (El Fantroussi, S. & Agathos, S.N. 2005. Curr Opin Microbiol. 8), and, therefore, revealing the nature and impact on pollutant removal efficiency of such interactions is key for successful bioremediation of polluted sites. In this study, we employed simplified two- or three-member pyrene-degrading consortia using strains PO1, PW1 and PY1 to investigate the interspecies interactions causing positive or negative impacts on pyrene degradation using metatranscriptomic sequencing.

[Methods and results] First, we measured the degradation capabilities of pyrene and the degradation intermediates phthalate and protocatechuate by the individual strains in resting cell status. HPLC analysis showed that PO1 could degrade pyrene whereas PY1 and PW1 degraded only phthalate and protocatechuate, respectively, confirming previous genomic analyses (attached figure). Second, pure PO1 and the consortia constructed by adding to PO1 either PY1 or PW1 (two-strain consortia), or both (three-strain consortium) were exposed to 100 ppm pyrene in resting cell status to determine the pyrene degradation capability of each combination. The results showed that PY1 and PW1 increased PO1's pyrene degradation capability when added individually, suggesting that they had a supportive role in pyrene degradation. Interestingly, addition of both PY1 and PW1 resulted in a decreased pyrene degradation rate by PO1, suggesting emergent negative interaction(s) when the three members are present. To investigate the nature of such interactions, genes differentially expressed which might be responsible for positive or negative impacts on pyrene degradation will be identified using RNA sequencing.



pyrene, consortia, positive and negative interactions

発表責任者：Zhu Yuanhao（zhuyuanhao1212@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D02-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

カルバゾール分解プラスミドを保持する細菌の代謝能の揺らぎの 1 細胞レベル検出

Detection of fluctuation in the metabolic ability of bacterial cells harboring a carbazole-degrading plasmid

○山口 雅貴[1]、水口 千穂[2]、野尻 秀昭[2]、重藤 真介[1]([1]関西学院大院理工、[2]東大院・農生科・AgTECH)
○ Masataka YAMAGUCHI[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[2], Hideaki NOJIRI[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Kwansei Gakuin Univ., [2]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo)

【序論】原油などに含まれるカルバゾールは難分解性の環境汚染物質であり, 環境に大きな影響を及ぼす。カルバゾール分解プラスミドを持つ細菌の代謝の理解は，このような難分解性物質の除去の効率化を図るために有用な知見を与える。本研究では、重水素（D）標識したカルバゾール（カルバゾール-d_8）をカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を保持する細菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株および *Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1)株に与え，顕微ラマン分光法を用いて各々のカルバゾール代謝能を 1 細胞レベルで評価することを目的とした。
【実験】CA10 株および KT2440(pCAR1)株をカルバゾール-d_8 もしくは無標識カルバゾールを主炭素源として添加した培地で培養し，それら 4 種の細胞のラマンスペクトルを研究室自作の共焦点ラマン分光装置（励起波長 532 nm）を用いて測定した。培養開始 8 時間後から 24 時間後まで 4 時間ごとに, それぞれ 30 細胞からラマンスペクトルを得た（レーザー強度 1 mW, 露光時間 40 秒)。
【結果】カルバゾール-d_8 を添加した培地で培養した CA10 株および KT2440(pCAR1)株の細胞のラマンスペクトルにおいて, 重水素が代謝によりタンパク質などの生体物質に取り込まれたことを示す C–D 伸縮振動バンドが 2180 cm^{-1} 付近に観測された。この C-D 伸縮振動バンドの強度を比較した結果, CA10 株ではほぼすべての細胞が一様にカルバゾールを分解しているのに対して，KT2440(pCAR1)株では細胞ごとの分解の程度のばらつきが大きく，顕著なカルバゾール分解能を示す細胞からまったく分解しない細胞まで多様な細胞が存在することが明らかとなった。この代謝能の不均一性は，同じプラスミドであっても宿主によってその上の遺伝子の発現に不均一性があることを示唆している。

In this work, we used Raman microspectroscopy to assess, at the single-cell level, the ability of bacterial cells carrying the carbazole-degrading plasmid pCAR1 to metabolize carbazole, a persistent organic pollutant. We cultured *Pseudomonas resinovorans* CA10 and *Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1) strains carrying pCAR1 in a medium containing deuterium-labeled carbazole (carbazole-d_8). The Raman spectra of the CA10 and KT2440(pCAR1) cells exhibited the C–D stretching band peaking at ~2180 cm^{-1}. The intensities of the C–D stretching band revealed that the heterogeneity of the carbazole-degrading ability is much greater for CA10 cells than KT2440(pCAR1) cells.

Carbazole degradation, Plasmid, Raman microspectroscopy

発表責任者：重藤真介（Shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：3D02-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

微生物培養用ゲル充填マイクロウェルアレイを用いたナフタレン分解菌の培養と取得

Cultivation and obtainment of naphthalene-degrading bacteria on a gel filled micro well array device for microbial culture

○岸上 佳保里[1]、楊 重陽[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、佐々 文洋[3]、野尻 秀昭[1,2]([1]東大院・農生科・AgTECH、[2]東大・微生物連携機構、[3]九州大・システム情報科学研究院)
○Kahori KISHIGAMI[1], Chongyang YANG[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKAZA[1], Fumihiro SASSA[3], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]ISEE, Kyushu Univ.)

従来のスクリーニング手法では、培養時の競争による多様性の低下や微生物間相互作用の喪失による生育の低下など、様々な要因により検出されない微生物の存在が課題となっている。本研究では、新規の微小空間培養デバイスである微生物培養用ゲル充填マイクロウェルアレイを用いたナフタレン分解菌培養法の確立と取得に取り組んだ。用いた培養デバイスは 900 個の独立したウェルを持ち、各ウェルに約 100 nL のゲル培地が充填可能である。菌液を塗布することで、ウェルごとに数細胞単位で区画化・隔離した状態での培養を行うことが出来る（図)。同じウェル上に植菌された微生物間の相互作用を保持しながらも、培養時の競争の抑制が可能となることから、多様な微生物の取得が期待される。

ナフタレンを含むゲル培地が充填された培養デバイス上で、ナフタレン資化菌や土壌試料から構築したナフタレン分解コンソーシアの培養を行ったところ、マイクロコロニーの形成による生育が確認された。試薬による生育検出を試みたが良好な結果は得られず、顕微鏡を用いた直接観察による検出法が有効であった。ナフタレン分解コンソーシアを用いて 96 ウェルプレートでのスケールアップ培養に取り組んだところ、培養デバイスから植菌を行ったウェルの 80%前後で生育が確認され、ナフタレン分解能を持つサブコンソーシアの取得に成功した。現在は菌叢解析に取り組んでおり、合わせて報告する。

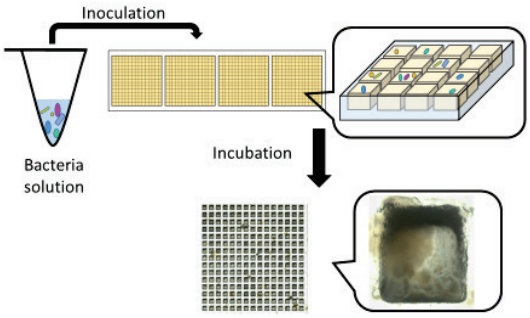


図. 培養デバイスによる細菌培養

Conventional screening methods only obtain a small part of whole bacteria in original samples because of loss of diversity due to competition and bacterial interaction during cultivation. Gel filled micro well array device for microbial culture, which can compartmentalize independent microscale reactors, will be an effective cultivation system to overcome these obstacles. In this study, an effective cultivation method for naphthalene-degrading bacteria on the device was established. The device was filled with gelling medium containing naphthalene, and members of naphthalene-degrading consortia were inoculated. The micro-colonies can be observed under the microscope after incubation and can scale-up culture in 96-well plates successfully. Some of the obtained sub-consortia showed naphthalene-degrading ability. The sub-consortia are being investigated for 16S rRNA gene sequences.

gel filled micro well array device, microscale cultivation, naphthalene-degrading bacteria

講演番号：3D02-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

ハイスループットな微小結晶蛍光測定法による多環芳香族化合物分解微生物群の取得

High-throughput, microcrystal fluorescence-based screening of PAH degrading bacteria

○ベハラノ フェリペ、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大院・農生科・AgTECH）
○Felipe VEJARANO, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri (AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo)

【背景と目的】多環芳香族化合物（PAH）による環境汚染をバイオレメディエーションにより解決するために、高分解能を持つ微生物の探索と評価が重要である。現在、主に実施されている微生物獲得手法は、膨大な時間と労力を費やすにもかかわらず、有用な微生物を獲得できる確率は低く、既存技術を凌駕する新規ハイスループットスクリーニング技術を開発することが必要不可欠である。そこで本研究では、微小結晶由来の蛍光測定に基づいたハイスループットなリアルタイム PAH 分解活性評価法を確立し、新規 PAH 高分解活性微生物あるいは微生物群（コンソーシア）の獲得を目指す。

【方法と結果】モデル PAH として高疎水性であるピレンを用いた。96 穴のマイクロプレート底面にてピレンの微小結晶を作製し、定着させた。このプレートを「テストプレート」と名付けた。テストプレート上で微生物を培養し、微小結晶由来の蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡で測定することで、微生物の分解活性を評価できるプラットフォームを開発した。実際に、農業土壌または海岸土壌から密度勾配遠心法によって環境微生物を抽出し、抽出したコンソーシアを、あるいはセルソーターで一細胞ずつ分取したものをテストプレートの各ウェルで培養することで、微生物による分解活性を非破壊的かつリアルタイムで評価することに成功した。一細胞を分取しテストプレートにて培養する方法であっても、わずか数日間以内に顕著な分解活性を検出できた。以上より、本プラットフォームを用いることで、従来の、集積培養・寒天培地を用いた単離により生じるバイアスを防ぎつつ、容易かつ短時間での分解菌取得を成功できることが明らかとなった。現在、高い分解活性を確認できたウェルに増殖した微生物の新規性を 16S rRNA アンプリコン解析によって検証している。

Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) requires time-efficient screening of novel PAH-degrading bacteria. Current enrichment and isolation methods of such bacteria are time consuming and low throughput. We have developed a high-throughput, non-destructive and fluorescence-based PAH microcrystal quantification method for enrichment and screening of PAH-degrading bacteria. Our results show that the novel platform can be used to detect PAH-degradation activity with bacterial cells directly extracted from environmental matrices and single cells captured using fluorescence activated cell sorting (FACS). Moreover, the system is sensitive enough as to be able to detect degradation of recalcitrant PAHs by environmental bacteria within a few days of incubation. Currently, the uniqueness of bacteria enriched with the new method compared to traditional enrichment and isolation in solid media methods is being implemented using 16S rRNA amplicon sequencing.

High-throughput screening, Microcrystal fluorescence, PAH degradation

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D02-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

Microdroplet-based system for cultivation and acquisition of naphthalene-degrading bacteria

○CHONGYANG YANG[1,2], Kahori KISHIGAMI[1,2], Yuri OTA[2], Tetsushi SUYAMA[2], Masamune MORITA[2], Satoko MATSUKURA[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3], Kazunori OKADA[1], Naohiro NODA[2], Hideaki NOJIRI[1,3] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agri. Life Sci., UTokyo, [2]BRI., AIST, [3]CRIIM, UTokyo)

[Backgrounds and Objectives] Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous in environment and have detrimental biological effects, toxicity, mutagenicity and carcinogenicity, which have been of great concern due to their high risks to animals and humans. Bioremediation, the major clean-up process for these contaminants, utilizes the action of microorganisms with low cost and low environmental load. The investigation of numerous unknown microbial species and their functions in mixed cultures may increase the understanding of the mechanisms in efficient PAH degradation and construct the efficient bioremediation technology. However, to unlock the hidden biodegradation potential of so far uncultured microbes and to unravel the complicate microbial interactions in consortia are still challenges. Microfluidic droplets techniques can manipulate and analyze micron-level fluidic volumes which are available for single-cell level analysis and can promote the understanding and utilizing of microbes. The aim of this study is to propose a preliminary strategy for the cultivation and screening of efficient naphthalene-degrading microbes by applying the water-in-oil droplet technique to provide prerequisites for the subsequent acquisition and understanding of effective microbes or microbial consortia.

[Methods and Results] The aqueous micro-droplets were generated by a QX100 droplet generator (BioRad, Hercules, CA, USA) and suspended in fluorinated oil. We compared the addition of naphthalene from the aqueous and oil phases during droplet generation and found that naphthalene tends to precipitate in the aqueous phase due to its high hydrophobicity and thus cannot enter the droplets, resulting in insufficient naphthalene in the droplets to serve as the sole carbon source for bacterial growth. Therefore, droplets were prepared using fluorinated oil containing 0.1% (w/v) naphthalene and naphthalene-saturated carbon-free mineral medium (CFMM) with the model naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas putida* G7. The droplets were incubated at 30°C and the bacterial growth in droplets was confirmed after 2-day incubation. We also verified the naphthalene addition and cultivation strategy by using naphthalene-degrading enrichment culture derived from a soil sample and successfully obtained the naphthalene-degrading micro-consortia in micro-droplets. The strategy of substrate supply through oil phase can cultivate highly hydrophobic PAH-degrading bacteria and communities, and efficiently facilitate the subsequent investigation of the unknown naphthalene-degrading bacteria and interactions of naphthalene-degrading bacterial communities.

Microdroplet, Naphthalene-degrading bacteria, Bioremediation

発表責任者：Hideaki NOJIRI（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D02-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

細菌由来の有機塩素系殺虫剤分解に関わるデハロゲナーゼを発現するシロイヌナズナ植物の作製
Construction of transgenic Arabidopsis plant expressing bacterial dehalogenase for degradation of organochlorine pesticide

○鄧 文昊、高田 美信、大坪 嘉行、渡辺 正夫、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Wenhao Deng, Yoshinobu Takada, Yoshiyuki Ohtsubo, Masao Watanabe, Yuji Nagata (Tohoku Univ.　Life Science)

残留性有機汚染物質 (POPs) で汚染された土壌の浄化を目的に、有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 分解資化細菌由来のγ-HCH dehydrochlorinase LinA を発現するシロイヌナズナ形質転換植物体を作製した。カボチャ毛状根で LinA を発現させた先行研究 (Plant Cell Reports **35**: 1963-1974, 2016) と同様に、植物への遺伝子導入が可能なバイナリーベクターの CaMV 35S プロモーター下流に、植物細胞での発現に最適化した合成 *linA* 遺伝子である *relinA* の 5'末端にアスコルビン酸オキシダーゼのアポプラストシグナル配列を付加した *AOs-relinA* を導入して作製したプラスミドを用いてシロイヌナズナを形質転換した。RT-PCR と Western 解析により転写および翻訳レベルで LinA の発現が確認された形質転換体系統は、コントロール系統に比べて明らかなγ-HCH 耐性を示した。本 LinA 発現形質転換シロイヌナズナはγ-HCH 汚染土壌の浄化に利用できる可能性があり、そのγ-HCH 分解特性について詳細な解析を進めている。

For the remediation of soil contaminated with persistent organic pollutants (POPs), we constructed transgenic *Arabidopsis* plants expressing γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) dehydrochlorinase LinA from a bacterium that degrades the organochlorine pesticide γ-HCH. As in a previous study in which LinA was expressed in pumpkin hairy roots (Plant Cell Reports **35**: 1963-1974, 2016), a synthetic *linA* gene optimized for expression in plant cells, *relinA*, with N-terminal ER signal sequence from the ascorbate oxidase, *AOs-relinA*, was introduced into the downstream of the CaMV 35S promoter of a binary vector for gene transfer to plants, and transgenic *Arabidopsis* plants were constructed using the resultant plasmid. The transgenic lines, whose LinA-expression at the transcriptional and translational level was confirmed by RT-PCR and Western analysis, respectively, showed obvious γ-HCH resistance compared to the control lines. This LinA-expressing transgenic *Arabidopsis* has the potential to be applied for the remediation of γ-HCH-contaminated soil, and characterization of its γ-HCH degradation ability is in progress.

transgenic plant, environment pollutant, dehalogenase

講演番号：3D02-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

既知微生物固定化担体を用いたアンモニア除去リアクターの構築

Construction of an ammonia removal reactor using known microbial immobilization carriers

○飯山 桃子[1]、木間塚 律輝[2]、矢野 未涼[2]、三浦 健[1,2,3]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学、[3]東洋大・バイオレジリエンス研究プロジェクト）
○Momoko IIYAMA[1], Ritsuki KIMATSUKA[2], Misuzu YANO[2], Takeshi MIURA[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Bio-resilience research project, Toyo Univ.)

【背景・目的】 近年、東南アジアにおいて高濃度の NH_4^+-N による汚染が深刻化しており、発展途上国における廃水処理技術の必要性はますます重要になっている。本研究室において構築した硝化リアクターから従属栄養細菌 4 株（a5、a10、b4、d1）の単離に成功した。本研究の目的は、NH_4^+-N 除去能を有した単離菌株を用いて微生物固定化担体を作製し、東南アジアで適応可能な NH_4^+-N 除去システムの構築および担体に付着した微生物叢の把握とした。

【方法・結果】 単離菌 4 株の NH_4^+-N 除去実験は試験管において行った。使用培地は炭素源に Glucose、窒素源に NH_4Cl を含有した NM 培地とした。培養 3 日目、6 日目に NH_4^+-N、全窒素（T-N）、NO_2^--N、NO_3^--N の分析を行った。全ての単離菌株において NH_4^+-N および T-N の減少が見られた。NO_2^--N および NO_3^--N の生成は検出されなかった。次に、開放系のリアクターにおいて単離菌 4 株および NBRC 分譲菌 2 株を組み合わせた 4 系列の連続処理実験を行った。リアクターは RUN-1、RUN-2 および RUN-4 を 1 槽構造、RUN-3 のみ 2 槽構造とした。使用した微生物固定化担体は PVA スポンジ担体を用いた。試験管実験と同様に NH_4^+-N および T-N の減少が見られ、各リアクターに充填した担体の表面には微生物膜の形成が観察できた。

当日は、各リアクターの水質分析および担体に付着した微生物叢の解析について発表する。なお、本研究は 2021 年度東洋大学井上円了記念研究助成を受けて行われた。

【Background・Purpose】 4 heterotrophic bacteria strains were isolated from the constructed nitrification reactor in our laboratory. In this study, the NH_4^+-N removal system were constructed using an isolated strains capable of removing NH_4^+-N. The microbial flora of the microbial immobilization carrier was analyzed in the system.

【Method・Result】 In 4 isolated strains, decrease in NH_4^+-N and total nitrogen（T-N）was observed in NM medium containing Glucose as a carbon source and NH_4Cl as a nitrogen source. In addition, the generation of NO_2^--N and NO_3^--N was not detected. Moreover, NH_4^+-N and T-N were reduced in 4 reactors and a microbial membrane was formed on the surface of the packed carrier.

ammonia, PVA sponge carrier, reactor

発表責任者：飯山桃子（s39102000038@toyo.jp）

講演番号：3D02-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

生物学的処理水を浄化するための光触媒・BDD 電極併用処理技術の開発

Development of Combined Photocatalytic and BDD Electrode Treatment Technology for Purification of Biologically Treated Water

○熊谷 尚[1]、久保田 智樹[1]、藤嶋 昭[2]、落合 剛[3]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応生、[2]東理大・総研、[3]KISTEC)
○ Nao KUMAGAI[1], Tomoki KUBOTA[1], Akira HUJISHIMA[2], Tsuyoshi OCHIAI[3], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, [3]Kawasaki Technical Support Department, Local Independent Administrative Agency Kanagawa Institute of Industrial Science and TEChnology)

現在、汚水処理の最終工程である化学的処理において、次亜塩素酸ナトリウムが一般的に使用されている。しかしながら、遊離した次亜塩素酸と次亜塩素酸イオン（有効遊離塩素）は処理水中の有機物と反応してトリハロメタンを生成し、環境問題となっている。この問題を解決するために、本研究は光触媒と BDD 電極を併用した酸化剤生成槽を構築し、環境に負荷をかけない浄化システムの開発を目的としている。

本研究では、光触媒・BDD 電極併用処理装置を構築し、トリハロメタン生成の要因である有効遊離塩素の定量を行った。また、この併用処理装置に生物学的処理水を投入し、有機物分解能とトリハロメタンの生成量を評価して、最適な電流値を検討した。さらに、併用処理装置内の細菌叢解析を行い、耐性菌を検出した。

その結果、有効遊離塩素の生成量は BDD 電極単独と比較して、光触媒を併用することで、約 90%減少した。また、生物学的処理水を用いた電流の設定検討を行った結果、24 h でトリハロメタンの生成量が低く、約約 75%の有機物分解効率を得た、20-30 mA に決定した。決定した電流値を使用して、耐性菌の殺菌性能評価等を行った結果も併せて報告する予定である。

Currently, sodium hypochlorite is commonly used in chemical treatment, the final step of sewage treatment. However, the free hypochlorous acid and hypochlorite ions (effective free chlorine) react with organic matter in the treated water to produce trihalomethane, which has become an environmental problem. In order to solve this problem, this study aims to construct an oxidant generation tank using photocatalyst and BDD electrode together and to develop an environmentally friendly purification system.

In this study, the combined photocatalytic and BDD electrode treatment system was constructed, and the determination of effective free chlorine, which is a factor in the formation of trihalomethane, was conducted. Biological treated water was fed into this system. Afterward, the organic resolution and the amount of trihalomethane produced were evaluated, and the optimum current value was investigated. In addition, bacterial flora in this system was analyzed for the detection of resistant bacteria.

The results showed that the production of effective free chlorine was reduced by about 90% by using photocatalyst and BDD electrode together. In addition, as a result of examining the setting of the current using biologically treated water, it was decided to use 20-30 mA, which produced a low amount of trihalomethane in 24 h and obtained an organic matter decomposition efficiency of about 75%. We will also report the results of the evaluation of the bactericidal performance of resistant bacteria using the determined current values.

Photocatalyst, Boron doped diamond electrode, Sewage treatment

講演番号：3D02-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

タンパク質と炭酸水素イオンによる金属回収法の検討

Recovery of metal ions using proteins and hydrogen carbonate ions

○鈴木 菜那、玉置 祥二郎、前山 和輝、上西 寛司（雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所）
○ Nana SUZUKI, Shojiro TAMAKI, Kazuki MAEYAMA, Hiroshi UENISHI (Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Bland Co., Ltd.)

工場排水、水質汚染水などの環境試料溶液から金属イオンを回収する方法は各種存在するが、処理工程が煩雑である。本検討では、一部の乳タンパク質が炭酸水素イオン存在下で金属イオンと複合体を形成する性質を活用し、試料に含まれる金属イオンを可溶化状態で分離し高い効率で回収する金属回収方法を検討した。

①ラクトフェリン等の乳タンパク質は炭酸水素イオン存在下で Fe^{3+}と複合体を形成し、多量の鉄を可溶化状態で保持することが報告されている。本検討では、モデルとして安価な乳清タンパク質分離物(以下 WPI)と、塩化第二鉄を用い、1 mM の Fe^{3+}を限外濾過膜で回収できる最適条件を検討した。その結果、WPI 濃度 0.125%、炭酸水素ナトリウム濃度 20 mM を用いることで複合体形成させ、限外濾過膜処理で Fe^{3+}を 100%回収することができた。②金属を Cu^{2+}、Zn^{2+}に変えた場合にも同様に複合体を形成し、限外濾過膜で回収することが可能であった。しかし、金属種によって複合体形成に必要なタンパク質濃度、炭酸水素ナトリウム濃度、金属イオンの回収率等が異なった。③大豆などの植物に由来するタンパク質素材を用いて同様の検討を行った結果、素材によって Fe^{3+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}を可溶化状態で分離できた。しかし、複合体形成に必要なタンパク質濃度、金属イオンの回収率等が異なった。

以上の結果から、多様なタンパク質と金属イオンが炭酸水素イオンを介して複合体を形成し、可溶化状態のまま限外濾過膜で金属イオンを効率的に分離・回収できることが明らかになった。本技術は、特殊な薬剤を使用せず、限外濾過膜処理のみの単純な工程で金属イオンを回収する、簡便で効率的な方法になり得る。

In this study, we investigated a new metal recovery method by concentrating metal ions as protein-metal-hydrogen carbonate ions complex with an ultrafiltration membrane.
Using whey protein isolate, 1 mM iron ions formed iron-protein complex in the presence of sodium hydrogen carbonate, and 100% of iron ion was recovered as the concentrated liquid by ultrafiltration. Moreover, zinc and copper ions were also recovered by the same method using not only whey protein isolate but also plant proteins.
This method may be useful for the recovery method of metal ions in a solubilized state.

metal recovery, protein-metal-hydrogen carbonate ions complex, ultrafiltration

発表責任者：鈴木　菜那（nana-suzuki@meg-snow.com）

講演番号：3D02-12
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム D

An investigation of upland soil fertility from different soil types

○QUOC THINH TRAN, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan University)

Soil type is a vital determinant of soil fertility because of its biological, chemical, and physical properties. However, the soil fertility of upland soil is probably changed by different agricultural management practices regardless of soil type. This study investigated the features of soil fertility (bacterial biomass, total carbon (TC), and total nitrogen (TN)) in upland fields in Japan. One thousand soil samples from different soil types were collected from upland fields located on 36 prefectures in Japan. Bacterial biomass, TC, and TN of soil samples were analyzed. There were six soil types included in this study: Organic soil (B), Andosols (D), Lowland soils (F), Red-yellow soils (G), Stagnic soils (H), and Brown Forest soils (I). Of these, the soil types D (63.3%) and F (17.6%) occupied the largest percentage of samples. The values of bacterial biomass, TC, and TN varied greatly, regardless of soil type. The soil fertility does not seem to be characterized by the soil type in upland soils in Japan. The correlations between bacterial biomass and TC ($r = 0.23$, $p < 0.01$) and bacterial biomass and TN ($r = 0.16$, $p < 0.01$) were relatively weak. Conversely, the correlation between TC and TN ($r = 0.68$, $p < 0.01$) was moderate. In soil type D, up to 40 % of samples had no bacterial biomass detected and 17 % possessed a low bacterial biomass. Meanwhile, more than 50% of samples in the other soil types had medium and high bacterial biomass. The effect of the soil types may not be a critical factor in soil fertility in the upland fields.

Soil fertility, Soil type, Bacterial biomass

講演番号：3D04-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

海洋微生物と鉄鋼スラグを用いた藻類生育の促進

algae growth promotion by marine bacteria and iron and steel slag

○大竹 晟佳[1]、月舘 秀典[1]、加藤 由悟[1]、吉村 航[2]、鈴木 道生[1]([1]東大院農、[2]日本製鉄先端技術研究所)
○Seika OTAKE[1], Hidenori TSUKIDATE[1], Yugo KATO[1], Ko YOSHIMURA[2], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]Nippon Steel)

鉄を製錬する際に発生する副産物である鉄鋼スラグはカルシウム、シリカ、鉄、マンガンなどの含有率が非常に高いことから、海洋の環境改善や大型藻類の鉄分供給源として活用する用途として期待されている。しかしながら、これまでの研究から単に鉄鋼スラグを海洋中に敷設しても、3 価の鉄イオンが水酸化鉄として沈殿しやすいことから海洋中に適切に金属を溶出させることは難しいと考えられている。本研究では、海洋中の微生物と鉄鋼スラグを相互作用させることにより、鉄鋼スラグからの金属の溶出を制御し、藻類の生育促進に寄与することを目的としている。本研究では東京湾、北海道増毛町沿岸の海水からスクリーニングにより見出された、鉄鋼スラグから鉄を多く溶出させる細菌株である TO1 及び O97 を用いた。16SrRNA の解析の結果、TO1 は *Sulfitobacter* 属と *Pseudomonas* 属の混合株、O97 は *Pseudoalteromonas* 属の細菌であった。シデロフォアを検出する CAS アッセイを行った結果、TO1 および 97 はシデロフォアを生成することが示唆された。そこで、これらの微生物株を用いて鉄を溶出させ藻類の生育に影響を与えるか確認するため、TO1 または O97 の前培養液、及びスラグが入ったフラスコでスサビノリを 4 日間培養した後、誘導結合プラズマ質量分析によるスサビノリ内の鉄濃度測定、吸光光度計を用いた色素含有量分析、リアルタイム PCR による遺伝子応答測定を行った。この結果、スサビノリ培養フラスコに鉄鋼スラグを添加すると、色素含有量および遺伝子応答に違いは見いだせなかったが、ノリの鉄含有濃度は上昇した。これらの結果から、細菌を用いて鉄鋼スラグから藻類に鉄を供給させることが可能であることが示唆された。

Iron slag, that is a by-product produced at iron refining process, contains calcium, silica, iron, and manganese. Therefore, it is expected to supply seaweed in the sea with iron. However, previous research showed it is difficult to elute the iron ion from iron slag in the sea. In this research, our aim is to control the metal elution from iron slag using interaction between bacteria and iron slag. And the contribution for the growth of seaweed was investigated. TO1 and O97 known as bacteria eluting iron ion from iron slag were used. TO1 is complex of two strains, *Sulfitobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., while O97 is *Pseudoalteromonas* sp. CAS assay was conducted to detect siderophore to know the mechanism of iron elution. CAS assay revealed both TO1 and O97 excreted siderophore. After four-day cultivation of *Pyropia yezoensis* , seaweed, with TO1 or O97, and iron slag, iron concentration, chlorophyll and phycoerythrin in seaweed, and gene expression were analyzed. These experiments showed that iron slag had positive impacts only on iron concentration of seaweed, while it did not influence on chlorophyll, phycoerythrin and gene expression. These results suggested that the treatment of bacteria can extract the iron ion from the iron slag and gave the iron ion to the seaweeds.

iron and steel slag, bacteria, algae

講演番号：3D04-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

インド高濃度セレン蓄積地帯由来 *Cellulomonas* 属細菌における亜セレン酸還元の呼吸鎖への関与およびセルロース分解能

Involvement of the respiratory chain in selenite reduction and the ability of cellulose degradation in a bacterium of the genus *Cellulomonas* isolated from a seleniferous soil in India

○坂本 曉紀[1]、井上 真男[1]、青野 陸[1]、Prakash Tejo N.[2]、三原 久明[1]([1]立命大生命、[2]Thapar Inst. Eng. Tech.)
○ Akinori Sakamoto[1], Masao Inoue[1], Riku Aono[1], Tejo N. Prakash[2], Hisaaki Mihara[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Thapar Inst. Eng. Tech.)

インド高濃度セレン蓄積土壌から単離した *Cellulomonas* sp. D3a は近縁種には見られない高い亜セレン酸還元活性を示す。本菌は既知の亜セレン酸還元酵素遺伝子を持たないことから、我々はその亜セレン酸還元特性に着目している。本大会では、最新の知見として、本菌の亜セレン酸還元への呼吸鎖の関与と本属細菌の特徴であるセルロース分解能について報告する。

まず、本菌の細胞画分を調べたところ、沈殿画分においてグルコースおよびビタミン K 類似化合物であるローソンに依存的な亜セレン酸還元活性が検出された。この沈殿画分に様々な呼吸鎖阻害剤を添加して亜セレン酸還元活性を調べたところ、ビタミン K 拮抗薬であるジクマロール存在下で亜セレン酸還元が阻害され、この阻害効果はローソンの添加によって緩和された。したがって、本菌の亜セレン酸還元は呼吸鎖を介することが示唆された。次に、本菌が他の本属細菌と同様にセルロース分解能を有するのかを検討した。カルボキシメチルセルロース含有寒天培地に菌液をスポットして培養したところ、菌体の周りにハロが観察され、本菌がセルロース分解能を有することが示唆された。以上の結果から、本菌は、亜セレン酸還元能を持つ初のセルロース分解菌であることが示された。

Cellulomonas sp. D3a isolated from a seleniferous soil in India exhibits a high selenite-reducing activity. Since the bacterium genome has no gene encoding known selenite reductases, we focus on its selenite reduction properties. We here report the involvement of the respiratory chain in the reduction of selenite and a cellulose degradation property in the bacterium.

First, a glucose- and Lawsone (a vitamin K analog)-dependent selenite-reducing activity was detected in the precipitated fraction of the cells. Among various respiratory chain inhibitors tested, dicoumarol inhibited selenite reduction. This inhibitory effect was alleviated by the addition of Lawsone. The results suggest that the reduction of selenite in the bacterium is mediated by the respiratory chain. Next, when the bacterial cells were spotted and cultured on a carboxymethyl cellulose-containing agar medium, a halo was observed around the bacterial cells, suggesting that the bacterium has the ability to degrade cellulose. Taken together, our results show that *Cellulomonas* sp. D3a is the first cellulose-degrading bacterium having a selenite reducing ability.

Cellulomonas, selenite, cellulose

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3D04-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

木材腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 由来 LPMO9 がセルロース分解に及ぼすシナジー効果

The synergistic effect on cellulose degradation of LPMO9 of wood rot fungi, *Ceriporiopsis subvermispora*

○八木 勇成[1,2]、近藤 敬子[2]、グエン フエン[1,2]、渡邊 隆司[3]、三上 文三[1,4]、永田 崇[1,2]、片平 正人[1,2] ([1]京大エネ研、[2]京大院エネ科、[3]京大生存研、[4]京大院農)

○Yusei YAGI[1,2], Keiko KONDO[2], Huyen NGUYEN[1,2], Ryuji WATANABE[3], Bunzo MIKAMI[1,4], Takashi NAGATA[1,2], Ms KATAHIRA[1,2] ([1]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Energy Sci., Kyoto Univ., [3]Res. Inst. Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. of Agriculture, Kyoto Univ.)

セルロースの効率的な分解は植物バイオマスの利用において必要不可欠である。従来、加水分解酵素であるセルラーゼによるセルロース分解が研究されてきたが、工業化できる効率には至っていない。Lytic polysaccharide monooxygenase 9 (LPMO9) はセルロース鎖の酸化的開裂を触媒する酸化還元酵素である。LPMO9 が生成したセルロース鎖の切断点はセルラーゼによる加水分解の開始点となるため、LPMO9 はセルラーゼとのシナジー効果を示す。そのため、LPMO9 のシナジー効果を活用したセルロース分解の工業化に期待が寄せられている。

我々は木材腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 由来 LPMO9 (*Cs*LPMO9) の発現・精製を確立し、結晶構造を解くことに成功した。さらに、我々はセルロース基質に対する *Cs*LPMO9 のシナジー効果を検証した。*Cs*LPMO9 をセルラーゼと共に結晶性セルロースに添加した系での還元糖収量は、セルラーゼを単独で添加した系の 8.5 倍となり、既報の他の LPMO9 と比較して最大のシナジー効果が得られた。高いシナジーが発揮される理由を、結晶構造に基づいて考察する。*Cs*LPMO9 は植物バイオマス中に存在する結晶性セルロースの効率的な分解に活用可能と期待される。

Efficient cellulose degradation is essential for plant biomass utilization. To date, cellulose degradation by cellulases has been well-studied, however, the improvement of degradation efficiency is required for industrialization. Lytic polysaccharide monooxygenase 9 (LPMO9) is an oxidoreductase that catalyzes the oxidative cleavage of the cellulose chain. As LPMO9 produces accessible points for cellulases, LPMO9 shows “synergy” with cellulases. Therefore, the cellulose degradation using the synergistic effect of LPMO9 is drawing attention to meet industrial goals.

We expressed, purified, and crystallized a LPMO9 of *Ceriporiopsis subvermispora* (*Cs*LPMO9). The crystal structure was solved at 2.14 Å resolution. We then investigated the synergy of *Cs*LPMO9 against cellulosic substrates. When *Cs*LPMO9 and cellulases were simultaneously added to crystalline cellulose, the reducing sugar yield reached the 8.5-fold of that obtained for the case when only cellulases were added. This turned out to be the highest synergistic effect observed among reported LPMO9s. The reason of exerting the high synergy will be discussed on the basis of the crystal structure. *Cs*LPMO9 can be expected to be a beneficial enzyme for efficient degradation of crystalline cellulose, which is ubiquitous in plant biomass.

Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO), cellulose saccharification, synergy

講演番号：3D04-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

レーザーによるリグノセルロース分解への挑戦

A challenge to lignocellulose degradation by a laser

○川崎 平康[1]、境 武志[2]、住友 洋介[2]、野上 杏子[2]、早川 建[2]、宍倉 文夫[2]、永田 崇[3]、全 炳俊[3]、早川 恭史[2] ([1]高エネ研、[2]日大 LEBRA、[3]京大エネ研)
○Takayasu Kawasaki[1], Takeshi Sakai[2], Yoske Sumitomo[2], Kyoko Nogami[2], Ken Hayakawa[2], Fumio Shishikura[2], Takashi Nagata[3], Heishun Zen[3], Yasushi Hayakawa[2] ([1]KEK, [2]Nihon Univ., [3]Kyoto Univ.)

リグノセルロースは地球最大の木質系バイオマスであり、リグニンとセルロースから形成される。リグニンは Coumaryl alcohol などのヒドロキシ桂皮アルコール類がβ-O-4 エーテル結合を介してラジカル重合したポリマーである。リグニンを分解すればこれらのアルコール類が原料となる産業上有用なポリフェノール類を得ることができる。セルロースはグルコースがβ1-4 グリコシド結合でつながったポリマーであり、グリコシド結合を分解して得られる単糖類は石油代替燃料のバイオエタノールの原料として有用である。またセルロースファイバーは先端材料としてヘルスケア・医薬品分野や電子工学分野において幅広い利用が期待されている。従って、リグノセルロースを分解加工する技術は、健康医薬品分野、エネルギー分野、機能性材料分野などにおいて極めて重要である。しかし、リグノセルロースは非常に強固であるため、強酸や高温加熱といった過酷な処理を行わない限り分解が困難である。本研究では、リグノセルロースを分解するための新規な方法として高輝度パルス光源である赤外自由電子レーザー（Infrared Free Electron Laser, IR-FEL）の適用を試みる。

Infrared free electron laser (IR-FEL) is an accelerator-based pico-second pulse laser where the oscillation wavelengths are tunable from 3 to 20 μm. In this infrared region, there are many wavelengths that are resonant with various functional groups of organic compounds. The IR-FEL can activate those chemical bonds vibrational mode selectively and induces the remarkable structural changes on the various compounds, which is hardly achieved by the simple heating. The lignin powder was irradiated by the IR-FEL tuned to 7.1 μm (δH-C-O) and 6.3 μm (νC=C) under atmospheric pressure. After the irradiation, the structural change was analyzed by synchrotron-radiation infrared microscopy and electron-spray ionization mass spectroscopy (ESI-MS). A new peak at 1129 cm^{-1} was appeared, and a peak intensity at 1650 cm^{-1} was decreased by the irradiation at both wavelengths. These spectral changes indicate that some functional groups containing C-O bonds in the lignin structure were modified by the irradiation. The ESI-MS analysis showed that the lignin structure was destroyed accompanied by releasing methoxy groups by the IR-FEL irradiation. In addition, the irradiation at 8.2 μm gave a mass peak at 150.17 *m/z* that corresponds to the molecular weight of Coumaryl alcohol (C9H10O2). Therefore, it can be estimated that the IR-FEL can degrade the lignin structure and produce the low-molecular weight aromatic alcohols wavelength dependently.

lignin, cellulose, infrared free electron laser

発表責任者：川崎平康（takayasu.kawasaki@kek.jp）

講演番号：3D04-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

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

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、石田 健登、亀川 颯人、今久保 友則、藤田 雄大、秦野 琢之（福山大生命工）
○ Hiroaki MATSUZAKI, Kento ISHIDA, Hayato KAMEGAWA, Tomonori IMAKUBO, Yudai FUJITA, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。また、化石燃料の消費は大気中の二酸化炭素濃度の増加による地球温暖化を招く。そこで、化石燃料の代替燃料として、我々は遺伝子導入によりアルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にセルラーゼ生産能を付与し、セルロース系バイオマスからのバイオ燃料の生産を目指している（現在の研究では、バイオエタノール）。本研究では、まず細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型とエキソ型のセルラーゼ (cenA と cex) および酵母 *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のβ-グルコシダーゼ (BGL1) の 3 種類の酵素の生産能を付与することを検討した。*cenA* と *cex* の分泌発現プラスミド pHM1061 は、*cenA* と *cex* を *GAP* プロモーターと *MEL1* 分泌シグナル配列の下流に連結して構築した。また、*BGL1* 分泌発現プラスミド pHM1062 は、*BGL1* を *GAP* プロモーターに連結して構築した。これらのプラスミドを導入した *S. cerevisiae* 二重形質転換体は、コンゴーレッド染色、MUC 発色法、および *p*-NPG 活性から 3 種類の酵素の分泌生産が確認できた。しかし、エンド型セルラーゼ活性 (cenA の活性) は低かった。次に、酵母 *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチルセルラーゼ遺伝子 *CMC1* (cDNA) の分泌発現プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体は、エンド型セルラーゼ活性を強化でき、紙をある程度分解できた。さらに、紙の分解向上のためのセロビオハイドロラーゼの生産、紙からのエタノール生産を検討している。

Recently, it is apprehensive to run out of the fossil fuel and global warming by consumption of the fossil fuel. We aim for production of bioethanol from cellulosic materials by breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae* using genetic engineering. In this study, we investigated production of three types of heterologous cellulolytic enzymes, endoglucanase cenA, exoglucanase cex, both from the *Cellulomonas fimi*, and *β*-glucosidase from the *Saccharomycopsis fibligera* in *S. cerevisiae*. We constructed a plasmid pHM1061 for co-expression of *cenA* and *cex* with the *MEL1* signal sequence for secretion under the control of the *GAP* promoter. A plasmid pHM1062 for expression of *BGL1* under the control of the *GAP* promoter was also constructed. A double transformant of *S. cerevisiae* with these plasmids was produced and secreted three types of cellulolytic enzymes. However, the activity of endocellulase (the cenA activity) was low. The activity of endocellulase was improved by introducing a plasmid pSC7 for expression of the carboxymethylcellulase gene, *CMC1*, from the *Cryptococcus flavus* into the double transformant, and papers were partly degraded.

cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

発表責任者：松崎 浩明（matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3D04-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

低分子リグニン類から *Pseudomonas* sp. ITH-B52 株により生産された有機蛍光物質の検討

Analysis of non-aromatic polymeric substances with fluorescent activities derived from low-molecular-weight lignins produced by *Pseudomonas* sp.ITH-B52.

○村上 詠里子、松藤 寛、岩淵 範之（日大生物資源）
○Eriko MURAKAMI, Hiroshi MATSUFUJI, Noriyuki IWABUCHI (Nihon Univ.)

リグニンは植物細胞壁の 15～30%を占める主要な成分であり、未だ十分に活用されていない天然バイオマスのひとつである。当研究室ではこれまでに、低分子リグニンであるシリンガアルデヒド (SYAL) を基質にして、その分子構造にベンゼン環を含まない世界初の有機蛍光物質 (NAPSFA, non-aromatic polymeric substances with fluorescent activity) を生産する菌株、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を単離し (Iwabuchi et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2015) 、その化学構造、蛍光メカニズムを検討している。そのスクリーニング過程で、ITH-SA-1 株よりも蛍光強度が強い物質を生産する株として、*Pseudomonas* sp. ITH-B-52 株を単離した。本研究では、ITH-B-52 株由来の蛍光物質の化学的性質に検討を加えた。

Pseudomonas sp. ITH-B-52 株を、SYAL を添加した MB 培地で培養し、その培養上清を取得し、凍結乾燥させた後、メタノール抽出画分を取得し、蛍光スペクトルを検討した結果、本サンプルは Ex 355、Em 510 nm の蛍光スペクトルを有していた。次に平均分子量を検討したところ、7.0 kDa と ITH-SA-1 株由来のものと同程度であった。続いて、NMR、ATR/FT-IR 解析した結果、ベンゼン環のシグナルは検出されなかったことから、ベンゼン環を有していないことが示唆された。一方で、本 ITH-B-52 株由来の蛍光物質は、液体状態に加え、固体状態でも蛍光を示すことが示唆された。以上のことから、ITH-B-52 株は、新しい非ベンゼン性の蛍光物質を生産しているものと考えられた。

We have reported that *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 can transform the lignin-derived aromatic compound syringaldehyde (SYAL) into non-aromatic polymeric substances with fluorescent activity (NAPSFA). We subsequently showed that the NAPSFA are produced by a non-biological process. The NAPSFA are particularly rare organic substances that fluoresce despite the absence of aromatic rings. In this study, we report that new NAPSFA produced by *Pseudomonas* sp. ITH-B-52 were found and characterized.

The fluorescent substances of ITH-B-52 exhibited excitation/emission peaks at 355/510 nm, respectively, nearly identical to those of NAPSFA (365/498 nm). The average molecular weight of the fluorescent substances (7.0 kDa) derived from ITH-B-52 was almost the same with that of NAPSFA (7.2 kDa) derived from ITH-SA-1. ATR-FTIR and NMR analyses revealed that signals derived from aromatic rings were not detected. On the other hand, the fluorescent substances derived from ITH-B-52 emitted fluorescence not only in aqueous solution but also in solid-state. These results suggested that new NAPSFA were found.

lignin, biomass, organic fluorescent

発表責任者：岩淵　範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D04-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

木材腐朽菌を用いた竹およびダンチクからのエタノール生産における糖化の改善

Improvement of saccharification in ethanol production from bamboo and giant-reed using wood-decay fungi

○島崎 幹生、堀沢 栄（高知工科大学）
○Motoki Shimasaki, Sakae Horisawa (Kochi University of Technology)

現在、セルロース系原料からのバイオエタノールは地球温暖化防止を目的とする脱化石燃料の観点において、持続可能な燃料として未だ意義が高い。セルロース系原料の生物処理は設備コストが比較的低く環境負荷が小さいものの処理時間が長く、この問題策として、複数の工程を連結して一つの反応槽で生物的に行う一貫バイオプロセス（Consolidated Bioprocess, CBP）があげられる。本研究ではリグニン分解、セルロースの糖化、発酵すべてに関与できる木材腐朽菌を用いた CBP を検討することとした。セルロース原料としては増殖速度が大きく安価で大量に入手できるダンチク（*Arundo donax*）とモウソウチク（*Phyllostachys edulis*）を考えた。木材腐朽菌としては、単糖に対する高い発酵能力から選抜したスエヒロタケ（*Schizophy11um commue*）*NBRC4928* を用いた。これらを用いた発酵試験の結果から、糖化に課題があることが明らかとなったので、本研究では糖化を補うセルラーゼを用いた発酵試験および、酵素処理の効率化のために原料粒径の微細化することによるエタノール収率への影響を検討した。

At present, bioethanol from cellulosic raw materials is still highly significant as a sustainable fuel in terms of fossil-free fuels for the purpose of preventing global warming. Biological treatment of cellulosic raw materials has relatively low equipment cost and low environmental impact, but the processing time is long. One of the solution to this problem is the Consolidated Bioprocess (CBP), where multiple bio-processes are combined together in a single reactor. In this study, we investigated the CBP using *Schizophyllum commue* NBRC4928, a wood-rotting fungus that can be involved in all processes such as lignin degradation, cellulose saccharification and ethanol fermentation, and also employed giant reed (*Arundo donax*) and bamboo (*Phyllostachys edulis*) as feedstocks. To assist in saccharification of feedstocks, cellulase adding in the fermentation chamber and size of materials were examined.

CBP, Schizophyllum commue, Bioethanol

講演番号：3D04-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

Effect of site-directed mutagenesis of *Aspergillus sydowii* feruloyl esterase on substrate preference

○Apisan Phienluphon[1,2], Keiko Kondo[1], Bunzo Mikami[1,3], Takashi Nagata[1,2], Masato Katahira[1,2]
([1]Inst. of Advanced Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Energy Sci., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

Feruloyl esterases (FAEs) are the accessory enzymes that significantly enhance the hemicellulase hydrolytic activity by hydrolyzing the ester-linkage decorated on hemicellulose. FAEs are known for their reactivity on various substrates such as hydroxycinnamate ester and acetyl ester. They are categorized in carbohydrate esterase family 1 together with acetyl xylan esterase (AXE). Although FAE activity is reported thoroughly, the structure of AXE-related FAE has still not been determined. Therefore, this study aims to obtain the three-dimensional structure of FAE of *Aspergillus sydowii* (*As*Fae). *As*Fae was expressed, purified and crystallized. The crystal diffracted to 1.5 Å resolution. The structure was solved by molecular replacement using AXE from *Aspergillus luchuensis* (PDB ID: 5X6S) as the starting model, and refined to residual factors, R_{work} and R_{free}, of 11.34% and 16.13%, respectively. Then a molecular docking program (Autodock Vina) was used to predict a binding pocket for a substrate, methyl ferulate (MFA). Cys39, Glu49, Pro158, and Val163 turned out to be close to MFA, < 4 Å. We substituted these residues by site-directed mutagenesis to investigate the effect on activity toward various substrates. FAE activity assay was then performed using hydroxycinnamate esters, including MFA, and 4-nitrophenyl acetate. Substrate reactivity of the mutants toward both substrates was significantly decreased especially for the Cys39 mutant. Further analysis indicated that some mutants (E49 and P158 mutants) switched the substrate specificity from M*p*CA preferred in wild type to MFA. These results suggested that residues in the binding pocket affect not only the FAE activity but also the substrate preference.

Feruloyl esterase, 3D structure, Site-directed mutagenesis

発表責任者：Apisan Phienluphon（apisan.phienluphon.22c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D04-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

水溶性リグニンを用いたセルラーゼ回収方法の検討

A study of cellulase-recycling process with water-soluble lignin

○西山 竜士、加川 雄介、山田 勝成（東レ株式会社）
○Ryuji NISHIYAMA, Yusuke KAGAWA, Katsushige YAMADA (Toray Industries, Inc.)

酵素法によるセルロース含有バイオマスの糖化プロセスでは、糖製造コストに占めるセルラーゼの使用コストが大きな課題となっている。したがって、当社では、糖化上清中に遊離したセルラーゼを分離膜により回収し、再利用するプロセス技術の構築を行っている。しかしながら、一部のセルラーゼは、バイオマス中のリグニンに吸着するため、更にセルラーゼ回収効率を上げるためには、リグニン吸着からセルラーゼを遊離させる必要がある。

本研究では、セルラーゼの主要成分であるセロビオハイドロラーゼが、CBM（Carbohydrate-Binding Module）を介してリグニンに吸着する性質を利用し、その CBM 部位を水溶性のリグニンによりマスキングする手法を着想した。そこで、セルラーゼ 1 ｇに対して水溶性リグニン 2.5-12.5 ｇを添加し、糖化反応を行った結果、セロビオハイドロラーゼの回収効率が 45%から 51-58%に向上することを見出した。本発表では、リグニンの混合方法、リグニンの種類、バイオマスの前処理方法、およびセルラーゼの種類などがセロビオハイドロラーゼの回収効率に与える影響について紹介する。

In enzymatic saccharification process of cellulosic biomass, cellulase cost is recognized as one of the largest problems. Therefore, we would engineer recycling process system for liberated cellulase in reaction mixture using filtration membrane. However, as a part of cellulase is absorbed to lignin region in cellulosic biomass, cellulase is needed to be liberated from lignin to enhance the recovery efficiency of cellulase.

In this study, we focused on lignin-adsorption characteristics of cellobiohydrolase which is major component of cellulase, and conceived a method for masking of cellobiohydrolase with water-soluble lignin. Then, when cellulase was mixed with water-soluble lignin at a mass ratio of 1:2.5-12.5, the recovery efficiency of cellobiohydrolase increased to 51-58% from 45%. Here, we will report what effect the differences of lignin-mixing methods, lignin types, cellulase types, and biomass-pretreatment methods have on the recovery efficiency of cellobiohydrolase.

cellulase, Lignin, enzyme recycling

発表責任者：西山竜士（ryuji.nishiyama.h6@mail.toray）

講演番号：3D04-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

Effect of weather on Bacterial biomass in Feces of Cows through different Season

○ Abdullatif Shahid, Quac Thinh TRAN, kiwako s ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Universty)

Microorganisms such as bacteria, fungi, protozoa, and viruses live in a host ruminant with cooperative relationship. Some of them are responsible for the conversion of cellulosic materials of plants into short chain volatile fatty acids (VFAs). These VFAs are ultimately converted into energy by fermentation that is fundamental and unique processes of ruminant species. Cows have a very sensitive behavior to heat stress at high temperature humidity index (THI) conditions because cows are unable to deal with heat discharge efficiently and large amount of heat produce in fermentation process. Microorganisms present in feces mixed with soil also play an important role in the circulation of nitrogen, phosphorus, potassium, and other substances in soil. The fecal samples through the seasons, spring, summer, and autumn were directly collected from rectum of total six animals: that is, two from each age group of 10-month, 20-month and 30-month ages. The feed samples along with history of cows and feeding record was also collected. The total amount of bacterial biomass of fecal sample in 30-month age group of animals was (14×10^9 cells/g) which was the highest followed by 20-month age group (9.4×10^9 cells/g) and lowest in 10-month (1.8×10^9 cells/g) in spring. But amount of total bacterial biomass drastically decreases in summer i.e., 6.8×10^8, 5.4×10^8, and 2.4×10^8 cells/g in 30-month,20-month, and 10-month respectively. In autumn total amount of bacterial biomass of fecal sample in 30-month age group of animals was (6.9×10^9 cells/g) which was the highest followed by 20-month age group (5.9×10^9 cells/g) and lowest in 10-month (4.0×10^9 cells/g) was recorded. As for dietary components TC, TN, TP, and TK (total carbon, total nitrogen, total phosphorus, and total potassium) in different feeds of B21, QTI, Grasses and Straw offered to the animals were also analyzed. TC, TN, TP, and TK was measured in each season of fecal sample.TN and TP found low in summer fecal sample as compared to spring sample in all age groups of animals. but TK found high in 10-month age group but in 20-month and 30-month no significant difference was observed in summer and spring fecal sample. Total carbon to total nitrogen ratio (C/N ratio) increased in summer because due to heat stress animals dry matter intake (DMI) decreases and less amount of nutrient is available and suggested may increase the digestion, to maintain the nutrients requirements of body of cows. It is also suggested from this study that weather have a great effect on bacterial biomass of gastrointestinal tract of cow.

Weather, Bacterial biomass, Cows

講演番号：3D04-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム D

Itaconic acid production from hydrolysates of lignocellulosic biomass by recombinant Corynebacterium glutamicum

○Dao Duy Hanh, Hideo Kawaguchi (Kobe Univ. Graduate School of Science, Technology and Innovation)

[Background] Itaconic acid (IA) is an unsaturated dicarboxylic acid, serving as a precursor for bio-based chemicals and materials. IA is produced on a commercial scale from starch of glucose by *Aspergillus terreus.* In this strain, IA is synthesized from *cis*-aconitate in the TCA cycle by cis-aconitate decarboxylase (encoded by *cadA*). Although *A. terreus* shows a high IA productivity from these edible sugars, it is difficult for this strain to produce IA from hydrolysates of inedible lignocellulosic biomass due to high sensitivity to inhibitors contained in the hyrdolysates.

[Aims] To produce IA from hydrolysates of lignocellulosic biomass, *Corynebacterium glutamicum*, which is an industrial working horse for the production of amino acids and value-added chemicals [1,2] and showed a high tolerance to fermentation inhibitors [3], was metabolically engineered to overexpress the *cadA* gene derived from *A. terreus*. Using the metabolically engineered *C. glutamicum* strain(s), IA production from enzymatic hydrolysates of lignocellulosic biomass was examined.

[Results and Discussion] A metabolically engineered *C. glutamicum* expressing *cadA* gene produced IA from glucose (2.42 g/L). This strain also produced IA from enzymatic hydrolysates of sorghum bagasse and kraft pulp at the concentration of 0.98 g/L and 6.7 g/L, respectively, while additional detoxification of lignocellulosic biomass hydrolysate is essential for the IA production by *A. terreus*. The present study suggests that recombinant *C. glutamicum* is suitable for IA production from lignocellulosic without additional detoxification of biomass.

[Acknowledgements] This work was supported by the Environmental Restoration and Conservation Agency, Japan,Grant Number JPMEERF20201005, and by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), Japan, Grant Number JPNP18016.

[References]

(1) Kawaguchi H et al (2015) *Bioresour Technol.,* 198:410-417.
(2) Nag A et al (2021) *Adv Sustain Syst.,* 5:2000193.
(3) Sakai S et al (2007) *Appl Environ Microbiol.,* 73(7):2349-2353.

Itaconic acid, lignocellulosic biomass, Corynebacterium glutamicum

発表責任者：Hideo Kawaguchi（kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3D07-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

Compositional analysis of glycosaminoglycans from several tissues in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)

○ Danang Dwi CAHYADI[1], Munehiro OKAMOTO[2], Katsuhiko WARITA[1], Naoko TAKEDA-OKUDA[3], Jun-ichi TAMURA[3], Yoshinao Z. HOSAKA[1] ([1]Joint Grad Sch Vet Sci, Tottori Univ, [2]Cell Biol, Primate Res Inst, Kyoto Univ, [3]Dept Life, Env Agri Sci, Fac Agri, Tottori Univ)

Glycosaminoglycans (GAGs) are found in various tissues and are involved in many physiological functions. Since the rhesus monkey (*Macaca mulatta)* is the most widely used nonhuman primate in biomedical research, an understanding of the compositions of GAGs in their tissue is important. The aim of the study was to determine the content and sulfation pattern of disaccharides in several tissues of the rhesus monkey. Trachea, gastrointestinal tract (esophagus, stomach, small intestine, large intestine) were collected from both male and female the monkeys, and kidneys were collected only from the female monkey. The chondroitin sulfate (CS)/dermatan sulfate (DS) hybrid chain was extracted from those tissues of female and male. Compositional analysis was performed by using high performance liquid chromatography systems after digestion with chondroitinases ABC and ACI to reveal the sulfation pattern of the CS/DS hybrid chain. Among all types of CS/DS disaccharide units, this study revealed that the major CS/DS disaccharide units present in the tissues were A- and C-types. The ratios of A/C types tend to increase from upper to lower site of the gastrointestinal tissues. In addition, the content of iA-type units CS/DS in gastrointestinal tissue is distributed in a tissue-site-specific manner. Non-sulfated O-type and over-sulfated D- and E-types CS/DS disaccharides were found in a low proportion. In detail, D-type CS/DS disaccharide was not detected in most tissues other than esophagus, while a certain amount of E-type CS disaccharide was specifically distributed in the tracheal tissue.

glycosaminoglycan, rhesus monkey, sulfation pattern

発表責任者：HOSAKA Yoshinao Z.（y-hosa@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3D07-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

Bacteroides ovatus のイヌリン分解におけるジアンヒドリド構造含有生成物の解析

Analysis of dianhydride-containing products from inulin degradation by *Bacteroides ovatus*

○石渡 明弘[1]、志手 由里奈[2]、北原 兼文[2]、田中 克典[1,3,4]、藤田 清貴[2]、伊藤 幸成[1,5] ([1]理研、[2]鹿児島大農、[3]東工大物質理工、[4]カザン大、[5]阪大院理)

○ Akihiro ISHIWATA[1], Yurina SHITE[2], Kanehumi KITAHARA[2], Katsunori TANAKA[1,3,4], Kiyotaka FUJITA[2], Yukishige ITO[1,5] ([1]RIKEN, [2]Fac. Agr., Kagoshima Univ., [3]Sch. Mat. Chem. Tech., Tokyo Tech, [4]Kazan Fed. Univ., [5]Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ.)

【目的】結核菌などの抗酸菌の細胞壁成分のD-アラビノフラノース (Ara*f*) の α-(1→5) 結合を主鎖に持つアラビナン鎖を分解する *Microbacterium* sp. 由来の exo-α-D-arabinofuranosidase[1] の相同タンパク質が、*Bifidobacterium dentium* 由来の酵素群の中から新規に見出された[2]。基質としてα-D-Ara*f* 類似構造の α-D-フルクトフラノシド (Fru*f*) 結合の形成と分解を触媒する新規酵素 (GH172) であり、本酵素によりフルクトビオース (Fru_2) から分子内脱水縮合体が得られることを確認した。今回、イヌリン資化性能のある *Bacteroides ovatus*[3] によるイヌリン分解生成物の解析を行ったので報告する。

【方法と結果】すでに GH172 の Fru_2 の脱水縮合体の構造解析を行い、カラメル化糖からは DHL II (α- D-Fru*f*-(1→ 2': 2→1')-β-D-Fru*p*)が、イヌロビオースからは DFA I (-β-D-Fru*f*) が生じることを見出した。ジアンヒドリド構造の解析を参考に、β-(2→1) 結合を主鎖に持つイヌリン資化性能のある*Ba. ovatus* のイヌリン分解において、これまでに確認されている還元糖[3]以外の分解生成物として分離した２ピークの解析を行ったところ、質量分析において、三糖、四糖の脱水縮合体であることが示唆された。また、NMR 解析を行ったところ、生成物のβ-D-Fru*f* (2→1)構造を主鎖とするオリゴ糖の還元末端二糖として DFA III (α-D-Fru*f*-(1→ 2': 2→3')-β-D-Fru*f*) の形成を確認した。すなわち、資化に関わるイヌリン分解酵素が、DFA III 形成能を持ちあわせる endo 型酵素であることが示唆された。

As the homologue of Microbacterial exo-α-D-arabinofuranosidase,[1] a novel enzyme (GH172) was newly discovered from *Bifidobacterium dentium*[2] and catalyzes the formation and decomposition of α-D-fructofuranoside bonds with a structure similar to α-D-arabinofuranose. This enzyme causes intramolecular dehydration and condensation of fructobioses. Here we would like to report the analysis of inulin degradation products by inulin assimilating *Bacteroides ovatus*.

We analyzed the dianhydride of the fructobiose such as DHL II from caramelized sugar and DFA I from inulobiose[2] obtained by GH172 treatment. Referring to the structural analysis of them, inulin degradation products by *Ba. ovatus* were analyzed. The mass analysis of the separated two peaks indicated the dehydrated tri- and tetra-saccharide and NMR analysis revealed that DFA III (α-D-Fru*f*-(1→2':2→3')-β-D-Fru*f*) was formed at the reducing end in the oligosaccharides concomitant with endo-type enzymatic cleavage.

1) a. Kotani, S. et al., *Biken J.* **1971**, *14*, 379; b. Bhamidi, S. et al. *J. Biol. Chem*. **2008**, *283*, 12992.
2) a. Fujita K., Ishiwata, A., Jp Patent Appl. 2020-055336;
b. Kashima, T. et al., *J. Biol. Chem.* **2021**, DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101324.
3) Zhu, Y. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3007.

Oligosaccharide, Difructose dianhydride, Polysaccharide degrading glycosidase

発表責任者：石渡明弘（aishiwa@riken.jp）

講演番号：3D07-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

Prevotella melaninogenica の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ PM の立体構造

Three-dimensional structure of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM produced by *Prevotella melaninogenica*

大倉 和貴[1]、森 真司[1]、米澤 健人[2]、清水 伸隆[2]、神谷 信夫[1]、宮原 郁子[1]、○伊藤 和央[1] ([1]阪市大・院理、[2]KEK・物構研)
Kazuki OKURA[1], Shinji MORI[1], Kento YONEZAWA[2], Nobutaka SHIMIZU[2], Nobuo KAMIYA[1], Ikuko MIYAHARA[1], ○Kazuo ITO[1] ([1]Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ., [2]IMSS, KEK)

我々が分離・同定した *Prevotella* 属菌株はいずれも Native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを産生する。本研究では、*P. melaninogenica* が産生する酵素(エンド PM)のアイソザイム、エンド PMαの遺伝子組換え体(r エンド PMα)の結晶と溶液の立体構造の解析を行った。r エンド PMαは糖タンパク質から Fuc や Sia の存在に関わらず 2～4 本鎖コンプレックス型糖鎖を特異的に遊離した。r エンド PMαの X 線結晶構造解析によって、分解能 2.1 Åで N 末端側の膜貫通領域以外の 28～1008 アミノ酸残基の立体構造を決定した。r エンド PMαは N 末端側からドメイン I～V で構成され、ドメイン I は(α/β)8 バレル構造で、触媒部位構成アミノ酸 N、E、Y が存在した。ドメイン II～V は異なるβバレル構造で、ドメイン I～III の構造は、他の GHF85 酵素と類似し、ドメイン IV は本酵素特有であった。ドメイン V はタイプ IX 分泌機構の外膜移行シグナルと考えられた。本酵素の結晶構造とコンプレックス型糖鎖とのドッキングモデルから、糖鎖認識部位はドメインIのループ領域と考えられたが、ドメイン IV がシアロ糖鎖の障壁となった。一方、Bio-SAXS 法で得られた本酵素の溶液構造は結晶構造とは異なり、両者の X 線散乱曲線の解析から、溶液中ではドメイン IV の相対配置が変化し障壁が解消され、シアロ糖鎖が結合すると考えられた。

The strains of genus *Prevotella* we isolated produce endo-β-*N*-acetylglucosaminidases releasing *N*-glycans from native glycoproteins. In this research, 3D structure of Endo PMα, an isozyme of Endo PM from *P. melaninogenica* was investigated by X-ray crystallography and Bio-SAXS using recombinant Endo PMα(rEndo PMα). rEndo PMα was specific for *N*-glycans of bi, tri, tetra antennary complex type. 3D structure of rEndo PMα of 28~1008 amino acid residues was constructed using X-ray diffraction data with 2.1Å. rEndo PMα consisted of domains I~V from N-terminal. Domain I was $(\alpha/\beta)_8$ barrel having N, E and Y of proposed catalytic site of GHF 85 enzymes. Domain II~V were βbarrels of different structures. The structure consisted of domain I~III was analogous to other GHF85 enzymes. Domain IV was characteristic of rEndo PMα. Domain V was thought to be the outer-membrane export signal of *P. melaninogenica* type IX secretion system. Docking model of rEndo PMα with *N*-glycan indicates glycan recognition site is located at the loop in domain I although domain IV prevents the interaction with sialo glycan. 3D structure of rEndo PMα in solution determined by Bio-SAXS was different from the crystal structure. Analysis of the X-ray scattering curves of both structures indicates domain IV does not prevent the interaction with sialo *N*-glycan by changing its position in solution.

Prevotella melaninogenica, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM, three-dimensional structure

講演番号：3D07-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

EndoS および EndoS2 の分岐型糖鎖に対する切断活性
Hydrolysis activity of EndoS and EndoS2 toward tri- and tetra-antennary N-glycans
○高島 晶、黒河内 政樹、月村 亘、森 昌子、大隅 賢二、菅原 州一、天野 純子、水野 真盛、高田 美生、松田 昭生（（公財）野口研）
○Shou Takashima, Masaki Kurogochi, Wataru Tsukimura, Masako Mori, Kenji Osumi, Shu-ichi Sugawara, Junko Amano, Mamoru Mizuno, Yoshio Takada, Akio Matsuda (The Noguchi Inst.)

EndoS、EndoS2 は抗体糖鎖を特異的に切断する *Streptococcus pyogenes* 由来のエンドグリコシダーゼで、糖転移活性を発揮するそれらの変異体を含め、近年、抗体糖鎖のリモデリングに活用されている酵素である。ヒト IgG に結合している複合型糖鎖は、通常 2 本鎖糖鎖であるが、我々は糖鎖リモデリング技術を活用して 3 本鎖以上の糖鎖が結合した抗体を調製している（1)。このような分岐型糖鎖に対する EndoS、EndoS2 の活性についての詳細は不明であったため、今回、その解析を試みた。その結果、抗体上に *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 GnT-V を用いて形成した GN3a 型の 3 本鎖糖鎖については、EndoS2 はこれを効率よく切断したが、EndoS は反応条件次第でわずかに切断する程度だった。一方、GnT-IV を用いて形成した GN3b 型の 3 本鎖糖鎖や GN4 型の 4 本鎖糖鎖については、両酵素ともほとんど切断しなかった。抗体上に *N*-アセチルグルコサミン転移酵素を用いて分岐型糖鎖を形成する際、これらの性質を利用して、例えば GN4 型糖鎖では、未反応の GN3a 型糖鎖を EndoS2 で切断除去することにより、目的とする 4 本鎖糖鎖をもつ抗体の分離精製を容易にすることができた。
(1) S. Takashima et al. *Glycobiology* **31**, 1401-1414 (2021)

EndoS and EndoS2 are endoglycosidases that hydrolyze *N*-glycans on IgG specifically. These enzymes, including their glycosynthase mutants, are used for *N*-glycan remodeling of IgG. In general, the complex-type *N*-glycans on human IgG are bi-antennary *N*-glycans. However, we prepared IgGs with multibranched complex-type *N*-glycans using the *N*-glycan remodeling technique (1). The substrate specificities of EndoS and EndoS2 toward multibranched *N*-glycans on IgG have not been investigated in detail yet, so we analyzed them in this study. As a result, EndoS2 was able to hydrolyze the GN3a-type tri-antennary *N*-glycan, which was synthesized by GnT-V, but EndoS hydrolyzed it only slightly. On the other hand, both enzymes hardly exhibited activity toward the GN3b-type tri-antennary *N*-glycan, which was synthesized by GnT-IV, and the GN4-type tetra-antennary *N*-glycan. We utilized these enzymatic properties for efficient preparation of IgGs with multibranched *N*-glycans.
(1) S. Takashima et al. *Glycobiology* **31**, 1401-1414 (2021)

endoglycosidase, antibody, N-glycan

発表責任者：高島　晶（staka@noguchi.or.jp）

講演番号：3D07-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

人工糖鎖基質を用いた EDEM2 の基質特異性の検討

Substrate analysis of EDEM2 by using artificial oligomannose-type glycan substrates

○青木 涼馬[1]、菊間 隆志[1]、伊藤 幸成[2]、武田 陽一[1] ([1]立命館大院生命、[2]阪大院理)
○Ryoma Aoki[1], Takashi Kikuma[1], Yukishige Ito[2], yoichi Takeda[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Osaka Univ.)

小胞体ではタンパク質が様々な修飾を受け、正しくフォールディングされるよう厳密な品質管理が行われている。正しい高次構造をとったタンパク質はゴルジ体に輸送され、正しい構造をとることができなかったタンパク質はプロテアソームで分解される。糖タンパク質においてミスフォールディングタンパク質は N 型糖鎖のマンノース残基が段階的にトリミングされることで小胞体関連分解(ER associated degradation ： ERAD)経路に向かうと考えられている。最近、GH47 ファミリーに属する EDEM2 がチオレドキシン様タンパク質 TXNDC11 とともに特定のマンノースをトリミングすることが明らかにされたが、基質特異性やアグリコン特異性などにおける糖鎖認識に関してはよくわかっていない。これらを明らかにするためには糖鎖基質が不可欠である。本研究では還元末端にアスパラギン残基を有するオリゴマンノース型糖鎖 (Man9GlcNAc2) に種々の分子を修飾した人工糖鎖基質を合成し、基質特異性を評価した。

In eukaryotes, most of the polypeptides synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) are glycosylated. Glycoprotein quality control system in the ER, correctly folded glycoproteins destined for delivery to the Golgi apparatus, however, misfolded glycoproteins are gradually demannosylated by ER mannosidase and delivered to the cytosol for ER-associated degradation and exported into the cytosol and degraded by the proteasome. Recently, it was revealed that EDEM2, which is a member of the GH47 family trims a specific mannose in collaboration with the thioredoxin-like protein TXNDC11. However, detailed aglycon specificity remains obscure. In this study, In this study, the substrate specificity was evaluated using artificial substrates in which asparagine residue at the reducing end of the oligomannose-type oligosaccharide (Man9GlcNAc2) was modified by several molecules.

endoplasmic reticulum, EDEM2, glycoprotein

発表責任者：武田陽一（yotakeda@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3D07-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

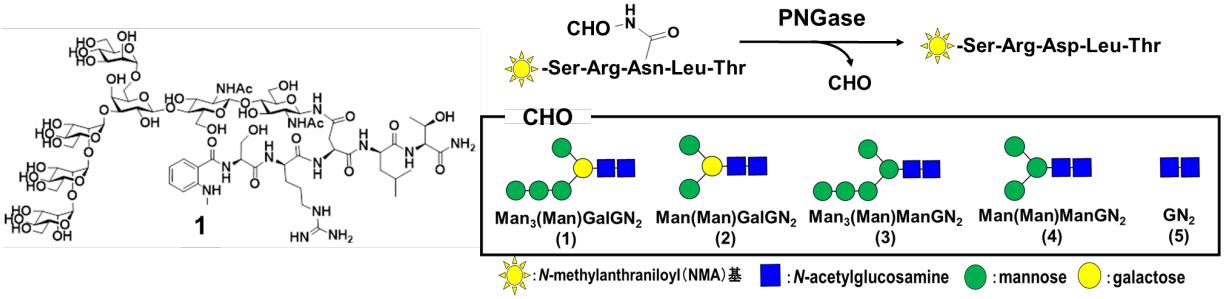
PNGase 活性検出に向けた非天然型 7 糖ペプチドの合成と評価

Synthesis and Evaluation of Glycopeptide Carrying Unnatural Heptasaccharides for PNGase activities

○高橋 諭[1]、石井 希実[1]、佐野 加苗[1]、内林 達也[2]、高橋 剛[1]、佐藤 匡史[3]、矢木 宏和[3]、加藤 晃一[3,4]、鈴木 匡[5]、松尾 一郎[1]（[1]群大院・理工、[2]群大・理工、[3]名市大院・薬、[4]自然科学研究機構 ExCELLS、[5]理研）

○Satoshi TAKAHASHI[1], Nozomi ISHII[1], Kanae SANO[1], Tatsuya UCHIBAYASHI[2], Tsuyoshi TAKAHASHI[1], Tadashi SATO[3], Hirokazu YAGI[3], Koichi KATO[3,4], Tadashi SUZUKI[5], Ichiro MATSUO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Gunma Univ., [2]Sch. Sci. Technol., Gunma Univ., [3]Pharm. Sci., Nagoya City Univ., [4]ExCELLS/IMS, Nat. Inst. Nat. Sci., [5]RIKEN.)

細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼ（PNGase）とは、糖タンパク質上の*N*-結合型糖鎖の脱グリコシル化を担う酵素であり、真核生物に広く保存されている[1]。細胞内のPNGase活性を検出するためには、*N*-結合型糖鎖を基質とするエンドβ-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）活性と区別する必要があるが、PNGase活性のみを簡便に検出することは容易ではない [2]。我々は、ENGaseが*N*-結合型糖鎖のコア 5 糖構造のβ-マンノース残基部分をβ-ガラクトース残基に変換した 4 糖誘導体を糖転移反応の基質としないことを見出している [3]。この知見をもとにコアの分岐部分をβ-ガラクトース残基に変換した糖鎖は、PNGaseには切断されるがENGaseには認識されないと考えた。そこで、非天然型 7 糖ペプチド **1** および 5 糖ペプチド **2** と天然型の*N*-結合型糖鎖構造を有する 7 糖ペプチド **3** および 5 糖ペプチド **4**、キトビオース構造を有する糖ペプチド **5** を合成し、由来の異なるPNGaseとENGaseに対する反応性の差を比較した。その結果、糖ペプチド **1** は、予期した通りENGaseには切断されず、PNGase活性のみを選択的に検出できることを確認した。



Cytosolic peptide:*N*-glycanase (PNGase) is a widely conserved eukaryotic enzyme responsible for deglycosylation of *N*-linked glycans on glycoproteins [1]. To selectively detect the PNGase activity in the cytosolic fraction, we designed glycan structures that are resistant to endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) activity [2]. Based on our previous studies of the substrate specificity of ENGase [3], we synthesized an unnatural type of heptasaccharide glycopeptide **1**. In addition, we synthesized glycopeptides **2**~**5** carrying different glycan structures. In this presentation, we will discuss the substrate specificity of PNGase and ENGase toward these synthetic glycopeptides.

[1] T Suzuki *et al.*, *FASEB J.*, 2002, **16**, 635. [2] H Hirayama *et al.*, *Glycobiology,* 2021, *in press*.
[3] N Ishii *et al.*, *ChemBioChem*, 2018, **19**, 136.

PNGase, glycopeptide, *N*-glycan

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3D07-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

分裂酵母糖鎖における β ガラクトース転移反応の分子メカニズムの解明

Analysis of proteins involved in the biosynthesis of pyruvylated galactose in *Schizosaccharomyces pombe*

○福永 嵩大[1]、田中 直孝[2]、古本 敏夫[2]、中北 愼一[3]、大橋 貴生[4]、樋口 裕次郎[1]、前川 裕美[1]、竹川 薫[1] ([1]九州大農、[2]香川大農、[3]香川大総合生命、[4]摂南大理工)

○Takamasa FUKUNAGA[1], Naotaka TANAKA[2], Toshio FURUMOTO[2], Shinichi NAKAKITA[3], Takao OHASHI[4], Yujiro HIGUCHI[1], Hiromi MAEKAWA[1], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Kyushu Univ. Faculty of Agriculture., [2]Kagawa Univ. Faculty of Agriculture., [3]Kagawa Univ. Life Science Research Center., [4]Setsunan Univ. Department of Life Science.)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の細胞表層には末端にガラクトース(Gal)が付加した糖鎖が存在する。Gal は *N* 結合型糖鎖、*O* 結合型糖鎖の両方に存在するが、この内 *N* 結合型糖鎖に含まれる Gal はさらにピルビン酸転移酵素 Pvg1 によるピルビン酸化を受ける。我々はこれまでに糖鎖中のピルビン酸化 Gal が非性的凝集等の同種間認識に関与することを報告している(1)。また、ピルビン酸化を受けるのは *N* 結合型糖鎖側鎖の Galβ1,3-のみであり、野生株では全ての βGal がピルビン酸化される(2)。分裂酵母において、糖鎖中に β1,3-Gal が付かない変異株が取得され、β1,3-Gal 転移反応に関与する Pvg2, 3, 5 が同定されたが(3)、詳細については不明であるため、Pvg2, 3, 5 について解析を行った。３つのタンパクは全て膜貫通ドメインを有しており、ゴルジ体に局在することが明らかになった。また、Pvg3 については糖転移酵素に保存されているドメインを有していることがわかった。そこで、Pvg3 が Gal 転移酵素であると予想し、活性に重要と考えられるアミノ酸の点変異体(Pvg3 D212,D282)を作製して Δ*pvg3* に対する機能相補試験を行った結果、これらの変異体は正常にゴルジ体に局在したが、細胞表層のピルビン酸を欠失したままだった。そのため、Pvg3 はピルビン酸化に必須の βGal 転移酵素であり、活性を示すためには D212,D282 が必要であることが明らかになった。

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, pyruvylated galactose (PvGalβ) residues are transferred to *N*-glycan. The pyruvylated galactomannans of *S. pombe* are important for non-sexual aggregation (1). Since pyruvyltransferase exhibits β-galactose-specific activities, β-galactosylations play an essential role for pyruvylation (2). Restoration of the cell surface negative charge by complementation with an *S. pombe* genomic library led to the identification of genes involved in Galβ biosynthesis (*pvg2,3,5*) (3). However, how biosynthesing of Galβ residues starts in the cells has been unclear. $pvg3^{+}$ encodes protein with a conserved domain of the glycosyltransferase family 31 (GT31). To determine the functions of GT31 domain of Pvg3, we constructed Pvg3-GFP with mutations D213A and D282A (DXD motif and GT-A fold mutants respectively). D213A $pvg3^{+}$ and D282A $pvg3^{+}$ did not rescue negative charge level deficiency of Δ*pvg3* cells. Therefore, we revealed that D213 and D282 were required for β-galactosyltransferase activities of Pvg3, which was essential for pyruvylation.

1)Matsuzawa T et al. FEMS Yeast Res. 13, 259-266 (2013).
2) Gemmill, T. R. and Trimble, R. B. J. Biol. Chem. 271, 25945-25949(1996).
3)Andreishcheva E N et al. J. Biol. Chem. 279, 35644-35655 (2004).

Glycobiology, pyruvylation, galactosyltransferase

発表責任者：福永嵩大（fa41119@agr.kyushu-u.ac.jp）

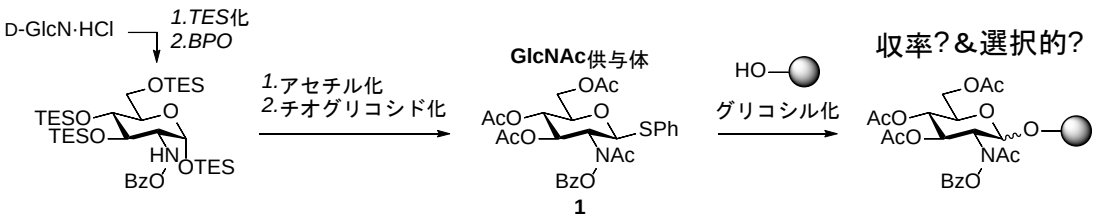
講演番号：3D07-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

N-ベンズオキシ修飾を有する新奇 *N*-アセチルグルコサミン供与体の開発とグリコシル化反応への応用

Development of novel *N*-acetylglucosamine donor with *N*-benzoxy modification and its application to glycosylation reactions

○浅野 剛志[1]、河村 奈緒子[2]、今村 彰宏[1,2,3]、石田 秀治[1,2,3,4]、安藤 弘宗[2,3]、田中 秀則[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・iGCORE、[3]岐阜大院・連合農学、[4]岐阜大・G-CHAIN）
○ Tsuyoshi ASANO[1], Naoko KOMURA[2], Akihiro IMAMURA[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2,3,4], Hiromune ANDO[2,3], Hide-Nori TANAKA[2] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ., [3]United Grad. Sci. Agr. Sci., Gifu Univ., [4]G-CHAIN, Gifu Univ.)

【背景・目的】糖鎖合成において糖と糖を繋ぐグリコシル化反応は最も重要な反応である。近年、保護基を利用した立体選択的なグリコシル化反応の開発が目覚ましい進展を遂げつつある。一方で、グルコサミンやガラクトサミンなどのアミノ糖のアミノ保護基においては、糖鎖合成で実用的に使用できるものはアシル系、カーバメイト系、アジドと限られている。我々は、アミノ糖におけるアミノ保護基の選択肢の拡充を狙い、これまで糖化学で保護基として利用されていなかったアミノオキシ官能基に着目した。窒素-酸素結合はグリコシル化や保護・脱保護条件において安定であるだけでなく、還元条件で化学選択的に切断できるため、アミノオキシ官能基は糖鎖合成に適した保護基である。加えて、酸素・窒素の両原子の保護様式をファインチューニングすることで、グリコシル化反応の精密な立体制御が実現できる可能性がある。そこで我々は、本コンセプトの実現可能性を探るため、2 位にアミノオキシ官能基を有する *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）供与体を合成し、グリコシル化反応での反応性及び立体選択性を検証することを目的とした。【方法・結果】グルコサミンのアミノ基に酸素原子を効率的に導入するため、ジアシル過酸化物を利用した合成経路を立案・実施した。グルコサミン塩酸塩を出発物質とし、水酸基の TES 化後に過酸化ベンゾイル（BPO）との反応に供することで、良好な収率でベンゾキシ基の導入に成功した。続いて、アセチル化、チオグリコシド化を行い、4 段階で GlcNAc 供与体 **1** を合成した。本講演では、**1** を用いたグリコシル化反応の検証結果も併せて報告する。



Glycosylation is the most important reaction in carbohydrate chemistry. Stereoselective glycosylations utilizing protecting groups have been intensively developed. Regarding the protection for the amino group of amino sugars including glucosamine and galactosamine, practical options in glycan synthesis are limited to acyl-type, carbamate-type, and azido group. To expand the scope of the protection, we focused on aminooxy functional groups, which have never been used as protecting groups in carbohydrate chemistry. The aim of this study is to synthesize *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) donor with a *N*-benzoxy group and to investigate its reactivity and stereoselectivtity in glycosylation.

For efficient installation of an oxygen atom into the amino group of GlcN, a synthetic pathway using diacyl peroxide was employed. We prepared GlcNAc thioglycoside donor **1** having a benzoxy group from GlcN hydrochloride in 4 steps including reaction using benzoyl peroxide. Herein, we report detail results of glycosylation using **1**.

protecting group, aminooxy group, glycosylation

発表責任者：田中秀則（htanaka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3D07-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

完全なα選択性を示す Kdo グリコシド化法の開発とその利用

Development and application of a method for fully α-selective Kdo glycosidation

○浜島 将伍[1,2]、野口 晴佳[3]、河村 奈緒子[4]、田中 秀則[2,4]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2,4,5]、一柳 剛[3]、安藤 弘宗[2,4]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・連合農学、[3]鳥取大・農、[4]岐阜大・iGCORE、[5]岐阜大・G-CHAIN）

○Shogo HAMAJIMA[1,2], Haruka NOGUCHI[3], Naoko KOMURA[4], Hide-Nori TANAKA[2,4], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,4,5], Tsuyoshi ICHIYANAGI[3], Hiromune ANDO[2,4] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]United Grad. Sci. Agr. Sci., Gifu Univ., [3]Fac. Agr., Tottori Univ., [4]iGCORE, Gifu Univ., [5]G-CHAIN, Gifu Univ.)

【目的】ケトアルドン酸の一種である3-Deoxy-D-*manno*-2-octulosonic acid (Kdo) は、グラム陰性菌が有するリポ多糖の内部コア領域基底部を普遍的に構成する鍵糖残基である。この領域に存在するKdo α-グリコシドは免疫学的な作用の観点などから近年注目されており、その機能解明には化学的合成による研究試料の安定的供給が肝要である。そのため、これまでに様々なα選択的Kdoグリコシド化法の開発が行われてきたが、従来法には基質や反応条件が立体選択性に大きく影響を与えるという共通の課題が残されている。そこで本研究では、完全なα選択的Kdoグリコシド化法の開発を目的とした。

【方法・結果】Kdo とシアル酸の構造的な類似点から、本研究では当研究室で近年確立した完全なα選択的シアロシド化法である「二環性シアル酸供与体」を用いる方法[1]を Kdo に応用した「二環性 Kdo 供与体」の構造が縮合反応に与える影響を検証することとした。昨年度大会では供与体が有する大員環の員数の最適化、脱離基の検討、基質適用範囲の検証について報告したが、本年度大会では後二者について新たに得られた結果を報告する。さらに、本供与体を用いた Kdo ダブルグリコシド化や保護様式の異なる供与体を利用することにより、複数の天然に存在する Kdo 含有糖鎖骨格を高収率で構築し、脱保護を行った。それらの結果についても併せて報告する。

3-Deoxy-D-*manno*-2-octulosonic acid (Kdo), a ketoaldonic acid, mainly constitutes the inner core region of bacterial lipopolysaccharides. Kdo glycosides in this region are the attractive targets for the development of immunoreagents and vaccines. Since Kdo glycosides dominantly exist in nature as the α-anomer, various methods for α-selective glycosidation of Kdo have been developed. However, the stereoselectivity of the Kdo glycosidation methods varies depending on the substrates and reaction conditions. Herein, we report a method for fully α-selective Kdo glycosidation by utilizing a bicyclic ring system[1].

We have already reported the optimization of the size of the macrolactone ring in the bicyclic Kdo donor, the evaluation of leaving groups, and the verification of the substrate scope in the last annual meeting. Herein, we report the new results obtained in the latter two subjects. As for leaving groups, the bicyclic donor with the SEt group gave the best result among five kinds of donors evaluated in this study. The optimized donor was glycosidated with various acceptors for verifying the substrate scope to produce α-glycosides in high yields with full stereoselectivity. Moreover, we have achieved the synthesis of naturally occurring Kdo-containing oligosaccharides by utilizing double Kdo glycosidation with the bicyclic donor or using a modified one bearing a selective removal protecting group for the chain elongation.

[1] Komura, N. *et al. Science* **2019**, *364*, 677-680.

Kdo, α-glycosidation, bridgehead cation

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3D07-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

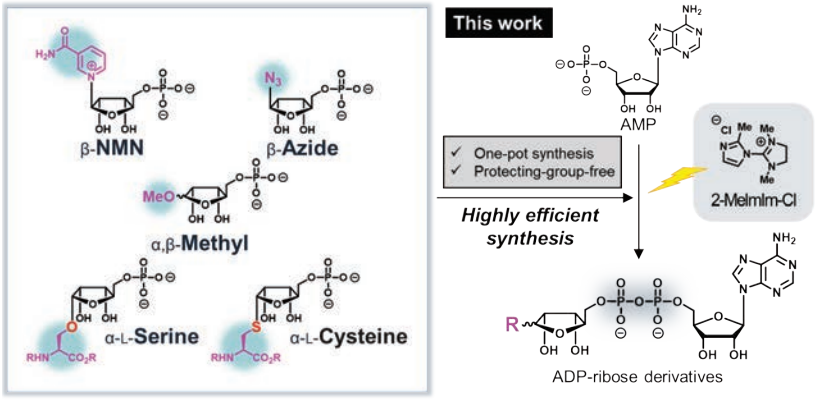
リン酸クロスカップリング反応による ADP リボース分子の高効率合成

Highly efficient synthesis of ADP-ribose molecules through phosphate cross-coupling reaction

○萩野 瑠衣[1,2]、河村 奈緒子[3]、今村 彰宏[1,2,3]、石田 秀治[1,2,3,4]、安藤 弘宗[2,3]、田中 秀則[2,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大院・連合農学、[3]岐阜大・iGCORE、[4]岐阜大・G-CHAIN）
○Rui HAGINO[1,2], Naoko KOMURA[3], Akihiro IMAMURA[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2,3,4], Hiromune ANDO[2,3], Hide-Nori TANAKA[2,3] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ., [3]iGCORE, Gifu Univ., [4]G-CHAIN, Gifu Univ.)

【背景・目的】ADP リボシル化はアミノ酸残基に ADP リボースを付加する翻訳後修飾であり、DNA 修復や転写など重要な生命現象に関与している。これまで ADP リボシル化修飾の重要性は広く研究されてきたが、本翻訳後修飾の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。本研究領域の進展の妨げとなっているのが、天然から構造均一な ADP リボース分子を研究試料として供給することが難しいことが挙げられる。そこで本研究では、リン酸クロスカップリング反応によるピロリン酸結合形成を鍵とした天然型及び非天然型 ADP リボース分子の高効率的合成を目的とした。

【方法・結果】ビルディングブロックである各種リボース-5-リン酸誘導体と AMP とのリン酸クロスカップリング反応による連結で ADP リボース分子の高効率合成を達成する。効率的なリン酸クロスカップリング反応のために、既知のリン酸基活性化剤（Hindsgaul *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**）の加水分解耐性を向上させた 2-MeImIm-Cl を開発した。本講演では、リン酸クロスカップリング反応による ADP リボース分子合成の結果を報告する。



ADP-ribosylation, one of post-translational-modifications, plays an important role in a variety of cellular processes including DNA repair and transcriptional regulation. Its biological importance has been widely investigated, however, detail functions remain poorly understood. The main difficulty in the molecular level research is to obtain homogeneous ADP-ribosylated samples. The aim of this research is to establish a simple and highly efficient synthesis of natural and unnatural ADP-ribose molecules through pyrophosphate formation by phosphate cross-coupling reaction.

For efficient phosphate cross-coupling reaction, we developed 2-MeImIm-Cl that is a highly hydrolysis-resistant activator of phosphate groups in comparison with ImIm-Cl originally reported by Hindsgaul *et al.* (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**). Herein we report detail results of synthesis of ADP ribose molecules by phosphate cross-coupling reactions.

ADP-ribosylation, Phosphate cross-coupling reaction, Pyrophosphate formation

発表責任者：田中秀則（htanaka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3D07-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム D

新規保護様式を利用したフコース含有糖アミノ酸 4 糖の合成研究

Synthetic study of fucosylated glycoamino acid by a novel protection scheme

○朝比奈 雄也、北條 裕信（阪大蛋白研）
○Yuya Asahina, Hironobu Hojo (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

D-フコースは、糖タンパク質糖鎖の構成単糖の１つであり、哺乳細胞ではα-1,6 結合を介して N-結合型糖鎖の還元末端側によく見いだされる。フコースは、6 位がデオキシ化特有の構造を持ち、このデオキシ構造のため、酸性条件下でグリコシド結合が容易に開裂する。この酸不安定性は、フコース含有糖ペプチドの化学合成の際に問題となる。なぜなら、ペプチド固相合成の最終段階では、強酸であるトリフルオロ酢酸（TFA）で脱保護を必ず行う必要があり、この条件下では、フコースのグリコシド結合の分解が予想されるためである。そこで我々は、前年度大会にて、フコース水酸基の保護基様式によりフコシド結合に酸安定性を付与する試みを報告した。その結果、糖水酸基に、TFA 感受性保護基と、電子求引性の保護基であるレブリノイル（Lev）基を組み合わせて導入すると、TFA 中での安定性が大きく向上し、フコースの欠損なく糖ペプチドが得られることがわかった。加えて、この Lev 基は、中性条件下でヒドラジンを作用させることで、副反応なく糖ペプチドから除去することもできた。本方法により、最も単純な Fuc-α-(1-6)-GlcNAc 構造を有する２糖含有糖ペプチドの合成に成功している。これら研究成果を基に、本研究では、フコース２つ含有する、より複雑な構造の N-結合型４糖アミノ酸の合成研究について報告する。

D-Fucose is one of monosaccharide in components of mammalian glycoprotein that links to reducing terminal of N-glycan via α-1,6 linkage. Due to 6-deoxy structure of fucose, its glycosidic linkage is highly unstable under acidic conditions. This low stability to acid makes a peptide synthesis containing fucose difficult, because the solid-phase method necessitates strong acid using trifluoroacetic acid for deprotection at the end of the peptide synthesis, which results decomposition of the fucosidic linkage. To overcome this problem, in the last symposium, our group reported a novel protection scheme of fucose alcohol for the glycopeptide synthesis. The protection scheme using TFA labile protecting groups and levulinoly (Lev) group stabilized the fucosidic linkage during TFA treatment to efficiently give the glycopeptide. Additionally, Lev group was successfully removed by hydrazine under neutral conditions without any side reactions. As a result, we succeeded in the synthesis of the glycopeptide containing Fuc-α-(1-6)-GlcNAc disaccharide. Based on these results, in this study, we report synthesis of another glycopeptide having more complex glycan tetrasaccharide.

Fucose, Glycopeptide, TFA-labile protection

発表責任者：朝比奈雄也（asahina@protein.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3D09-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

耐熱化変異酵素のハイスループット創出を可能にする好熱菌継代培養法の開発

Optimized culture method for high-throughput generation of thermostable enzyme variants in an error-prone thermophile

○吉村 俊祐[1]、服部 大河[1]、吉村 徳洋[2]、髙田 真穂[2]、河本 真依[2]、大城 隆[2]、鈴木 宏和[2]([1]鳥取大院・持続創生、[2]鳥取大・工)

○Shunsuke YOSHIMURA[1], Taiga HATTORI[1], Norihiro YOSHIMURA[2], Mao TAKATA[2], Mai KAWAMOTO[2], Takashi OSHIRO[2], Hirokazu SUZUKI[2] ([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sei., Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ.)

有用酵素の耐熱化変異体を簡単に創出できれば，酵素の産業実用は加速する。そのための技術として我々は，高変異性好熱菌（*Geobacillus kaustophilus* MK480）を利用した耐熱化指向性変異を研究しており，これまでに本手法によって枯草菌の核酸合成酵素（$PyrF_A$）の耐熱化変異体（$PyrF_V$）を創出した。本研究では MK480 株の変異特性を詳細に解析し，それを用いた変異発生法を最適化することを目的とした。変異発生の解析には，*pyrF*$_A$ 遺伝子をもつ高変異性株（MK494）と安定株（MK503）を利用した。両株は高温下でウラシル要求性であるが，*pyrF*$_V$ 遺伝子が発生するとウラシル原栄養性となる。MK503 株からウラシル原栄養性株は培養 2 日目から発生し，その頻度は 10^7 細胞に 1 つほどだった。ゲノム配列を調べたところ，前培養過程では変異が発生しなかったのに対し，ウラシル原栄養性株には *pyrF*$_V$ 変異に加えて 3 ヶ所の変異が見られた。本結果は，ウラシル飢餓中に変異が発生したことを示唆する。MK494 株からのウラシル原栄養性株は培養 1 日目から発生し，その頻度は 10^6 細胞に 1 つほどだった。ゲノム解析を行ったところ，前培養過程で 32 ヶ所の変異が発生していた。よって MK494 における高効率な変異発生は，前培養中における自然変異に依存していると考えられる。以上の結果から，ウラシル飢餓と増殖性の培養を繰り返すことが MK480 における変異発生に有効であると結論した。現在，この変異発生法によって新たな耐熱化酵素を創出できるか検証している。

We have studied efficient approaches to generate thermostable variants from thermolabile proteins in an error-prone thermophile (*G. kaustophilus* MK480). In a previous study, this approach was used to generate a thermostable variant ($PyrF_V$) of a pyrimidine biosynthetic enzyme from *B. subtilis* ($PyrF_A$). This study was conducted to analyze mutagenesis profiles in MK480 strain and to optimize the process that generates thermostable variants. The mutagenesis analysis was performed using two strains carrying the *pyrF*$_A$ gene: error-prone strain (MK494) and genetically stable strain (MK503). Both were auxotrophic for uracil but could become uracil prototrophy when *pyrF*$_A$ was mutated to generate *pyrF*$_V$. The prototrophs from MK503 strain occurred with an efficiency of 10^{-7} cells following 2-days incubation. Genome analysis suggested that mutations occur under uracil starvation but not during preculturing. In MK494 strain, mutations efficiently occur during preculturing. Therefore, it is likely that MK494 strain efficiently generate mutations via repeated cultures under normal growth and uracil starvation conditions. Currently, generation of a new thermostable variant has been examined using this mutagenesis approach.

engineering, directed evolution, mutagenesis

講演番号：3D09-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

Decoration of GII.4 Norovirus-like Particles via SpyTag/SpyCatcher Bioconjugation System for a Modular Protein-displaying Platform

○Jirayu Boonyakida[1], Fahmida Nasrin[2], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Recombinantly expressed VP1 of norovirus can lead to the self-assembly of norovirus-like particles (NoV-LPs). The VLPs are an attractive biomaterial for displaying foreign amino acid sequences on the exposed surface. By combining NoV-LP with SpyTag/SpyCatcher (SpT/SpC) bioconjugation system, we intended to develop a modular display platform for antigen presentation. SpyTag peptide was introduced to the C-terminal of the VP1, named VP1(c-SpT). In silkworm, these native VP1 and VP1-SpyTag variants were expressed using the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) bacmid expression system. We recently demonstrated that the tag-free norovirus VP1 formed the VLP when recombinantly expressed in silkworm larvae. The highly purified NoV-LPs could be obtained from the two-step purification [1]. We then applied the published technique for this study.

The VLPs were collected from silkworm fat body lysate by sucrose density gradient ultracentrifugation and were further purified using the Ni-NTA column. The morphology and size of the purified VLPs were examined using TEM and DLS. To demonstrate the norovirus-based particle as a functional modular protein-displaying platform, EGFP and/or mCherry were displayed on the particles. The conjugation efficiency was ~65% upon the addition of SpC::EGFP. Bivalent displaying of EGFP/mCherry on the VLPs was additionally determined through the Förster resonant energy transfer (FRET) technique. A single VLP with multiple proteins or ligands may be further applied as a platform for vaccine development or functional nanoparticles.

Reference:

[1] Boonyakida, J., *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 190: 106010 (2022)

silkworm, norovirus, virus-like particle

講演番号：3D09-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

Co-expression of dengue virus structural proteins serotype 1‐4 in silkworm larvae, and its capability inducing a humoral immune response in a mouse model

○ Doddy Irawan Setyo UTOMO[1], Sabar PAMBUDI[2], Enoch Y PARK[1,3] ([1]Laboratory of Biotechnology, Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan, [2]Center of Pharmaceutical and Medical Technology, National Research and Innovation Agency, Jl. Kawasan Puspiptek, Gedung I LAPTIAB, Kota Tangerang Selatan, Banten 15314, Indonesia, [3]Laboratory of Biotechnology, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan)

Dengue fever is the most common mosquito-borne arboviral disease in the world to date, and it is a major cause of morbidity. Though infection with one of the four serotypes may provide long-term resistance to homotypic re-infection, the secondary infection of heterotypic is known to increase the chance of severe disease. As a result, vaccine development efforts have been focused on creating a tetravalent vaccine capable of giving long-term protection against all four dengue virus (DENV) serotypes.

The capsid (C), premembrane (prM), and envelope (E) of cDNAs of DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 were inserted into the pFastbac1 vector, followed by transformation to *Escherichia coli*, BmNPV/1CprM/E, /1prM/E, /2CprM/E, /2prM/E, /3CprM/E, /3prM/E, 4CprM/E, and /4prM/E bacmids, respectively, were obtained. The mixed BmNPV/CprME1–4 and /prME1–4 bacmids were co-injected into 5th instar silkworm larvae, and their hemolymph was collected. These proteins were purified using affinity chromatography and confirmed with specific serotype monoclonal antibodies, anti-E-DENV-1 E29 clone, Anti-E DENV-2 3H5-1 clone, anti-E DENV-3 E1 clone, and anti-E-DENV-4 E42 clone. The morphological analysis was done by TEM and immuno-transmission electron microscopy (IEM). The display of EDIII (Envelope Domain III) region on the surface of the dengue virus-like particles (DENV-LPs) was confirmed by heparin-binding assays using ELISA and isothermal titration calorimetry assay (ITC). Mice immunization with each DENV-LPs significantly elicit the specific antibody.

The purified polypeptides formed spherical DENV-LPs with approximately 30–55 nm in diameter. The IEM images revealed antigens on the surface of a lipid bilayer of DENV-LPs. The heparin-binding assay by ELISA shows a positive relationship between absorbance and the quantity of E protein, which was supported by the ITC, demonstrating a moderate binding affinity between heparin and DENV-LP. The high correlation between patient sera and DENV-LP reactivities revealed that these DENV-LPs shared similar epitopes with the natural dengue virus. IgG elicitation studies in mice demonstrated that both DENV-LPs could generate IgG antibodies and specific binding to their antigens.

dengue, virus-like particles, silkworm

発表責任者：Enoch Y Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D09-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

耐熱化抗体

Heat-resistant antibodies

○吉浜 麻生[1]、児玉 晃[1]、仲嶺 三代美[1]、祝嶺 陽子[1]、久保田 智巳[2]、小河 晋悟[1]、石川 一彦[2] ([1]リムコ株式会社、[2]産業技術総合研究所)
○Maki YOSHIHAMA[1], Akira KODAMA[1], Sayomi NAKAMINE[1], Youko SHUKUMINE[1], Tomomi KUBOTA[2], Shingo OGAWA[1], Kazuhiko ISHIKAWA[2] ([1]Rimco corporation, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

【背景と目的】エイズ（Human immunodeficiency virus : HIV）感染診断のための検査キットとして，リムコ㈱では　HIV p24 抗原を高感度に且つ特異的に検出する HIV 抗体を取得し、HIV 定量キットとして上市済みである(1)。本キットは当該抗体の熱安定性を考慮すると、流通および保管時における低温温度管理が必須である。しかし、厳密な温度管理が困難な新興国および流通期間が長期化する場合、検査キットの機能劣化に繋がる。そこで、温度管理不要な検査キットの構築を目的とし、熱安定性のボトルネックである抗体の耐熱化改良をタンパク質工学的に行った。

【方法と結果】HIV p24 抗体を哺乳類培養細胞および遺伝子組み換えカイコを用いて発現・精製し、ELISA 法を用いて抗原に対する結合能および熱安定性評価を行った。抗体の耐熱化設計はアミノ酸配列の相同性比較から基本となる立体構造を予測、タンパク質構造の基本原理を参考に行った。抗体の機能を低下させることなくタンパク質工学的手法でアミノ酸変異導入を行った。その結果、天然型抗体は 65℃で 80 分加熱処理することで活性は 15%以下に低下したが、抗体長鎖の Fab 領域の一部に SS 結合を導入することで、50%の活性を維持した変異体抗体の構築に成功した。さらに種々の耐熱化変異体の取得にも成功した(2)。

High sensitive test kit for human immunodeficiency virus (HIV) using HIV p24 antibody has been developed and available from Rimco Co., Ltd (1). Because of the instability of the antibody resulting from heat stress, the test kit must be controlled under low temperature condition. In order to grow the market in the developing nations, we tried to stabilize the antibody with protein engineering method and apply it to the test kit.

The HIV p24 antibody was prepared and purified using mammalian cultured cell and transgenic silkworm. The function and thermostability of the antibody were estimated by ELISA method. Wild type antibody lost its 85% activity after heating at 65 ℃ for 80 min. The thermostable mutant antibody was constructed with protein engineering method using the information of basic principle of the protein structure. The mutant antibody in which a disulfide bond was introduced held 50% activity after heating at 65 ℃ for 80 min. Furthermore, additional thermostable mutants have been constructed (2).

(1)　リムコ、測定キット情報
HIV-1 p24 ELISA キット：検体中の HIV-１p24 抗原を定量する研究用 ELISA キット
HIV Ag/Ab Combo ELISA KIT：HIV 抗原抗体同時測定が行える第 4 世代型研究用 ELISA キット

(2)　特許出願中（2021 年）；特願２０２１－１８６２９７

Thermal stabilization, Heat resistance, ELISA

発表責任者：吉浜　麻生（yoshihama@rimco.jp）

講演番号：3D09-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

無細胞タンパク質合成系を用いた COVID-19 感染患者由来単一 B 細胞からの抗 SARS-CoV-2 Spike ヒトモノクローナル抗体の取得

Acquisition of anti-SARS-CoV-2 Spike human monoclonal antibody from single B cells derived from COVID-19 infected patients using cell-free protein synthesis system

○木原 もなみ[1]、兒島 孝明[1]、長谷 哲成[2]、上田 宏[3]、中野 秀雄[1] ([1]名大院生命農、[2]名大院医、[3]東工大科学技術創成研究院)
○MONAMI KIHARA[1], TAKAAKI KOJIMA[1], TETSUNARI HASE[2], HIROSHI UEDA[3], HIDEO NAKANO[1] ([1]Nagoya Univ. Agr, [2]Nagoya Univ. Med, [3]IIR)

我々のグループでは、動物の末梢血や組織から B 細胞を単離し、1 細胞逆転写反応と PCR により得られた L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントを、無細胞タンパク質合成系により Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する、迅速なモノクローナル抗体取得技術である（Ecobody 法）を開発した。本研究では、この Ecobody 法により、ヒト B 細胞から迅速に抗原特異的なモノクローナル抗体を取得する技術開発を行っている。

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の膜タンパク質であり、診断やワクチンに利用するための抗体のターゲットとして注目されている Spike タンパク質を抗原とした抗体の探索を行った。新型コロナウイルス感染患者から B 細胞を採取し、抗原結合ビーズを用いて抗原特異的な抗体を提示している B 細胞をセレクションした。一細胞ずつに単離したのち、逆転写 PCR と 2 段階の PCR を行うことで抗体遺伝子を獲得した。さらに無細胞タンパク質合成系を用い、ELSA により Spike タンパク質に対する結合能を確認した。

今後得られたヒトモノクローナル抗体の詳細な評価を行う予定である。

Our group has developed a rapid monoclonal antibody acquisition method (named Ecobody technology), in which antibody genes from isolated single B cells from peripheral blood or tissues of animals are amplified by single-cell reverse transcription and several rounds of PCR, followed by cell-free protein synthesis, resulting in a generation of Fab fragment in a very high-throughput manner.

In this study, antibodies were conducted against spike proteins, which are membrane proteins of novel coronaviruses and are attracting attention as targets for antibodies to be used in diagnosis and vaccines. B cells were collected from patients infected with human novel coronaviruses, and B cells presenting antigen-specific antibodies were selected using antigen-binding beads. After isolation of each cell, the antibody gene was obtained by reverse transcription PCR and two-step PCR. In addition, using a cell-free protein synthesis system, the binding ability to Spike protein was clarified by ELSA. We are going to evaluate the activity in detail by ELISA and to analyze the sequence in detail.

Monoclonal Antibody, cell-free protein synthesis system, SARS-CoV-2

発表責任者：木原もなみ（kihara.monami@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3D09-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

Duplex Specific Nuclease を用いた SARS-CoV-2 の遺伝子増幅型検出

Gene amplification detection of SARS-CoV-2 using Duplex Specific Nuclease

○砂金 敬太[1]、Dutta Chowdhury Ankan[1]、朴 龍洙[1,2] ([1]静岡大学農学部応用生命科学科、[2]静岡大学グリーン科学技術研究所)
○Keita Isago[1], Ankan Dutta Chowdhury[1], Enoch Y Park[1,2] ([1]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Green Chemistry Research Division, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

現在、世界中で新型コロナウイルスが流行している。流行を最小規模に抑え、被害を最低限にするためには初期段階での蔓延の押さえ込みが不可欠である。この新型コロナウイルスに対しての検出技術のゴールドスタンダードとしてリアルタイム RT-PCR が知られているが、簡易性、迅速性、現場でのオンサイト検出などの面において十分とは言えない状況であり、早急な新たな検出技術の開発が求められている。

そこで、ナノ材料と duplex specific nuclease(DSN)を用いて、遺伝子増幅型ウイルス検出方法を開発した。DSN は最適条件下で二本鎖 DNA もしくは RNA と DNA の二本鎖の DNA を切断することが知られている。本研究では、蛍光色素（ローダミン）を修飾した一本鎖 DNA プローブを作製し、標的 RNA と結合すると DNA プローブが切断され、これによって DNA プローブの蛍光分子の蛍光が増強され、ウイルスの RNA を検出することが出来るシステムを構築した。この時、未切断の DNA プローブは次々と標的 RNA にハイブリダイゼーションし、益々蛍光強度が増強され、シグナルは増幅される。この検出方法で 10 PFU/mL の標的 RNA の検出に成功した。また、この検出の中で温度操作は一度のみで、反応時間も 15 分で済む。

Currently, the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is spreading worldwide and is a threat to people. The real-time RT-PCR is the gold standard detection technique for this SARS-CoV-2. However, it is not enough operational simplicity, detection speed, and onsite detection. This is why, we need to develop a new detection technique instead of RT-PCR.

We developed the new amplificated RNA detection method using “duplex specific nuclease (DSN). DSN is the enzyme to chop DNA of the double-stranded DNA, or RNA-DNA double-stranded. We synthesized fluorescence (Rhodamine)-conjugated single-strand DNA as a DNA probe. This DNA probe binds the target RNA and is hybridized as double-stranded DNA-RNA. Here, DSN chops the DNA of the RNA-DNA strand and generates Rhodamine fluorescence. Free DNA probes bind another target RNA and more fluorescence intensity, amplifying fluorescence signal. We can detect target RNA 10 PFU/mL in a one-time temperature increase within 15 min.

SARS-CoV-2, virus detection, nano material

発表責任者：朴　龍洙（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D09-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

量子ドット-金ナノ粒子複合体相互作用による蛍光増強を利用した新型コロナウイルス検出法の開発
Development of a new coronavirus detection method using fluorescence enhancement by quantum dot-gold nanoparticle complex interaction

○前畑 秀叡[1,2]、オジョドモ アチャド[2] ([1]静岡大学農学部応用生命科学科、[2]静岡大学グリーン化学技術研究所)
○Shuei MAEHATA[1,2], Achadu OJODOMO[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. Ros. Inst. Green Sci. Technol.)

ナノ材料を用いた免疫測定法は、その固有の特性と標的分析物の存在を決定するための信号の伝達や増幅に利用できることから、大きな関心を集めている。免疫測定における局在表面プラズモン（LSPR）増強蛍光検出は，様々な形状とサイズの金ナノ粒子（AuNP）が検出プローブとして用いられている。本研究では，量子ドット（QD）の蛍光に対する LSPR 効果を高めるために，コアの AuNPs 上に AuNPs を島状に結合し，AuNPs@AuNPs を形成するという新しいアプローチを開発した。作成した AuNPs@AuNPs と QDs に、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質（S タンパク質）に特異的な抗体を結合させた。両方のナノ材料を S タンパク質のサンプルに混合し、検出を開始した。インキュベーション後、QD の蛍光ピークをサンプル中の S タンパク質の定量に用いた。本イムノアッセイの検出限界（LOD）は、緩衝液では約 6.69 fg/mL、スパイクサンプルでは約 12.5 fg/mL と推定された。さらに、AuNPs@AuNPs を用いた免疫測定法は、AuNPs のみを用いた免疫測定法と比較して、優れたシグナル増強効果を示しました。今後は、検出の安定性を示すためにさらなる研究を行う予定である。

Nanomaterial-based immunoassay has been emerging and focused on a huge interest due to the intrinsic properties and its utilization in transducing and amplifying the signal for determining the presence of the target analytes. Localized surface plasmon resonance (LSPR)-enhanced fluorescent detection in immunoassay has been developed using gold nanoparticles (AuNPs) with various shapes and sizes s as the detection probe pair. In this work, a new approach is developed to enhance the LSPR effect to the fluorescent of the quantum dots (QDs) by deposition of islands of AuNPs on the core AuNPs, forming AuNPs@AuNPs. The prepared AuNPs@AuNPs and QDs were conjugated to antibodies specific to SARS-CoV-2 spike protein (S protein). The detection was simply initiated by mixing both nanomaterials to the S protein as analyte. After incubation, the fluorescent was measured and the fluorescent peak of the QDs was used as the signal for quantifying the concentration of the S protein in the sample. The detection limit (LOD) was estimated around 6.69 fg/mL in buffer and 12.5 fg/mL in spike sample. In addition, the AuNPs@AuNPs-based immunoassay showed better signal enhancement compared to only AuNPs-based immunoassay. Further study will be conducted to show the stability of the detection.

SARS CoV-2 S-protein, Immunoassay, AuNP

発表責任者：朴龍洙（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D09-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

Impedimetric biosensor for highly sensitive electrochemical detection of norovirus-like particles

○Fahmida Nasrin, Ankan Dutta Chowdhury, Enoch Y. Park (Lab. of Biotech., Res. Ins. of Green Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

The development of an electrochemical biosensor has emerged as a recent advancement tool in the sensing field, which focuses on detecting target analytes with high specificity. For this purpose, we have developed a sensitive, rapid, and highly specific electrochemical impedimetric method. In this work, we have focused on detecting norovirus-like particles due to their severity to make infection in a vast population every year. In this electrochemical impedimetric detection method, we could successfully detect norovirus-like particles using the corresponding antibody-conjugated electrodes. The electrodes were fabricated using a common matrix of gold-polyaniline on which streptavidin-biotinylated antibody was conjugated. This electrode showed a strong impedimetric response due to the interaction between antibody and target norovirus-like particles. The enhancement of the impedimetric response is directly related to the applied concentration of the target virus. As a result of this system, norovirus-like particles were detected with an LOD of femtogram mL^{-1} order. The results of this impedimetric electrochemical biosensor were used to implement a fast and straightforward method to determine the presence of norovirus, which can be applied for the detection of clinical samples in the near future for biomedical application.

electrochemical impedimetric spectroscopy, biosensor, Norovirus-like particles

講演番号：3D09-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

磁性ナノ粒子を用いた磁気アシストによる電気化学的ウイルス検出

Magnetically-Assisted Electrochemical using magnetic nanoparticles for Virus Detection

○敦賀 健太[1]、朴 龍洙[2] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン科技研)
○KENTA TSURUGA[1], Y. Enoch Park[2] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ, [2]Green Science and Technology, Shizuoka Univ)

近年、電気化学バイオセンサーは、その感度の高さと小型化の点で大きな注目を集めている。しかし、電極の製造や機能化にはそれぞればらつきがあるため、電気化学バイオセンサーの実用化には困難な点がある。さらに、電極の機能化は、その電気的特性を阻害する可能性がある。そこで、本研究では、シンプルな電気化学バイオセンサーを作製するため、インフルエンザウイルス A/H1N1（IV/A/H1N1）に特異的な抗体を結合させた磁性ナノ粒子（MNPs-Ab）を用いた。MNPs-Ab は、サンプル中の不純物から標的ウイルスを分離できる。そして、分離したウイルスと MNPs-Ab を、磁場下で電極上に滴下した。その後、電気化学インピーダンス分光法を実施し、ナイキストプロットを得た。IV の検出では，10 pg/mL～10 ng/mL の範囲において，緩衝液では 15 pg/mL 程度，スパイク液では 10 pg/mL 程度の検出限界が得られた。さらに，このバイオセンサーは IV/A/H1N1 に対してのみ良好な特異性を示した。次に、導電性ポリマーのポリアニリンを用いた修飾 MNP を用いた場合、MNP のみの場合と比較して S/N 比が 2 倍向上したという結果が得られた。

In the last decade, electrochemical biosensor has been attentions due to its sensitivity and highly miniaturized. However, the fluctuation of the fabrication and functionalization of electrodes hindered its application. Moreover, the functionalization of the electrode can impedance its electrical properties. Therefore, to fabricate a simple electrochemical biosensor, in this study, magnetic nanoparticles conjugated antibodies (MNPs-Ab) which were specific to Influenza virus A/H1N1 (IV/A/H1N1). MNPs-Ab was mixed with the target virus and separated from the impurity in the sample. Then, the isolated virus and MNPs-Ab was drop casted on the electrode under a magnetic field, and the impedance of the electrode was measured. The Influenza virus detection showed a limit down 15 pg/mL in buffer solution and 10 pg/mL in spike solution in a dynamic range of 10 pg/mL - 10 ng/mL. In addition, the biosensor demonstrated good specificity to IV/A/H1N1 only. Next, by using modified MNPs using conductive polymer polyaniline, the preliminary result demonstrated 2-fold improved signal-to-noise (S/N) ratio compared to MNPs only. Further study will be conducted to highlight the developed biosensor.

Biosensor, Nano material, electrochemistry

講演番号：3D09-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

抗体エンジニアリングのためのバイオインフォマティクス
Bioinformatics for Antibody Engineering

○山本 秀男[1]、中野 秀雄[1]、兒島 孝明[1]、上田 宏[2]([1]名大院生命農、[2]東工大科学技術創生研究院)
○Hideo YAMAMOTO[1], Hideo NAKANO[1], Takaaki KOJIMA[1], Hiroshi UEDA[2] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology Univ.)

本研究グループでは、単一 B 細胞から PCR と無細胞タンパク質合成系を用いてモノクローナル抗体を取得する Ecobody 法を確立している。本手法では多数の抗体配列情報を取得、無細胞タンパク質合成系で合成することが簡便に行える。そこで得られた抗体配列を機械学習させることで、より効率的に目的の性質を有する抗体を見出す方法論の開発を目指した。

これまでは Ecobody 法により取得した抗 cAMP 抗体の配列情報を基に教師あり機械学習アルゴリズム 5 種類で結合活性予測モデルを構築した。このモデルの精度を、テストデータを用いて検証し、ランダムフォレストが 76%の精度で標的抗原に対する結合能力を予測できることを確認した。現在、本構築予測モデルの正確性を実証するため、無細胞タンパク質合成系により新規抗体を調製し、ELISA によって検出される結合活性との比較照合を検討中である。

Our research group has established the Ecobody method for obtaining monoclonal antibodies from single B cells using PCR and a cell-free protein synthesis system. With this method, it is easy to obtain a large number of antibody sequences and synthesize them using a cell-free protein synthesis system. We aimed to develop a methodology for finding antibodies with the desired properties more efficiently by using machine learning of the obtained antibody sequences.

So far, we have constructed a model for predicting binding activity using five supervised machine learning algorithms based on the sequence information of anti-cAMP antibodies obtained by the Ecobody method. The accuracy of these models was verified using test data, and it was confirmed that the random forest could predict the binding ability to the target antigen with 76% accuracy. In order to demonstrate the accuracy of the constructed prediction models, we are currently preparing new antibodies by cell-free protein synthesis system and examining the comparison and matching with the binding activity detected by ELISA.

antibody engineering, bioinformatics, cell-free protein synthesis

講演番号：3D09-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム D

Poisson-Boltzmann 式に基づいた数値計算よる脂質二分子膜内外のイオン濃度分布
Ion-distribution around a bilayer lipid membrane based on the Poisson-Boltzmann equation

○北隅 優希、宋和 慶盛、白井 理（京大院農）
○Yuki Kitazumi, Keisei Sowa, Osamu Shirai (Kyoto Univ.)

脂質二分子膜は生体膜の基本構造である。膜内部は疎水性の環境であり、水中の電解質が膜内に分配することは困難である。熱力学的には、二相間における電解質の分配はそれぞれのイオンの親水性疎水性と電気的中性則を満たすように決まり、界面のみが電気的中性則から外れる。脂質二分子膜は極めて薄いため、界面の特徴が強く反映されることが予想されるが、膜内部が電気的中性則から外れたことに由来する膜の帯電は議論されてこなかった。そこで、膜全体を無構造の誘電体と仮定し、イオンの吸着を無視した条件での分配平衡時の電荷分布を、各イオンの電気化学ポテンシャルと Poisson-Boltzmann 式に基づいて見積もった。また、同様の条件で外部から膜電位を印加した際のイオンの膜透過を Nernst-Plank 式を直接解くことで算出し、定常状態におけるイオンの濃度分布変化を評価した。カチオンとアニオンの分配係数がイオン移動の標準電位換算で 100 mV 異なる場合の平衡時の電荷分布を計算したところ、電荷の大部分は水相と膜の界面近傍に局在するが、一部の電荷が膜内部に均一に分布することが分かった。その際の電荷密度は C m^{-3} のオーダーであり nM 程度の電気的中性からの解離はエネルギー的に許容されることがわかった。また、膜に電位差を印加したところ、膜内部の電荷分布は若干影響を受けるが、電位差を印加するために注入された電荷の大部分は水相中の電気二重層に蓄えられることが分かった。

Bilayer lipid membrane (BLM) is a basic component of the biomembrane. Assuming that the aqueous and BLM phases were the non-structural components, the ion distribution around a BLM under the equilibrium conditions was numerically calculated based on the electrochemical potential for the ions and the Poisson-Boltzmann equation. When the standard ion-transfer potential of ions differs by 100 mV, the charges are mainly located at the interface of the BLM and the aqueous phases. However, a part of the charges was homogeneously distributed in the BLM phase. The distributed charge density is in the order of C m^{-3}, that is, the deviation from the electronic neutrality is in the order of nM. The steady-state ion distribution was calculated based on the Nernst-Plank equation when the external potential difference was applied to the membrane. The injected charges were mainly distributed to the double layer in the aqueous phases. The charge distribution in the BLM phase was insensitive by the external potential.

biomembrane, numerical simulation, membrane transfer

発表責任者：北隅優希（kitazumi.yuki.7u@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E01-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

微細藻類由来 DHA 合成酵素の炭素鎖伸長反応の解析

Dissecting Biosynthetic Machinery of Microalgal Polyunsaturated Fatty Acid Synthase

○仲間 陸[1]、小林 飛悠[1]、大塚 慎[1]、佐藤 康治[2]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Riku Nakama[1], Hiyu Kobayashi[1], Makoto Otsuka[1], Yasuharu Satoh[2], Yasushi Ogasawara[2], Tohru Dairi[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng. Chem. Sci., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng.)

ある種の海洋性微細藻類や細菌はポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体 (PUFA 合成酵素) によりドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6 ω3) やエイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5 ω3) を特異的に生合成することが知られている。これら酵素は類似のドメイン構造を持つにも関わらず異なる PUFA を作り分けるが、その生合成機構は未解明であった。当研究室では、海洋性細菌由来 PUFA 合成酵素を用いた in vivo, in vitro 解析により、炭素鎖長制御及びシス二重結合導入機構を明らかにした [1~4]。しかし、海洋性細菌由来の酵素と相同性を有さない微細藻類由来の酵素については、生産物制御機構は不明であることから解明を試みた。本研究では、*Schizochytrium* sp. 由来の DHA 合成酵素遺伝子を大腸菌で発現させた in vivo 系と組換え酵素を用いた in vitro 系で制御機構を解析した。その結果、前者により、2 つのケトシンターゼ (KS) ドメインと Fab_A タイプのデヒドラターゼ (DH) ドメインが必須であること、また後者により、炭素鎖長 2 から 6 までの伸長反応に関与する KS ドメインと DH ドメインを明らかにしたので紹介したい。



DHA 生合成遺伝子(*Schizochytrium* sp.)

Some marine bacteria and microalgae produce polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) by PUFA synthases, which are fatty acid synthase-like enzyme complexes with multiple catalytic domains. Interestingly, individual PUFA synthase creates a specific PUFA, even though domain organization of PUFA synthases are similar to each other. Previously, we investigated PUFA synthases of marine bacteria and unveiled machanisms to control carbon chain length and cis double bond position of the product.[1~4] However, product profile elucidation of the microalgal DHA synthase are difficult due to low sequence similarity between bacteria and microalgae enzymes. Here, we investigated the product control mechanism of microalgae enzymes. *In vivo* experiments revealed that two ketosynthase (KS) domains and FabA-type dehydratase (DH_{FabA}) domains are essential for PUFA biosynthesis. We also performed in vitro experiments with truncated recombinant KS and DH domains to clarify early stage of PUFA biosynthesis.

1)*Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 2326 (2019). 2) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 6605 (2019). 3) *ACS Chem. Biol.*, **14**, 2553 (2019). 4) *ACS Chem. Biol.,* **15**, 651 (2020)

fatty acid, ketosynthase, dehydratase

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E01-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

三員環構造を有するペプチド抗生物質ベラクトシンとホルマオマイシンの生合成研究

Identification of cyclopropane formation in the biosyntheses of hormaomycins and belactosins

○島谷 諒[1]、大利 徹[2]、小笠原 泰志[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Ryo Shimaya[1], Tohru Dairi[2], Yasushi Ogasawara[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng. Chem. Sci., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng.)

【背景・目的】ベラクトシンおよびホルマオマイシンは、それぞれ *Streptomyces* sp. KY11780 と *Streptomyces griseoflavus* W-384 から単離されたペプチド天然物で、いずれもシクロプロピルアラニン構造を有する。その生合成について、標識化合物の投与実験からシクロプロピルアラニン部は L-リジンを前駆体とすること、また、ベラクトシン (*bel*) とホルマオマイシン (*hrm*) の生合成遺伝子クラスターの同定も報告されていた。しかし、シクロプロピルアラニン部の生合成機構については報告がないため、その解明を目的とした。
【方法・結果】両者の生合成遺伝子クラスターの比較から、*belK*/*hrmI* (Fe 依存酸化酵素) と *belL*/*hrmJ* (α-ケトグルタル酸-Fe 依存酸化酵素) の 2 つの機能未知遺伝子が共通して見出されたため、これらがシクロプロピルアラニン部の生合成に関与すると予想された。そこで各遺伝子を大腸菌 BL21(DE3) で発現させ、静止菌体を用いた *in vivo* 反応を LC-MS で解析した結果、*belK* または *hrmI* を発現した場合に、6-ニトロノルロイシンが検出された。また、組換え酵素を用いた *in vitro* 実験で、BelK/HrmI が L-リジンから 6-ニトロノルロイシンへの酸化反応を触媒することが確認された。さらに、BelL/HrmJ が 6-ニトロノルロイシンからニトロシクロプロピルアラニンへの環化反応を触媒することも分かった。本反応は、α-ケトグルタル酸-Fe 依存酸化酵素によるシクロプロパン化の初の例である。

【Introduction】Hormaomycin and belactosin are peptide natural products that contain cyclopropyl-alanine (CpAla) moieties. Previously, biosynthetic gene clusters of hormaomycin (*hrm*) and belactosin (*bel*) have been identified. However, these clusters lacked obvious candidate genes suitable for the CpAla formation, and thus, the biosynthesis of CpAla moiety was unclear.
【Results and Discussion】On the basis of our bioinformatics analysis, we proposed that two conserved genes, *hrmI*/*belK* (heme oxygenase-like dinuclear iron enzymes) and *hrmJ*/*belL* (Fe/α-ketoglutarate (KG) oxygenases), were involved in the CpAla formation. Using *in vivo* and *in vitro* assays, we revealed that HrmI and BelK catalyzed oxidation of the ε-amino group of L-lysine to afford 6-nitronorleucine. We also showed that HrmJ and BelL converted 6-nitronorleucine to 3-(*trans*-2-nitrocyclopropyl)-alanine. This is the first demonstration of Fe/α-KG oxygenase-catalyzed cyclopropane formation.

biosynthesis, cyclopropane, metalloenzyme

発表責任者：小笠原泰志（yogasawa@eng.hokudai.ac.jp）

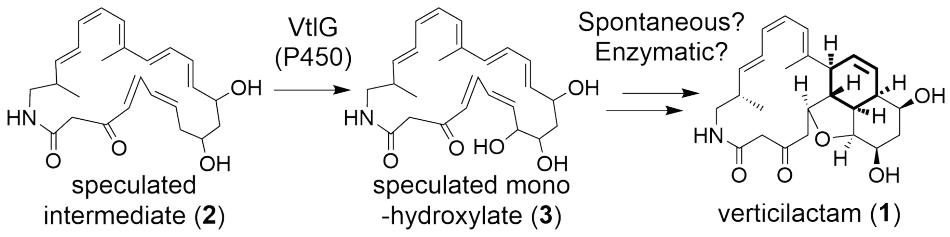
講演番号：3E01-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

Characterization of cytochrome P450 function in verticilactam biosynthesis

○Yu ZHENG[1], Hiroshi TAKAGI[1], Katsuyuki SAKAI[1], Yumi SHIOZAKI-SATO[1], Toshihiko NOGAWA[2], Risa TAKAO[1], Shunji TAKAHASHI[1] ([1]RIKEN CSRS, Nat. Prod. Biosynth., [2]RIKEN CSRS, Mol. Str. Charact.)

[Objective] Verticilactam (**1**) is a polycyclic macrolactam isolated from *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 and is presumably biosynthesized by intramolecular [4+2] cycloaddition.[1)] However, a candidate gene responsible for [4+2] cycloaddition remains cryptical in the *vtl* biosynthetic gene cluster.[2)] Alternatively, given that cytochrome P450s represent one of the most versatile biocatalysts in nature and adopt an open/close motion in catalysis, this study aimed to reveal the function of cytochrome P450 *vtlG* gene in verticilactam biosynthesis.

[Methodology and Results] Firstly, we performed in-frame deletion of the *vtlG* gene in BAC vector containing the entire *vtl* cluster and analyzed the metabolites profile in *S. avermitilis* SUKA17. The Δ*vtlG* strain abolished the production of **1** but accumulated polyene **2** (λ_{max} = 286, 324, 340, 357). **2** (*m/z* 412 $[M+H]^+$) was speculated as the biosynthetic intermediate of **1** (*m/z* 428 $[M+H]^+$) and is proposed to undergo mono-hydroxylation, [4+2] cycloaddition, and Michael addition reactions to form **1**. Secondly, we purified recombinant protein of VtlG from *Escherichia coli* for *in vitro* assay with the purified **2**. When the reaction was initiated, VtlG rapidly converted **2** into polyene **3** (λ_{max} = 280, 324, 340, 357). LC-MS analysis clearly indicated **3** (*m/z* 428 $[M+H]^+$) as a mono-hydroxylation product. The K_m and k_{cat} values were determined as 0.84 ± 0.26 μM and 6.47 ± 0.82 min^{-1}, respectively. Notably, **2** was converted into **1** in the long term VtlG reaction, therefore confirmed **2** as the on-pathway biosynthetic intermediate of **1**. Intriguingly, **2** can also be spontaneously cyclized during purification, and the spontaneous [4+2] adduct was not recognized as a substrate for VtlG. Currently, whether the [4+2] cycloaddition can be catalyzed by enzyme remains unclear. Identification of this cryptical enzyme is still in progress. Collectively, this study confirmed the mono-hydroxylation function of VtlG in verticilactam biosynthesis.



[1)] Nogawa, T., *et al.*, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4564–4567; [2)] Nogawa, T., *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 3598–3605.

verticilactam, P450, [4+2] cycloaddition

発表責任者：Shunji TAKAHASHI（shunjitaka@riken.jp）

講演番号：3E01-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

Streptomyces flagilis 由来 azaserine の生合成機構の解析

Study on the biosynthesis of azaserine from Streptomyces flagilis

勝山 陽平[2,3]、○四海 佑亮[1]、川合 誠司[2]、大西 康夫[2,3] ([1] 東大農・生命化学工学、[2] 東大院・農生科・応生工、[3] 東大・微生物イノベ連携機構)
Yohei KATSUYAMA[2,3], ○Yusuke SHIKAI[1], Seiji KAWAI[2], Yasuo OHNISHI[2,3] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

Azaserine は *Streptomyces flagilis* から単離されたジアゾ基を有する天然物であり、glutamine との化学構造の類似性から抗腫瘍活性を持つ。これまでジアゾ基を持つ化合物の生合成経路は複数同定されているが、azaserine の生合成機構は未知である。そこで、azaserine の生合成経路の特定・解明を目指した。我々は azaserine が以前発見されたヒドラジノ酢酸 (HAA) 生合成経路を用いて生合成されると予想し、azaserine 生産菌である *S. flagilis* 及び *Glycomyces harbinensis* に共通する HAA 生合成遺伝子群含有生合成遺伝子クラスターを探索した。その結果、20 の遺伝子からなる azaserine 生合成遺伝子クラスターの候補を発見した。次に、*S. flagilis* 由来の遺伝子クラスターを *Streptomyces albus* に導入し、得られた形質転換体の代謝解析を行った。その結果、azaserine と考えられる化合物の生産がわずかに観測された。さらに、クラスター内部に存在する LuxR ファミリー転写制御因子遺伝子を、*tipA* プロモーターを用いて過剰発現した。その結果、azaserine の生産量が著しく増加した。次に、HAA から azaserine 変換過程の前半を担うと予想された AzsS (アシル基転移酵素)、AzsP (AMP 依存リガーゼ)、AzsQ (キャリアータンパク質, CP)、AzsT (ペプチダーゼ)、AzsF (脱水素酵素) の組換えタンパク質を調製し、*in vitro* 反応を行い LC-MS で解析した。その結果、AzsS が HAA のスクシニル化、AzsP が合成されたスクシニル HAA を AzsQ にロード、AzsT が脱スクシニル化、AzsF が炭素-窒素二重結合の形成をそれぞれ触媒し、2-hydrazineylideneacetyl-AzsQ が合成されることが確認された。全生合成経路を解明すべく、現在さらなる実験を継続している。

Azaserine is a natural product with a diazo group isolated from *Streptomyces flagilis* and *Glycomyces harbinensis*. It has an antitumor activity due to its structural similarity to glutamine. By searching the genomes of *S. flagilis* and *G. harbinensis* for biosynthetic gene clusters that contain hydrazino acetic acid (HAA) biosynthetic genes, we found a putative azaserine biosynthetic gene cluster consisting of 20 genes in *S. flagilis*. We introduced the gene cluster into *Streptomyces albus* and performed a metabolic analysis of the recombinant strain. As a result, a small amount of azaserine was detected. When the LuxR family transcriptional regulator gene in the cluster was overexpressed in the recombinant strain, the production of azaserine was drastically increased. Next, recombinant proteins of AzsS, AzsP, AzsQ, AzsT, and AzsF were prepared and used for *in vitro* analysis. We showed that these enzymes synthesized the 2-hydrazineylideneacetyl unit tethered to the carrier protein AzsQ from HAA. Further experiments are in progress to elucidate the total biosynthetic pathway of azaserine.

azaserine, biosynthesis, streptomyces

発表責任者：勝山陽平（aykatsuhko@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E01-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群に見出した Phenylalanine 水酸化酵素の機能解析

Functional analysis of Phenylalanine dihydroxylase found in the resormycin biosynthetic gene cluster.

○岸 千紘[1]、山中 一也[2]、五十嵐 雅之[3]、濱野 吉十[1]、丸山 千登勢[1]([1]福井県大院生物資源、[2]関西大化生工、[3]微化研)
○Chihiro KISHI[1], Kazuya YAMANAKA[2], Masayuki IGARASHI[3], Yoshimitsu HAMANO[1], Chitose MARUYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]Institute of Microbial Chemistry, BIKAKEN)

放線菌が生産する抗生物質 resormycin[1]（RM）は、3 つの非タンパク性アミノ酸からなるトリペプチドであり、2 つの水酸基を有する *p*-chlorophenylalanine を有する。これまでの研究で我々は、RM 生合成遺伝子群（*res* 遺伝子群）に存在する *res8* 遺伝子が Phe-4-hydroxylase（Phe4H）に高い相同性を示し、Res8 は 1 つの酵素で 2 箇所の水酸化反応を同時に触媒する新規水酸化酵素であることを見出した。すなわち、既存の Phe 水酸化酵素に比べて 2 倍の酵素活性を示す可能性が考えられ、本酵素は高感度 Phe 定量用酵素として利用が期待された。そこで本研究では、Res8 組換え酵素および変異型酵素を用いて、水酸化部位選択性に関わる触媒残基の同定を試みた。

まず、Res8 のアミノ酸配列からドメイン検索を行った結果、本酵素は、一般的な Phe4H と同様に 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin（BH_4）を補酵素とする水酸化酵素であることが示唆された。また、Res8 の触媒残基を明らかにするために、既存の Phe4H および、二次代謝産物生合成で見出された Phe-3-hydroxylase（Phe3H）とのアミノ酸配列比較を行ったところ、Phe のフェニル基周辺のアミノ酸残基に幾つかの違いが観察された。現在、Res8 に部位特異的変異を導入し、Phe4H 型および Phe3H 型変異型酵素を用いた *in vitro* 反応にて、Phe の水酸化部位の変化を調べており、その詳細について紹介する。

[1] M. Igarashi *et al.*, *J. Antibiot. Tokyo*, 50(12): 1020-1025 (1997).

Resormycin[1] (RM), produced by *Streptomyces* strain, has dihydroxy-4-chlorophenylalanine. Recently, we found that the *res8* gene in the RM biosynthetic gene cluster (res-cluster) showed high homology to the genes encoding Phe-4-hydroxylase (Phe4H) and Phe-3-hydroxylase (Phe3H). We further clarified that Res8 is a novel hydroxylase catalyzing the dihydroxylation of Phe. Because Res8 is a promising enzyme used for the highly sensitive detection of Phe, we investigated the enzyme property of the recombinant Res8 enzyme (rRes8) and identified the catalytic residues involved in the regioselective hydroxylation.

An online search for the catalytic domain showed that Res8 is a typical Phe hydroxylase using 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH_4) as a co-factor, similar to Phe4H and Phe3H. However, in the modeling analysis based on the X-ray crystal structure of Phe4H, we found that Res8 has some amino acid variations around the phenyl group of the Phe substrate. Therefore, we tried the mutation analysis of rRes8 to investigate whether these amino acid residues are involved in the regioselective hydroxylation of rRes8.

[1] M. Igarashi *et al.*, *J. Antibiot. Tokyo*, 50(12): 1020-1025 (1997).

Antibiotics, Non-proteinogenic amino acid, Monooxygenase

講演番号：3E01-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

Streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型 アミド合成酵素の変異解析
Mutation analysis of an aa-tRNA-dependent amide bond-forming enzyme showing a broad substrate recognition.

○内山 駿[1]、丸山 千登勢[1]、HAMDY Sherif[2]、中嶋 優[2]、森田 洋行[2]、濱野 吉十[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]富山大・和漢医薬総合研)
○Shun UCHIYAMA[1], Chitose MARUYAMA[1], Sherif HAMDY[2], Yu NAKASHIMA[2], Hiroyuki MORITA[2], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ., [2]Inst. Nat. Med., Toyama Univ.)

放線菌が生産する抗生物質 streptothricin (ST) およびその類縁化合物は、共通して streptothrisamine 骨格とアミノ酸側鎖からなり、このアミノ酸側鎖構造が生理活性に重要であることが知られている。天然から数多く ST 類縁化合物が発見されているが、アミノ酸側鎖構造には β-lysine 型と glycine (Gly)型の 2 種類しか見つかっていない。そこで我々は、多様な側鎖構造を有する新規 ST 類縁化合物の創製を目指し、アミノ酸側鎖の合成に関わるアミド合成酵素に着目した。これまでの研究で、ST 類縁化合物 BD-12 の Gly 側鎖が、FemXA family に相同性を示す Orf11 によって、Gly-tRNA^{Gly}依存的に触媒されることを明らかにし[1]、さらにそのホモログ酵素である Sba18 および Sbb17 を見出した。これら 2 つのホモログ酵素は互いに 90%以上の配列相同性を示すが、興味深いことに、Sbb17 は Orf11 と同様に Gly-tRNA^{Gly} を特異的に基質認識する一方、Sba18 は Gly-tRNA^{Gly} だけでなく、Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を基質認識し、新規 ST 類縁化合物を生成した。そこで本研究では、Sba18 および Sbb17 の配列比較を基に、基質認識に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。まず、約 300 残基からなるこれらの酵素を 100 残基ずつ 3 つの領域に分け、それぞれの領域を相互に入れ替えたキメラ酵素を構築し、*in vitro* 反応を行った。さらに最近、Sbb17 の X 線結晶構造解析から Sba18 のモデリング実験を行い、基質認識に関わるアミノ酸残基を同定した。

［参考文献］[1] C. Maruyama *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, (2016)

Streptothricins (STs) and ST-related compounds are classical antibiotics produced by *Streptomyces* strains. These antibiotics have a common core structure, streptothrisamine, and are classified into two groups based on the amino-acid side chains, β-Lys side chain group and glycine-derived side chain group. It is known that the differences in amino-acid side chains contribute to the specificity of antibiotic activity. Therefore, we have been interested in the amide bond formation mechanism for connecting the amino-acid side chain and streptothrisamine. In the biosynthesis of the ST-related compound, BD-12, we have reported that the formation of a peptide bond between the streptothrisamine and the glycine residue is catalyzed by a Fem-like enzyme (Orf 11) in a tRNA-dependent manner [1]. Recently, we found Orf11 homologous enzymes, Sba18 and Sbb17, which share more than 90% of sequence homology. Interestingly, despite high sequence homology, Sbb17 specifically recognized Gly-tRNA^{Gly} as a substrate, but Sba18 recognized Ala-tRNA^{Ala} and Ser-tRNA^{Ser} as the substrates in addition to Gly-tRNA^{Gly}, producing novel ST-related compounds. We therefore constructed the chimeric enzymes by domain swapping of Sbb17 and Sba18. Moreover, we performed modeling experiments for Sba18 based on the X-ray crystallography of Sbb17 and identified amino acid residues involved in substrate recognition.

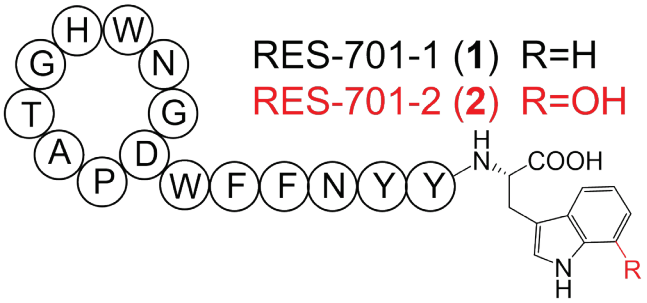
antibiotics, aminoacyl-tRNA

講演番号：3E01-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

ラッソペプチド RES-701 の生合成研究

Biosynthesis of lasso peptide RES-701

○山谷 優花[1]、小笠原 泰志[2]、佐藤 康治[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Yuka Yamaya[1], Yasushi Ogasawara[2], Yasuharu Satoh[2], Tohru Dairi[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng. Chem. Sci., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng.)



【背景】RES-701-1 (**1**) と RES-701-2 (**2**) は、放線菌 *Streptomyces* sp. RE-701 から単離されたラッソペプチド天然物であり、血管収縮作用にかかわるエンドセリン B 受容体の選択的アンタゴニストとして作用する。いずれも 16 アミノ酸残基からなり、前者は C 末端にトリプトファン (Trp) を、後者は 7-ヒドロキシトリプトファン（7-OH-Trp）を有する。これまで、生合成遺伝子クラスター (*res*) が同定されており、7-OH-Trp 残基がリボソームで生合成される前駆体ペプチド (ResA) の C 末端 Trp の翻訳後修飾で導入されることが示されている。クラスター中には、既知の酸化酵素と相同性を示す遺伝子はないが、機能未知遺伝子が一つ (*resE*) 存在したことから、ResE が新規酸化酵素と予想し、解析を行った。
【方法・結果】*res* クラスターを近縁放線菌 *Streptomyces lividans* で異種発現し、代謝産物を LC-MS で分析した結果、**1** と **2** の生産が確認された。また、クラスター中の *resE* 遺伝子の欠失により **1** のみが生産されたことから、ResE が C 末端 Trp 残基の酸化反応に関与することが示唆された。

RES-701-1 (**1**) and RES-701-2 (**2**), isolated from *Streptomyces* sp. RE-701, are lasso peptides consisting of 16 amino acid residues with a tryptophan (Trp) and a 7-hydroxytryptophan (7-OH-Trp), respectively, at their C-terminus. Analysis of biosynthetic gene cluster (*res*) revealed that the 7-OH-Trp residue in **2** was biosynthesized via oxidation of the C-terminal Trp in ribosomal peptide (ResA). However, *res* clusters did not contain obvious candidate genes for hydroxylation, and thus, the mechanism to introduce 7-OH-Trp remains elusive. Because *res* cluster contains a gene with unknown function (*resE*), we proposed that ResE is responsible for the hydroxylation of the Trp residue. To gain insights into **2** biosynthesis, we cloned *res* cluster into pWHM3 and expressed in *Streptomyces lividans* TK23. LC-MS analysis of the culture broth revealed production of both **1** and **2**. Furthermore, expression of *res* cluster lacking *resE* resulted in production of **1** only. These results suggested that ResE is a novel hydroxylase involved in **2** biosynthesis.

lasso peptide, natural products, biosynthesis

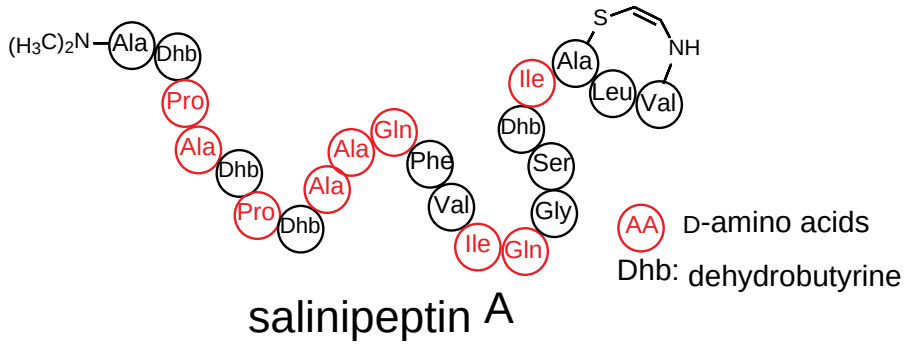
発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E01-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

Involvement of Peptide Epimerization in the biosynthesis of Linaridin Class Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptides

○Wanlu Xiao[1], Yasushi Ogasawara[2], Yasuharu Satoh[2], Tohru Dairi[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng. Chem. Sci., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Eng.)

【Introduction】Salinipeptin is linaridin peptide natural product containing multiple D-amino acids. Analysis of the biosynthetic gene clusters (*sal*) revealed that salinipeptin is a ribosomal peptide and that epimerization of a precursor peptide (SalA) is required for its biosynthesis. Although *sal* cluster did not contained any candidate genes of epimerases, a gene with unknown function (*salL*) was found near *salA* gene. Interestingly, bioinformatics analysis showed that gene clusters with similar gene organization were widely distributed in many different bacterial strains, mainly in actinobacteria, and that the biosynthetic gene clusters of other two linaridin peptides, grisemycin and cypemycin, also contained *salL* homologs. Thus, we proposed that SalL is responsible for the epimerization and that grisemycin and cypemycin also contained D-amino acids.



salinipeptin A

【Results and Discussion】To prove above hypothesis, the biosynthetic gene clusters of grisemycin (*grm*) and cypemycin (*cyp*) along with *sal* were individually cloned into pWHM3 and expressed in *Streptomyces lividans* TK23. LC-MS analysis of the culture broth revealed that specific metabolites whose *m*/*z* are consistent with corresponding linaridin peptides were produced. In addition, chiral analysis confirmed that grisemycin and cypemycin contained multiple D-amino acid residues in the similar manner to salinipeptin. We also showed that SalL homolog was indispensable for grisemycin production by gene knockout experiments. Taken together, these results suggested that SalL is a novel peptide epimerase responsible for biosynthesis of salinipeptin class linaridin natural products.

biosynthesis, linaridin, epimerase

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E01-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

アミプリマイシンに含まれる特殊アミノ酸の生合成機構の解析

Biosynthesis of the nonproteinogenic amino acid moiety in amipurimycin

○日比 玄紀[1]、梅村 龍槻[1]、白石 太郎[1]、西山 真[1,2]、葛山 智久[1,2]([1]東大農、[2]東大・微生物連携機構)
○Genki HIBI[1], Tatsuki UMEMURA[1], Taro SHIRAISHI[1], Makoto NISHIYAMA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[1,2] ([1]GSALS, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景と目的】アミプリマイシンは、*Streptomyces novoguineensis* 株の培養液中から、イネいもち病の病原菌である *Pyricularia oryzae* の特異的阻害剤として発見されたペプチジルヌクレオチド系抗生物質である[1]。これまでに当研究グループはその生合成機構に関する詳細な解析を行い、*Streptomyces* sp. C-1 株におけるアミプリマイシン生合成遺伝子クラスターの同定に至った[2]。アミプリマイシンにはシスペンタシンと呼ばれる特殊アミノ酸を部分構造として含んでいるが、その生合成経路はいずれの生物においても明らかになっていない。シスペンタシン単体でも *Candida albicans* に対して生育阻害活性を示すことから抗真菌薬としての利用が期待されており、*in vitro* 再構成などの解析を通じて、詳細な生合成機構の解明および生産系の確立を目指している。

【方法・結果】アミプリマイシン生合成遺伝子クラスター内から特殊アミノ酸の生成に関与するⅡ型ポリケタイド合成酵素や機能未知酵素をコードする 7 個の生合成遺伝子の機能を推定し、大腸菌や放線菌 *Streptomyces albus* での異種発現や、相互作用が予想される遺伝子の共発現を通じて、それら全ての組換えタンパク質を得ることができた。その後、異種放線菌の *Streptomyces avermitilus* 由来のホロ化酵素を用いたアシルキャリアプロテイン（ACP）の活性化や、反応基質の検討などを通じて *in vitro* 再構成系を構築し、ACP 上で酵素を介して行われる一連の反応の検出や生合成中間体と推定される未知化合物の生成が確認できた。現在、各生合成酵素の解析や *in vivo* での解析を通じて、生合成機構の全容解明を目指している。

Amipurimycin is a peptidyl nucleoside antibiotic containing a nonproteinogenic amino acid, which was isolated from *Streptomyces novoguineensis*.[1] We have identified the biosynthetic gene cluster for amipurimycin.[2] The gene cluster contains seven candidate genes for the biosynthesis of the unusual amino acid. In this study, we aim to elucidate the biosynthetic mechanism of the unusual amino acid through in vitro analysis of each biosynthetic enzyme and in vivo production of the unusual amino acid in the heterologous host *Streptomyces albus*.

1) Structure of amipurimycin, a nucleoside antibiotic having a novel branched sugar moiety. *Tetrahedron Lett*. 23: 1271-1274 (1982)

2) The amipurimycin and miharamycin biosynthetic gene clusters: unraveling the origins of 2-aminopurinyl peptidyl nucleoside antibiotics. *J. Am. Chem. Soc*. 141: 14152-14159 (2019)

peptidyl nucleoside, polyketide synthase, nonproteinogenic amino acid

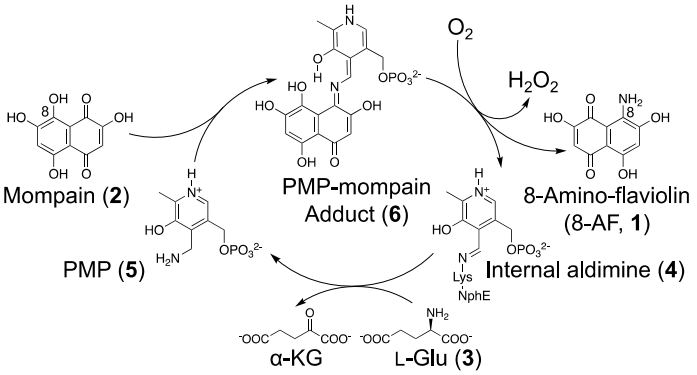
発表責任者：日比玄紀（hibi-genki841@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E01-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム E

アミノ基転移と酸素による酸化を触媒する新規二機能性 PLP 依存性酵素の反応機構
Reaction Mechanism of an Unprecedented Oxygen- and PLP-dependent Aminotransferase

○野口 智弘[1]、寺田 透[1,2]、西山 真[1,2]、葛山 智久[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構)
○Tomohiro Noguchi[1], Tohru Terada[1,2], Makoto Nishiyama[1,2], Tomohisa Kuzuyama[1,2] ([1]GSALS, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

放線菌が生産するメロテルペノイドに共通の生合成中間体である **1** は、ナフトキノン骨格を有する **2** の 8 位のヒドロキシ基がアミノ基へと変換されることで生合成される[1]。**2** から **1** への変換は通常のアミノ基転移反応とは異なり、二電子の酸化が必要な特殊なアミノ基転移反応であり、NphE やそのホモログが関与することが示されていたが、詳細な解析は行われてこなかった。そのため NphE の反応機構の解明を本研究の目的とした。



NphE の組換えタンパク質を大腸菌から調製して *in vitro* 反応に供し、HPLC、LC-MS、分光光度計、酸素電極を用いて解析を行った。さらに Alphafold v2.0[2]で得られた NphE の立体構造と予想中間体との複合体構造の MD 計算を行った。その結果、NphE の反応では **3** と **4** とのアミノ基交換によって生成した **5** が **2** と脱水縮合することで非常に長い共役系 (極大吸収 $\lambda_{max}\approx$ 610 nm)を有する **6** (キノノイド中間体)を形成し、この **6** は酸素によって酸化、開裂して **1** を生成することを明らかにした。以上のことから NphE がアミノ基転移と酸素による酸化反応を両方触媒する、新規な二機能性酵素であることを示した。

Pyridoxal 5′-phosphate (PLP)-dependent enzymes are a group of versatile enzymes that catalyze various reactions, but only a small number of them react with O_2. Here, we report an unprecedented PLP-dependent enzyme, NphE, that catalyzes both transamination and two-electron oxidation using O_2 as an oxidant. Our intensive analysis reveals that NphE transfers the L-glutamate-derived amine to 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN)-derived mompain to form 8-amino-flaviolin (8-AF) via a highly conjugated quinonoid intermediate ($\lambda_{max}\approx$ 610 nm) that is reactive with O_2. During the NphE-catalyzing reaction, O_2 is reduced to yield H_2O_2. We identified an O_2-accessible cavity via an integrated technique involving NphE structure prediction by AlphaFold v2.0[2] and molecular dynamics simulation.

[1] S. Isogai, *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 5823 (2012)
[2] Jumper, J. *et al. Nature* 596, 583 (2021)

natural product biosynthesis, transamination, oxidation

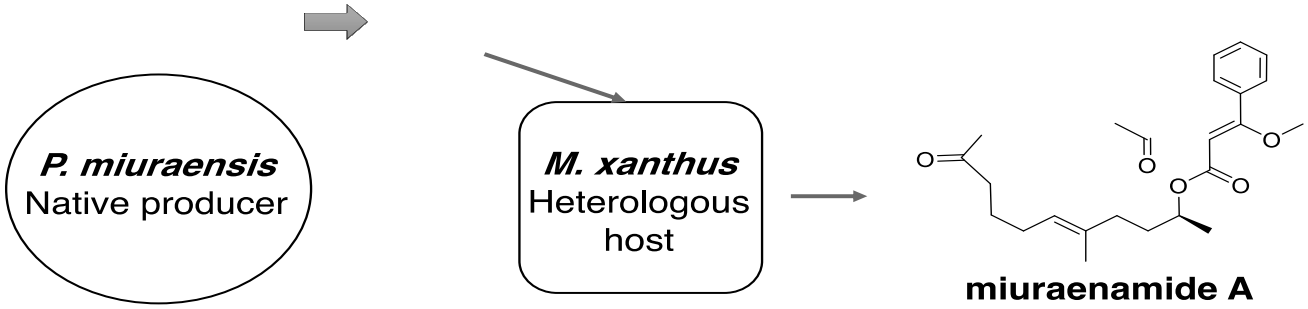
発表責任者：野口智弘（neon950107@gmail.com）

講演番号：3E03-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

Heterologous Biosynthesis of Myxobacterial Antibiotic Miuraenamide A

○YING LIU, Satoshi YAMAZAKI, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

The marine myxobacteria *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4 was isolated from a near seashore soil sample in Japan[1]. As a unique secondary metabolite, miuraenamide A was isolated and exhibited strong antifungal and cytotoxic activity, unique actin interaction mode, and a simple structure[2-4]. Those properties make it an ideal candidate for potential antifungal and anti-tumor drug development. Since the production from the native producer or total synthesis is complicated and in a low yield, this study aims to achieve heterologous biosynthesis of miuraenamide A in a myxobacterial type strain for its efficient production.



A de novo assembled draft genome and functional annotation for *P. miuraensis* SMH-27-4 was first conducted. *P. miuraensis* SMH-27-4 is furnished with 11.9 Mbp genome and represents a novel genus of the Nannocystaceae family. It owns up to 24 well-defined biosynthetic gene clusters (BGC), and at least 6% of the genome is devoted to secondary metabolism. The putative miuraenamide A BGC (miu BGC) spans 87 kb containing 36 open reading frames. The miu BGC was then cloned to a BAC and introduced to the myxobacterium *Myxococcus xanthus* via homologous recombination. The heterologous biosynthesis of miuraenamide A succeeded and intermediates were also detected as non-natural products. The functions of some genes are now investigated.

[1] T. Iizuka *et al.*, *J. Antibiot.*, **2006**, 59, 385–391.
[2] M. Ojika *et al.*, *Chem. Asian J.*, **2008**, 3, 126–133.
[3] E. Sumiya *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, 6, 425–431.
[4] S. Wang *et al.*, *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 9731.

myxobacteria, heterologous expression, biosynthetic gene cluster

発表責任者：小鹿一（ojika@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E03-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB の構造活性相関解析

Structure-activity relationship of butenolide type signaling molecule SRB for induction of antibiotic production

○手島 愛子、江口 雄聡、荒川 賢治（広島大院・統合生命）
○Aiko TESHIMA, Yuto EGUCHI, Kenji ARAKAWA (Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン（LC）およびランカマイシン（LM）を生産し、それらの生産は抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB（*Streptomyces rochei* butenolide）により厳密に制御されている。SRB は SRB 生合成因子 SrrX によって生合成され、2,3-二置換ブテノライド構造を有している。また、40 nM という極低濃度で抗生物質生産を誘導する。この二次代謝誘導能を利用し、放線菌の二次代謝活性化を行おうと考えた。しかし、SRB の C-2 位の炭化水素鎖には、ケト基やメチル基が存在しており、側鎖合成に 6 工程を要するため、市販の直鎖アルデヒドで代用が可能かを調べることとした。鎖長の異なる 5 種類の SRB 誘導体（合成に使用した直鎖アルデヒドの炭素鎖長に基づき、C_4-SRB, C_6-SRB, C_8-SRB, C_{10}-SRB, C_{12}-SRB と名付けた）を化学合成し、各々を *srrX* 欠損株 KA20 に添加し、28°C で 48 時間培養した。この培養液を酢酸エチルで抽出し、LC, LM 生産の回復を TLC により評価した。C_4-SRB および C_6-SRB は 1 mM でも LC, LM 生産を回復しなかった。C_8-SRB および C_{10}-SRB については、μM オーダーで活性が認められ、C_{12}-SRB はいずれの濃度でも生育阻害が出た。

Streptomyces rochei strain 7434AN4 produces two structurally unrelated polyketide antibiotics: lankacidin and lankamycin, and their biosynthesis is tightly controlled by signal molecules, termed *Streptomyces rochei* butenolide (SRB). SRB contains butenolide skeleton and is produced by SRB synthase SrrX. Its minimum concentration for induction of antibiotics production is 40 nM. For the synthetic efficiency, we synthesized five SRB derivatives with various C-2 side-chain-length, and fed into *srrX* mutant strain. After cultured for 48 hours, we investigated to the recovery of LC, LM by TLC analysis. C_8-SRB and C_{10}-SRB exhibited antibiotic-inducing activity around μM order in *S. rochei*, whereas C_4-SRB and C_6-SRB failed to induce antibiotic production even at 1 mM. C_{12}-SRB showed growth inhibition when it was supplemented at early stage of cultivation.

signaling molecule, *Streptomyces*, secondary metabolite

講演番号：3E03-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

シグナル分子を用いた二次代謝産物のゲノムマイニングへのアプローチ

Approach to genome mining for secondary metabolites using the *Streptomyces* signaling molecules

○平田 朝陽[1]、手島 愛子[2]、江口 雄聡[2]、住吉 美保[3]、荒川 賢治[1,2,3]([1]広島大・工、[2]広島大院・統合生命、[3]広島大院・先端研)
○Asahi HIRATA[1], Aiko TESHIMA[2], Yuto EGUCHI[2], Miho SUMIYOSHI[3], Kenji ARAKAWA[1,2,3] ([1]Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】
放線菌はさまざまな二次代謝産物を生産し、それらはシグナル分子によって生産が制御されている。*Streptomyces* 属放線菌は 1 株あたり 30 種類を超える二次代謝産物遺伝子をコードしているが、通常培養ではこれらが全て機能しているわけではなく、得られる二次代謝産物はこのうち数種類であり、8~9 割は休眠状態である。さらにその生産はシグナル分子によって厳密に制御されている。このことからも放線菌ゲノムは天然有機化合物の宝庫であると言える。本研究では、*Streptomyces rochei* で見出された、ブテノライド型シグナル分子 SRB の二次代謝生産誘導システムを利用して、休眠二次代謝の活性化を目指している。
【方法・結果】
シグナル分子 SRB の C-2 位の炭化水素鎖には、ケト基やメチル基が存在し、有機合成による構築に多くの工程を要した。そのため、本研究では、この炭化水素鎖の代わりに市販の直鎖アルデヒド(オクタナール)を用いて、構造を簡略化した SRB 誘導体 C-8 SRB を合成した。SRB 誘導体を添加した供試菌 46 株の代謝プロファイルを調べると、18 菌株の代謝プロファイルに変化が見られており、SRB 誘導体の添加により二次代謝生産が活性化される供試菌の存在が確認された。さらに、SRB 誘導体の添加によって、新たに抗菌活性物質の生産が見られる株も検出できた。現在、新たに生産が認められた代謝産物の単離、構造決定を行っており、その経緯について報告する。

Secondary metabolite production in *Streptomyces* is regulated by signaling molecules. *Streptomyces* sp. harbors more than 30 secondary metabolite genes on there genomes, however, most of them are silent in normal culture condition. In this research, we are trying to activate the silent secondary metabolism using signaling molecule SRB that is produced by *Streptomyces rochei*. For the synthetic efficiency, we used simplified SRB (C-8 SRB) that harbors *n*-octan-1-ol instead of 6-oxo-8-methyl decan-1-ol at C-2. When 46 test strains were tested with C-8 SRB, the metabolic profiles of 18 strains were changed. Furthermore, some strains showed new production of antimicrobial active substances by addition of C-8 SRB, the results of which will be described in this paper.

Streptomyces, signaling molecule, secondary metabolite

講演番号：3E03-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

アーキア型メバロン酸経路を用いた大腸菌のイソプレノイド生産能強化

Enhancement of isoprenoid productivity of Escherichia coli utilizing the archaeal mevalonate pathway

○高橋 拓矢、吉田 稜、伊藤 智和、吉村 徹、邊見 久（名大院農）
○TAKUYA TAKAHASHI, RYO YOSHIDA, TOMOKAZU ITO, TOHRU YOSHIMURA, HISASHI HEMMI (Nagoya Univ.)

メバロン酸（MVA）経路はイソプレノイドの生合成前駆体を供給する経路の一つである。我々は近年、大部分のアーキアに保存される変形経路である、アーキア型 MVA 経路を見出した。同経路は、１分子の IPP を合成するのに３分子の ATP を消費する既知の MVA 経路とは異なり、同じ過程に２分子の ATP しか必要としない省エネ型の代謝経路である。そのため、イソプレノイドの微生物生産への応用が期待されている。本研究では，常温性メタン生成アーキア *Methanosarcina mazei* より単離した酵素遺伝子を挿入したアーキア型 MVA 経路導入用のプラスミドを作製し、同経路を大腸菌中に再構成した。また IPP から揮発性のファルネセン（Fn）を生合成する経路の遺伝子を共発現させ、培地にドデカンを重層し Fn を蓄積させることでイソプレノイド生産能を定量した。アーキア型 MVA 経路導入株は、好気培養条件では Fn を生産せず、振盪速度を緩やかにしたところ Fn を生産するようになった。この準嫌気条件では、生産誘導開始から 18 時間後の Fn 蓄積量は比較対象とした古典的 MVA 経路導入株と同程度であった。本発表では経時的な観察で見られた両株の差異を、毒性中間体である IPP 蓄積の影響を考慮して現在取り組んでいる遺伝子発現調節の結果も含めて報告する。

The mevalonate (MVA) pathway is one of the pathways that supply biosynthetic precursors for isoprenoids. We have recently discovered a new modified pathway conserved in most archaea, the archaeal MVA pathway. The pathway is an energy-saving metabolic pathway that requires only 2 ATP to synthesize one molecule of IPP, unlike the known MVA pathways that consume 3 ATP for the same process. Therefore, it is expected to be applied for the bio-production of isoprenoids. In this study, a plasmid containing enzyme genes isolated from a mesophilic methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* was constructed for the introduction of the archaeal MVA pathway in *Escherichia. coli*. We also co-expressed the farnesene (Fn) biosynthetic pathway genes and quantified accumulated Fn in dodecane overlaid on a culture medium to determine isoprenoid productivity. The archaeal MVA pathway transgenic strain did not produce Fn under aerobic culture conditions but produced Fn when the shaking speed was slowed down. Under the semi-anaerobic conditions, Fn accumulation at 18 hours after the start of induction was comparable to that of a classical MVA pathway transgenic strain used for comparison.

mevalonate pathway, archaea, isoprenoid

発表責任者：邊見久（hhemmi@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E03-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

機能多様化を指向したシネオール合成酵素の多世代進化

Divergent evolution of Cineol synthase through genetic drift.

○平野 裕真[1]、市川 智之[1]、木下 葵子[1]、小野里 由実[1]、河合(野間) 繁子[1]、梅野 太輔[1,2] ([1]千葉大工、[2]早大先進理工)
○Yuma HIRANO[1], Tomoyuki ICHIKAWA[1], Noriko KINOSHITA[1], Yumi ONOZATO[1], Shigeko KAWAI-NOMA[1], Daisuke UMENO[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Waseda Univ.)

モノテルペン合成には，ジメチルアリル二リン酸(DMAPP)およびイソプレン二リン酸(IPP)が一分子ずつ消費される。我々は，外部から添加したジメチルアリルアルコール(DMAOH)の二リン酸化によって DMAPP を細胞に過剰蓄積すると，その強毒性によって宿主細胞が非常に効率よく死滅することを見出した．この DMAPP 過剰蓄積条件での培養によって，DMAPP 基質の消費活性を維持したテルペン合成酵素変異体が濃縮できることが確認できた。ランダム変異の導入と基質消費選抜を繰り返し，多世代にわたって遺伝子変異を蓄積させることによって，バクテリア由来シネオール合成酵素のプロダクト特異性に有意な発散が観察された．

Monoterpenes are biosynthesized via condensation of dimethylallylpyrophosphate (DMAPP) and isoprenylpyrophosphate (IPP), common precursor of all isoprenoids. By controlled accumulation of DMAPP, which is known to strongly inhibit cell growth, we have constructed efficient selection system for active monoterpene cyclases. Iterative rounds of random mutagenesis and elimination of dead (non-functional) mutants using this selection resulted in the divergence of the product specificity of bacterial cineol synthase.

synthetic biology, divergent evolution, directed evolution

講演番号：3E03-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

メタボローム解析で見出した代謝変動の解釈を支援するキーワード提示技術の開発

Keyword recommendation of molecular mechanisms based on metabolome data and the researcher's knowledge

○松田 史生[1]、金澤 慎司[1,2,3]、山田 洋平[2]、清水 悟司[2]、梶原 茂樹[2]、向 紀雄[2]、飯田 順子[2,3] ([1]阪大院情報、[2]島津製作所、[3]阪大・島津分析イノベーション研究所)
○Fumio Matsuda[1], Shinji Kanazawa[1,2,3], Yohei Yamada[2], Satoshi Shimizu[2], Shigeki Kajihara[2], Norio Mukai[2], Junko Iida[2,3] ([1]Osaka Univ, [2]Shimadzu Corp., [3]Osaka Univ & Shimadzu)

【目的】メタボロミクスの発展により、薬剤の投与や疾患の進展に連動して生体中含量が増減する内因性代謝物といった、バイオマーカー分子を見出すことが可能となってきた。しかし、発見した代謝変動の意味を既存の知識と繋げて解釈する作業は、研究者の代謝に関する知識と文献調査に強く依存する困難な作業となっている。そこで本研究では代謝物と、所与のキーワードから、分子メカニズムに関するキーワードを自動提案する新たな手法の開発を試みた。
【方法と結果】本研究ではキーワードとして、PubMed のインデックスである MeSH (Medical Subject Headings)タームを用いた。MeSH タームの共起情報を用いて、メタボローム解析により見つかった代謝物の MeSH ターム、および研究における所与のキーワード（疾患名など）の MeSH タームの両方と、統計的に優位に共起する MeSH タームを提案する手法を開発した。 “Sarcosine”および”Prostate Neoplasm”という 2 種の MeSH タームをクエリとして、構築した手法をテストした。その結果、“Sarcosine Dehydrogenase” など 5 つの MeSH タームが提案され、関連する文献の調査から、前立腺がんでサルコシン含量が増加する分子メカニズムに関する文献情報を容易に得ることができた。
Metabolomics has been used to find biomarker candidate metabolites from various biological samples. However, estimating a molecular mechanism behind the metabolite accumulation is difficult since it depends on the researcher’s knowledge. This study reports a novel method to find MeSH (Medical Subject Headings) terms of PubMed that connects between a "metabolite" obtained by the metabolome analysis and a "researcher's known keyword" such as a name of the disease using the MeSH co-occurrence data. Pilot analyses using the literature reported biomarker (sarcosine in prostate cancer) demonstrated that metabolic reaction responsible for the sarcosine metabolism such as “Sarcosine Dehydrogenase” were recommended. The developed method can recommend keywords that would be valuable for further investigating the molecular mechanism behind the metabolome data.

metabolism, biomarker, keyword recommendation

発表責任者：松田史生（fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3E03-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

アブラナ科作物ハクサイ、コマツナにおけるオーキシン代謝物の分析

Analysis of auxin metabolites in Brassica crops Chinese cabbage and komatsuna

○礒邊 拓也[1,2]、宮川 恒[1,2] ([1]京大農、[2]日本農芸化学会)
○Takuya Isobe[1,2], Hisashi Miyagawa[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JSBBA)

【目的】植物ホルモンのひとつであるオーキシンは, さまざまな恒常性維持メカニズムによりその組織内濃度が厳密に維持されている。このメカニズムのうち代謝では, 酸化や生体成分との抱合を組み合わせた代謝物を生成することが知られている。そこで本研究では, アブラナ科作物ハクサイ, コマツナについてインドール-3-酢酸 （IAA） およびその代謝物を定量し, IAA 代謝プロファイルを明らかにした。また, 塩ストレス処理時の代謝物も定量し, ストレス応答時の IAA 代謝プロファイルの変化を調べた。

【方法】発芽後 5 日間水耕栽培したハクサイ, コマツナ を 200 mM NaCl 水溶液 （コントロールは水）で 24 時間生育し, 地上部と根部に分けて 80%アセトン水溶液で抽出した。抽出液と水耕液をそれぞれ濃縮し, 固相抽出により精製した後, LC-ESI-MS/MS （Shimadzu LCMS-8040） 分析に供した。

【結果・考察】ハクサイ, コマツナともに, IAA のインドール環の 2 位が酸化された OxIAA, さらに 3 位が酸化された DiOxIAA などの酸化代謝物が地上部, 根部, 水耕液中のそれぞれに多く含まれていた。一方で, シロイヌナズナやイネで観察されている Asp, Glu の抱合体はほとんど見られなかった。塩処理により, ハクサイの地上部, 水耕液中とコマツナの水耕液中で DiOxIAA が有意に増加した。IAA を含む他の代謝物では有意な差は見られなかった。このことから, 塩ストレス下のハクサイとコマツナでは IAA 酸化代謝の活性が上昇することが示唆された。

The auxin levels in plants tissue are strictly maintained by multiple homeostatic mechanisms. Among these mechanisms, metabolism is known to produce metabolites through a combination of oxidation and conjugation with biological components. In this study, we quantified indole-3-acetic acid (IAA) and its metabolites in Brassica crops Chinese cabbage and komatsuna and clarified the metabolic profile of IAA. In addition, we quantified IAA and its metabolites under salt stress condition and investigated the changes in IAA metabolic profile.

Chinese cabbage and komatsuna plant seedlings grown hydroponically for 5 days after germination were treated with 200 mM NaCl solution (control: water) for 24 hours, and then the shoots and roots were separated to be extracted with 80% acetone. The extracts and the hydroponic fluid were concentrated and purified by solid-phase extraction and analyzed by LC-ESI-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040).

In both Chinese cabbage and komatsuna, oxidized metabolites such as OxIAA (oxidized at the 2-position of the indole ring of IAA) and DiOxIAA (oxidized at the 2 and 3-positions) were abundant in shoots, roots, and hydroponic fluid respectively, while Asp and Glu conjugates, which have been observed in *Arabidopsis* and rice, were almost absent. By salt treatment, DiOxIAA were significantly increased in the shoots of Chinese cabbage and the hydroponic fluid of both Chinese cabbage and komatsuna. The levels of IAA and other metabolites were almost unchanged. These results suggest that the activity of IAA oxidative metabolism is increased in Chinese cabbage and komatsuna under salt stress.

Brassica crops, Chinese cabbage and komatsuna, auxin

発表責任者：礒邊拓也（isobe.takuya.88n@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E03-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

イネジャポニカ品種における新葉へのβ-チロシン集約機構の解明

Elucidation of the mechanism of β-tyrosine accumulation in the youngest leaf of Japanese rice plants

○阪本 駿太[1]、吉川 貴徳[1]、寺石 政義[1]、吉永 直子[1]、落合 久美子[1]、小林 優[1]、奥本 裕[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]摂南大農)

○Shunta SAKAMOTO[1], Takanori YOSHIKAWA[1], Masayoshi TERAISHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Kumiko OCHIAI[1], Masaru KOBAYASHI[1], Yutaka OKUMOTO[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Setsunan Univ.)

イネジャポニカ品種（*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*）は植物界において新規な非タンパク質性アミノ酸 (3*R*)-β-チロシン（以降 β-チロシン）をもつと我々は明らかにした [1]．しかし，その生理的・生態的意義は不明である．これら意義の解明は亜熱帯原産であるイネ [2]が温帯地域へ適応した進化の理解を深める．そこで我々は，イネ（品種日本晴）における β-チロシンの動態を調べた．

葉ごとの β-チロシン濃度を LCMS で定量すると，β-チロシンは新葉（展開直後の葉）に豊富であった．それに対して，β-チロシン生合成酵素 OsTAM1 活性は成熟葉（展開して時間が経過した葉）で高かった．これより，日本晴は β-チロシンを成熟葉から新葉に転流すると仮説を立てた．そこで，独自に確立した β-チロシンの化学合成法を用いて得た ^{13}C 標識化 β-チロシンを日本晴の成熟葉に与えると，新葉から検出された．また，β-チロシンは師管液に含まれた．さらに，成熟葉を切除すると，新葉の β-チロシン濃度は低下した．以上より，日本晴は β-チロシンを成熟葉で活発に産生し，師管を通して新葉に転流，蓄積すると結論した．つまり，日本晴は体系的に β-チロシンを新葉に集約する．

We found that Japanese rice plants (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) produce a non-proteinogenic amino acid, (3*R*)-β-tyrosine, which is novel in plant kingdom [1]. Physiological, and ecological roles of β-tyrosine remain unknown. The elucidation of the roles will lead to better understanding of adaptive evolution to the temperate zone in rice plants, which were originally distributed in the subtropics [2]. Therefore, we investigated the kinetics of β-tyrosine in cultivar Nipponbare.

LC/MS analysis of Nipponbare leaves showed that β-tyrosine is abundant in the youngest leaf (the most newly developed leaf). In contrast, the activity of OsTAM1, an enzyme which produces β-tyrosine, was higher in mature leaves (previously developed leaves). Based on these results, we hypothesized that β-tyrosine is transported from mature leaves to the youngest leaf. Therefore, we synthesized ^{13}C labeled β-tyrosine by novel method and applied on a mature leaf. The labeled compound was detected in the youngest leaf, and β-tyrosine was contained in phloem exudates. Furthermore, removal of mature leaves decreased β-tyrosine level in the youngest leaf. Thus, we concluded that β-tyrosine is actively produced in mature leaves and then transported to the youngest leaf via phloem in Nipponbare. Collectively, Nipponbare systemically accumulates β-tyrosine in the youngest leaf.

[1] Yan et al., *Plant Cell*, 27(4), 1265-1278 (2015); [2] Huang et al., *Nature*, 490(7421), 497-501 (2012)

β-tyrosine, Japanese rice plants, long-distance transport

講演番号：3E03-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

ヤマカガシ属ヘビが保有する強心性ステロイドの種関差異

Interspecific Differences in Cardiotonic Steroids Sequestered by Rhabdophis Snakes

○井上 綾[1]、井上 貴斗[2]、吉永 直子[2]、森 哲[3]、森 直樹[2]([1]京大農、[2]京大院農、[3]京大院理)
○Aya INOUE[1], Takato INOUE[2], Naoko YOSHINAGA[2], Akira MORI[3], Naoki MORI[2] ([1]Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

【背景・目的】日本に生息するユウダ亜科のヘビであるヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) は、ヒキガエルを食べることで頸腺と呼ばれる器官にヒキガエル由来の強心性ステロイド化合物 bufadienolide 類 (BDs) を防御物質として蓄積する。ヤマカガシのように、エサ由来の毒を専用の器官に蓄積する脊椎動物は同属種以外では知られていない。海外に生息するヤマカガシ属ヘビの頸腺の形態はさまざまであり、頸腺は多様に進化している。そこで、本研究では、頸腺の形態学的、系統学的知見と関連付けて、化学的観点から頸腺の多様性について更なる知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】 頸腺液をしぼり、LC/MS を用いて海外のヤマカガシ属計 9 種の頸腺液の成分分析を行った。その結果を用いてクラスター分析を行ったところ、種によって毒組成に差がみられ、祖先的な種に特異的な成分が 4 成分検出された。これまで日本のヤマカガシから検出された BDs は分子量約 400–440 までの成分であったが、今回検出された 4 成分には今まで日本のヤマカガシからは検出されたことのない、分子量 386、448 の成分が存在した。これらの 2 成分に着目し、その特徴からヤマカガシ属の頸腺の進化、多様性について考察を行った。

The Japanese natricine snake, *Rhabdophis tigrinus*, feeds on toads and accumulates toad-derived cardiotonic steroids, bufadienolides (BDs), as defensive toxins in the nuchal glands. Morphology of the nuchal glands of *Rhabdophis* species in overseas countries varies, indicating the diversified evolution. In this study, LC/MS was applied to analyze the BDs in nuchal gland fluids from 9 *Rhabdophis* species. We compared their BD profiles using hierarchical cluster analysis. As a result, there were differences in the BD profiles among the species, and 4 compounds specific to the ancestral species were detected. Previously, BDs detected in *R.tigrinus* were compounds with molecular weights ranging from about 400 to 440. However, in this study, compounds with molecular weights of 386 and 448 were detected. We focused on these 2 compounds and based on their characteristics, we discussed the evolution and diversity of the nuchal glands.

biotoxin, bufadienolides, nuchal glands

講演番号：3E03-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム E

ヤマカガシにおけるエサ由来毒素変換能力の多様性

Diversity in the ability to convert toad-derived toxins in Rhabdophis tigrinus

○井上 貴斗[1]、吉永 直子[1]、森 哲[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]京大院理)
○Takato INOUE[1], Naoko YOSHINAGA[1], Akira MORI[2], Naoki MORI[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

【背景・目的】日本に生息するユウダ亜科のヘビであるヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) はヒキガエルを食べ、強心性ステロイド化合物の bufadienolide 類 (BD 類) を頸腺と呼ばれる頸部の器官に防御物質として蓄える。これまでに、ヤマカガシが自然条件下でヒキガエル由来 BD 類を構造変換していることを明らかにした。特に、日本産ヒキガエルの最も普遍的成分である bufalin をヤマカガシがもたないことから、ヤマカガシ体内で bufalin は種々の形に変換されていると予想した (Inoue et al. 2020; 2021)。そこで本研究では bufalin 変換能力の実験的検証を目的とし、ヤマカガシに対する bufalin 給餌試験を行った。

【方法・結果】愛媛県産ヤマカガシ (*N*=14) を採集し、野外での摂食由来の毒成分を排除するために頸腺液を全て採取した。約 3 か月間飼育後、エタノールに溶解させた bufalin を体表に 2 mg 塗布したトノサマガエルを、約 2 週間おきに 3–5 回与えた。常時のエサは BD 類をもたない日本産の種々のカエルを与えた。半年間飼育後、再び頸腺液採取を試みた。その結果、飼育個体全てで、部分的あるいは全体的に頸腺が再生し、頸腺液を採取できた。また、頸腺液成分を LC/MS 分析した結果、図 1 に示したように、8 化合物を bufalin の変換産物として確認した。

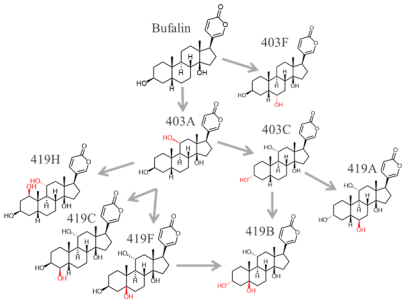


図 1 ヤマカガシにおけるヒキガエル由来 bufalin の予想変換反応

The Japanese natricine snake, *Rhabdophis tigrinus*, sequesters bufadienolides (BDs), cardiotonic steroids from toads, as defensive toxins into the nuchal glands (NGs). The snake chemically converts BDs from toads under natural conditions, and in particular, bufalin, the most ubiquitous component of the Japanese toad, is not found in the snake. This suggests that bufalin is converted into various BDs in the snake. In this study, we conducted bufalin feeding experiments on *R. tigrinus* in order to verify the bufalin conversion ability of the snake. The NG fluids of *R. tigrinus* (*N*=14) were squeezed out to eliminate BDs obtained in wild. After rearing for about 3 months, the snakes were fed 3–5 times every 2 weeks with the BD-free frogs to which 2 mg of bufalin was applied. After 6 months of feeding, we attempted to collect NG fluids. As a result, NGs were partially or completely regenerated and NG fluids were collected from all the snakes. LC/MS analyses of the NG fluid components revealed that 8 compounds of the BDs shown in Fig. 1 were identified as conversion products from bufalin.

biotoxin, bufadienolide, chemical conversion

発表責任者：井上貴斗（chem-riku.it@outlook.jp）

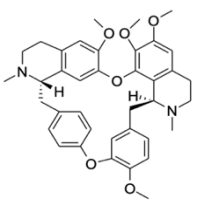
講演番号：3E05-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

Analysis of subcellular localization of tetrandrine that modulates autophagy-lysosome pathway

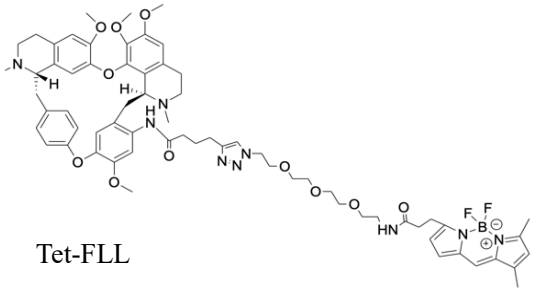
○ZHE YANG[1], Tomoki Takahashi[2], Tatsuya Yamamoto[3], Hiroko Isoda[3,4], Hideyuki Shigemori[3,5], Yusaku Miyamae[3,4] ([1]Grad. Sch. Human. Comp. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]FLES, Univ. Tsukuba, [4]ARENA, Univ. Tsukuba, [5]MiCS, Univ. Tsukuba)

Autophagy is a fundamental cellular process for maintaining cellular and tissue homeostasis. In response to starvation or hormonal stimulus, unnecessary or dysfunctional cytoplasmic components are surrounded by double membrane vesicle and degraded hydrolases after fusion with lysosomes. Imbalance of autophagy have been linked to various human diseases, including neurodegeneration and cancer. There have been growing interests in modulating autophagy as a potential treatment for these diseases.

Tetrandrine is a bis-benzylisoquinoline alkaloid initially isolated from the root of a traditional medicinal herb, *Stephania tetrandra* S Moore. Several researchers reported that tetrandrine acts as an autophagy activator, while Qiu et al. showed that tetrandrine was a potent lysosomal alkalizing agent that impairs the lysosomal function and causes a blockade of the autophagic flux. In contrast with previous studies, Miyamae et al. proved that tetrandrine was an autophagy blocker, inhibited autophagic flux without affecting lysosomal function, and may target regulators involved in fusion between autophagosomes and lysosomes. To resolve the contradiction, this study aims to clarify the subcellular localization and potential target of tetrandrine by using a fluorescent-labeled tetrandrine, termed Tet-FLL. Initially, to investigate the bioavailability of Tet-FLL, Hela cells were treated with Tet-FLL for 1 hour, then incubated with a drug-free medium for 1, 16, or 24 hours, and then subjected to Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) for measurement of cellular fluorescent intensity. We detected a strong signal even after 24 hours wash-out. This result demonstrates that Tet-FLL is not be easily metabolized in cells and could be used as an effective tool in subcellular localization observation. By using immunoblotting, we confirmed that Tet-FLL has also increased the level of microtubule-associated protein 1 light chain 3, type II (LC3-II), suggesting that conjugation of a fluorescent group does not affect the bioactivity. Moreover, cells treated with Tet-FLL were dyed with ER-tracker and Lysotracker, and their localizations were observed by confocal microscopy. We found that the fluorescence of Tet-FLL was specifically co-localized with lysosome. The effect of tetrandrine on the fusion between autophagosome and lysosome is under investigation.



Tetrandrine



Tet-FLL

autophagy, tetrandrine, subcellular localization

発表責任者：宮前　友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E05-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

Effect of Cyanidin 3-Glucoside on the Production of Hepatocyte Growth Factor in Normal Human Dermal Fibroblasts

○Annisa Krama[1], Natsu Tokura[2], Hiroko Isoda[3,4], Hideyuki Shigemori[3,5], Yusaku Miyamae[3,4]
([1]SIGMA, Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life. Environ. Sci. Univ. Tsukuba, [3]FLES, Univ. Tsukuba, [4]ARENA, Univ. Tsukuba, [5]MiCS, Univ. Tsukuba)

Hepatocyte growth factors (HGF) has been commonly known as a mitogen of hepatocytes. Besides hepatocytes, HGF has been discovered to stimulate epithelial cell proliferation, motility, morphogenesis, and angiogenesis in various organs. HGF is found as therapeutic agent for renal fibrosis and cardiovascular diseases by inducing proliferation of epithelial and endothelial cells. Therefore, inducing HGF production will be useful as a potential application of disease treatments. The purpose of this study is to identify the natural derived compound which has promoting effects on HGF production levels in Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF).

A series of natural derived compounds were treated to NHDF cells, and the secreted HGF level was determined by ELISA assay. HGF level was significantly increased by the treatment of cyanidin 3-glucoside (C3G) which is known as an anthocyanin. We also found that treatment of C3G in various concentrations (1, 5, 20, 50 μM) showed increased levels of HGF productions in dose- and time-dependent manner, and significantly increased mRNA levels of HGF compared with vehicle groups. To elucidate the mechanism of C3G on the stimulation of HGF production, we examined whether the increase of HGF production is canceled in the presence of inhibitors specific for Erk, PKA, or PKC pathways. Among them, PKA inhibitors such as KT5720 and H89 specifically suppressed the promoting effect of C3G. Furthermore, immunoblotting showed that C3G promoted the intensity of phosphorylation of cAMP responsive element binding protein (CREB). These results suggested that C3G stimulated the HGF production through the PKA pathway. To investigate whether C3G promotes the activation of cAMP, we performed a reporter assay by utilizing a pGL4.29 plasmid, as a construct that contains CRE-Luc reporter gene which can measure the promoter activity of CRE. HEK293 cells were transfected with the plasmids and then treated with forskolin, phosphodiesterase (PDE) inhibitors (rolipram and IBMX), and C3G for 6 h and 24 h. We observed that the luciferase activity was activated by the treatment of forskolin, an adenyl cyclase activator, and further enhanced by co-treatment of C3G and forskolin. This suggested that C3G has the synergistic effect on the promoter activity of CRE in combination with forskolin and may have different target other than adenyl cyclase. Currently, we are investigating on potential target of C3G in PKA pathway.

cyanidin 3-glucoside, hepatocyte growth factor, PKA pathway

発表責任者：Yusaku Miyamae（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

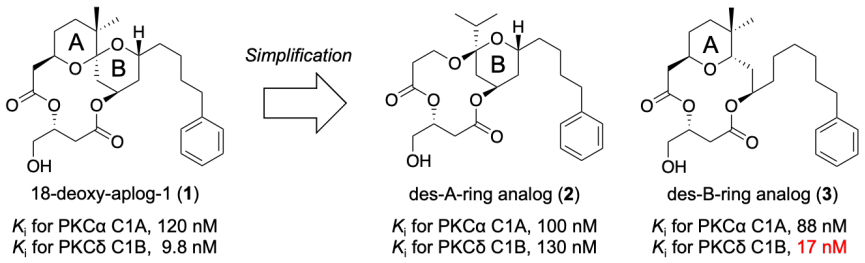
講演番号：3E05-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

B 環を除去した Aplysiatoxin 単純化アナログの合成と生物活性

Synthesis and biological activities of des-B-ring simplified analog of aplysiatoxin

○関戸 智紀[1]、山本 剛資[1]、柳田 亮[2]、花木 祐輔[2]、川浪 康弘[2]、入江 一浩[3]([1]香川大院農、[2]香川大農、[3]京大院農)

○Tomoki SEKIDO[1], Takeshi YAMAMOTO[1], Ryo C. YANAGITA[2], Yusuke HANAKI[2], Yasuhiro KAWANAMI[2], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa University, [3]Kyoto Univ.)



Protein kinase C (PKC) は様々な細胞内シグナル伝達に関与し、がん等の難治性疾患の治療における潜在的な標的として注目されている。海洋天然物 aplysiatoxin (ATX) は、11 種類からなる PKC アイソザイムのうち conventional PKC (α, βI, βII, γ) と novel PKC (δ, ε, η, θ) の C1 ドメイン (C1A, C1B) に結合し、強力に活性化する。近年、がんにおいて PKC に機能喪失変異が起きていることが明らかとなっていることから、PKC のアイソザイム選択的な活性化は副作用の少ないがん治療戦略として有望であると考えられている。我々はこれまでに ATX の構造を単純化した一連のアナログを開発し、特にスピロ環の A 環の構造改変がアイソザイム選択性を大きく変化させることを見出した。そこで本研究では、18-deoxy-aplog-1 (**1**) の B 環を除去した des-B-ring analog (**3**) を合成し、各種生物活性を評価した。化合物 **3** は PKCδ-C1B 及び α-C1A ドメインの両方に対して **1** と同程度の親和性を有していた。A 環の除去は PKCδ-C1B に対する親和性を大きく低下させることから、この結果は PKCδ-C1B がスピロ環の B 環よりも A 環を強く認識していることを示唆している。

Protein kinase C (PKC) is involved in various intracellular signaling and is attracted as a potential target for the treatment of intractable diseases such as cancer. Aplysiatoxin (ATX), the marine natural product, binds to and activates the C1 domains (C1A, C1B) of conventional PKC (α, βI, βII, γ) and novel PKC (δ, ε, η, θ) isozymes. Since recent study showed that loss-of-function mutations occur in PKC in many cancers, isozyme-selectively activation of PKC is a promising strategy for cancer treatment with fewer undesireble effects. Previously, our group developed a series of simplified analogs of ATX and found that structural modification of the A-ring of spiroketal moiety significantly altered PKC isozyme selectivity. In this study, we synthesized des-B-ring analog (**3**) of 18-deoxy-aplog-1 (**1**) and evaluated its biological activities. Compound **3** showed the affinity for PKCδ-C1B and α-C1A domain comparable with **1**. Because the removing the A-ring of 1 showed resulted in significant decrease of affinity for PKCδ-C1B, those results suggest that the PKCδ-C1B domain more strongly recognizes the A-ring of the spiroketal moiety of aplysiatoxins than the B-ring.

protein kinase C, aplysiatoxin, isozyme selectivity

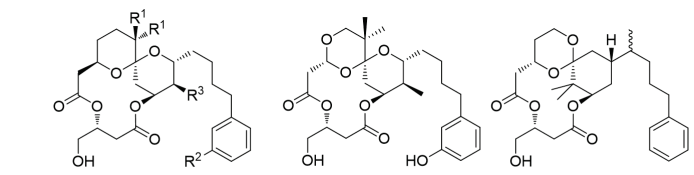
発表責任者：柳田亮（yanagita.ryo@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3E05-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

(*R*)-(−)-Carvone を用いる Aplysiatoxin 単純化アナログの合成と活性評価

Synthesis and biological activity of simplified analogs of aplysiatoxin with (*R*)-(−)-carvone-based core structure

○鈴木 芳幸[1]、守時 恵一[1]、梶原 瑞生[1]、柳田 亮[2]、川浪 康弘[2]、花木 祐輔[2]、入江 一浩[3] ([1]香川大院農、[2]香川大農、[3]京大院農)
○Yoshiyuki SUZUKI[1], Keiichi MORITOKI[1], Mizuki KAJIWARA[1], Ryo YANAGITA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2], Yusuke HANAKI[2], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa University, [3]Kyoto Univ.)



セリン/スレオニンリン酸化酵素ファミリーの一種である protein kinase C (PKC) は細胞の分化、増殖およびアポトーシスなどの機能に関わる。多くのがんにおいて PKC の機能損失型変異が起こっていることから、PKC は恒常的に発がん抑制に働いていると考えられており、PKC の活性化はがん治療における有効な戦略となり得る。近年、天然の発がんプロモーターである aplysiatoxin (ATX) の構造を適切に単純化した Aplog 類が、PKC の活性化によりがん細胞増殖抑制活性を示すものの、ATX の有する発がんプロモーション活性および炎症作用を示さないことが報告された。そのなかで特に高い活性を示した 10-Me-Aplog-1 は抗がん剤リード化合物として有望であるが最長直線工程数 23 段階、全収率 1.1%と合成に多段階を要する。本研究では ATX のスピロケタール環を(*R*)-(–)-carvone 由来の環状ケタールに単純化することで短段階での合成を目指した新規アプリシアトキシン単純化アナログ **2** の合成とその活性評価を行った。アナログ **2** は最長直線工程数 8 段階、全収率 1.7%で合成され、以前報告された 18-deoxy-Aplog-1 や **1** と同程度の PKC への結合能を示した。

Protein kinase C (PKC), a family of serine/threonine kinases, plays a crucial role in cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Since loss-of-function mutations of PKC occur in many cancers, PKC is considered to be a tumor suppressor. Thus, activation of PKC could be an effective strategy in cancer therapy. Recently it was reported that Aplogs, simplified analogs of natural tumor promoter aplysiatoxin (ATX), showed anti-proliferative activity but did not exhibit tumor promoting and proinflammatory activities. 10-Me-Aplog-1, which showed comparable biological activity to ATX, is promising as an anticancer lead compound, though its synthesis involved a longest linear sequence (LLS) of 23 steps with an overall yield of 1.1%. In this study, we designed a novel aplog **2**, where the spiroketal moiety of ATX is replaced by the cyclic ketal moiety derived from (*R*)-(–)-carvone. The analog **2** was synthesized in an LLS of eight steps with an overall yield of 1.7% and showed the same order of affinity for PKC as previously reported 18-deoxy-Aplog-1 and **1**.

aplysiatoxin, protein kinase C, cancer

発表責任者：柳田亮（yanagita.ryo@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3E05-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

Hitachimycin による膜機能破綻のメカニズム検討

Studies on the mechanism of plasma membrane disruption by hitachimycin.

○岩井 南会子[1]、南雲 陽子[2]、工藤 史貴[3]、江口 正[3]、臼井 健郎[2] ([1]筑波大・理工情報生命、[2]筑波大・生命環境、[3]東工大・理学院)
○Naeko Iwai[1], Yoko Nagumo[2], Fumitaka Kudo[3], Tadashi Eguchi[3], Takeo Usui[2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tec., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Tokyo Inst. Technol.)

【背景・目的】Hitachimycin は *Streptomyces* sp. KG-2245 から単離された抗真菌・抗腫瘍活性を示す天然化合物である [1]。我々はこれまで、本化合物が出芽酵母の膜輸送やコレステロール局在の異常を介して細胞質 pH 恒常性を破綻させることを明らかにしている。また、ホスファチジルセリン (PS) を培地に加えると hitachimycin の細胞毒性が低下するとの報告があることから [2]、PS 合成遺伝子を破壊した出芽酵母株を作成して hitachimycin 耐性を検討したところ、PS 欠損酵母は hitachimycin 耐性を示すことを見出した。以上の結果は、hitachimycin が酵母細胞膜中の PS と結合することによって、膜機能を破綻させる可能性を示唆している。そこで、hitachimycin の PS 特異的結合活性について検討を行うことにした。

【方法・結果】ホスファチジルコリンとコレステロールを主成分とする PS を含むベシクル、及び PS を含まないベシクルをそれぞれ作成した。これらのベシクル懸濁液に hitachimycin を添加し、超遠心でベシクルを沈澱させた。その後、ベシクルに結合せず上清に残った hitachimycin を酢酸エチルで抽出し、HPLC で定量した。現在、PS 結合活性の詳細を検討しており、併せて報告する予定である。

【Background/Purpose】Hitachimycin, a natural compound with antifungal and antitumor activity isolated from *Streptomyces* sp. KG-2245 [1]. We previous showed that hitachimycin disrupts the plasma membrane functions of *Saccharomyces cerevisiae* such as cytoplasmic pH homeostasis *via* disorders of membrane transport and cholesterol localization. Consistent with the previous report that the addition of PS to the medium reduces the cytotoxicity of hitachimycin [2], we found that PS synthase deletant is resistant to hitachimycin. These results suggest that hiatchimycin may disrupt plasma membrane integrity by binding to PS in the yeast plasma membrane. Therefore, we investigated whether hitachimycin binds to PS or not.

【Method/Results】Vesicles with or without PS were prepared, respectively. After adding hitachimycin to these vesicle suspensions, the vesicles were precipitated by ultracentrifugation. Then, hitachimycin remaining in the supernatant without binding to the vesicles was quantified by HPLC after ethyl acetate extraction. The details of the PS-binding activity of hitachimycin is currently investigated and will be presented.

[1] *J. Antibiot.*, **34**, 259 (1981). [2] *J. Antibiot.*, **36**, 301 (1983)

hitachimycin, yeast, phosphatidylserine

講演番号：3E05-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

TJ 開口剤 MA026 の Claudin ファミリーに対する標的特異性の検討
Investigation of the target specificity for Claudin family of MA026, a TJ opener

○向山 海凪[1]、内山 千尋[3]、福田 茜[3]、中澤 圭輝[3]、倉持 由佳[3]、今野 翔[3]、谷口 敦彦[3]、南雲 陽子[2]、林 良雄[3]、臼井 健郎[2]([1]筑波大学大学院・理工情報生命、[2]筑波大学・生命環境、[3]東京薬科大・薬)
○Minagi MUKAIYAMA[1], Chihiro UCHIYAMA[3], Akane FUKUDA[3], Yoshiki NAKAZAWA[3], Yuka KURAMOCHI[3], Sho KONNO[3], Atsuhiko TANIGUCHI[3], Yoko NAGUMO[2], Yoshio HAYASHI[3], Takeo USUI[2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】 MA026 は *Pseudomonas* sp. RtIB026 から抗ウイルス活性を指標に単離された環状リポペプチドである[1)]。本物質はヒト C 型肝炎ウイルスの感染受容体で、かつタイトジャンクション（TJ）の重要な構成タンパク質でもある Claudin-1 の VFDSLL ペプチド配列と結合することが報告されている[2)]。我々は MA026 がイヌ腎臓上皮細胞 MDCK II 単層に対して TJ 開口活性を示すことを見出し[3)]、本物質が非侵襲的薬剤投与に有用である可能性を指摘してきた。これらのことから MA026 は Claudin-1 の VFDSLL ペプチド配列を標的として TJ を開口させると考えられるが、その詳細な作用機構や標的特異性は不明である。また、Claudin はヒトで 23 種類が知られているが、VFDSLL 相同配列の保存性はそれほど高くない。そこで本研究では各 Claudin の VFDSLL 相同配列に対する MA026 の標的特異性について検討を行った。
【方法・結果】 MA026、及び各 Claudin の VFDSLL 相同領域ペプチドを MDCK II 単層に共処理し、4 kDa の FITC-Dextran の透過性を指標に TJ 開口活性を評価する competition 実験を行った。その結果、VFDSLL ペプチドが MA026 の活性を強く阻害した一方で、他の相同配列ペプチドでは MA026 の活性阻害の強さに違いが見られた。さらに Claudin-1 の VFDSLL 配列を competition 実験で阻害が無かった配列に置き換えた Claudin を作製し、MDCK II で発現させたところ、MA026 の TJ 開口活性は見られなくなった。以上の結果から、MA026 は VFDSLL 配列を認識して TJ 開口を誘導することが強く示唆された。

MA026 is a cyclic lipopeptide isolated from *Pseudomonas* sp. RtIB026 as an antivirus compound [1)]. It has been reported that MA026 binds to the VFDSLL region in Claudin-1, a receptor for human hepatitis C virus and also an important component protein of tight junctions (TJ)[2)]. We have reported that MA026 showed TJ opening activity in MDCK II cell monolayer[3)]. These results suggest that MA026 targets the VFDSLL of Claudin-1, but its mechanism of action and target specificity are unknown. Therefore, we investigated whether MA026 specifically recognizes VFDSLL or not. VFDSLL homologous region pepteide of each Claudin and MA026 were co-treated with MDCK II monolayer, and TJ opening activity was evaluated. Our results suggest that MA026 recognizes the VFDSLL region of Claudin-1 and opens TJ transiently.

1) *PCT WO* 02/062831 (2002)　2) *J. Am. Chem. Soc.***135**, 18949 (2013)　3) *J. Antibiot.* **70**, 691 (2017)

epithelial cell, tight junction, claudin

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E05-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

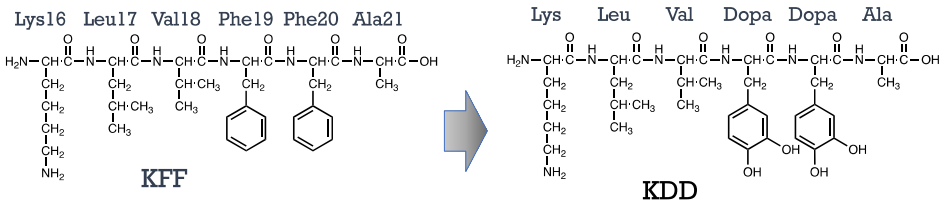
アミロイドβの神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発

Rationally Designed Peptide Modulators of Amyloid ß Toxicity in Alzheimer's Disease

○福原 潔[1]、森 一憲[1]、沖山 佳生[2]、三澤 隆史[2]、水野 美麗[1]、出水 庸介[2]、柴沼 質子[1]、大野 彰子[2] ([1]昭和大薬、[2]国衛研)

○ Kiyoshi FUKUHARA[1], Kazunori MORI[1], Yoshio OKIYAMA[2], Takashi MISAWA[2], Mirei MIZUNO[1], Yosuke DEMIZU[2], Motoko SHIBANUMA[1], Akiko OHNO[2] ([1]Showa Univ., [2]NIHS)

アルツハイマー病(AD)患者の脳内に高発現しているアミロイドβタンパク質(Aβ$_{1-42}$)は、βシート構造をとることによって高い凝集能を示し、アミロイド繊維からなる老人斑を形成して大脳皮質に沈着する。カテキンやフィセチンなどのフラボノイド系抗酸化物質の Aβ凝集阻害作用が報告されている。これらの化合物の共通の構造であるカテコールが Aβの凝集阻害には必須であり、我々はカテキン二量体が強力な Aβ凝集阻害作用と Aβによる神経細胞毒を抑制すること明らかにした。一方、Aβの凝集には 16 番目から 21 番目の配列(Aβ$_{16-21}$:KLVFFA)が重要であることが報告されており、この配列を有するペプチドは Aβの凝集を阻害する。我々は Aβ$_{16-21}$のフェニルアラニン(F)のベンゼン環をカテコールに置換することで凝集阻害活性が増強することを期待し、Aβ$_{16-21}$(KLVFFA(KFF))の F をカテコール構造を有する L-Dopa(D)に変換したペプチド 3 種類(KLVFDA(KFD), KLVDFA(KDF), KLVDDA(KDD))を設計・合成した。KFF は Aβのβシート形成を抑制するが、F を D に変換することでさらに強力な抑制作用を示し、特に 2 つの F を D に変換した KDD はほぼ完全にβシートの形成を抑制した。また、KFD < KDF < KDD の順で Aβの凝集阻害作用を示し、KDD は Aβによる神経細胞毒性を強力に阻害することが明らかとなった。これらのペプチドは AD 予防・治療薬の新たなリードとなることが期待される。



The pentapeptide sequences Aβ16-21(KLVFFA) in amyloid-β protein (Aβ42) can recognize amyloid polypeptides and, therefore, be used as recognition units in the design of inhibitors for amyloid fibrillization. Most polyphenols with aggregation-inhibiting activity against amyloid proteins have a catechol structure or are converted to catechol during metabolism. Here, we rationally designed hexapeptides (KLVFDA(KFD), KLVDFA(KDF), KLVDDA(KDD)) in which one or two phenylalanines (F) of the KLVFFA (KFF) sequence in Aβ42 was changed to dopa(D). By comparing the original hexapeptide (KFF), the peptides with catechol structure enhanced the inhibitory effect on amyloid β-sheet formation, and potentially suppressed neuronal toxicity by enhancing the anti-amyloid aggregation activity. The rationally designing peptides should be promising seed candidates for the treatment of Alzheimer's disease.

Alzheimer's disease, amyloid ß, peptide

発表責任者：福原　潔（fukuhara@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：3E05-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

酵母の増殖阻害活性を示す含ホウ素化合物の作用機序解析

Mode-of-action analysis of boron-containing compounds that inhibit yeast growth

○八代田 陽子[1,2]、木村 寛美[1]、吉村 麻美[1]、臼井 正哉[3]、丹羽 節[4,5]、高橋 一光[6]、俣賀 宣子[3]、細谷 孝充[4,5]、イリエシュ ラウレアン[6]、吉田 稔[2,7,8]、ブーン チャールズ[1,9] ([1]理研 CSRS・分子リガンド標的、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]理研 CBS・生体物質分析支援、[4]理研 BDR・分子標的化学、[5]東京医歯大・生体材料工学研、[6]理研 CSRS・機能有機合成化学、[7]東大院農・応生工、[8]東大・CRIIM、[9]トロント大・ドネリーセンター)

○ Yoko YASHIRODA[1,2], Hiromi KIMURA[1], Mami YOSHIMURA[1], Masaya USUI[3], Takashi NIWA[4,5], Ikko TAKAHASHI[6], Nobuko MATAGA[3], Takamitsu HOSOYA[4,5], Laurean ILIES[6], Minoru YOSHIDA[2,7,8], Charles BOONE[1,9] ([1]Mol. Ligand Target Res. Team, RIKEN CSRS, [2]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [3]BMA, RIKEN CBS, [4]Lab. Chem. Biol., RIKEN BDR, [5]Lab. Chem. Biosci., IBB, TMDU, [6]Adv. Org. Syn. Res. Team, RIKEN CSRS, [7]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [8]CRIIM, Univ. Tokyo, [9]Donnelly Centre, Univ. Toronto)

骨髄腫治療薬の一つであるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブに代表されるように、有機ホウ素化合物の医薬への応用が注目されている。我々は、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）に対して増殖阻害活性を示す化合物として、含ホウ素化合物 CP90399 および CP91389 を見出した。これらはボロン酸ピナコールエステル構造を含む類縁体で、両化合物ともに 50%増殖阻害濃度は約 2 μM であった。これらの化合物の作用機序を解明するため、我々がこれまでに開発した、出芽酵母の遺伝子改変株ライブラリーを用いた「酵母ケミカルゲノミクス法」を実施した。これは化合物存在下での各株の fitness を指標として化合物と遺伝子産物の相互作用を明らかにすることにより化合物の標的分子や標的経路を同定する方法である。約 1,000 個の必須遺伝子についての二倍体のヘテロ遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、CP90399 および CP91389 に対する感受性プロファイリングを行ったところ、真菌の細胞膜成分であるエルゴステロールの合成を担う C-4 ステロールメチルオキシダーゼをコードする *ERG25* 遺伝子のヘテロ破壊株が顕著に感受性を示した。さらに、これらの化合物存在下で酵母細胞はエルゴステロールを標的とする amphotericin B に対し耐性化を示した。以上の結果は、CP90399 および CP91389 がエルゴステロール合成経路に作用する可能性を示唆する。

Since the approval of the proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma, organoboron compounds have attracted attention in medical research. We have discovered that boron-containing compounds CP90399 and CP91389 exhibited growth inhibitory activity against the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Their structures are similar in that they contain a pinacol boronic ester moiety and GI_{50} of both compounds showed approx. 2 μM. To elucidate mode-of-action of these compounds, we performed chemical genomics analysis using a heterozygous yeast deletion collection of ~1,000 essential genes in budding yeast. The heterozygous gene disruptant of the *ERG25* gene encoding a C-4 sterol methyl oxidase that is involved in the synthesis of ergosterol, the main component of fungal membrane, showed hypersensitivity to CP90399 and CP91389. Furthermore, in the presence of these compounds, yeast cells conferred resistance to amphotericin B that targets ergosterol. These results suggest that CP90399 and CP91389 may act on the ergosterol synthesis pathway.

mode-of-action, boron-containing compound, yeast chemical genomics

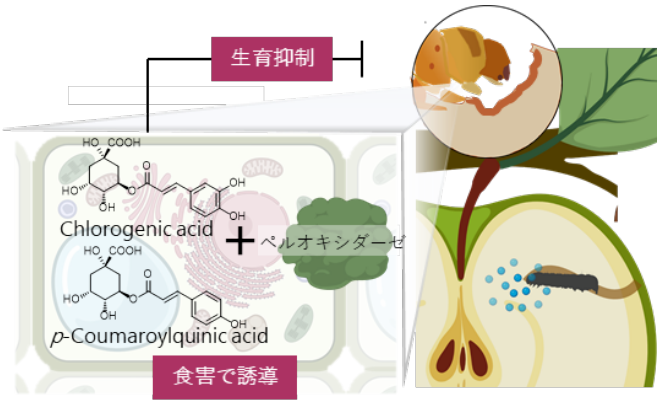
発表責任者：八代田陽子（ytyy@riken.jp）

講演番号：3E05-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

リンゴ果実が樹との相互作用により発現する食害応答の機構解明

The dual defense system of on-tree apple fruits expressed by interaction with tree

○大畑 勇統[1]、板井 章浩[2]、石栗 陽一[3]、森 直樹[1]、吉永 直子[1]([1]京大院・農、[2]京都府大院・生命環境、[3]青森産技セ りんご研)
○Yuto OHATA[1], Akihiro ITAI[2], Yoichi ISHIGURI[3], Naoki MORI[1], Naoko YOSHINAGA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto. Pref. Univ., Life & Env. Sci., [3]AITC Apple Research Institute)



リンゴ果実は様々な昆虫の食害を受ける．中でもモモシンクイガ *Carposina sasakii* の幼虫は果実内に食入し，種子や果肉を食害するリンゴの重要害虫である．我々はリンゴ果実がモモシンクイガ幼虫の食害に対して，化学的防御応答を行うと明らかにしてきた．果実食害部にフェノール性化合物（chlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acid）とペルオキシダーゼ（POD）を誘導し，これらが幼虫の摂食で反応することで生育を抑制するというものである．Chlorogenic acid（catecol 型）と POD による昆虫への生育抑制機構は既知である．しかし，*p*-coumaroylquinic acid（*p*-hydroxy 型）の POD 反応物の生育抑制機構はこれまで報告がない．今回，*p*-hydroxy 型が catecol 型に比べ低濃度で作用すると明らかになり，新規の作用機構が示唆された．さらに，この複合的防御機構は果実が樹になった状態（着果）でのみ発現することから，果実に流入する師管液成分の関与が推測されている．本講演では，フェノール性化合物と POD の反応物のモモシンクイガ幼虫の生育作用抑制メカニズムと，師管液を介した樹と果実のクロストーク（Tree Factor）について発表する．

Apple fruits are infested by various insects. Among them, peach fruit moth *Carposina sasakii* is an important pest of apples in which larvae bore into fruits. We have shown that apple fruits exhibit a chemical defense response against feeding damage by the peach fruit moth larvae. In this defense system, larval growth was inhibited by peroxidase-catalyzed reaction with phenolics (chlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acid) which were induced by feeding damage. The mechanism of growth inhibition by chlorogenic acid (catechol type) and POD has been reported, although by *p*-coumaroylquinic acid (*p*-hydroxy type), which acts at lower concentrations than catechol type, has not been reported. In addition, this defense response was expressed only when the fruit is on the tree, suggesting the involvement of the phloem sap components that flow into the fruit. In this presentation, we will discuss the larval growth inhibitory mechanism of the phenolics and POD reactant and the crosstalk between tree and fruit.

chemical defense, *Carposina sasakii*, Tree Factor

発表責任者：吉永直子（yoshinaga.naoko.5v@kyoto-u.ac.jp）

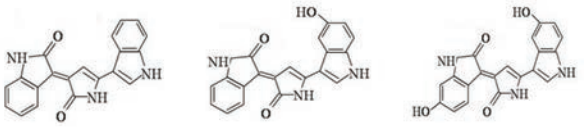
講演番号：3E05-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

ヴィオラセインの抗菌性の作用機序

Mechanism of antibacterial action of violacein

○横川 奈央、吉野 凌太、滝口 泰之（千葉工大先進工）
○Nao YOKOKAWA, Ryota YOSHINO, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Institute of Technology)

Chromobacterium violaceum VP2 株 はヴィオラセインという色素を生産する。現在ヴィオラセインはデオキシヴィオラセイン(1)，ヴィオラセイン(2)，オキシヴィオラセイン(3)の 3 種確認されており，そのうちヴィオラセインはグラム陽性菌に対して抗菌性を示す。しかし，ヴィオラセインが細菌のどの部位に作用して抗菌性を示すのか詳しいことはわかっていない。本研究ではヴィオラセインの細菌に対する抗菌性の作用機序の検討を行った。



1　　2　　3

C. violaceum を 30℃で大量培養して抽出・精製を行い 3 種のヴィオラセインを得たのち，これを加えた培地で *Cutibacterium acnes* を培養したところ，ヴィオラセインを添加したものでのみ菌体表面が紫色に染色された。これはヴィオラセインの抗菌活性と細菌の細胞膜の関係を示唆していると考えられる。

細胞膜への作用による影響の測定や他種の細菌に対する作用についても報告する予定である。

Chromobacterium violaceum VP2 strain produces a pigment called violacein. Currently, three types of violacein have been identified: deoxyviolacein (1), violacein (2), and oxyviolacein (3). Among them, violacein has antibacterial activity against Gram-positive bacteria. However, it is not known in detail which part of the bacterial body violacein acts on to produce its specific antibacterial activity. In this study, we investigated the mechanism of action of violacein on bacteria.

Three kinds of violacein were extracted and purified by mass cultivation of *C. violaceum* at 30°C. When *Cutibacterium acnes* was cultured in each type of violaceins, the surface of the bacteria stained purple only when violacein was added. This suggests a relationship between the antibacterial activity of violacein and the cell membrane of the bacteria.

Currently, we are investigating the effects of violacein on the cell membrane and on other species of bacteria.

Chromobacterium violaceum, Violacein, antibacterial action

講演番号：3E05-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム E

サクラソウ科薬用植物 *Maesa lanceolata* 由来抗マラリア活性化合物の同定
Identification of antimalarial compounds in medicinal plants,*Maesa lanceolata*

○太田 真理[1]、田邉 麻衣子[1]、半澤 宏子[1]、Okeyo Kennedy Omondi[2]、Julius Otieno Oyugi[3]、Lucy Ochola[4]、武田 志津[1]([1]日立研開・基礎研、[2]京大ウィルス・再生研、[3]ナイロビ大、[4]霊長類研究所・ナイロビ・ケニヤ)
○Mari OHTA[1], Maiko TANABE[1], Hiroko HANZAWA[1], Kennedy Omondi Okeyo[2], Otieno Oyugi Julius[3], Ochola Lucy[4], Shizu TAKEDA[1] ([1]Hitachi, Ltd. R&D group,CER., [2]Inst. Front. Life Med. Sci., Kyoto Univ., [3]Nairobi Univ., [4]IPR, Nairobi, Kenya)

サクラソウ科の一種である *Maesa lanceolata* は、中央・東アフリカに分布する薬用植物であり、ケニアのカカメガ地域にて伝統的に抗マラリア代替治療薬として処方されている。本研究では、同植物の抗マラリア作用機構を理解することを目指し、葉の抽出物に含まれる抗マラリア活性を示す化合物の同定を試みている。ヘキサンと水を用いた *Maesa lanceolata* の葉からの抽出物を HPLC により分離したフラクションについて、赤血球中のヘムを無毒化するマラリア原虫の代謝機構を模した β-ヘマチンアッセイを実施し、同代謝機構を阻害する物質が含まれているフラクションを選定した。その後、本アッセイにより陽性反応を示した抽出物中に含まれる化合物を LC-MS/MS を用いた構造解析により同定し、得られた化合物を β-ヘマチンアッセイにて評価した結果、抗マラリア活性をもつ化合物として報告事例のある Quercetin とその配糖体など、計 7 種類の化合物を見出した。本研究により、*Maesa lanceolata* の抗マラリア活性に寄与する可能性のある化合物を初めて明らかにした。本発表では、同定した化合物の詳細を示すとともに、その作用機構について考察した結果を報告する。

Maesa lanceolata, a member of the Musaceae family, is a medical plant distributed in Central and East Africa. This plant is traditionally prescribed as an alternative antimalarial treatment in the Kakamega region of Kenya. In this study, we identify compounds with antimalarial activity in the leaf extracts in order to gain in depth understanding of the antimalarial mechanisms in *Maesa lanceolata*. Firstly, fractions of the leaf extract of *Maesa lanceolata* were separated by HPLC using hexane and water, followed by analysis using the β-hematin assay, which mimics the metabolic mechanism of *Plasmodium falciparum* that detoxifies heme in red blood cells and fractions containing compounds that inhibit this metabolic mechanism were selected. Then, the compounds contained in the extracts that showed positive results using this assay were further identified by structural analysis using LC-MS/MS, and the identified compounds were evaluated by the β-hematin assay. As a result, we found seven compounds, including Quercetin and its glycosides, which have been reported as compounds exhibiting antimalarial activity. This is the first study in which compounds with potential antimalarial agents have been described and identified in *Maesa lanceolata*. In this presentation, we will show the details of the identified compounds and the putative mechanism of action of the compounds.

antimalarial, ß-hematin, *Maesa lanceolata*

発表責任者：太田真理（mari.ohta.qs@hitachi.com）

講演番号：3E06-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

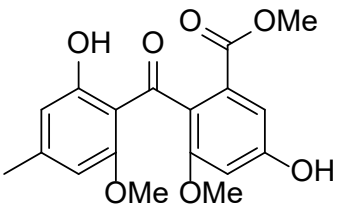
芳香族炭化水素受容体アンタゴニストの探索とその抗 C 型肝炎ウイルス活性

Identification of an AhR antagonist and its anti-hepatitis C virus activity

○中村 洸[1]、山崎 雅子[2,3]、大橋 啓史[4]、齋藤 史季[1]、芦川 広大[1]、佐藤 寛奈[1]、西岡 華実[2,3]、鈴木 優華[1]、鶴川 幸音[1]、菅野 和紀[1]、村上 裕信[1,5]、永根 大幹[1]、岡田 麻衣子[6]、倉持 幸司[3]、渡士 幸一[2,3,4]、紙透 伸治[1,5]（[1]麻布大獣医、[2]感染研・ウイルス第二部、[3]東理大理工、[4]感染研・治療薬・ワクチン開発研究センター、[5]麻布大ヒトと動物の共生科学センター、[6]東京工科大応用生物）

○ Kou NAKAMURA[1], Masako YAMAZAKI[2,3], Hirofumi OHASHI[4], Shiki SAITOH[1], Koudai ASHIKAWA[1], Kanna SATO[1], Kazane NISHIOKA[2,3], Yuka SUZUKI[1], Yukine TSURUKAWA[1], Kazuki KANNO[1], Hironobu MURAKAMI[1,5], Masaki NAGANE[1], Maiko OKADA[6], Kouji KURAMOCHI[3], Koichi WATASHI[2,3,4], Shinji KAMISUKI[1,5] ([1]School of Veterinary Medicine, Azabu Univ., [2]Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, [3]Tokyo Univ. of Science, [4]Research Center for Drug and Vaccine Development, NationalInstitute of Infectious Diseases, [5]Center for Human and Animal Symbiosis Science, Azabu Univ., [6]Tokyo Univ. of Technology)

C 型肝炎ウイルス（HCV）は高率に慢性肝炎を引き起こし、持続感染により肝硬変や肝がんへと進行する。現在、C 型肝炎の治療には HCV タンパク質を直接標的とする Direct acting antiviral（DAA）が用いられているが、投薬中に生じた薬剤耐性ウイルスへの対策が課題の一つとなっている。



Monomethylsulochrin

これまでの研究で、flutamide が芳香族炭化水素受容体（AhR）の転写活性化を特異的に抑制することで、細胞内の脂肪滴蓄積を阻害し、HCV 粒子産生を阻害することが明らかにしている[1)]。そこで本研究では、AhR を標的とした新たな抗 HCV 薬を目指し、AhR アンタゴニスト活性を持つ化合物を探索することとした。当研究室で構築された真菌由来の化合物ライブラリーにある約 1000 種類の化合物から、ヒト肝臓がん由来細胞である HuH-7 細胞に XRE-luc を導入したレポーターアッセイにより、スクリーニングを行った。その結果、AhR アンタゴニストとして monomethylsulochrin が得られた。Monomethylsulochrin は、AhR アゴニストである TCDD による AhR の転写活性化を濃度依存的に抑制することが明らかになった。加えて、この化合物を HCV に感染させた HuH-7.5.1 細胞に処理したところ、毒性を示さず、有意に HCV 産生量を低下させた。

Hepatitis C virus (HCV) causes chronic hepatitis, and HCV infection often progresses to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Previously, our group reported that flutamide inhibited the accumulation of lipid droplets by suppressing the transcriptional activity of AhR in HuH-7 cells, and block the HCV production.[1)] Since AhR would be a potential target for the treatment for HCV infection, we screened for AhR antagonist from an in-house natural product library by a reporter assay using HuH-7 cells. As a result, we discovered monomethylsulochrin as an AhR antagonist. Monomethylsulochrin inhibited the activation of AhR by TCDD, an AhR agonist, in a dose-dependent manner. In addition, this compound was found to inhibit production of HCV in HuH-7.5.1 cells.

1) Ohashi H *et al. J. Biol. Chem.* 2018;293:19559-71.

Aryl hydrocarbon Receptor, Hepatitis C virus, antiviral

発表責任者：紙透伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：3E06-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の脂質組成の攪乱および小胞体の形態異常

Perturbation of lipid composition and deformation of endoplasmic reticulum by odd-chain fatty acids in fission yeast

○星川 陽次郎[1]、西村 慎一[1,2]、松山 晃久[1,3]、リ シーナ[4,5]、八代田 陽子[3,4]、ブーン チャールズ[4,5]、津川 裕司[6,7,8,9]、有田 誠[8,9,10]、吉田 稔[1,2,3]（[1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[4]理研 CSRS・分子リガンド標的、[5]トロント大・ドネリーセンター、[6]東農工大院工・システムバイオロジー、[7]理研 CSRS・メタボローム情報、[8]理研 IMS・メタボローム、[9]横市大院生命医・代謝エピゲノム科学、[10]慶大薬・代謝生理化学）

○ Yojiro HOSHIKAWA[1], Shinichi Nishimura[1,2], Akihisa Matsuyama[1,3], Sheena Li[4,5], Yoko Yashiroda[3,4], Charles Boone[4,5], Hiroshi Tsugawa[6,7,8,9], Makoto Arita[8,9,10], Minoru Yoshida[1,2,3] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Mol. Ligand Target Res. Team, RIKEN CSRS, [5]Donnelly Centre, Univ. Toronto, [6]Dept. System Biol., Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [7]Metabolome Inform. Res. Team, RIKEN CSRS, [8]Lab. for Metabolomics, RIKEN IMS, [9]Cell. and Mol. Epigenetics Lab., Yokohama City Univ., [10]Div. of Physiol. Chem. and Metab., Keio Univ.)

生体中の脂肪酸の炭素鎖長はほとんどが偶数であり、奇数鎖脂肪酸は微量にしか存在しない。奇数鎖脂肪酸について生合成経路は報告されているものの、生理機能は依然として不明である。我々は最近、奇数鎖脂肪酸が分裂酵母の生育を阻害し、それはエルゴステロールの生合成遺伝子変異株ではみられないことを見出した。本現象を分子レベルで理解すれば、炭素鎖長が司る脂肪酸の新しい機能を解明できると期待できる。そこで我々は奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の生育抑制メカニズムの解析を行い、炭素数 15 の脂肪酸（FA-C15）が細胞分裂や細胞膜極性に異常をもたらすことを報告した（2021 年度大会）。本発表では、新たに見出した小胞体の異常と細胞分裂異常の関係や、細胞のリピドームの解析結果について報告する。

まず、FA-C15 で処理した細胞の形態解析を行った。細胞分裂中に形成する隔壁を蛍光染色して観察したところ、FA-C15 は隔壁の歪曲化などの隔壁形成異常を引き起こすことが判明した。さらに、小胞体を mCherry-AHDL で可視化したところ、FA-C15 が小胞体の異常構造を出現させることが分かった。異常な小胞体は分裂溝の陥入を物理的に妨げており、このような小胞体の異常形態が細胞質分裂異常の原因の一つであることが強く示唆された。次に、ノンターゲットリピドミクスにより FA-C15 処理が脂質組成に及ぼす影響を調べた。結果、FA-C15 処理した細胞では炭素数 15 の飽和アシル鎖を持つグリセロリン脂質の量が劇的に増加し、飽和アシル鎖含有脂質の占有率が上昇することが明らかになった。これにより生体膜の物性が変化すると予想され、形態異常との関連を現在検証している。

Fatty acids in organisms usually have even-numbered carbons; however, odd-chain fatty acids (OCFAs) also exist in minute amounts. Although the biosynthetic pathway of OCFAs was identified, their functions remain unknown. We have found that OCFAs inhibit the growth of fission yeast wild-type cells, but not ergosterol biosynthetic mutant cells. To understand the functions of OCFAs, we started analyses of the mechanisms underlying the toxicity of OCFAs. We have previously reported that pentadecanoic acid (FA-C15) perturbs plasma membrane polarity and cell division (2021 annual meeting). Here, we present the relationship between defects in endoplasmic reticulum (ER) and cell division, with the latest results on cellular lipidome.

We first analyzed the cell morphology of fission yeast cells treated with FA-C15. Fluorescent labeling of septa revealed that FA-C15 treatment causes deformation of septa. We also visualized ER by expressing mCherry-AHDL and observed that abnormal ER structures appear upon FA-C15 treatment. The abnormal ER seemed to physically block the ingression of cleavage furrow, suggesting that the irregular ER morphology is one of the causes of the cytokinetic defect. We next conducted non-targeted lipidomics to investigate the effect of FA-C15 treatment on the lipid composition. FA-C15 treatment drastically increased the amount of glycerophospholipids (GPLs) possessing one or two FA-C15 chains, which may affect the physical properties of the membrane. We are now investigating the relationship between the altered lipid composition and the morphological defects.

fission yeast, lipid, endoplasmic reticulum
発表責任者：星川陽次郎（yhoshikawa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

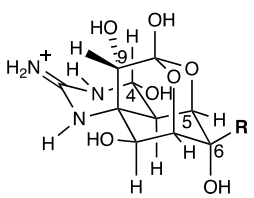
講演番号：3E06-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

抗テトロドトキシンモノクローナル抗体のフグの主要テトロドトキシン類縁体に対する交差反応性評価

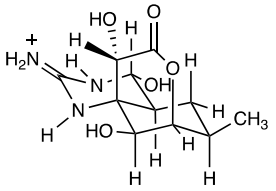
Evaluation of cross-reactivity of the anti-tetrodotoxin monoclonal antibody against major tetrodotoxin analogues in pufferfish

○八巻 慶汰[1]、佐藤 恭佳[1]、工藤 雄大[1,2]、川津 健太郎[3]、荒川 修[4]、高谷 智裕[4]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1]（[1]東北大院農、[2]東北大学際研、[3]大阪健康安全基盤研、[4]長崎大院水環）
○Keita YAMAKI[1], Kyoka SATO[1], Yuta KUDO[1,2], Kentaro KAWATSU[3], Osamu ARAKAWA[4], Tomohiro TAKATANI[4], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Mari YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ. FRIS, [3]Osaka Institute of Public Health, [4]Nagasaki Univ.)

【背景・目的】フグ毒テトロドトキシン (tetrodotoxin, TTX, **1**) は、電位依存性 Na チャネルを阻害し、致死性の食中毒を引き起こすため、食品衛生上重要な生物毒である。抗体を使用した分析法は、検出の簡便性や応用性に優れている。川津らは抗 TTX モノクローナル抗体を作製し[1]、その有用性は多くの論文で報告されている。我々は、多種の TTX 類縁体を同定してきた[2]。フグ中には低毒性の 5,6,11-trideoxyTTX (**2**)が TTX と同等程度の高濃度で存在し、一方、TTX と同等の毒性を示す 11-oxoTX (**3**)も低濃度で存在する。また、11-norTTX-6(*S*)-ol (**4**)も主要な類縁体である。本研究では、高度に精製した TTX と TTX 類縁体 **2-4** を用いて、本抗体の交差反応性を調べることを目的とした。【方法】TTX と類縁体 **2-4** は、フグやイモリから精製し、LC/MS で純度 98% (mol/mol) 以上であることを確認し、qNMR で定量した。この類縁体を用いて、既報の方法[1]で OVA-TTX との競合 ELISA を行い、各類縁体の抗体結合阻害率を調べ、交差反応性を評価した。【結果】TTX の 50%阻害濃度は、文献値[1]に近い 35 nM であることを確認した。また、200 nM における阻害率は、TTX で 100%、**2** と **4** は約 10%、**3** は約 30%であり、この値を各類縁体に対する本抗体の交差反応性とした。この結果は、本抗体が TTX に高い特異性をもつことを示し、フグ抽出物などの分析に有用であることを再確認した。



TTX (**1**) R=CH_2OH



5,6,11-trideoxyTTX (**2**)

11-oxoTTX (**3**) R=CHO

11-norTTX-6(*S*)-ol (**4**) R=H

Tetrodotoxin (TTX, **1**) is the lethal pufferfish toxin, that is present as a mixture with its analogues in pufferfish. 5,6,11-trideoxyTTX (**2**) is usually present at high concentrations in pufferfish, as is TTX, while 11-oxoTTX (**3**) is present at low concentrations but its toxicity in mice is almost the same as that of TTX. In this study, the cross-reactivity of anti-TTX monoclonal antibody, previously reported by Kawatsu *et al.*,[1] against **2**, **3**, and 11-norTTX-6(*S*)-ol (**4**) was evaluated by competitive ELISA using highly purified **2-4**. As a result, we first confirmed that the half inhibitory concentration of TTX was 35 nM, almost the same as the reported value[1]. Next, the inhibition ratios of antibody binding at 200 nM were 100% for TTX, approximately 10% for **2** and **4**, and 30% for **3**. These results suggested high specificity of this antibody to TTX, confirming that it is useful for analysis of pufferfish extract.

1) Kawatsu, K. *et al., Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **1997**, *50*, 133–150. 2) Yotsu-Yamashita, M. *et al., Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813.

tetrodotoxin, monoclonal antibody, cross-reactivity

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3E06-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

プラディミシンと複合型糖鎖との相互作用の化学的検証

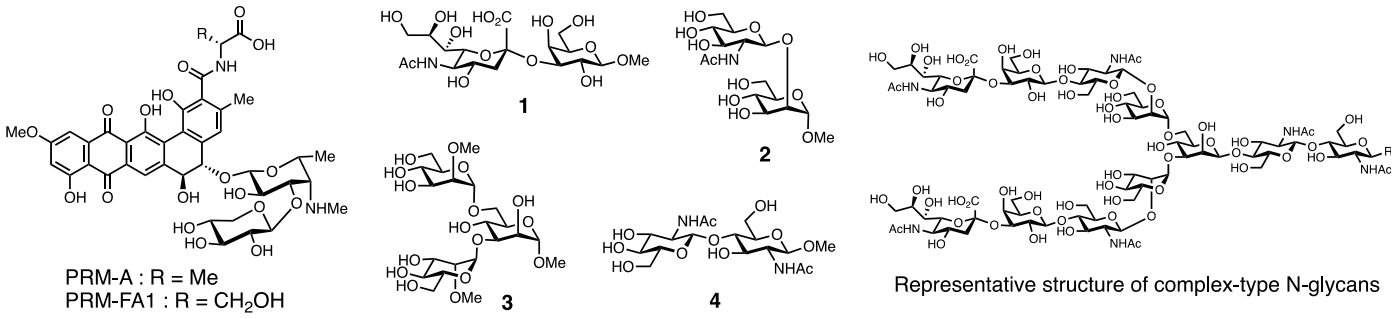
Chemical verification of interaction between pradimicins and complex type N-glycans

○藤井 将人[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3,4]、中川 優[1,3,5]([1]名大院・生命農、[2]富山県大・生物工、[3]理研、[4]阪大院・理、[5]iGCORE)
○Masato FUJII[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukishige ITO[3,4], Yu NAKAGAWA[1,3,5]
([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]RIKEN, [4]Osaka Univ., [5]iGCORE)

Pradimicin (PRM) 類は，D-マンノース (Man) を含む糖鎖に結合するユニークな天然物である。PRM 類は糖鎖の非還元末端 Man に結合することが知られているが，近年 PRM-A と PRM-FA1 の混合物が非還元末端 Man をもたない複合型糖鎖と相互作用することを示唆する知見が報告された [1)]。そこで本研究では，PRM 類と複合型糖鎖の相互作用の有無を検証することを目的として，複合型糖鎖の部分構造に対応するオリゴ糖 (**1**–**4**) を合成して，PRM 類に対する結合能を評価した。

二糖 (**1**, **2**, **4**) および三糖 (**3**) はいずれもチオ糖を用いたグリコシル化反応によって合成した。合成したオリゴ糖の PRM-A に対する結合能を UV スペクトル解析および共沈殿試験によって評価したところ，PRM-A とはほとんど結合せず，PRM-A は複合型糖鎖と相互作用しない可能性が示唆された。現在，PRM-FA1 が複合型糖鎖と相互作用する可能性を検証するため，**1**–**4** の PRM-FA1 に対する結合能の評価を行なっており，その結果も併せて報告する。

Pradimicin A (PRM-A) and PRM-FA1 are unique natural products with the lectin-like property of being able to recognize terminal D-mannose (Man) residues of glycans. Recently, the possibility was raised that a mixture of PRM-A and PRM-FA1 could interact with complex-type N-glycans without terminal Man residues.[1)] To examine this possibility, we evaluated binding ability of PRM-A for synthetic oligosaccharides (**1**–**4**) derived from complex-type N-glycans. UV spectroscopic analysis and co-precipitation experiments suggested that PRM-A hardly binds to these oligosaccharides. Binding evaluation of PRM-FA1 for **1**–**4** will be also presented in this meeting.



1) Enomoto, M. *et al. Tetrahedron* **2015**, *71*, 2603

pradimicin, glycan, carbohydrate recognition

発表責任者：中川優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E06-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

プラディミシンの非凝集性アジド含有誘導体の開発

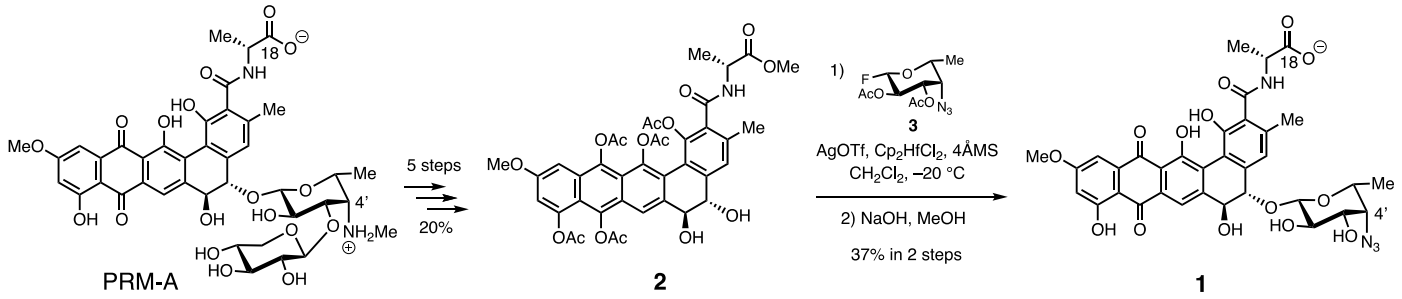
Develpoment of a less aggregative pradimicin derivative having an azide group

○音田 昂志[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3,4]、中川 優[1,3,5]（[1]名大院・生命農、[2]富山県大・生物工、[3]理研、[4]阪大院・理、[5]iGCORE）
○Koshi ONDA[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukishige ITO[3,4], Yu NAKAGAWA[1,3,5]
([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]RIKEN, [4]Osaka Univ., [5]iGCORE)

プラディミシン A (PRM-A) は，D-mannose (Man) を認識する類稀な抗真菌物質であり，糖鎖研究への利用が期待されている。しかしながら，PRM-A は高い凝集性を有するため，研究ツールとしての利用には制限がある。我々は近年，PRM-A の 18 位カルボキシ基と 4’ 位アミノ基部分における双性イオンの形成が凝集性の要因になっている可能性を見出した[1,2]。そこで本研究では，4’ 位アミノ基をアジド基に置換することによって凝集性を軽減できるかどうかを検証するため，誘導体 **1** を合成し，その凝集性と Man 結合能を評価した。

誘導体 **1** はアグリコン **2** とアジド基を含むフッ化糖 **3** のカップリングによって合成した。凝集試験の結果，**1** は PRM-A とは異なり，ほとんど凝集しないことが明らかとなった。さらに，**1** の Man 結合能を等温滴定カロリメトリーおよび抗真菌試験によって評価したところ，**1** が PRM-A と同等の Man 結合能を保持していることが確認された。現在，**1** のアジド基を利用したツール分子の開発も検討しており，その結果も併せて報告する。

Toward future application of D-mannose (Man)-binding pradimicin A (PRM-A) in glycobiological research, we synthesized an azide-containing derivative (**1**) by coupling of aglycon **2** and azide sugar **3**. Aggregation experiments confirmed that unlike PRM-A, **1** hardly aggregated in natural aqueous solutions. Isothermal titration calorimetry experiment and antifungal assay demonstrated that **1** showed Man-binding affinity comparable to PRM-A. Further modification at the azide group of **1** is in progress, and the results will be also presented in this meeting.



1) Nakagawa, Y. *et al. J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 2496.　2) 日本農芸化学会講演演要旨集, 2021, p.801.

Pradimicin, carbohydrate recognition, molecular design

発表責任者：中川優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E06-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

受動拡散による膜透過性が高い環状ペプチドを構成するアミノ酸の立体配置の探索

Screening for configurations of amino acid residues in cyclic peptides with high membrane-permeability by passive diffusion

○三浦 篤修、井上 雄介、稲垣 穣、増田 裕一（三重大生物資源）
○Tokushu MIURA, Yusuke INOUE, Minoru INAGAKI, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

受動拡散による膜透過性が高い環状ペプチドは、細胞内標的を狙えるだけでなく、経口吸収性にも優れる可能性があることから、創薬資源として注目されている。本研究では、膜透過性が高い環状ペプチドのアミノ酸残基の立体配置の組み合わせを効率的に探索する方法を開発した。

膜透過性と生物活性の相関が報告されている環状ペプチド PF1171F (図 1) を基に、Ala, MeLeu, Ile, Phe 残基において L 体と D 体を均等に含む異性体混合物 ($2^4 = 16$ 種類) を合成した。なお、MS/MS により各アミノ酸残基の立体配置を見分けるため、L 体のアミノ酸のみを ^{15}N 標識した。人工脂質膜で類縁体の膜透過性を評価し、強酸条件下で Ant-Pip 間のアミド結合を加水分解して鎖状化した後、LC-MS/MS にて配列を解析した。しかしながら、鎖状体の HPLC ピークは保持時間の差が小さくブロードであったため、すべての類縁体の配列を決定することは困難であった。そこで、HPLC 保持時間の差が大きい環状体を分取し、それぞれを鎖状にして LC-MS/MS で解析した。その結果、16 種類全ての類縁体の配列を決定することに成功した。

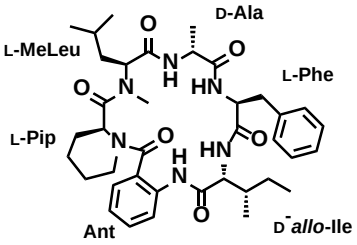


図 1. PF1171F の化学構造

Cyclic peptides with high membrane-permeability by passive diffusion are attracting attention as a drug discovery resource because of its ability to target intracellular molecules and its potential for excellent oral absorption. In this study, we developed an efficient method to screen combinations of amino acid configurations in high membrane-permeable cyclic peptides.

PF1171F (Fig.1) is a cyclic peptide whose membrane-permeability and bioactivity correlate well. Hence, we synthesized a mixture of its isomers (2^4=16 isomers) containing equal amounts of L- and D-amino acids at Ala, MeLeu, Ile, and Phe residues. To distinguish configurations of residues by MS/MS, only the L-amino acids were labeled with ^{15}N. Membrane-permeability of the analogues were evaluated using artificial membrane permeability assay. The amide bonds between Ant and Pip were hydrolyzed under strong acid conditions to form the linear peptides, whose sequences were analyzed by LC-MS/MS. However, it was difficult to determine the sequences of all the analogues because HPLC retention times for the linear peptides were close to each other. Therefore, cyclic analogues, whose retention times are different from each other, were separated by HPLC, then linearized and sequenced by LC-MS/MS. We succeeded in determining the sequences of all the 16 analogues.

cyclic peptide, membrane-permeability, LC-MS/MS

発表責任者：増田裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3E06-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

細胞死を誘導するフラバン-3-オール誘導体の活性発現メカニズム解析

Analysis of activity expression mechanism of flavan-3-ol derivatives that induce cell death

○道下 僚[1]、二村 友史[2]、齊藤 安貴子[1] ([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科工学専攻、[2]理化学研究所環境資源科学研究センター)
○Ryo DOGE[1], Yushi Futamura[2], Akiko Saito[1] ([1]Graduate School of Engineering, OECU, [2]RIKEN CSRS)

我々はこれまでに、フラバン-3-オール骨格を有する化合物群の構造-活性相関研究を進めてきた。これまでの大会において、ガン細胞に対して高い増殖抑制活性と細胞毒性を示し M 期で細胞周期を停止させる誘導体**(1)**と、短時間の暴露でミトコンドリアの機能不全を引き起こすフッ素化誘導体**(2)**について報告している。本大会では、各細胞死の阻害剤に対する応答やオルガネラの細胞内局在について確認したところ、誘導体 **1**、**2** が異なる細胞死を誘導している可能性が示唆されたので報告する。誘導体**(2)**では短時間でミトコンドリアの機能不全を引き起こすことに加え、ミトコンドリアのクラスター化が確認された。このクラスター化は光学顕微鏡で観察可能であり、細胞種に依存しなかった。ミトコンドリアを介した細胞死、および、ミトコンドリアの機能障害・形態異常は、様々な疾病において報告されていることから、本現象は極めて興味深いと考えている。

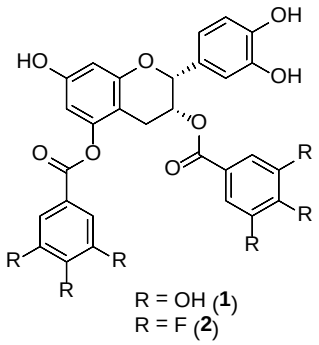


Figure 1. フラバン-3-オール誘導体の構造

We have been studying the structure-activity relationship of flavan-3-ol derivatives. We reported on a derivative (**1**) that exhibits high growth inhibitory activity and cytotoxicity to cancer cells and arrests the cell cycle in the M phase, and a fluorinated derivative (**2**) that causes mitochondrial dysfunction upon short-term exposure. As a result of confirming the response to each cell death inhibitor and the intracellular localization of organelles, it was suggested that derivatives **1** and **2** may induce different cell deaths. In addition to causing mitochondrial dysfunction in a short time with the derivative (**2**), mitochondrial clustering was confirmed. This clustering was observable with a light microscope and was cell type independent. Since cell death via mitochondria and mitochondrial dysfunction / morphological abnormalities have been reported in various diseases, this phenomenon is considered to be extremely interesting.

structure-activity-relationship, flavan-3-ol, mitochondrial dysfunction

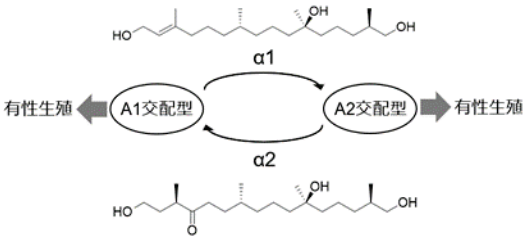
発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3E06-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

疫病菌交配ホルモン受容体遺伝子の探索（２）

Study on mating hormone receptor genes of *Phytophthora* （２）

笠原 功輝[1]、○米倉 令惠[1]、田中 愛子[1]、竹本 大吾[1]、鈴木 孝征[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]中部大・応生)
Kouki KASAHARA[1], ○Yoshie YONEKURA[1], Aiko TANAKA[1], Daigo TAKEMOTO[1], Takamasa SUZUKI[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Chubu Univ.)



疫病菌は *Phytophthora* 属の卵菌で、heterothalic 種では 2 つの交配型（A1、A2）が出会って初めて有性生殖する。A1、A2 交配型はそれぞれが交配ホルモン（α1、α2）を分泌し、互いを認識することで有性生殖を行う。これまでに交配ホルモンの生合成経路の一部が明らかになっているが、受容機構は未解明である。本研究は卵菌の有性生殖メカニズム解明の一環として、交配ホルモン受容体の同定を目的とする。

（1）*In silico* 解析：2 つの交配ホルモンの化学的構造の酷似性と低極性から、受容体の性質として「交配型間で構造が類似し発現比が逆の関係にある核内受容体」を想定し、ゲノム解析及びトランスクリプトーム解析から候補遺伝子の絞り込みを行った。ゲノム配列から遺伝子予測を行った結果、A1、A2 各交配型はそれぞれ約 18,500 遺伝子を有していた。RNA-Seq 解析と交配型間での類似性により、6 個のパラロガス遺伝子グループに絞り込んだ。今後、これら候補遺伝子の機能解析を行う予定である。

（2）遺伝学的アプローチ：A1 交配型と A2 交配型の交配により F1 株 39 株を作出した。この F1 株の自家受精または元々自家受精が可能な homothalic 種を自家受精させてゲノムシャッフルした株の取得を進めている。その後、交配型を決定しゲノム解析を行うことで、A1 交配型と A2 交配型に共通の遺伝子を抽出することで受容体の探索を目指す。

The plant pathogen *Phytophthora* sexually reproduces by crossing between A1 and A2 mating types in heterothallic species. A1 and A2 mating types secrete mating hormones, α1 and α2, respectively, to recognize each other. In this study, we aim to identify the mating hormone receptors using two approaches as follows. (1) Based on the similarity of the chemical structures and low polarity of the two mating hormones, the receptors could be nuclear receptors with similar structures but in different expression levels between the two mating types. By gene prediction from the draft genome sequence, the both mating types have about 18,500 genes. Using RNA-Seq and sequence comparison, we narrowed down 6 paralogous gene groups. The candidate gene function will be investigated. (2) F1 strains obtained by crossing of A1 and A2 mating types or homothalic species were allowed to self-fertilization to obtain A1 and A2 types progenies with shaffled genomes, which will be analyzed for NGS.

Phytophthora, mating hormone, receptor

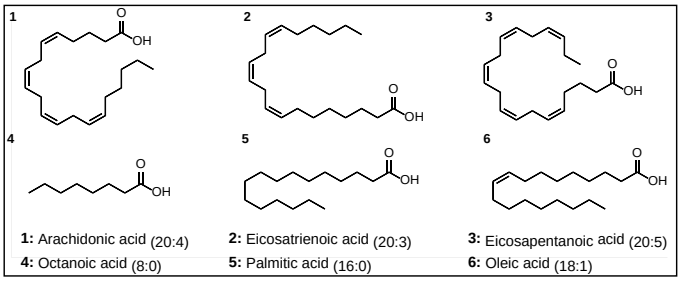
発表責任者：小鹿一（ojika@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E06-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

クロイソカイメンより単離したアラキドン酸と各種脂肪酸による電位依存性ナトリウムチャネルの阻害作用

Inhibitory activity of the voltage-gated sodium channels by arachidonic acid, isolated from the marine sponge Halichondria okadai, and other fatty acids.

○千葉 修[1]、島田 紀子[1]、工藤 雄大[1,2]、長 由扶子[1]、山下 まり[1]、此木 敬一[1]([1]東北大院農、[2]東北大学際研)
○Osamu CHIBA[1], Noriko SHIMADA[1], Yuta KUDO[1,2], Yuko CHO[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[1], Keiichi Konoki[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tohoku Univ. FRIS)



【目的】クロイソカイメン（*Halichrondria okadai*）は海水中の様々なプランクトンをろ過摂食する。このためクロイソカイメンは多くの付着微生物とそれらに由来する二次代謝産物を体内に有しており、オカダ酸やハリコンドリン B など様々な天然物有機化合物の宝庫である。当研究室では、電気生理学的手法の一つであるホールセル記録法を用いたスクリーニングにより、クロイソカイメンの抽出画分より Na_v 阻害剤としてアラキドン酸（**1**）を同定し、昨年度、本大会にて報告した。脂肪酸が各種イオンチャネルを阻害することはすでに報告されているが、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A（N2A）細胞に発現する Na_v への阻害については未報告であり、他の脂肪酸による Na_v の阻害など分子機構の詳細は不明である。本研究ではアラキドン酸と炭化水素の二重結合数の異なるエイコサトリエン酸（**2**）、エイコサペンタエン酸（**3**）を含む 6 種の脂肪酸に対する Na_v の感受性を評価し、医薬資源としての可能性を調査することを目的とした。
【材料と方法】N2A 細胞に発現する Na_v に対して、**1**、**2**、**3** の他、オクタン酸（**4**）、パルミチン酸（**5**）、オレイン酸（**6**）が示す阻害活性をホールセル記録法[1]により調べた。
【結果と考察】脂肪酸 **4**-**6** は N2A 細胞に発現する Na_v に対して 100 μM で Na_v を阻害しなかった。脂肪酸 **1**-**3** は同濃度で強い活性を示したため、各種濃度を与えた際の Na_v 阻害率を調べ、IC_{50} 値を算出した。その結果、Na_v に対する阻害活性が強い順に **1**（6.1 ± 2.0 μM）、**3**（26 ± 4.0 μM）、**2**（58 ± 20 μM）となった。**1** の阻害作用を定常状態モデルにあてはめると、Na_v に想定される活性化ゲート、不活性化ゲートのうち、後者を負電極側に移行することがわかった。

The marine sponge *Halichrondria okadai* is a filter feeder that feeds on a variety of plankton in seawater and contains numerous attached or symbiotic microorganisms and their secondary metabolites such as okadaic acid and halichondrin B. In our laboratory, arachidonic acid (**1**) was identified as a voltage-gated sodium channel (Na_v) inhibitor from the extract of *H. okadai* by conducting whole-cell patch-clamp recordings, which was reported last year at this conference. Although fatty acids are known to inhibit the various ion channels, inhibition of Na_v expressed in neuroblastoma Neuro 2A (N2A) cells has not yet been reported, and the details of inhibition by other fatty acids are not investigated well. The purpose of this study was to evaluate the sensitivity of Na_v to six fatty acids, including arachidonic acid (**1**), eicosatrienoic acid (**2**) and eicosapentanoic acid (**3**) to evaluate their potential as pharmaceutical resources. The IC_{50} values were **1** (6.1 ± 2.0 μM), **3** (26 ± 4.0 μM), **2** (58 ± 20 μM). Steady-state analysis of Na_v revealed that **1** shifted the half inactivation potential of Na_v to the hyperpolarized direction. Other results from the electrophysiological analyses will be presented on site.

【Reference】1) Tsukamoto, T. *et al., Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174,* 3881-3892.

polyunsaturated fatty acid, voltage-gated sodium channel, electrophysiology

発表責任者：此木　敬一（keiichi.konoki.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：3E06-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム E

クアシノイド類のタンパク質合成阻害活性による 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解の促進

Quassinoids induce lipolysis in 3T3-L1 adipocyte through inhibition of protein synthesis

○木下 雄太、岩田 稜平、加藤 英介（北大院農）
○Yuta KINOSHITA, Ryouhei IWATA, Eisuke KATO (Hokkaido Univ.)

脂肪細胞に蓄積された脂肪は、細胞内リパーゼにより分解された後、代謝される。したがって、細胞内リパーゼによる脂肪分解経路の活性化は、蓄積された脂肪の利用につながり、肥満改善に役立つと考えられている。我々は、クアシノイド類が 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解を促進することを見出しており、かつ、その作用が cAMP 濃度の上昇を伴わず、アドレナリン受容体などを介した脂肪分解経路の活性化とは異なることを見出している。一方、クアシノイド類はタンパク質合成阻害活性を有することが知られている。本研究では、細胞内タンパク質量の変化が脂肪分解促進活性に関わっていると考え、タンパク質合成阻害活性と脂肪分解促進活性との関連について解析した。

タンパク質合成阻害剤シクロヘキシイミド（CHX）を、3T3-L1 脂肪細胞に投与したところ脂肪分解の促進が見られた。また、クアシノイド類と CHX を、ペプチダーゼ阻害剤であるロイペプチン、MG132 と共投与したところ、MG132 の共投与により脂肪分解促進活性は抑制された。さらに、タンパク質合成を阻害する種々の抗生物質で 3T3-L1 脂肪細胞を刺激したところ、1 つを除いて脂肪分解の促進が見られた。これらより、クアシノイド類はタンパク質合成阻害により脂肪分解を促進していることが示唆された。次に、クアシノイド類及び CHX で 3T3-L1 脂肪細胞を刺激し、脂肪分解経路に関わるタンパク質量の変化を解析した。その結果、これら化合物による 8 時間以上の刺激により PKA 触媒サブユニットのリン酸化の促進が見られ、さらに一晩以上刺激した場合には perilipin-1 量の減少も見られた。したがって、クアシノイド類は、タンパク質合成を阻害することで、PKA 触媒サブユニットを活性化するとともに perilipin-1 の減少を誘導し、3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解を促進していることが明らかとなった。

Quassinoids promote lipolysis in 3T3-L1 adipocytes without an increase in cAMP concentration. We postulated that quassinoids induce lipolysis through inhibition of protein synthesis and investigated in this study. Various protein synthesis inhibitors including cycloheximide (CHX) stimulated lipolysis of 3T3-L1 adipocytes, and the lipolytic activity of quassinoids/CHX was inhibited by the peptidase inhibitor MG132, indicating that inhibition of protein synthesis induces lipolysis. Analysis of lipolysis related proteins revealed phosphorylation of PKA Cα subunit and reduction of perilipin-1. Thus, quassinoids were revealed to promote lipolysis through activation of PKA Cα subunit and reduction of perilipin-1 amount.

lipolysis, inhibition of protein synthesis, adipocyte

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E08-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

植物由来のジテルペン化合物 Momilactone B は細胞内の ROS レベルを減少させることで細胞の増殖を阻害する

Momilactone B, a plant-derived diterpenoid, inhibits cell proliferation by decreasing intracellular ROS level

○富田 啓介[1]、松尾 安浩[2]、八代田 陽子[3]、吉田 稔[3,4,5]、川向 誠[2]、野尻 秀昭[1,5]、岡田 憲典[1]（[1]東大・農生科・AgTECH、[2]島根大・生物資源、[3]理研・CSRS、[4]東大院・農生科・応生工、[5]東大・微生物連携機構）

○Keisuke TOMITA[1], Yasuhiro MATSUO[2], Yoko YASHIRODA[3], Minoru YOSHIDA[3,4,5], Makoto KAWAMUKAI[2], Hideaki NOJIRI[1,5], Kazunori OKADA[1] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]RIKEN CSRS, [4]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [5]CRIIM, UTokyo)

植物が生産するジテルペン化合物である Momilactone B (MB) は抗菌活性やアレロパシー活性、抗腫瘍活性等の様々な生物活性を有し、化学防御物質としての役割が明らかになりつつある。しかしながら、MB がどのようにして活性を発揮するのか、その作用メカニズムに関しては殆どが未解明である。そこで本研究では、MB 高感受性を示すモデル生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いた化学遺伝学的手法により MB の作用メカニズム解明を目指した。

まず、MB 感受性を規定する遺伝子を探索するため、分裂酵母に変異原を処理し、MB 耐性変異体をスクリーニングした。得られた耐性変異体において変異が生じていた遺伝子の MB 感受性への関与を調べたところ、ATP 合成酵素の β サブユニット Atp2 の機能欠損が MB 耐性を付与することが明らかになった。MB 耐性は ATP 合成酵素の他のサブユニットや電子伝達系構成因子をコードする遺伝子の破壊や呼吸阻害剤 Antimycin A の処理でも見られ、反対に呼吸亢進の表現型を示す *pka1* 破壊株は MB 高感受性を示したことから、MB 感受性と呼吸活性の間に相関がみられた。呼吸活性の変化は活性酸素種 (ROS) の産生量に影響を与えることから、MB の作用機序への ROS の関与が疑われた。そこで次に、MB 処理時の細胞内の ROS レベルを測定すると、MB は細胞内の ROS レベルを減少させた。また、過酸化水素や、ROS 誘導剤 Menadione の添加は MB の生育阻害効果を一部抑制した。近年、ROS は様々な生理機能を調節するシグナル因子としての役割を果たすことが示されており、MB はそのような正の役割を持つ ROS を減少させることで生育を抑制している可能性が考えられる。

Momilactone B (MB) is a plant-derived diterpenoid possessing various bioactivities. However, its mode of action was largely unknown. Here, we tried to elucidate it by chemical genetics using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. First, we screened for MB-resistant mutants to identify genes that determine MB sensitivity. We found that a functional defect in Atp2, the β-subunit of ATP synthase, confers MB resistance. MB resistance was also caused by the deletion of genes encoding other subunits of ATP synthase and ETC components, while *pka1* deletion strain, which showed accelerated respiration, was hypersensitive to MB, indicating a correlation between MB sensitivity and respiratory activity. Furthermore, MB decreased the cellular ROS levels and ROS addition partially restored the growth defect caused by MB, implying that MB suppresses the growth by decreasing cellular ROS, which is required for the proper cell growth.

mode of action, fission yeast, reactive oxygen species

発表責任者：岡田憲典（ukazokad@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E08-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

コレラ菌 NADH-ユビキノン酸化還元酵素の Na^+輸送におけるユビキノン側鎖の重要性

The side chain of ubiquinone plays a critical role in Na^+ translocation by NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○石川 萌[1]、桝谷 貴洋[1]、黒田 聖奈[1]、宇野 晋平[1]、志波 智生[2]、稲岡 健 ダニエル[3]、村井 正俊[1]、Barquera Blanca[4]、三芳 秀人[1]([1]京大農、[2]京都工繊大応用生物、[3]長崎大熱帯医学、[4]レンセラー工科大生物工)

○Moe ISHIKAWA[1], Takahiro MASUYA[1], Seina KURODA[1], Shinpei UNO[1], Tomoo SHIBA[2], Ken Daniel INAOKA[3], Masatoshi MURAI[1], Blanca Barquera[4], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Institute of Technology, [3]Nagasaki Univ., [4]Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景と目的】Na^+輸送型 NADH-ユビキノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）は、酸化還元と共役したナトリウムポンプであり、6 つのサブユニット（NqrA-F）と 6 つのコファクターから構成される膜タンパク質複合体である。本酵素はコレラ菌（*Vibrio cholerae*）など多数の病原性細菌の生育に必須であり、哺乳類ミトコンドリアの H^+輸送型 NADH-ユビキノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）とは構造的にも進化的にも異なるため、病原性細菌に対する有望な創薬標的として注目されている。2014 年にコレラ菌 Na^+-NQR の X 線結晶構造が報告されたが、一連の酸化還元反応と Na^+輸送の共役メカニズムについてはほとんど解明されていない。本研究では酸化還元の最終電子受容体であるユビキノン（UQ）に注目して、コレラ菌 Na^+-NQR におけるエネルギー共役機構の解明を目指した。

【方法と結果】コレラ菌 Na^+-NQR を再構成したプロテオリポソームを用い、UQ 類縁体ごとの UQ 還元活性と、Na^+輸送活性を測定した（**図** 1）。その結果、側鎖の短い UQ 類を基質とした場合、それらは還元されるにも関わらず、Na^+は全く輸送されない”脱共役”が起こることがわかった。一方、それらよりも長いアルキル基もしくはプレニル基を有する UQ 類では、側鎖構造に関わらずキノン還元と共役した Na^+輸送が観測された。さらに、共役可能な UQ 側鎖の結合部位を調べるため、長鎖 UQ の側鎖末端部に光親和性標識基を持つプローブ pUQ_5 を用いて標識実験を行ったところ、膜貫通領域ではなく、サイトプラズム側の膜表面に位置する NqrA サブユニットを標識することがわかった。以上の結果より、UQ 側鎖は酵素に取り込まれた Na^+がサイトプラズム側へ逆流することを防ぐことで、Na^+輸送を制御していると推測した。

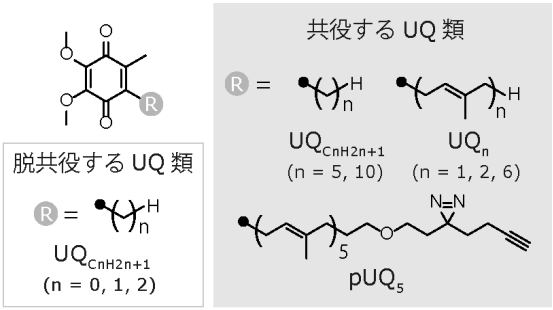


図 1. UQ 類縁体の構造.

The Na^+-pumping NADH-ubiquinone (UQ) oxidoreductase (Na^+-NQR) is an essential bacterial respiratory enzyme that generates a Na^+ gradient across the cell membrane. It remains unknown how the redox reactions and Na^+ translocation are mechanistically coupled in Na^+-NQR. To address this, we investigated the relation between reduction of UQ and Na^+ translocation using a series of UQs with *V. cholerae* Na^+-NQR reconstituted into liposomes. This study revealed that the final UQ reduction makes an important contribution to Na^+ translocation through a critical role of its side chain at the cytoplasmic membrane surface.

Na^+-NQR, ubiquinone, Na^+-pump

発表責任者：石川萌（ishikawa.moe.83u@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E08-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I における人工ユビキノン類の多様な反応機構

Diverse reaction manners of artificial ubiquinones in mitochondrial respiratory complex I

○宇野 晋平[1]、生西 凌[1]、桝谷 貴洋[1]、伊藤（新澤） 恭子[2]、村井 正俊[1]、三芳 秀人[1] ([1]京大農、[2]兵庫県立大生命理学)

○Shinpei UNO[1], Ryo IKUNISHI[1], Takahiro MASUYA[1], Kyoko SHINZAWA-ITOH[2], Masatoshi MURAI[1], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Univ. of Hyogo)

【背景と目的】NADH-ユビキノン酸化還元酵素（**複合体-I**）はミトコンドリア電子伝達系の初発酵素で、基質の酸化還元と共役してプロトンを輸送する膜タンパク質複合体である。複合体-I の cryo-EM 構造を参照すると、ユビキノン (UQ) が還元されるキノン結合ポケットは小さな入口を持つ細長い“洞窟様”の構造をとることが示唆されている。我々は先行研究にて、洞窟には侵入できないような嵩高い構造を有する UQ 類がウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMPs）において良好な電子受容体となることを見出した。一方で、嵩高い UQ 類はウシ心筋ミトコンドリアから単離した複合体-I では電子受容体とならないことも示した。本研究では、独自にデザインした**光反応性ユビキノン類**を用いて、SMPs に内在する native 複合体-I と単離複合体-I の間にある差異を解明することを目指した。

【方法と結果】光反応性基であるジアジリンとヨウ素を *meta* あるいは *para* 置換した 2 系統の光反応性 UQ 類（pUQ 類、**図 1**）を合成した。ここで、*meta* 体に比べて *para* 体は約 1 Å だけ幅広い。SMPs で電子伝達活性を評価したところ、2 系統の pUQ 類は同程度の活性を示したが、単離複合体-I では *meta* 体に対して *para* 体の活性が顕著に低下した。図 1 に示す 4 種類の pUQ 類においてヨウ素を ^{125}I に置換して光親和性標識実験を行ったところ、native 複合体-I と単離複合体-I の間でわずかに標識パターンが異なっていた。これらの結果は、**native 複合体-I と単離複合体-I の間には構造的な差異がある**ことを示唆する。さらに、*meta* 体と *para* 体との間においても結合部位が異なることがわかり、**UQ 類は側鎖構造に依存して異なる侵入経路を経て電子を受容する**ことが示唆された。

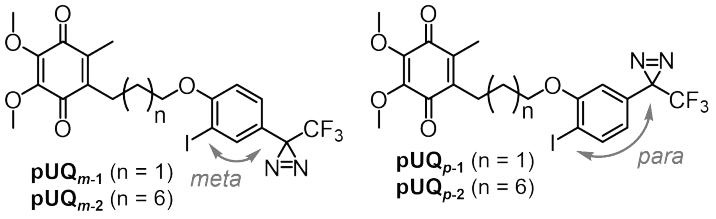


図 1. 本研究で使用した光反応性 UQ 類の構造

Structural studies identified a long and narrow UQ-access tunnel in mitochondrial respiratory complex I. We previously reported that oversized ubiquinones, which are unlikely to transit the narrow tunnel, are catalytically reduced by native complex I in submitochondrial particles (SMPs) but not by the isolated complex I. To explore this contradiction, we produced two types of photoreactive ubiquinones (pUQs), which have different substituted pattern (*para* vs *meta*). The catalytic reduction of the wider pUQs by the isolated complex I was extremely slower than that of the narrower pUQs, but both of them were similarly reduced by the native complex. Photoaffinity labeling experiments demonstrate that labeling patterns are different between native and isolated complex I. The *meta*- and *para*-substituted ubiquinones also exhibited different labeling patterns. These results indicate that the structure of UQ-binding pocket in native complex I may be different from that in the isolated enzyme and that the access routes may change depending on their side chain structures.

complex I, ubiquinone, mitochondria

発表責任者：宇野晋平（uno.shinpei.85r@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E08-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

米糠由来成分フェルラ酸の美容効果

Beauty effect of ferulic acid, derived from rice bran extract

○中川 詩織、中村 紀夫、築野 卓夫 (築野ライスファインケミカルズ株式会社)
○Shiori NAKAGAWA, Toshio NAKAMURA, Takuo TSUNO (TSUNO RICE FINE CHEMICALS Co., Ltd.)

米糠抽出物は複数の機能性成分を含み、これらの効果を期待して化粧品原料にも利用される。一方、近年の化粧品では消費者の肌状態や目的に合った製品が勧められており、複数の成分を含む米糠抽出物をそのような化粧品に利用するには各成分の機能性評価も重要である。そこで、本研究では米糠中の機能性成分の一つであるフェルラ酸に着目し、抗炎症作用、抗菌作用、抗酸化作用、抗メラニン形成作用など化粧品用途に関わる機能性について解析を行った。

その結果、フェルラ酸による抗炎症作用では、LPS (lipopolysaccharide) 刺激した RAW264.7 細胞において TNF-α (tumor necrosis factor-α) 、COX2 (cyclooxygenase-2) 遺伝子発現の抑制、NO (nitric oxide) 産生の抑制が認められた。また、抗菌作用ではアクネ菌と黄色ブドウ球菌の増殖抑制が認められた。その他、抗酸化作用では過酸化水素で刺激した HaCaT 細胞において ROS (reactive oxygen species) 産生を抑制し、抗メラニン形成作用では B16 細胞でのチロシナーゼ遺伝子発現、メラニン産生を抑制した。これらの作用は従来使われている化粧品原料と比較しても遜色ない効果であった。今後、さらなる解析を進めることで米糠抽出物の化粧品原料における適切な利用につながると考えられる。

Rice bran extract includes plural functional ingredients and is used as cosmetics raw materials expecting those functional effects. The recent cosmetics are used in according to consumer's skin types and their needs. Therefore, functional analysis of each ingredient is important. One of the functional ingredients is ferulic acid (FA). We investigated whether FA has effects to anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-oxidative, and anti-melanogenesis.

As a results, FA inhibited expression of TNF- α and COX2 gene, and production of NO in LPS-stimulated macrophages (RAW264.7). Also, suppressed growth of P. acnes and S. aureus. In addition, FA inhibited ROS production in H_2O_2 stimulated keratinocytes (HaCaT). FA had functioned to reduce tyrosinase gene expression and melanin production in melanomas (B16). All of those effects were higher than the other drug substances. This study leads us to the appropriate use of ingredients of rice bran extract.

ferulic acid, anti-inflammatory, anti-bacterial

講演番号：3E08-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

マンゴー種子からの美白有効成分の探索

Screening for skin whitening ingredients from mango kernels

○藤田 光、藤巻 貴宏（東京農大・農芸化学科）
○ Hikaru FUJITA, Takahiro FUJIMAKI (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Agricultural Chemistry)

メラニンは紫外線から皮膚の細胞を守る重要な役割がある一方、過剰なメラニン産生やメラニンの排出が滞ることで色素沈着が起こり、シミやそばかすの原因となる。チロシナーゼはメラニン生合成において律速酵素として重要な働きを担っており、この酵素を阻害することで美白効果を得られることが知られている。本研究はチロシナーゼ阻害による美白効果をもつ化粧品素材を天然物から探索することを目的とする。*in vitro* チロシナーゼ阻害活性試験の活性を指標に、薬草や未利用農作物を中心とする天然物サンプルの選別と活性成分の単離を行った。さらに活性があった成分に関してはメラニン産生細胞である B16 メラノーマ細胞を用いて動物細胞での活性評価を行った。*in vitro* 試験の結果、強い阻害活性を持つ天然物としてマンゴー種子が見出された。マンゴー種子の 50%EtOH 抽出物を水-酢酸エチルでの液液分配および HPLC で活性成分の単離精製を行った。得られた画分を LC/MS および NMR によって構造解析した結果、マンゴー種子から新規のチロシナーゼ阻害活性報告となる 3-*O*-digalloyl-1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose (HGG)を含むいくつかの活性成分を単離した。

Melanin is a pigment which protects human skin from ultraviolet radiation. However, abnormal melanin product and accumulation induce hyperpigmentation, which cause the chloasma and freckles. Tyrosinase plays an important role as a rate-limiting enzyme in melanin biosynthesis, and inhibiting this enzyme is known to have skin whitening effect. Therefore, the purpose of this study is to isolate safe and unique ingredients from natural products that have whitening effects by inhibiting tyrosinase. Several crude extracts of plants were screened for tyrosinase inhibitory activity by measuring dopachrome formation of L-DOPA after reaction with tyrosinase.

In the course of screening, mango (*Mangifera indica* L.) kernels extract was found to be a natural product with strong inhibitory activity. Thus, we performed to isolate tyrosinase inhibitor from mango kernels. 50% EtOH extracts of mango kernels was dissolved in H_2O and extracted with EtOAc. Organic layer was concentrated and subjected to HPLC. Eventually, several active constituents including 3-*O*-digalloyl-1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose (HGG) were isolated.

tyrosinase, gallotannin, Mango kernels

発表責任者：藤巻　貴宏（tf206510@nodai.ac.jp）

講演番号：3E08-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

アマニ抽出油による皮膚の抗老化作用

Anti-aging effect of flaxseed extract oil on the skin

○赤堀 友治、鈴木 聡（株式会社実正）
○Yuji AKAHORI, Satoshi SUZUKI (MISHO CO., LTD.)

アマニ（亜麻仁）は豊富な不飽和脂肪酸、脂溶性ビタミンを含有することが知られている。本研究では種々の方法でアマニから抽出したオイルの抗老化作用について検討した。

初めに、SF-TY 正常ヒト皮膚線維芽細胞に 100 μg/mL の濃度で低温圧搾アマニ油、超臨界 CO_2 抽出アマニ油、エタノール抽出アマニ油、n-ヘキサン抽出アマニ油を添加し、細胞内のタンパク当たりのコラーゲン量を測定した。その結果、いずれの油にも細胞のコラーゲン産生を促進する作用が見られ、特にエタノール抽出アマニ油の効果が最も大きかった。

次に、上記各アマニ油のエラスターゼ活性阻害作用を測定したところ、超臨界 CO_2 抽出アマニ油が強くエラスターゼ活性を阻害していた。また、低温圧搾アマニ油も弱いが、有意な効果が見られた。

今回の研究は、アマニ油のコラーゲン産生促進及びエラスターゼ活性阻害作用を初めて示すものである。また、同じアマニ油でも採取方法の違いにより効果に大きな差が出ることが示された点でも、非常に興味深い。なお、エラスターゼ活性阻害作用の有効成分に関しても言及する予定である。

Flaxseed is known to contain abundant unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. In this study, we investigated the anti-aging effect of oil extracted from flaxseed by various methods.

First, SF-TY normal human skin fibroblasts were added with cold pressed flaxseed oil, supercritical CO_2-extracted flaxseed oil, ethanol-extracted flaxseed oil, and n-hexane-extracted flaxseed oil at a concentration of 100 μg/mL. The amount of collagen per protein was measured. As a result, all the oils had an effect of promoting collagen production in cells, and the effect of ethanol-extracted flaxseed oil was the greatest.

Next, when the elastase activity inhibitory effect of each of the above flaxseed oils was measured, the supercritical CO_2-extracted flaxseed oil strongly inhibited the elastase activity. The cold pressed flaxseed oil was also weak, but a significant effect was observed.

This study is the first to show the collagen production promoting and elastase activity inhibitory effects of flaxseed oil. It is also very interesting that the same flaxseed oil has been shown to have a large difference in effect depending on how it is taken. In addition, we will also mention the active ingredient of the elastase activity inhibitory effect.

collagen, elastin, flaxseed

講演番号：3E08-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

エゴマ種子超臨界 CO_2 エキスのメラニン産生抑制作用

Anti-melanogenesis activity of the supercritical CO_2 extract from *Perilla frutescens* seed

○鈴木 聡[1]、藤澤 日土美[2]、阿部 純平[2]、木村 賢一[2] ([1]（株）実正、[2]岩手大学)
○Satoshi SUZUKI[1], Hitomi FUJISAWA[2], Junpei ABE[2], Ken-ichi KIMURA[2] ([1]Misho Co., Ltd., [2]Iwate Univ.)

エゴマ種子は、優れた食用オイルとして活用される油分を豊富に含んでいる。我々は今回、エゴマ種子から超臨界流体 CO_2 により抽出したエキス（超臨界 CO_2 エキス）のメラニン産生抑制作用について検討した。

同エキスを B16 マウスメラノーマ細胞に 100 μg/mL の濃度で添加すると、細胞毒性を伴わずにメラニン産生を約 96 %以上抑制した。この効果は、同じ濃度のコウジ酸及び低温圧搾により採取されたエゴマ種子油の効果を大きく上回っていた。また、エゴマ種子のエタノールエキスと、エゴマの変種である青ジソの趣旨から採った超臨界流体 CO_2 エキスについても調べたが、いずれも 10 μg/mL でのメラニン産生抑制効果はエゴマ種子超臨界流体 CO_2 エキスと同等だったものの、50 μg/mL 以上では細胞毒性が現れ、それ以上の濃度での比較はできなかった。

エゴマ種子に含まれることが知られている複数の不飽和脂肪酸及びフラボノイドについて調べたところ、リノール酸とアピゲニンが有意にメラニン産生を阻害した。HPLC を用いてこれらの成分を定量すると、リノール酸に関しては、エゴマ種子超臨界流体 CO_2 エキスの方がエゴマ種子油より多く含有していた。一方、アピゲニンはいずれからも検出されなかった。エゴマ種子超臨界流体 CO_2 エキスは他にもメラニン産生阻害成分を含有している可能性があり、我々は現在、その特定を進めている。

Perilla frutescens seed (PFS) is rich in lipids used as fine edible oil. In this study, we tested anti-melanogenesis activity of the PFS supercritical CO_2 extract ($scCO_2$ ext.). It decreased >96 % of melanin production in B16 melanoma cells without cytotoxicity at 100 μg/mL, more efficiently than kojic acid and PFS oil extracted by cold press. Although the inhibitory effect of PFS ethanol extract and the $scCO_2$ ext. of *P. frutescens* var *crispa* f. *Viridis* seeds was almost the same as that of the PSF $scCO_2$ ext. at 10 μg/mL, they had cytotoxicity at >50 μg/mL. Among some ingredients of PFS, linoleic acid and apigenin significantly inhibited melanin production of the cells. Linoleic acid was contained more in PSF $scCO_2$ ext. than in PFS oil. Apigenin was not detected in the both of them. The PFS $scCO_2$ ext. could contain other unknown inhibitors. We are trying to identify them.

Perilla frutescens, Melanogenesis, Supercritical CO_2 extract

発表責任者：鈴木　聡（ssuzuki@misho.co.jp）

講演番号：3E08-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

ライステロール™エステルによるヒト線維芽細胞およびヒト皮膚への効果

The effect of Riceterol™ester on fibroblast and skin.

○小林 瑞佳、中川 詩織、中村 紀夫、築野 卓夫 (築野ライスファインケミカルズ株式会社)
○Mizuka KOBAYASHI, Shiori NAKAGAWA, Toshio NAKAMURA, Takuo TSUNO (TSUNO RICE FINE CHEMICAL Co.,Ltd)

【背景】
米ぬかには植物ステロールが豊富に含まれている。我々は、米糠から米油を抽出する際の副産物を用い、植物ステロールおよび脂肪酸のエステル体である「ライステロール™エステル」(RSE)を開発した。同成分はこれまでも化粧品素材として抱水性やエモリエント効果などの有効性が既知であったが、この度、培養細胞試験による新規機能性の探索及びヒトでの新規有効性を検証した。
【方法】
細胞試験：ヒト真皮線維芽由来培養細胞（Hs68）に RSE を添加し、ヒアルロン酸およびコラーゲンについて、その合成遺伝子発現および培地中への産生を ELISA により定量的に検出した
顔面塗布試験：22 名の女性(38.0±2.8)を対象に 12 週間のプラセボ対照単盲検試験を実施した。被験者は RSE を 0.5%配合したクリームと配合しないクリームの 2 種類を半顔ずつ毎日塗布した。評価項目として画像解析(シワ、赤み)、経皮水分蒸散量、角層水分量を計測した。
【結果・考察】
細胞試験において、RSE 添加によってヒアルロン酸合成酵素(HAS2)およびヒアルロン酸量の増加が認められた。またⅢ型コラーゲン合成酵素(COL3)の遺伝子発現およびタンパク質も増加が確認された。一方、顔面塗布試験にて 8 週目 12 週目に経皮水分蒸散量の有意な減少が認められた。また、年代別解析において、角層水分量、シワスコアの改善を確認した。RSE は、ヒアルロン酸合成促進による保湿機能改善効果、およびコラーゲン合成促進によるシワ改善効果を有することが示唆された。

Rice bran abundantly contains various phytosterols. Ricetrol™ester(RSE) was produced from the by-products of rice bran oil manufacturing. In this study, we examined effectiveness of RSE to human skin. In human fibroblast cell, the hyaluronan and collagen productions were effectively enhanced by RSE treatment. Moreover, the half-face of subjects which treated with RSE were improved scores TEWL, moisture, and wrinkles. These results suggested that RSE improves skin moisture and wrinkles due to promote hyaluronan and collagen production.

rice bran, hyaluronan, collagen

講演番号：3E08-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

米糠由来植物ステロールエステルの皮膜形成によるヒト皮膚における保湿効果

Moisturizing effect of rice bran-derived plant sterol esters by forming a film on human skin

○山内 優歩、周 京秀、中村 紀夫、築野 卓夫（築野ライスファインケミカルズ株式会社）
○Yuho YAMAUCHI, Jingxiu ZHOU, Toshio NAKAMURA, Takuo TSUNO (TSUNO RICE FINE CHEMICALS Co., Ltd)

米糠には様々な機能性成分が含まれていることが分かっており、その中にはステロール類およびその誘導体がある。これらは一般に植物ステロールと呼ばれ、化粧品に広く用いられている。『ライステロールエステル（RSE）』は、米糠から抽出した天然の植物ステロールであり、抱水性や水蒸気透過抑制性に優れていることが分かっている。そこで実際のヒト皮膚においてRSEが保湿効果を有するのかについて検討するため、1%RSE 配合美容液と RSE を配合していないプラセボ美容液を作製し、各美容液塗布部位の経皮水分蒸散量、角層水分量、皮膚摩擦を測定した。前腕皮膚の角層剥離後、RSE 美容液を塗布することによって、30 分後に経皮水分蒸散量は抑制された。角層水分量は RSE 美容液塗布 30 分後に上昇し、1 時間後まで高い値を維持した。また、皮膚摩擦はプラセボ美容液塗布部位よりも RSE 美容液塗布部位において低くなった。さらに、RSE には疎水性の皮膜形成能があることを観察した。RSE には皮膚バリア機能改善効果および保湿効果が期待できる。

Rice bran contains various functional ingredients, including sterols and their derivatives. These are commonly referred to as plant sterol and are widely used in cosmetics. ”Riceterol esters (RSE)”, which is natural sterol esters derived from rice bran, is demonstrated to have excellent water holding property and steam permeation preventability. Therefore, we investigated whether RSE has a moisturizing effect on human skin. A 1% RSE-containing beauty essence and a placebo beauty essence without RSE were prepared, and we measured the transepidermal water loss, stratum corneum water content, and skin friction at each beauty essence application site. After stripping the stratum corneum of the forearm skin, the transepidermal water loss was suppressed 30 minutes later by applying RSE essence. The water content of the stratum corneum increased 30 minutes after application of RSE essence and remained high until 1 hour later. In addition, skin friction was lower at the RSE essence application site than at the placebo essence application site. Furthermore, it was observed that RSE has the ability to form a hydrophobic film. RSE can be expected to improve skin barrier function and moisturize.

plant sterol esters, transepidermal water loss, skin barrier function

発表責任者：山内優歩（yamauchi.yuho@tsuno.co.jp）

講演番号：3E08-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム E

コウズク（*Alpinia galanga*, 果実）含有ネオリグナン成分のケモカイン受容体 CCR3 アンタゴニスト作用

Neolignan from the fruit of *Alpinia galanga* as antagonists of CC chemokine receptor-3

○坂本 裕介[1]、萬瀬 貴昭[1]、楡 光世[1]、綿原 光司[2]、原 雄大[2]、松尾 一彦[2]、中山 隆志[2]、森川 敏生[1,3] ([1]近畿大・薬総研、[2]近畿大・薬、[3]アンチエイジングセ)
○Yusuke SAKAMOTO[1], Yoshiaki MANSE[1], Mitsuyo NIRE[1], Koji WATAHARA[2], Yuta HARA[2], Kazuhiko MATSUO[2], Takashi NAKAYAMA[2], Toshio MORIKAWA[1,3] ([1]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [2]Faculty of Pharmacy, Kindai Univ., [3]Antiaging Center)

ケモカインは，白血球やリンパ球などの免疫担当細胞の細胞遊走を誘導するサイトカインとして，広く認識されている．ケモカインは免疫応答の制御のみならず，アレルギー疾患，自己免疫疾患，感染症やがんの病態発症においても重要な役割を果たしていることが明らかになっている．アレルギー疾患の発症や増悪に関与するケモカイン受容体の CCR3 は，好酸球の最も主要な遊走制御因子であり，好酸球，好塩基球および Th2 細胞の一部に選択的に発現する．我々はアレルギー疾患をはじめとした難治性炎症性疾患の新たな治療薬シーズの探索研究として，単一のケモカイン受容体のみを遺伝子工学的に過剰発現し樹立した CCR3 安定発現細胞株を用い，細胞遊走阻害活性を指標に CCR3 に対するアンタゴニストの探索を行った．その結果，薬用のみならず香辛料として食用にも用いられるコウズク[ショウガ科（Zingiberaceae）植物, *Alpinia galanga* 果実]の含水アセトン抽出エキスに，CCR3 選択的なアンタゴニスト活性を見いだしたことから，その活性寄与成分の同定を行った．

タイ産 *A. galanga* 果実の含水アセトン抽出エキスについて, CCR3 アンタゴニスト活性を 10 μg/mL の濃度にて, 評価した結果, eotaxin/CCL11 をリガンドとした際に選択的なアンタゴニスト活性が見いだされた．さらに, その含有成分についても同様に活性を検討した結果, 7-*O*-9' 結合型ネオリグナンである galanganol D diacetate (**1**, EC_{50} = 46.6 μM) に陽性対照である選択的 CCR3 アンタゴニストである SB328437 (151.1 μM) を 上回る活性を確認した．また, 脱顆粒抑制活性指標である RBL-2H3 細胞を用いた抗原刺激による β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性についても検討したので併せて報告する．

CC chemokine receptor 3 (CCR3) is expressed selectively in eosinophils, basophils, and some Th2 cells and plays a major role in allergic diseases. *Alpinia galanga* (Zingiberaceae) is a perennial herb distributed in south of China and Southeast Asia. An aqueous acetone extract from the fruit of *A. galanga* inhibited CC chemokine ligand 11-induced chemotaxis in CCR3-expressing L1.2 cells at 10 μg/mL. From this extract, galanganol D diacetate was isolated. galanganol D diacetate (**1**, EC_{50} = 46.6 μM) was more potent than a synthetic CCR3 selective antagonist, SB328437 (151.1 μM). Furthermore, the degranulation inhibitory effect of galanganol D diacetate (**1**) was evaluated.

Alpinia galanga, neolignan, CCR3

講演番号：3F02-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

Discovery of new lucilactaene derivatives with potent antimalarial activity and their structure-activity relationship

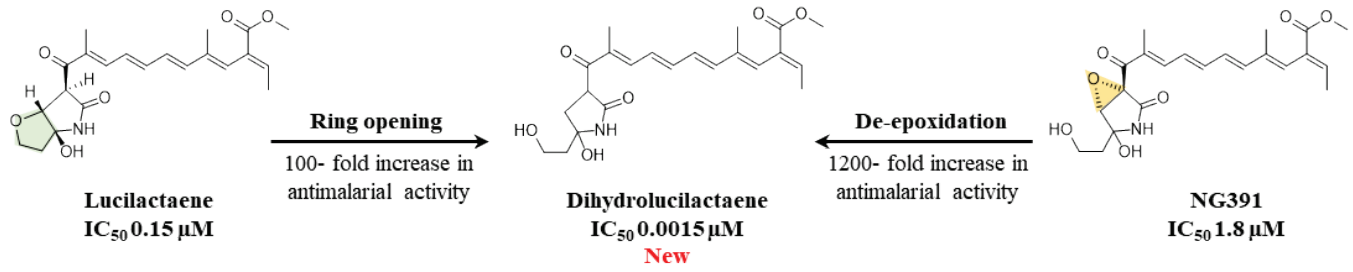
○ Islam Adel Abdelhakim Amin[1,2,3,4], Fauze Mahmud[1,5,6], Motoyama Takayuki[1], Nogawa Toshihiko[1], Futamura Yushi[1], Takahashi Shunji[2,3], Osada Hiroyuki[1] ([1]Chemical biology, CSRS, RIKEN, [2]Natural products biosynthesis unit, CSRS, RIKEN, [3]Saitama Univ., [4]Assiut Univ., [5]INFORMM, USM, [6]FSSA, UMS)

[Background and Objective] *Fusarium* sp. RK97-94 has been identified as a producer strain of lucilactaene and NG391. In a recent study conducted by our group, these compounds demonstrated potent *in vitro* antimalarial activity (IC_{50} 0.15 and 1.8 μM, respectively). Furthermore, the biosynthetic gene cluster of lucilactaene *(luc1-luc8)* was identified, however only *luc1* which encodes for a methyl transferase was functionally characterized. The purpose of this study is to isolate novel lucilactaene derivatives with potent antimalarial activity and to investigate the critical structural features required for this activity.

[Methods] We screened a recently discovered secondary metabolism activator, NPD938, to induce the production of new lucilactaene derivatives from *Fusarium* sp. RK97-94. In addition, two genes from lucilactaene gene cluster encoding P450 monooxygenase (*luc2*) and aldehyde dehydrogenase (*luc3*) were separately disrupted, and the resulted mutant strains were cultured and screened for production of new lucilactaene derivatives.

[Results] Three lucilactaene analogues were isolated and identified from NPD938-treated *Fusarium* sp. RK97-94 culture. One of these compounds, dihydrolucilactaene, displayed exceptional antimalarial activity against wild-type (3D7) and chloroquine-resistant (K1) *Plasmodium falciparum* strains (IC_{50} 1.5 nM). Metabolic profiling of *Fusarium* sp. RK97-94 mutant strains (Δ*luc2 and* Δ*luc3*) has resulted in identification of six new lucilactaene derivatives with antimalarial potential ranging from 3.9 – 25 μM. These findings enabled us to not only investigate the structure-activity relationship of lucilactaene derivatives as potent antimalarial lead compounds, but also speculate the biosynthetic mechanism of lucilactaene.

[Graphical abstract]



Antimalarial activity, Dihydrolucilactaene, Structure-activity relationship

発表責任者：Hiroyuki Osada（osadahiro@riken.jp）

講演番号：3F02-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

Mode of action study of dihydrolucilactaene, a new highly potent antimalarial compound

○ Fauze Mahmud[1,2,3], Futamura Yushi[1], Islam A. Abdelhakim[1,4,5,6], Motoyama Takayuki[1], Takahashi Shunji[1,4,5], Ngit Shin Lai[2], Osada Hiroyuki[1] ([1]Chemical Biology, RIKEN, CSRS, [2]INFORMM, USM, [3]FSSA, UMS, [4]Natural Product Biosynthesis Research Unit, RIKEN, CSRS, [5]Saitama Univ., [6]Assiut Univ.)

[Background] Malaria remains one of the most devastating infectious diseases in the tropics that claimed around half-million lives annually. The emergence of drug-resistance strains, including against the current frontline antimalarial, artemisinin, further complicates the problem. Hence, there is an utmost need to identify a new antimalarial compound.

[Methods] Dihydrolucilactaene (DHLC), a new lucilactaene derivative, was isolated from *Fusarium* sp. RK97-94. The antimalarial activity was tested against the wildtype (3D7) and chloroquine (CQ) resistant (K1) *P. falciparum* strains. To understand the mode of action of DHLC, the erythrocytic stage-specific activity profile was investigated based on a time-specific drug exposure/washout assay against a sorbitol-synchronized *Pf* 3D7 culture.

[Results] DHLC inhibited *Pf* 3D7 and K1 strains at similar IC_{50} values (1.5 nM). Microscopic observation further showed that DHLC and CQ caused distinctive parasite morphological changes. DHLC slowed down the stage-egression of the parasites, meanwhile CQ induced shrunken morphology, suggesting a different antimalarial mode of actions. DHLC was also highly potent throughout the erythrocytes cycle of *P. falciparum* but mainly targets trophozoites, followed by schizont and ring stage.

[Conclusion] DHLC is a potential antimalarial drug lead that may provide a new drug regimen to combat the widespread of drug-resistant strain.

Antimalarial, Dihydrolucilactaene, Mode of action

発表責任者：Hiroyuki Osada（osadahiro@riken.jp）

講演番号：3F02-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

酵母ユビキチンリガーゼ RSP5 変異株を高温ストレス下で生育を回復させる久慈産琥珀由来の生物活性物質の探索

Isolation of biologically active compounds that restore the groth of yeast ubiquitin ligase *rsp5*^{A401E} strain under high temperature stress from Kuji amber.

○丹場 晴也[1]、田中 来実[2]、高木 博史[3]、越野 広雪[4]、木村 賢一[1,2] ([1]岩手大・農、[2]岩手大院・総合科学、[3]奈良先端大・バイオ、[4]理研 CSRS)
○ Seiya TANBA[1], Kurumi TANAKA[2], Hiroshi TAKAGI[3], Hiroyuki KOSHINO[4], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Fac. of Agri. Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci.Iwate Univ., [3]Div. of Biol. Sci. NAIST, [4]RIKEN CSRS)

久慈産琥珀メタノール抽出物（MEKA）からは、これまでに酵母の Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母株(YNS17 株)に対する生育回復活性を指標に、80%以上の割合で新規物質が単離されている。また、MEKA は主たる活性物質 kujigamberol と同程度の強力な抗アレルギー活性を動物で示すことから、MEKA には未知の生物活性物質がまだ含まれることを示唆している。そこで、高温ストレス(37℃)下で酵母のユビキチンリガーゼ RSP5 変異酵母株(*rsp5*^{A401E} 株)を生育回復させる活性を指標とした新たなスクリーニング系を用い、さらなる活性物質の単離精製を目的とした。久慈産琥珀粉末 1007 g から得られた MEKA 51 g を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル＝20：1～1：3)で 17 画分に分画し、ヘキサン：酢酸エチル＝2:1 の画分を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー（100% MeOH）と HPLC 分取(ODS, 80% MeOH)により、合計 6 成分を単離精製した。これらの活性を *rsp5*^{A401E}株と YNS17 株とで比較した結果、活性物質には *rsp5*^{A401E} >YNS17(I)、*rsp5*^{A401E} ≒YNS17(II)並びに *rsp5*^{A401E} <YNS17(III)の 3 タイプ存在することが判明した。タイプ III の化合物 B-3 は、HREIMS により $C_{17}H_{26}O_2$(262)であり、NMR 等の各種機器分析により新規の 5-hydroxy-16,19,20-trinor-4,5-seco-5,7,9-labdatrien-4-one であると決定した。これは kujigamberol の A 環部分が開裂等の酸化的修飾を受けた構造と考えられ、YNS17 株に対して kujigamberol と同程度の生育回復活性を示した。

Potent biological activities of the methanol extract of Kuji amber (MEKA) suggested there are still undiscovered biologically active compounds in it. The aim of this study is to isolate biologically active compounds from MEKA based on growth-restoring activity of the ubiquitin ligase RSP5 mutant yeast strain *rsp5*^{A401E} exposed to high temperature stress (37℃). As a result, 6 compounds were isolated from MEKA using silica gel column chromatography (hexane: ethyl acetate = 20:1 to 1:3), LH-20 column chromatography (100% MeOH) and HPLC (ODS,80% MeOH). Comparing the growth-restoring activity of these compounds with YNS17 and *rsp5*^{A401E}, we found that they showed three types of biologically activity : *rsp5*^{A401E} >YNS17(I), *rsp5*^{A401E}≒YNS17(II), and *rsp5*^{A401E}<YNS17(III). Compound B-3 was a type III compound and was molecular formula $C_{17}H_{26}O_2$ by HREIMS. It was a new compound 5-hydroxy-16,19,20-trinor-4,5-seco-5,7,9-labdatrien-4-one. It may be an oxidative degradation product of kujigambeol, and its growth-restoring activity against YNS17 strain was comparable to that of kujigambeol.

Saccharomyces cerevisiae rsp5^{A401E}, Kuji amber, 5-Hidroxy-16,19,20-trinor-4,5-seco-5,7,9-labdatrien-4-one

発表責任者：木村 賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3F02-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

がん細胞の中心体クラスタリング阻害活性を有する kolavenic acid analog の各種抗がん剤との併用効果

Combination effect of kolavenic acid analog having centrosome clustering inhibitory activity with various anticancer agents on cancer cells

○古山 達貴[1]、髙屋敷 望[2]、小野寺 拓夢[2]、河村 幸男[2]、湯川 格史[3,4]、登田 隆[3,4]、木村 賢一[1,2]([1]岩手大農、[2]岩手大院・総合科学、[3]広島大院・統合生命科学、[4]広島大・健康長寿（HiHA))
○Tatsuki FURUYAMA[1], Nozomi TAKAYASHIKI[2], Takumu ONODERA[2], Yukio KAWAMURA[2], Masashi YUKAWA[3,4], Takashi TODA[3,4], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Fac. of Agri. Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ., [3]Grad. Sch. of Integrated Sch. for Life. Hirosima Univ., [4]HiHA, Hiroshima Univ.)

[目的] がん細胞はしばしば過剰な中心体を持つが、中心体クラスタリングを実行し細胞死を回避する。その必須因子である HSET（KIFC1）は、がん細胞の有望な標的分子と考えられている。本研究室では、HSET 過剰発現分裂酵母 TY-27 株の生育回復活性を指標に、セイタカアワダチソウから kolavenic acid analog（KAA）を単離し、乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞において IC_{50} = 81.9 μM を示し、中心体クラスタリングを 40 μM で 80%阻害することを明らかにした。本研究では、KAA の抗がん剤としての可能性を探るとともに標的分子を明らかにすることを目的とした。
[方法] MDA-MB-231 細胞を用い、KAA に対し合成 HSET 阻害剤（AZ82、SR31527、CW069）と各種抗がん剤を単独及び併用で処理し、CCK-8 を用いた細胞毒性試験を行った。得られた結果より、combination index を算出し併用効果（相乗・相加・拮抗）を決定した。
[結果] Vinblastine（VBL）と KAA の併用は相乗効果を示し、SR31527 と VBL と併用においても同様に相乗効果を示したことから、KAA は SR31527 と類似した作用を持つと考えられた。一方、paclitaxel（PTX）と KAA の併用では拮抗効果が認められたが、PTX と合成阻害剤の併用では同様の効果が観察されないことから、KAA は特有の作用を持つことが示唆された。PTX と KAA の併用における拮抗効果から、KAA は NIMA 関連キナーゼ 6（NEK6）の阻害活性を有すると考えられる。

Although cancer cells often contain supernumerary centrosome, they avoid cell death via centrosome clustering. HSET (KIFC1) which is an important protein to play centrosome clustering is considered a promising therapeutic target in cancer cells. Kolavenic acid analog (KAA) restored the growth of fission yeast cells exhibiting lethal HSET overexpression, and it showed cytotoxicity (IC_{50} = 81.9 μM) against MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells. Additionally, it inhibited centrosome clustering (80%) at 40 μM. The aim of this study is to explore the possibility as an anticancer drug and to identify target molecules.

MDA-MB-231 cells were treated with KAA, synthetic HSET inhibitors (AZ82, SR31527, CW069) and various anticancer drugs alone and/or in combination.

As the result, combined use of KAA with vinblastine (VBL) and SR31527 with VBL showed synergistic effect. Combined use of KAA with paclitaxel (PTX) showed antagonistic effect and it shows the molecules target of KAA may be NIMA-related kinase 6 (NEK6).

Kolavenic acid analog, HSET (KIFC1), NIMA-related kinase

発表責任者：木村 賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3F02-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

ビオチン標識プローブを用いたプルダウン実験による PF1171B の標的分子の探索

Screening of target molecules of PF1171B by pull-down experiments using its biotin-labeled probes

○織田 大河、稲垣 穣、増田 裕一 (三重大院生物資源学)
○Taiga Oda, Minoru Inagaki, Yuichi Masuda (Graduate School of Bioresources, Mie University)

PF1171B は、子嚢菌 *Hamigera* 属が生産する環状ペンタペプチドで、アントラニル酸 (Ant)、L-Pro、D-MePhe が連続した特異な構造を有している(図 1)。PF1171B はヒト肝癌由来細胞株 Hep G2 において、低密度リポタンパク質 (LDL) の主要な構成タンパク質であるアポリポタンパク質 B (apoB) の産生を抑制する。我々はこれまでに、PF1171B の全合成および構造活性相関研究を行っている。さらに、PF1171B の標的分子を同定するために、PF1171B のアミノ酸側鎖にアフィニティタグとしてビオチンを導入した分子プローブを合成した。本研究では、ビオチン標識プローブを用いて、細胞内の標的分子のプルダウン実験を行った。

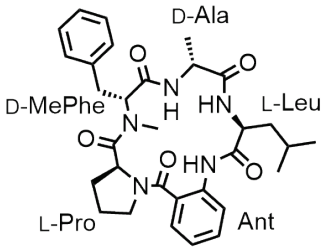


図 1. PF1171B の化学構造

ビオチン標識プローブをアビジンレジンに担持させた後、Hep G2 細胞の破砕液中でインキュベートした。非特異的タンパク質を除去するために 1% Triton/PBS 溶液で洗浄した後、PF1171B 溶液を用いて溶出させたタンパク質を SDS-PAGE で展開し、銀染色により検出した。その結果、約 65 kDa の結合タンパクを示すバンドが再現性よく観察され、これが標的分子であることが示唆された。

PF1171B, produced by *Hamigera* species, is a cyclic pentapeptide containing successive anthranic acid (Ant), L-Pro, and D-MePhe (Fig. 1). PF1171B suppresses the production of apolipoprotein B (apoB), the carrier of low-density lipoprotein (LDL), in Hep G2 cells. We have conducted total synthesis and structure-activity relationship study of PF1171B. To identify target molecules of PF1171B, we synthesized its affinity probes bearing biotin at the side chains of the amino acid residues. In this study, we conducted pull-down experiments using the biotin-labeled probes.

Avidin resin immobilized biotin-labeled probes was added to Hep G2 cell lysate. The resultant resin was washed with 1% Triton/PBS buffer to remove non-specifically bound proteins, then eluted with PF1171B solution to provide binding proteins, which were analyzed by SDS-PAGE and visualized by silver staining. We reproducibly observed a band of binding protein at ～65 kDa, indicating a possible target molecule of PF1171B.

cyclic peptide, apolipoprotein B, pull-down experiments

発表責任者：増田 裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3F02-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

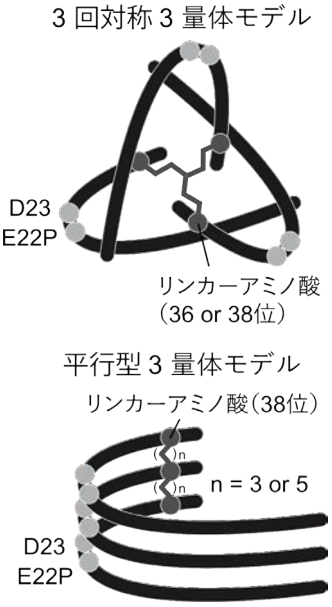
3 回対称ならびに平行型 Aβ40 の 3 量体モデルの合成と機能解析

Synthesis and characterization of trimer models of Aß40 with C_3-symmetric or parallel structure

○内野 歩美[1]、入江 由美[1]、塚野 千尋[1]、川瀬 泰治[2]、廣瀬 賢治[2]、入江 一浩[1]([1]京大院農、[2]日本ウォーターズ)
○Ayumi UCHINO[1], Yumi IRIE[1], Chihiro TSUKANO[1], Taiji KAWASW[2], Kenji HIROSE[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nihon Waters K. K.)

アルツハイマー病の発症には、42 あるいは 40 残基からなるアミロイド β (Aβ) タンパク質の凝集が関与し、その毒性本体は凝集中間体であるオリゴマーと考えられている。所属研究室では Aβ の毒性オリゴマー構造を解明するため、22、23 位での毒性ターン構造をプロリン置換で模倣し、多価性アミノ酸リンカーで C 末端付近を架橋することによって、化学的に単一な 2 および 3 量体モデルを合成してきた[1)]。しかしながら分子中央に芳香環を含む 1,3,5-phenyltris-L-alanine で架橋した E22P-Aβ40 の 3 量体モデルは、E22P-Aβ40 単量体やその 2 量体モデルと比較して弱い神経細胞毒性を示した[1b)]。

我々は Aβ の毒性オリゴマー構造をより正確に反映した 3 量体モデルの合成を目指して、柔軟性を向上させた新規 3 量体リンカーとして *tert*-butyltris-L-alanine (*t*ButA) を、平行 β-シート構造を模倣するためのリンカーとして α,α-di-L-homonorleucyl-L-glycine (di-hnL-Gly) [2)] および α,α-di-L-norvalyl-L-glycine (di-nV-Gly) を設計・合成した。続いて Fmoc 固相合成法により、*t*ButA で 36 位または 38 位を架橋したプロペラ型 3 量体モデル、および di-hnL-Gly または di-nV-Gly で 38 位を架橋した平行型 3 量体モデルを合成した。本発表では、これらの凝集能ならびに神経細胞毒性についても述べる。



Oligomers of amyloid β (Aβ) peptides are suggested to play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Analysis of chemically pure dimers and trimers tethered with a stable linker could identify the toxic structure of Aβ oligomers.[1)] However, a tris-amino acid containing an aromatic ring might not be appropriate for mimicking the toxic trimer structure because of solidity of the molecule.[1b)]

We have developed more flexible new linkers to synthesize trimer models which reflect the toxic conformation of Aβ oligomers more precisely.[2)] C_3-Symmetric and parallel E22P-Aβ40 trimers using these linkers were synthesized by the Fmoc solid-phase strategy. Their aggregative ability and neurotoxicity will also be reported.

[1] a) Irie, Y. *et al., ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8,* 807-816; b) Irie, Y. *et al., Chem. Commun.* **2019**, *55,* 182-185.
[2] Uchino, A. *et al., Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 1370-1377.

Alzheimer's disease, amyloid ß peptide, toxic oligomer

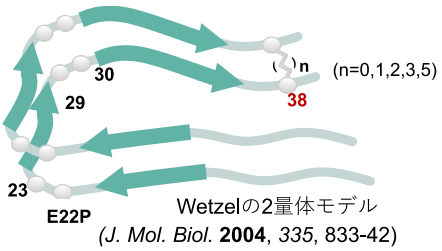
発表責任者：入江　一浩（irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3F02-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

アミロイドβ-40 の毒性 2 量体モデルにおけるリンカー長の凝集能と細胞毒性に及ぼす影響

Effects of the length of the linker on the aggregative ability and cytotoxicity in the toxic dimer model of Aβ40

○筑後 文馨[1]、入江 由美[1]、内野 歩美[1]、塚野 千尋[1]、川瀬 泰司[2]、廣瀬 賢治[2]、入江 一浩[1]([1]京大農、[2]日本ウォーターズ)
○AYAKA CHIKUGO[1], YUMI IRIE[1], AYUMI UCHINO[1], CHIHIRO TSUKANO[1], TAIJI KAWASE[2], KENJI HIROSE[2], KAZUHIRO IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nihon Waters)



アルツハイマー病の発症には、アミロイド β (Aβ) タンパク質の凝集が関係している。神経細胞死を引き起こす毒性本体は、高度に凝集したアミロイド線維ではなく低分子量のオリゴマーであると考えられている。この毒性オリゴマーの構造を解明するため、最小単位である 2 量体について様々なモデルが合成されてきた。最近当研究室において、22、23 位での毒性ターン構造をプロリン置換で模倣した E22P-Aβ40 を、C 末端の 38 位でジアミノピメリン酸 (n = 1) によって架橋した 2 量体が、顕著な神経細胞毒性を示すことが判明した[1,2]。今回、ペプチド鎖間の最適な距離を特定するため、新たに 4 種類のリンカー (n = 0, 2, 3, 5) を合成した。出発物質としてジアルデヒドまたは環状不飽和炭化水素を用いて、後者をオゾン分解でジアルデヒドとした後、HWE 反応および不斉水素化反応を鍵として各種 di-Fmoc-アミノ酸リンカーを合成した。続いて Fmoc 固相合成法を用いて、38 位に各種リンカーを組み込むことにより 2 量体モデルを合成した。本発表では、各種リンカーおよび 2 量体モデルの合成と、これらの凝集能ならびに神経細胞毒性について報告する。

Amyloid β proteins (Aβ) are involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Recent studies suggest that Aβ oligomers are more neurotoxic than Aβ fibrils. To elucidate the structure of Aβ oligomers, various dimer models have been synthesized so far. We focused on the C-terminal region which could form a hydrophobic core, and synthesized a toxic conformer-restricted dimer model (G38DAP,E22P-Aβ40 dimer) with a L,L-2,6-diaminopimeric acid linker (n = 1) at position 38, which exhibited significant neurotoxicity.[1,2] In this study, we synthesized additional four linkers (n = 0, 2, 3, 5) to identify the most suitable distance between two Aβ40 chains as a toxic dimer model. Each di-Fmoc-linker was synthesized from dialdehyde or cycloalkene followed by ozonolysis, using HWE reaction and asymmetric hydrogenation as key steps. Then, the dimer models with the four linkers at position 38 were synthesized using the solid-phase Fmoc strategy, respectively. Their aggregative ability and neurotoxicity will be reported.

1) Irie, Y. *et al., ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 807-816. 2) Irie, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2020**, *84,* 1-16.

Alzheimer's disease, amyloidß, toxic oligomer

講演番号：3F02-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

主成分分析を活用した LC-MS による アミロイドβ凝集阻害剤の効率的探索法

An efficient search method for Amyloid-ß aggregation inhibitors by LC-MS with principal component analysis

○花木 瑞穂[1]、村上 一馬[1]、郡司 裕樹[2]、入江 一浩[1]（[1]京大院農、[2]アルプス薬品工業）
○Mizuho HANAKI[1], Kazuma MURAKAMI[1], Hiroki GUNJI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Alps Pharmaceutical Ind. Co.,Ltd.)

アルツハイマー病の原因物質の一つと考えられているアミロイド β タンパク質（Aβ42）は，凝集することにより細胞毒性を示す．そのため，Aβ42 の凝集抑制は有望な予防戦略の一つとなり得る．これまでに植物や漢方薬中の多くの成分が，Aβ42 の凝集抑制活性を示すことが報告されている (*e.g.* Ref. 1). 一方で抽出物中の活性成分を同定するためには，精製と活性確認を繰り返す必要があり, 長期間かかることも珍しくない. そこで本研究では, LC-MS と多変量解析を利用した効率的な活性成分同定法を検討した. チオフラビン T (Th-T) 試験において，ハス由来の部位の異なる 5 つの生薬［荷梗（葉柄），荷葉（葉），藕節（根節），蓮鬚（雄蕊），蓮房（果托）］が，それぞれ異なる Aβ42 凝集阻害活性を示すことを見いだした．これらの生薬抽出物の LC-MS 分析データを主成分分析により解析することで 12 種の活性候補化合物を推定した．これらの化合物を Th-T 試験に供した結果，6 種のフラボノイドおよびケルセチン配糖体 2 種が凝集抑制活性を示した．これらの活性成分のうち 2 種（robinetin, myricitrin）は, 本研究により初めて Aβ42 凝集抑制活性が報告された. 以上より，本手法によって効率的に Aβ42 の凝集抑制化合物を同定できる可能性が示された.

Aggregation of amyloid β42 (Aβ42) is one of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Inhibition of Aβ42 aggregation is thus a promising approach for AD therapy. There are many reports that several compounds in plants or *Kampo* inhibit the aggregation of Aβ42 (*e.g.* Ref. 1). However, it is occasionally time-consuming and laborious to identify active compounds from the extracts. Herein we show an efficient searching methodology for compounds that inhibit Aβ42 aggregation from crude drug extracts. The effect of crude drug extracts on Aβ42 aggregation was examined using thioflavin-T assay, and the extracts from lotus showed different inhibitory activities depending on the part of the plant (*e.g.* petiole, leaf, root node, stamen, and receptacle). These extracts were subjected to LC-MS measurement, followed by principal component analysis, leading to 12 candidates as active compounds. Among them, six flavonoids and two quercetin glycosides suppressed Aβ42 aggregation. Notably, 2 compounds (robinetin and myricitrin) were found to inhibit Aβ42 aggregation for the first time, offering this method as an efficient way to identify the compounds with anti-aggregative ability against Aβ42.

Ref. 1) Murakami, K. and Irie, K. ***Molecules***, *24*, 2125 (2019)

Amyloid ß, LC-MS, Principal component analysis

発表責任者：入江一浩（irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.ac.jp）

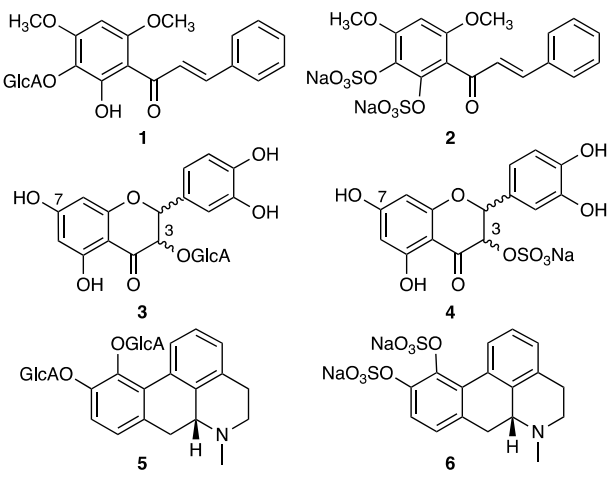
講演番号：3F02-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

機能性食品成分に含まれるフラボノイド抱合体の合成とアミロイドβ42 に対する凝集阻害活性
Synthesis and inhibitory activity against amyloid ß42 aggregation of conjugated metabolites in functional food components

○谷輪 厚太、村上 一馬、入江 一浩（京大院農）
○Kota Taniwa, Kazuma Murakami, Kazuhiro Irie (Grad. Agri. Kyoto Univ.)

アルツハイマー病の原因物質の一つと考えられているアミロイドβタンパク質 (Aβ42) は，凝集することにより細胞毒性を示す．そのため，機能性食品成分に着目した Aβ42 凝集阻害剤の探索は有望な予防戦略である (*e.g.* Ref. 1). 昨年度までに，青じそ由来の 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone（DDC）の Aβ42 凝集阻害活性[2] および準安定な活性本体を明らかにした.[3] さらに DDC をマウスに摂取させたところ，脳内および血中でグルクロン酸抱合体 (**1**) や硫酸抱合体 (**2**) に代謝されていることを報告した.[2] 本研究では，**1** と **2** に加えて，同様に脳内で検出された凝集阻害剤の taxifolin や apomorphine のそれぞれの抱合体 (**3** ~ **6**) も合成し，凝集阻害活性を調べた．グルクロン酸化には *O*-glycosyl trichloroacetimidate をルイス酸存在下で基質として用い，硫酸化には三酸化硫黄–トリエチルアミン錯体を用いた．凝集阻害活性をチオフラビン T 蛍光法で調べたところ，**1** および **2** は DDC と同様に Aβ42 の凝集を顕著に阻害したことから，脳内でもその活性を維持している可能性が示唆された．**3** ~ **6** の活性試験の結果についてもあわせて報告する．

Aggregation of amyloid β42 (Aβ42) is one of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Inhibition of Aβ42 aggregation by considering eating habit is thus a promising approach for AD prevention. There are many reports that several compounds (DDC, taxifolin, apomorphine, *etc*.) in functional food components or plants inhibited Aβ42 aggregation (*e.g.* Ref. 1). Since the glucuronide form (**1**) and sulfated form (**2**) of DDC isolated from green peperilla were previously detected in mice brain and plasma,[2] here we synthesized the conjugated forms (**3** ~ **6**) of taxifolin and apomorphine as well as **1** and **2**, and subjected to the aggregation test. In the thioflavin-T assay, **1** and **2** prevented the aggregation of Aβ42, implying a possibility that the anti-aggregation activity of DDC might not disappear even upon conjugation. The results of aggregation test of **3** ~ **6** would also be presented.



References

1) Murakami, K. and Irie, K. ***Molecules***, *24*, 2125 (2019)
2) 坂口ら，2018 年度日本農芸化学会本大会（名古屋）2A15a15
3) 谷輪ら，2021 年度日本農芸化学会本大会（仙台）3G05-08

amyloid ß, metabolite, flavonoid

発表責任者：村上一馬（murakami.kazuma.4v@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3F02-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム F

Studies on chemical regulation of fungal denitrification toward global environmental conservation

○Qing CAI[1], Yoshida MINORU[1,2], Akihisa MATSUYAMA[1,2], Shinichi NISHIMURA[1], Masaki MATSUOKA[1,2], Seiji MATSUOKA[2], Kousiki MINO[2], Toshie KAIZUKA[2], Kam Y. J. ZHANG[3], Ashutosh KUMAR[3] ([1]Tokyo Univ, [2]RIKEN CSRS, [3]RIKEN BDR)

Nowadays, a large amount of nitrogen fertilizers is applied in farm fields to make plants grow better, but these fertilizers are also good substrates for denitrification, which lead to the increased emission of N_2O, a potent greenhouse gas. The full denitrification process is comprised of four reducing steps ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$), each of which is catalyzed by a specific enzyme. In the past, denitrification was thought to be only in bacteria, but recently it has been also found in several eukaryotes and archaea. Unlike denitrifying bacteria, fungi lack nitrous oxide reductases, resulting in the generation of N_2O as a final product of denitrification. Therefore, some ecologists assumed that fungal denitrification might be a dominant contributor to N_2O production in terrestrial ecosystems. Indeed, some recent reports showed that in diverse soils such as agricultural soil and grassland soil, N_2O emissions from fungi were greater than those from bacteria. Thus, if we can inhibit fungal denitrification by development of fungal denitrification inhibitors, it will pave the way to reduce N_2O emissions and N loss in the form of N_2O.

In this study, we aimed at chemically controlling fungal nitrite reductase NirK, which can reduce NO_2^- to NO. We performed high-throughput screening of Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) libraries for compounds that inhibit the enzymatic activity of NirK. Out of 16,299 compounds, we identified 412 hits showing over 80% inhibitory activity *in vitro*. The hit rate was 2.5%, which was higher than those in other screening programs. To filter out false positives, we performed a counter screen, and selected 126 compounds with over 80% inhibition in NirK assay, of which ratio of inhibition (counter/ NirK) was less than 0.5. After measuring the IC_{50} values of these compounds, 79 compounds with IC_{50} for NirK < 50 μM and IC_{50} for counter assay > 50 μM or ratio of IC_{50} (counter/ NirK)≧2.5 were taken as hit compounds. These 79 compounds were further tested for *in vivo* denitrification activity on *Fusarium oxysporum*, and 15 compounds exhibited over 20% inhibition at 50 μM. Out of these 15 compounds, 2 compounds could inhibit denitrification of *F. oxysporum* in a dose-dependent manner without showing apparent growth inhibition. We also found some compounds structurally similar to the 2 hit compounds, which also showed inhibitory effects on denitrification, suggesting that these compounds can be good candidates for denitrification inhibitors. We also performed docking simulations on these two inhibitors with both fungal and bacterial NirK, which successfully predicted the putative binding site and binding mode of the compounds.

denitrification, screening, NirK

講演番号：3F04-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

コレラ菌 Na^+-輸送型 NADH-ユビキノン酸化還元酵素の位置特異的化学修飾

Site-specific chemical modification of Na^+-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○田中 比奈子[1]、石川 萌[1]、桝谷 貴洋[1]、青木 航[1]、村井 正俊[1]、Blanca Barquera[2]、三芳 秀人[1]
([1]京大農、[2]レンセラー工科大・生物工)
○ Hinako TANAKA[1], Moe Ishikawa[1], Takahiro Masuya[1], Wataru Aoki[1], Masatoshi Murai[1], Barquera Blanca[2], Hideto Miyoshi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Rensselaer Polytechnic Inst.)

【背景と目的】Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）は、基質の酸化還元と共役した Na^+の能動輸送を行う膜タンパク質複合体であり、コレラ菌や緑膿菌などの病原性細菌に必須のエネルギー代謝酵素である。コレラ菌 Na^+-NQR の X 線結晶構造を参照すると、酵素のターンオーバーに伴い大きな構造変化が生じていることが予想されるが、未だ実証されていない。本研究では Na^+-NQR の構造変化を直接捉えることを将来的な目標に据え、阻害剤結合部位近傍のアミノ酸残基を機能性分子によって位置特異的に化学修飾する方法論の確立を目指した。

【方法と結果】化学修飾法には、生理活性リガンドの持つ高い結合親和性を利用して、標的タンパク質にタグ分子を求核置換によって固定させる ligand directed chemistry（LD 化学）を採用し、それを実行するためのリガンド分子（KN3 および KB1、図 1）をデザイン合成した。リガンドには Na^+-NQR の特異的阻害剤であるコロルミシンを用い、導入するタグ分子にはクリックケミストリーの足場となる末端アルキンを用いた。これらリガンド分子を用いてコレラ菌 Na^+-NQR を化学修飾したところ、本酵素を構成する 6 つのサブユニットのうち、阻害剤の結合に関与する NqrB サブユニットの N 末端領域が特異的に修飾されることが分かった。

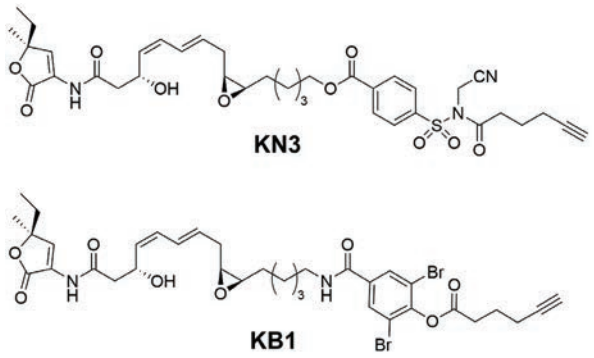


図 1. コロルミシンを鋳型とするリガンドの構造

The Na^+-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase (Na^+-NQR) is a crucial respiratory enzyme in many pathogenic bacteria. The X-ray crystallographic model of *Vibrio cholerae* Na^+-NQR proposed a large conformational rearrangement of the enzyme during turnover; however, there is no direct evidence that verifies this idea. If we can develop a method that enables pinpoint labeling of the Na^+-NQR by functional chemicals, it could lead to new ways for the investigation. In this study, we developed a means of specific chemical labeling of the enzyme via LD chemistry using synthetic ligands KN3 and KB1. The attached alkyne can serve as a “anchor” for connecting secondary functional chemicals. After incubation of isolate *V. cholerae* Na^+-NQR with these probes, alkyne was predominantly incorporated into the NqrB subunit, which constructs the inhibitor binding pocket.

Na^+-NQR, korormicin, LDBB chemistry

講演番号：3F04-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

抗がん剤タモキシフェンのラット肝臓ミトコンドリアにおける作用機構研究

Comprehensive understanding of multiple actions of anticancer drug tamoxifen in isolated rat liver mitochondria

○運天 優歩、村井 正俊、越高 知生、北尾 虎太郎、白井 理、桝谷 貴洋、三芳 秀人（京大院農・応用生命）
○Yufu UNTEN, Masatoshi MURAI, Tomoki KOSHITAKA, Kotaro KITAO, osamu SHIRAI, Takahiro MASUYA, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】タモキシフェン（TAM）はエストロゲン受容体（ER）のアンタゴニストとして見出され、ER 陽性乳癌に対する治療薬として長年用いられてきた。しかし最近になって、ER の有無に関わらず、その他のがん細胞に対しても細胞死を誘導し抗がん活性を示すことが報告されている。細胞死誘導の要因としてミトコンドリアにおける標的分子の存在が示唆されているが、そのメカニズムについては統一的な見解が得られていない。特に、細胞死誘導の初動現象とされるミトコンドリア膜透過性亢進を抑制することが報告されており、がん細胞において細胞死を誘導するという見解と矛盾が生じる。そこで本研究では、ラット肝臓より単離したミトコンドリアに対する TAM の効果を再検証した。

【結果と考察】単離ミトコンドリアに過剰量の Ca^{2+} が取り込まれると、ミトコンドリアが膨潤し、シトクロム c などミトコンドリア内容物の顕著な漏出が誘導される。“膜透過性亢進”と呼ばれるこの現象は、細胞死の初動現象として知られており、電位依存性アニオンチャンネル（VDAC）やリン酸輸送体（PiC）などのミトコンドリア膜輸送体が深く関与することが示唆されている。Ca^{2+} が誘導する膜透過性亢進に対する TAM の影響を調べたところ、ミトコンドリアの膨潤やシトクロム c の漏出を顕著に抑制することが明らかになった。マトリックス内に取り込まれた Ca^{2+} はリン酸カルシウム（$Ca_3(PO_4)_2$）の形態で保持されることが知られており、リン酸によって保持されないフリーCa^{2+} が増大すると膜透過性亢進が生じると考えられている。TAM はリン酸の輸送を促進し、マトリックス内のフリーCa^{2+} を減少させることで膜透過性亢進を抑制するという作業仮説を立て、TAM がマトリックス内へのリン酸取り込みに与える影響を評価した。その結果、TAM はリン酸取り込みをわずかに促進することが判明し、TAM はリン酸輸送を促進することで膜透過性亢進を抑制すると結論した。

Tamoxifen has been widely used in the treatment of estrogen receptor (ER)-positive breast cancer, whereas it also exhibits ER-independent anticancer effects in various cancer cell types. As one of the convincing mechanisms underlying the ER-independent effects, induction of apoptosis through mitochondrial dysfunction has been advocated. However, the mechanism of action of tamoxifen even at the isolated mitochondrial level is not fully understood and remains controversial. Here, we attempted to comprehensively understand tamoxifen’s multiple actions in isolated rat liver mitochondria through not only revisiting the actions hitherto reported but also conducting originally designed experiments. Tamoxifen was found to suppress opening of the mitochondrial permeability transition pore induced by Ca^{2+} overload through enhancing phosphate uptake into the matrix.

tamoxifen, mitochondria, permeability transition

講演番号：3F04-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

合成ユビキノンプローブを用いた出芽酵母のユビキノン取り込みに関与するタンパク質の探索

Screening of the proteins involved in uptake of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic ubiquinone probe

○黒田 聖奈[1]、村井 正俊[1]、桝谷 貴洋[1]、奥 公秀[2]、三芳 秀人[1] ([1]京大農、[2]京都先端大)
○Seina KURODA[1], Masatoshi MURAI[1], Takahiro MASUYA[1], Masahide OKU[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]KUAS)

【背景と目的】“コエンザイム Q”の名称で広く知られているユビキノン（UQ）は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（ATP 合成）に必須の脂溶性分子であり、ミトコンドリア内膜でその生合成は完結する。一方で、サプリメントのような形で供給された外来 UQ はミトコンドリアに特異的に蓄積することがわかっているが、どのような仕組みでミトコンドリアに輸送されるのか全くわかっていない。こうした背景から、UQ の取り込みや細胞内動態に関与するタンパク質を明らかにすることは、細胞内のエネルギー代謝やレドックスの制御に関わる新規な生理活性分子の開発研究に資するところが大きい。本研究では、独自に設計・合成したユビキノンプローブを活用して、出芽酵母 UQ 生合成欠損株（*ΔCOQ2*）の外来 UQ の取り込みに関与するタンパク質を同定することを目的とした。

【方法と結果】長鎖 UQ のプレニル側鎖末端部に光反応基（ジアジリン）およびクリックケミストリーの足場となる末端アセチレンを導入した pUQ_5（**図 1**）を合成した。出芽酵母が持つ天然 UQ_6 と同程度の疎水性を担保することを意図しての分子設計である。グリセロール（呼吸系）培地に低濃度（5 μM）の pUQ_5 を添加し、酵母 *ΔCOQ2* 株を培養したところ、天然 UQ_6 と同等のレベルで生育が相補された。この結果は、pUQ_5 が UQ_6 と同様にミトコンドリアへ能動輸送され、電子伝達担体として機能していることを意味する。pUQ_5 存在下で培養した *ΔCOQ2* 酵母からミトコンドリアを単離し、光親和性標識を行ったところ、特異的に標識を受ける複数のタンパク質を検出した。

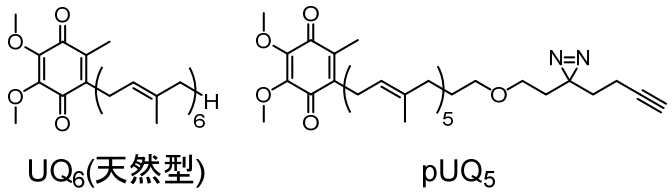


図 1. UQ_6 と pUQ_5 の構造

Ubiquinone (UQ), also known as “coenzyme Q”, is an essential player in the mitochondrial respiratory chain in eukaryotic cells. Although synthesis of natural UQ is completed in mitochondria, exogenous UQs are known to be taken up through unknown mechanism. To get insights into the mechanism of UQ uptake, we synthesized a UQ probe (pUQ_5), which has a photoreactive diazirine group attached to a five-unit isoprenyl chain. pUQ_5 successfully restored the growth of UQ-deficient *Saccharomyces cerevisiae* (*ΔCOQ2*), indicating that pUQ_5 was taken up similarly to native UQ (UQ_6). Using the *ΔCOQ2* yeast as a model, we comprehensively screened proteins that are involved in the uptake of exogenous UQ.

ubiquinone, photoaffinity labeling, click chemistry

発表責任者：黒田聖奈（kuroda.seina.33u@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3F04-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

Allantopyrone A はヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞においてプロテアソーム活性を阻害することによって HIF-1αタンパク質を安定化する

Allantopyrone A stabilizes HIF-1α protein by preventing proteasome activity in human fibrosarcoma HT-1080 cells

○奥田 千遥[1]、上田 悠斗[1]、武田 賢治[1]、塩野 義人[2]、木村 賢一[3]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大学・応生、[2]山形大学・農、[3]岩手大院・総合科学)

○Chiharu OKUDA[1], Yuto UEDA[1], Kenji TAKEDA[1], Yoshihito SHIONO[2], Ken-ichi KIMURA[3], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Faculty of Agr., Yamagata Univ., [3]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ.)

【目的】低酸素誘導因子 HIF (hypoxia-inducible factor)は低酸素応答を担う重要な転写因子である。HIF サブユニットの一つである HIF-1α は、通常酸素状態では翻訳後に直ちに分解されるが、低酸素状態では安定化される。Allantopyrone A は植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 より単離された α-pyrone 系化合物であり、抗腫瘍活性や抗炎症活性を有する。さらに、ヒト繊維肉腫由来 HT-1080 細胞において allantopyrone A が HIF-1α タンパク質の発現を増加させることを見出した。本研究では、HIF-1α タンパク質の発現調節における allantopyrone A の作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】HT-1080 細胞を通常酸素状態下で allantopyrone A で処理した。細胞ライゼートを調製して、ウェスタンブロッティングを行った。トータル RNA を調製し cDNA へ変換した後、リアルタイム PCR を行った。Proteasome-Glo™ Cell-based assays (Promega)を用いて、プロテアソーム活性を測定した。
【結果】Allantopyrone A は、プロリン水酸化の修飾を受けた HIF-1α タンパク質を増加させた。さらに、allantopyrone A が細胞内タンパク質のグローバルなユビキチン化を亢進させることを見出した。一方、allantopyrone A は HIF-1α の転写に影響を及ぼさなかった。HT-1080 細胞を allantopyrone A で 6 時間処理すると、濃度依存的にキモトリプシン様及びトリプシン様のプロテアソーム活性が低下したが、プロテアソーム阻害剤 MG-132 とは異なり、allantopyrone A はプロテアソーム活性を直接的に阻害しなかった。

Hypoxia-inducible factor (HIF) is a transcription factor that plays an important role in hypoxic response. HIF-1α, one of HIF subunits, undergoes degradation immediately after translation under normoxia conditions, while it is stabilized under hypoxia conditions. Allantopyrone A, isolated from the plant endophytic fungus *Allantophomopsis lycopodina* KS-97, is an α-pyrone compound and has been shown to exert anti-tumor and anti-inflammatory activities. We found that allantopyrone A upregulated the expression of HF-1α protein in human fibrosarcoma HT-1080 cells. Allantopyrone A augmented the levels of prolyl hydroxylated HIF-1α protein, and also increased the global ubiquitination of intracellular proteins. By contrast, HIF-1α transcription was unaffected by allantopyorone A. In HT-1080 cells treated with allantopyrone A for 6 h, chymotrypsin-like and trypsin-like proteasome activities were greatly reduced, while they were not directly prevented by allantopyrone A unlike the proteasome inhibitor MG-132.

Allantopyrone A, HIF-1α, proteasome

発表責任者：片岡孝夫（takao.kataoka@kit.ac.jp）

講演番号：3F04-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

Cucurbitacin B は TNF-α で誘導される NF-κB シグナル伝達経路を阻害する
Cucurbitacin B inhibits TNF-α-induced NF-κB signaling pathway

○草川 鋭一[1]、中野 香織[1]、三宅 靖延[2]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大学・応生、[2]佐賀大学・医)
○Eiichi KUSAGAWA[1], Kaori NAKANO[1], Yasunobu MIYAKE[2], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Faculty of Med., Saga Univ.)

【目的】TNF-α などの炎症性サイトカインによって誘導される NF-κB シグナル伝達経路は免疫応答の制御だけでなく、がんの発生や進行にも関与している。したがって、NF-κB シグナル伝達経路に作用する化合物は炎症性疾患、及びがんに対する治療効果が期待される。Cucurbitacin B は様々な植物に見出され、抗炎症活性や抗菌活性などを有することが知られている。我々は、cucurbitacin B が炎症性サイトカインによって誘導される細胞接着因子 ICAM-1 の発現を阻害することを見出した。本研究では、ICAM-1 発現や NF-κB シグナル伝達経路に対する cucurbitacin B の作用機序の解明を目的とした。
【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を cucurbitacin B で 1 時間処理した後、TNF-α で刺激した。Cell ELISA 法を用いて細胞表面 ICAM-1 の発現量を測定した。ルシフェラーゼレポーターアッセイで ICAM-1 プロモーターの転写活性を測定した。リアルタイム PCR で ICAM-1 mRNA 量を測定した。細胞ライゼートを調製して、ウェスタンブロッティングを行った。
【結果】Cucurbitacin B は、TNF-α で誘導される細胞表面 ICAM-1 の発現、ICAM-1 mRNA の発現、ICAM-1 プロモーター応答性ルシフェラーゼレポーターの発現を阻害した。さらに、cucurbitacin B は TNF-α で誘導される IκBα のリン酸化と分解を阻害した。一方、グルタチオンと N-アセチルシステインは cucurbitacin B による ICAM-1 発現の阻害効果を抑制したことから、分子内の α,β-不飽和カルボニル基が阻害活性に必要であることが示唆された。以上の結果より、cucurbitacin B は TNF-α による NF-κB シグナル伝達経路の活性化を阻害していることが明らかになった。

The NF-κB signaling pathway induced by inflammatory cytokines, such as TNF-α, is involved not only in the regulation of immune responses but also in the development and progression of cancer. Cucurbitacin B is found in various plants and is known to possess anti-inflammatory and antibacterial activities. The purpose of this study is to elucidate the mechanism of action of cucurbitacin B on the TNF-α-induced NF-κB signaling pathway. Cucurbitacin B inhibited TNF-α-induced cell surface ICAM-1 expression, ICAM-1 mRNA expression, and ICAM-1 promoter-driven luciferase reporter expression in human lung adenocarcinoma A549 cells. Moreover, cucurbitacin B inhibited the TNF-α-induced IκBα phosphorylation and its subsequent degradation. By contrast, glutathione and N-acetylcysteine suppressed the inhibitory effect of cucurbitacin B on the TNF-α-induced ICAM-1 expression, suggesting that α,β-unsaturated carbonyl moiety is critical for its inhibitory activity. Our present results indicate that cucurbitacin B inhibits the TNF-α-induced activation of the NF-κB signaling pathway.

Cucurbitacin B, TNF-α, NF-κB

発表責任者：片岡孝夫（takao.kataoka@kit.ac.jp）

講演番号：3F04-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

12-ヒドロキシジャスモン酸グルコシドにより蓄積が誘導される活性化酸素種がアメリカネムノキの閉葉を誘導する

12-Hydroxyjasmonic acid glucoside-induced reactive oxygen species accumulation causes the leaf-folding of Samanea saman

○星野 隼治[1]、Yang Gangqiang[2]、村岡 勇樹[2]、石丸 泰寛[3]、上田 実[1,2]（[1]東北大院生命科学、[2]東北大院理、[3]東北大院工）
○Shunji HOSHINO[1], Gangqiang Yang[2], Yuki Muraoka[2], Yasuhiro Ishimaru[3], Minoru Ueda[1,2]
([1]Grad. Sch. of Life Sciences, Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Science, Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Engineering, Tohoku Univ.)

12-ヒドロキシジャスモン酸グルコシド（JAG）は、アメリカネムノキの閉葉運動を誘導する（*Plant Physiol.,* **2011**, *155*, 1226）。この際、JAG は葉の付け根にある運動細胞に作用し（*Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 7289）、K^+チャネル SPORK2 を介して細胞収縮を引き起こす（*Curr Biol.,* **2018**, *28*, 2230）。しかし、JAG が SPORK2 を活性化するメカニズムは未解明であった。

運動細胞プロトプラストを JAG で処理したところ、細胞体積の減少と共に ROS 蓄積が観察された。この系に NADPH オキシダーゼ阻害剤を添加すると、ROS の蓄積と細胞収縮が共に抑制された。また、*SPORK2* の発現量が低下した運動細胞プロトプラストでは、JAG は ROS 蓄積を誘導するが、細胞収縮は引き起こさなかった。さらに、アフリカツメガエル卵母細胞に異種発現した SPORK2 に H_2O_2 を処理すると、SPORK2 の K^+ 輸送活性が 3 倍程度増加した。これらの結果より、JAG は ROS の蓄積を介して SPORK2 を活性化し、運動細胞を収縮させることが示された。

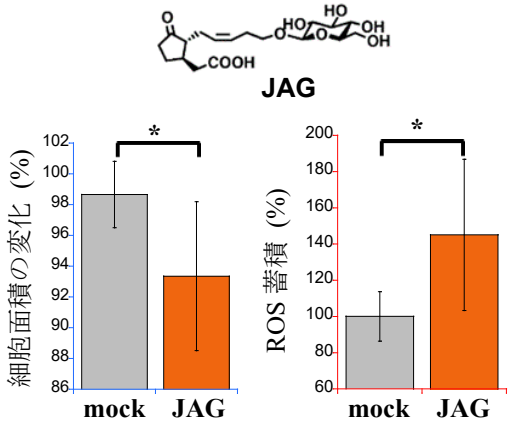


図. JAG は細胞収縮と ROS 蓄積を誘導する（n = 8, mean±SD. t-test; p<0.05）

12-*O*-β-D-glucopyranosyl jasmonic acid (JAG) induces the leaf closure of *Samanea saman* at night. JAG triggers motor cells shrinkage through activation of K^+ channel SPORK2, and results in leaf closing. However, it was not clear about the detailed mechanism of cell shrinkage induced by JAG. Here, we report that ROS is involved in the JAG-mediated cell shrinkage.

Firstly, the shrinkage of the protoplasts from *Samanea* motor cells was induced under JAG treatment. Additionally, ROS accumulation in the cytosol was observed. ROS accumulation and JAG-induced cell shrinkage were both inhibited when an NADPH oxidase was added. Next, we examined the effect of JAG on motor cells when the expression of *SPORK2* was lowest. ROS accumulation was observed in the protoplasts from the motor cells under JAG treatment, whereas cell shrinkage was not observed. The K^+ transport activity of SPORK2 expressed in *Xenopus* oocyte was increased about threefold under H_2O_2 treatment. These results indicated that JAG induces ROS accumulation, subsequently activates SPORK2 leading to cell shrinkage in the motor cells.

nyctinasty, jasmonate, reactive oxygen species

発表責任者：星野 隼治（shunji.hoshino.q5@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3F04-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

コロナチン立体異性体フォーカスドライブラリーを用いたジャスモン酸受容体サブタイプ選択的リガンドの開発

Development of jasmonate-receptor subtype selective ligands via focused library screening composed of stereoisomers of coronatine

○林 謙吾[1]、加藤 信樹[1]、野本 春菜[1]、中山 美涼[1]、Khurram Bashir[2,3]、Andrea Chini[4]、高橋 聡史[2]、齋藤 大明[5]、渡部 楽[6]、高岡 洋輔[1]、田中 真帆[2]、永野 惇[7,8]、関 原明[2]、Roberto Solano[4]、上田 実[1,6] ([1]東北大理、[2]理研 CSRS、[3]ラホール経営科学大学、[4]CNB-CSIC、[5]北陸大薬、[6]東北大生命、[7]龍谷大農、[8]慶應大先端生命)

○ Kengo HAYASHI[1], Nobuki KATO[1], Haruna NOMOTO[1], Misuzu NAKAYAMA[1], Bashir KHURRAM[2,3], Chini ANDREA[4], Satoshi TAKAHASHI[2], Hiroaki SAITO[5], Raku WATANABE[6], Yousuke TAKAOKA[1], Maho TANAKA[2], Atsushi NAGANO[7,8], Motoaki SEKI[2], Solano ROBERTO[4], Minoru UEDA[1,6] ([1]Tohoku Univ. Science, [2]Riken, [3]LUMS, [4]CNB-CSIC, [5]Hokuriku Univ., [6]Tohoku Univ. Life Science, [7]Ryukoku Univ., [8]Keio Univ.)

植物ホルモンのジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）は、植物体内に存在する COI1-JAZ 共受容体に結合し、生長阻害や防御応答など、多様な生物応答を制御する。しかし、COI1-JAZ 共受容体には複数のサブタイプが存在し、その高い遺伝的冗長性により、各共受容体サブタイプの機能を従来の遺伝学的手法で明らかにすることは困難であった。一方、サブタイプ選択的リガンドを用いる化学遺伝学的手法は、このような遺伝的冗長性の高い受容体それぞれの機能を解析するうえで有効であると期待され、開発が望まれている。

今回我々は、JA-Ile の構造を模倣した天然物コロナチン（COR）の、三次元的な構造がわずかに異なる立体異性体のフォーカスドケミカルライブラリー（16 種）から、COI1-JAZ 共受容体サブタイプ選択的リガンドを見出した。COI1-JAZ9 共受容体に対して高い選択性を示す立体異性体は、生長抑制という副作用を伴わずに病原菌感染防御応答を選択的に活性化した。トランスクリプトーム解析より、この立体異性体は、COR が誘導するシグナル伝達の一部を活性化することが確認された。さらに、*jaz9* 変異株の発現プロファイルと比較することで、本立体異性体を用いた化学遺伝学的手法が、遺伝的冗長性の高い受容体の機能解析に有用であることが示唆された。

Plant hormone, jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile), causes various physiological events such as growth inhibition and defense responses in plants. These diverse biological activities are attributed to plural subtypes of the co-receptor, COI1-JAZ. Functional analysis of each subtype of COI1-JAZ is difficult by using genetic approach because of the genetical and functional redundancy of COI1-JAZ. In contrast, chemical genetics approach using subtype selective ligands would enable to reveal the function of each COI1-JAZ subtype.

In this report, we constructed a focused chemical library of 16 stereochemical isomers of coronatine (COR) which is a structural mimic of JA-Ile. We screened this library *in vitro* by examining the binding affinity against all functional COI1-JAZ co-receptor pairs of *Arabidopsis thaliana*. As a result, some stereoisomers of COR showed selective affinity with specific COI1-JAZ pairs. Further *in planta* evaluation revealed one of hit compounds selectively activated the defense responses without growth inhibition as a subtype selective ligand. This result ensures the power of stereochemical library of COR to screen the selective activator of jasmonate signaling.

Focused chemical library, Plant hormone, Protein-protein interaction

講演番号：3F04-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

がん免疫療法治療薬開発のための新規ペプチド阻害剤の PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用いた探索と機能解析

Screening and functional analysis of novel peptide inhibitors by PURE system and mRNA display for cancer immunotherapy

○安東 丈洋[1]、ヴェディ サンタナ[1]、横山 匠[2]、高守 幸男[2]、冨士 大輔[2]、山本 美月[1]、川上 隆史[3,4]([1]山梨大院・医工農・統合応用生命科学、[2]山梨大院・医工農・生命環境学、[3]山梨大院・総合研究・生命環境、[4]JST・さきがけ)
○Takehiro ANDO[1], Santhana VEDI[1], Takumi YOKOYAMA[2], Yukio TAKAMORI[2], Daisuke FUJI[2], Mizuki YAMAMOTO[1], Takashi KAWAKAMI[3,4] ([1]Dept. Integr. Appl. Life Sci., Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Yamanashi Univ., [2]Dept. Life Environ. Sci., Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Yamanashi Univ., [3]Fac. Life Environ. Sci., Grad. Fac. Interdiscip. Res., Yamanashi Univ., [4]JST, PRESTO)

がん免疫療法は、免疫チェックポイントと呼ばれる自己免疫応答を防ぐための免疫系の調節機構を阻害し、T 細胞などの免疫細胞の抗がん反応を回復させることに基づく治療法である。免疫チェックポイントタンパク質の一つである PD-L1 はいくつかのがん細胞上に過剰発現しており、その受容体である PD-1 は活性化 T 細胞上に発現していることが知られている。PD-1 と PD-L1 が結合すると T 細胞の活性化が抑制されるため、一部のがん細胞はこの PD-1/PD-L1 間相互作用を利用してがん細胞による攻撃を回避していると考えられている。そこで PD-1/PD-L1 間相互作用を阻害すると、T 細胞は再び活性化し、がん細胞への攻撃を行うことができるようになる。従って PD-1/PD-L1 間相互作用の阻害剤の開発は、がん免疫療法において重要である。しかし、現在阻害剤として利用されている抗体は非常に高価であり、組織浸透性が低いなどの問題点が存在する。

本研究では、化学合成が可能なことから抗体よりも安価であり、高い組織浸透性を有する治療薬の開発を目的とし、PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用いた SELEX 法により新規の PD-1.PD-L1 間相互作用ペプチド阻害剤を探索した。

Cancer immunotherapy is one of the cancer treatments based on restoring anti-cancer responses of immune cells such as T cells by inhibition of immune checkpoints that prevent autoimmune responses. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1), one of the key inhibitory immune checkpoint proteins, is often overexpressed on the surface of some cancer cells. Its receptor, programmed cell death 1 (PD-1), is expressed on the surface of activated T cells. Since PD-1/PD-L1 interaction leads to suppression of T cell activation, the interaction allows cancer cells to avoid immune recognition and T cell attack. Hence, blocking the PD-1/PD-L1 interaction allows re-activation of T cells. Therefore, development of PD-1/PD-L1 interaction inhibitors is important in cancer immunotherapy. However, currently clinically used antibodies have some disadvantages such as high production cost and low permeability.

Here, we report the screening of novel peptide inhibitors targeting PD-1/PD-L1 interaction by SELEX using an *Escherichia coli* reconstituted cell-free translation system (PURE system) and mRNA display.

SELEX, PURE system, mRNA display

講演番号：3F04-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

Discovery of HER3/HRG inhibitors by SELEX and functional analysis for cancer treatment

○Santhana VEDI[1], Takehiro ANDO[1], Takumi YOKOYAMA[2], Yukio TAKAMORI[2], Daisuke FUJI[2], Mizuki YAMAMOTO[1], Takashi KAWAKAMI[3,4] ([1]Dept. Integr. Appl. Life Sci., Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Yamanashi Univ., [2]Dept. Life Environ. Sci., Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Yamanashi Univ., [3]Fac. Life Environ. Sci., Grad. Fac. Interdiscip. Res., Yamanashi Univ., [4]JST PRESTO)

The interaction of human epidermal growth factor receptor 3 (HER3) and heregulin (HRG) is involved in resistance to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted cancer treatment, such as therapies using anti-HER2 monoclonal antibody. Therefore, inhibition of the HER3/HRG interaction is potentially valuable therapeutic target for cancer treatment. In this study, we used *in vitro* selection, also known as systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) against the extracellular domain of human HER3, and discovered a novel RNA aptamer. Pull-down and bio-layer interferometry assays showed that the discovered RNA aptamer specifically bound to HER3 with a dissociation constant (K_D) of 700 nM. Pull-down assays using chemiluminescence detection also revealed that the HER3-binding RNA aptamer inhibited the interaction between HER3 and human HRG. These results indicated that the novel HER3-binding RNA aptamer has potential to be used as basic tool in a range of applications involving HER3/HRG interactions, including research, therapeutic, and diagnostic applications.

[Reference]
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2021 534, 27-33

SELEX, HER3, Cancer treatment

講演番号：3F04-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム F

生細胞中の脱ユビキチン化酵素の活性を検出する準生体直交型バイオセンサータンパク質の開発

A Semi-Bioorthogonal Biosensor that Detects Deubiquitinating Enzyme Activities in Living Cells

○鈴木 琢海 [1]、宇津木 優樹 [1]、礒田 博子 [2,3]、宮前 友策 [2,3] ([1] 筑波大人間総合科学、[2] 筑波大生命環境、[3] 筑波大地中海北ア)
○Takumi Suzuki[1], Yuki Utsugi[1], Hiroko Isoda[2,3], Yusaku Miyamae[2,3] ([1]Grad. Sch. Comp. Human Sci., Univ. Tsukuba, [2]FLES, Univ. Tsukuba, [3]ARENA, Univ. Tsukuba)

脱ユビキチン化酵素 (DUBs) は細胞内のユビキチン化を負に制御するプロテアーゼの一種であり、Ubiquitin-specific protease (USP)を始めとする 100 種類超の分子が同定されている。DUBs は癌や炎症性疾患を始めとした様々な疾病と関連しており、それらの創薬において有用な標的である。本研究では、生体発光共鳴エネルギー転移 (BRET) の原理を活用し、生細胞中で DUBs の酵素活性を定量的に検出するための手法の開発を目的とした。まず初めに、mNeonGreen (mNG)と NanoLuc (NL)の間に、リシン残基をアルギニンに置換した UbK0 変異体 (Ub*) を、DUBs の切断基質として挿入した融合タンパク質 (プローブ分子)を発現するプラスミドを作成した。本プラスミドを NIH3T3 細胞に発現させ、mNG と NL 間で生じる BRET の発光値を測定した。その結果、野生型の C 末端配列を持つ Ub*を挿入したプローブ分子の発現細胞では、基底レベルの低い BRET 値が観測された。一方、DUBs による認識に重要な C 末端残基に変異を導入した Ub*を挿入したプローブ分子では高い BRET 値が検出された。次に、変異させた C 末端配列を持つ Ub*を特異的に認識及び切断するように、触媒部位に変異を導入した改変 USP2 酵素を、プローブと共に NIH3T3 細胞に発現させた。その結果、改変酵素の共発現により BRET 値の有意な減少が見られ、さらに実際に mNG 及び NL が切断されていることを、ウェスタンブロッティングにより確認した。以上より、C 末端残基に変異を導入した Ub*を持つ BRET プローブ分子は、内在性の野生型 DUBs とは反応せず、触媒部位に変異を導入した改変 DUB の酵素活性を特異的に検出可能な、準生体直交型のバイオセンサーとしての利用が期待される。

Deubiquitinating enzymes (DUBs) are ubiquitin-specific proteases which negatively regulate intercellular ubiquitination. More than 100 types of DUBs have been reported and correlated with pathogenesis of cancer and inflammatory diseases. Here, we report a method that quantitatively detects the intercellular DUBs activity by using a technology of bioluminescent resonance energy transfer (BRET). We prepared a series of plasmids encoding a fusion protein (termed a probe) which consists of mNeonGreen (mNG), NanoLuc (NL), and a lysine-free ubiquitin variant (Ub*). BRET should be occurred between mNG and NL, and be disrupted when the C-terminus of Ub* is cleaved by cellular DUBs. We found that high BRET signal was detected in NIH3T3 cells which express a probe bearing cleavage resistant Ub* mutant. Next, we sought to achieve a specific cleavage of the resistant Ub* mutant by using an engineered enzyme. We introduced a single mutation on the catalytic site of ubiquitin-specific protease 2 (USP2) for the specific recognition of resistant Ub*mutant, and transduced NIH3T3 cells with the vector encoding mutated probe and enzyme. Consequently, BRET signal was significantly decreased only in the presence of engineered USP2 mutant. Moreover, cleavage of the probe was also confirmed by western blotting. These results suggested that BRET probe bearing Ub* mutant reacts with only engineered DUB mutant, but not wild type DUBs, and can specifically detect their enzymatic activity as a semi-bioorthogonal substrate.

deubiquitinating Enzyme, BRET, ubiquitin

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3F07-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

カンジダの細胞形態変化を指標とした抗真菌剤の探索

Exploration of antifungal agents based on phenotypic changes in Candida

○二村 友史[1]、ウソンーロペス レイチェル[1]、青野 晴美[1]、堀 康宏[1]、室井 誠[1]、平野 弘之[2]、西浦 正芳[3]、侯 召民[3]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]理研 CSRS・化合物リソース、[3]理研 CSRS・先進機能触媒)
○Yushi FUTAMURA[1], Rachael A. Uson-Lopez[1], Harumi Aono[1], Yasuhiro Hori[1], Makoto Muroi[1], Hiroyuki Hirano[2], Masayoshi Nishiura[3], Zhaomin Hou[3], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]Chem Biol, RIKEN CSRS, [2]Chem Resour Dev, RIKEN CSRS, [3]Adv Catal, RIKEN CSRS)

我々はこれまで様々な薬剤が誘導する動物細胞や真菌の細胞形態変化をデータベース化して新規物質の探索を行ってきた。本研究ではカンジダの形態変化を指標に新規抗真菌剤の探索を試みた。

スクリーニングには、理研内の有機合成グループから供試された合成化合物で構成された化合物ライブラリーを用いた。1680 化合物について抗真菌活性や細胞毒性を評価し、テトラキス（ペンタフルオロフェニル）ホウ酸塩（TPPB）に強い抗真菌活性を見出した（IC_{50} = 0.012 μM)。また本化合物は酵母が大きく膨らむ形態変化を誘導し、この表現型は細胞壁合成酵素阻害剤であるミカファンギンと類似していた。カンジダのヘテロ接合体変異株のコレクション（The Merck DBC strain library）を使った薬剤感受性プロファイリングを行ったところ、TPPB はミカファンギンの標的である Fks1 の変異株ではなく、低分子量 G タンパク質 Rho1 の変異株に対して感受性が亢進した。このことから TPPB は既存薬とは作用が異なるユニークな抗真菌物質であることが示唆された。

We have explored the bioactive compounds based on morphological changes of cancer cells and rice blast fungi induced by the compounds. In this study, we constructed a cell morphology database of opportunistic pathogen *Candida albicans* and used it to discover novel antifungals.

In the course of screening from RIKEN chemical library containing the synthetic compounds, we found that tetrakis(pentafluorophenyl)borate (TPPB) had a potent antifungal activity against *C. albicans* (IC_{50} = 0.012 μM). In addition, TPPB showed swelling phenotype characteristic to micafungin, an inhibitor of cell wall synthase Fks1. Haploinsufficiency profiling with the Merck *Candida albicans* Double Barcoded strain library revealed that TPPB are highly potent to *rho1* (coding small GTPase Rho1) mutant strain, not *fks1* mutant one, suggesting TPPB is unique antifungals distinct from conventional drugs.

Chemical biology, Antifungals, Candida albicans

発表責任者：二村友史（futamuray@riken.jp）

講演番号：3F07-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

FKBP12 よるセリン・スレオニン代謝制御の化学遺伝学的解析

Chemical genetic analysis of the serine/threonine metabolism regulation by FKBP12.

○佐々木 舞雪[1]、西村 慎一[1,2]、松山 晃久[1,3]、八代田 陽子[3]、掛谷 秀昭[4]、吉田 稔[1,2,3] ([1]東大院農応用生命工学専攻、[2]東大微生物連携機構、[3]理研 CSRS　ケミカルゲノミクス、[4]京大院薬　システムケモセラピー・制御分子学分野)

○ Mayuki SASAKI[1], SHINICHI NISHIMURA[1,2], AKIHISA MATSUYAMA[1,3], YOKO YASHIRODA[3], HIDEAKI KAKEYA[4], MINORU YOSHIDA[1,2,3] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Dept. Syst. Chemotherapy and Mol. Sci. Kyoto Univ.)

アミノ酸はただタンパク質を構成するだけでなく、生体内で多様な役割を持つことが報告されている。その中でもセリンは脂質や核酸、ピルビン酸など様々な生体分子を構成する要素として働く一方で、近年、がんなどの疾患でもその代謝が注目される生体の鍵分子である。このように多くの生理機能を持つセリンの代謝酵素はほぼ明らかであるが、その制御機構には未解明な点が多い。

我々は、セリン代謝の分子機構の解明と化合物による代謝制御を目指して、化合物探索研究を行い、免疫抑制剤 FK506 が、セリンを単一窒素源として培養した際にのみ分裂酵母の生育を抑制することを見出した。これは FK506 のレセプターである FKBP12 の欠損によって遺伝学的に再現された。FKBP12 はタンパク質のプロリン残基のシス・トランスの異性化を担う酵素であり、出芽酵母では転写因子として働くことも報告されている。しかし、セリン代謝との関連については全く報告がない。そこで、分裂酵母のセリン代謝関連遺伝子の破壊株および過剰発現株を用いた化合物感受性試験により FKBP12 の下流因子を探索したところ、セリン／スレオニンの脱アミノ化酵素 Tda1 の過剰発現が FKBP12 阻害剤に対して耐性を示すことを発見した。ミトコンドリアに局在し、セリンやスレオニンの脱アミノ基反応の触媒や分岐鎖アミノ酸の生合成に関わるとされる Tda1 が FKBP12 の下流因子である可能性が高い。本発表では、薬剤処理による表現型および FKBP12 と Tda1 との関係性について報告する。

Serine is an amino acid that plays not only an essential role as a composing element of many biomolecules, but also metabolic roles in various diseases such as cancer, which has attracted broad attention as a key molecule in living organisms. The enzymes responsible for serine metabolism have been almost fully elucidated, but how they are regulated is yet uncovered.

To better understand the mechanism of serine metabolism we performed screening for a chemical tool to regulate serine metabolism using a culture system of fission yeast depending on serine. As a result, we identified FK506, an immunosuppressant, which causes growth defect when cultured in a medium containing serine as the sole nitrogen source. This phenomenon was recapitulated by the genetic deletion of FKBP12, the receptor of FK506. By searching the proteins involved in this activity, we found that the overexpression of Tda1, a serine/threonine deaminase, conferred resistance to FKBP12 inhibitors. In this presentation, we will introduce the phenotype shown by FKBP12 inhibitors, and the relationship between FKBP12 and Tda1.

fkbp12, serine/threonine deaminase, fission yeast

発表責任者：吉田稔（yoshidam@riken.jp）

講演番号：3F07-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

3T3-L1 細胞を用いた脂肪分化抑制化合物の探索

Screening for compounds that inhibit adipose differentiation in 3T3-L1 cells

○佐藤 千花子、山本 れい、渡邉 彩葉、藤巻 貴宏（東京農業大学・農芸化学科）
○Chikako SATO, Rei YAMAMOTO, Sayo WATANABE, Takahiro FUJIMAKI (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Agricultural Chemistry)

肥満とは脂肪組織が過度に増加した状態であり、糖尿病などの生活習慣病を引き起こす大きな因子となる。脂肪組織の増大には、前駆脂肪細胞が細胞内に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞へと分化する過程が寄与する可能性が知られており、肥満の解消には脂肪細胞への分化を抑制する必要がある。3T3-L1 細胞は dexamethasone（DEX）、isobutylmethylxanthine（IBMX）、insulin による刺激で効率よく脂肪細胞に分化する細胞として広く研究に用いられている。そこで本研究は 3T3-L1 細胞を用いて、果物の種子や果皮などの未利用農作物を中心とする天然物ライブラリーから脂肪細胞への分化を抑制する化合物を探索することを目的とする。今回我々は Oil red O 染色による脂肪分化抑制活性を指標に、特に強い活性が見られたマンゴー種子から 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucose（PGG）、3-*O*-digalloyl-1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose（HGG）、ethyl gallate、ethyl digallate を単離した。MTT アッセイにおいて細胞毒性が見られなかった濃度域で Oil red O 染色による分化抑制活性を評価し、単離した化合物の活性を比較した。さらに単離した化合物が脂肪細胞形成関連遺伝子に及ぼす影響を調べるため、分化期間中に化合物処理した細胞の遺伝子の発現量を RT-PCR により測定することで詳細なメカニズム解析を行ったのでその結果について報告する。

Obesity is defined as an excessive increase in adipose tissue, which is a major factor causing chronic metabolic diseases such as diabetes. It is reported that the process of differentiation of preadipocytes into adipocytes, termed adipogenesis, may contribute to the growth of adipose tissue. Therefore, suppression of differentiation into adipocytes may help to treat obesity. 3T3-L1 preadipocytes have been widely used in research as differentiation of adipocytes. Upon the treatment with DEX, IBMX, and insulin, 3T3-L1 preadipocyte efficiently differentiate into adipocyte. The objective of this study is to screen for inhibitors of adipocyte differentiation from natural products. In the course of screening mango (*Mangifera indica* L.) kernels were found to have potent suppression effects of lipid accumulation by Oil red O staining assay. Furthermore, we isolated active compounds, PGG, HGG, ethyl gallate, and ethyl digallate from mango kernels extracts. To compare the effects of isolated compounds with adequate concentration on anti-adipogenesis activity, we performed MTT assay and Oil red O staining assay. To investigate the mechanism of anti-adipogenesis effect of isolated compounds, we performed to measure adipogenesis-related gene expression levels in differentiated cells treated with each compound by RT-PCR.

adipogenesis, 3T3-L1 cells, natural products

発表責任者：藤巻貴宏（tf206510@nodai.ac.jp）

講演番号：3F07-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

キューバ産植物由来抗炎症物質 jacaranone の作用メカニズム解析

Mechanism of action of jacaranone, an anti-inflammatory compound

○蛭川 美奈子、柴田 貴広、北 将樹（名大院生命農）
○Minako HIRUKAWA, Takahiro SHIBATA, Masaki KITA (Nagoya Univ.)

炎症は最も知られている生体反応のひとつであるが、がんや糖尿病、関節リウマチなどの様々な疾患と関連している。新しい抗炎症リード化合物の創出とその作用機序を解明するため、キューバ産薬用植物を対象に抗炎症性化合物を探索し、活性物質として共役ジエノン構造を有する jacaranone (**1**) をこれまでに単離した。この化合物は抗腫瘍活性や抗菌活性などの多くの生物活性が報告されているが、抗炎症活性に関しては新たな知見であった。本研究では、**1** の標的分子の探索と様々な生物活性を発現する作用機序の解明を目指すこととした。

まず、**1** の構造活性相関の結果から抗炎症活性を保持し、ビオチンをアフィニティタグとしたケミカルプローブを合成した。このプローブを用いて、RAW264.7 細胞の細胞抽出液を用いたアフィニティー精製により、**1** と共有結合する 41 kDa のタンパク質 X を同定した。X は細胞内で他のタンパク質と複合体を形成し、サイトカインの産生を制御することが報告されている。この複合体形成が **1** により実際にどのような影響を受けるか、現在解析を行っている。

A dienone compound, jacaranone (**1**), shows various biological activities such as antitumor and antimicrobial activities, but its mechanism of action has been almost unclear. Recently, we found that **1** showed potent anti-inflammatory activity in macrophage and mice. In this study, we searched for the target molecules of **1** and elucidated its mechanism of action to express various biological activities.

Based on structure-activity relationship studies, a chemical probe of **1** with biotin affinity tag was synthesized, which retained anti-inflammatory activity of **1**. Affinity purification using this probe resulted in the identification of a 41 kDa protein that covalently bound to **1**. This protein was reported to form a multiple complex with other proteins in cells to regulate the production of several cytokines. We are currently analyzing how **1** affects the formation and activity of this protein complex.

Natural products, anti-inflammatory activity, mechanism of action

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F07-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

分裂酵母の適応生育をうながすフェロモン様分子の組織的探索

Genome-wide screen for discovering pheromone-like molecules in fission yeast

○吉住 僚太朗[1]、三浦 俊一[1]、西村 慎一[1,2]、八代田 陽子[3]、松山 晃久[1,3]、吉田 稔[1,2,3] ([1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス)
○ Ryotaro Yoshizumi[1], Synichi Miura[1], Shinichi Nishimura[1,2], Yoko Yashiroda[3], Akihisa Matsuyama[1,3], Minoru Yoshida[1,2,3] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS)

微生物はコロニーの内外で化合物を用いたコミュニケーションを行っている。それにより効率的に有性生殖を行い、あるいは細胞外の栄養状態に応じて代謝経路を変調することで、種の保存を図っていると考えられる。例えば分裂酵母はオキシリピンの一種であるフェロモン様分子 Nitrogen Signaling Factor (NSF) を微量に分泌しており、それにより、窒素カタボライト抑制 (NCR) を解除する。NCR とは細胞外に「資化しやすい窒素源」と「資化しにくい窒素源」が存在する場合に「資化しやすい窒素源」を優先的に取り込み、「資化しにくい窒素源」の取り込みを抑制するシステムである。NSF は細胞密度が上昇した際に「資化しにくい窒素源」も取り込むためのコミュニケーション分子であると考えられている。この因子は NCR により特定の培地条件で生育できない変異株が野生株の近傍では生育回復を示すという現象を偶然見出したことを機に同定された。最近我々は、細胞間コミュニケーション分子は他にもあると期待し、「生育回復」現象の組織的探索を開始した。

分裂酵母の遺伝子破壊株コレクションを用いて、富栄養培地で生育するが最少培地では生育しない株を 86 株単離し、さらに野生株の近傍で生育回復する 37 株を単離した。このうち 26 株は既知の生育回復因子 NSF やアルギニン、コリン、システインで生育回復しなかった。多くの株の生育回復に寄与したシステインの分泌に関して詳細の解析を検討中である。また、遺伝子破壊株コレクションが持つ栄養要求性と生育回復現象に関連性が示唆されたことから、栄養要求性を排除した株を作製中であり、それらを用いた解析についても、最新の結果を報告する。

Microorganisms communicate each other for efficient sexual reproduction or regulation of metabolisms in response to extracellular nutritional conditions. The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* releases pheromone-like molecules, referred to as Nitrogen Signaling Factors (NSFs), which likely allow cells to utilize 'poor nitrogen source' depending on increased cell density. NSFs were identified through the serendipitous observation that a particular metabolic gene mutant show growth recovery in the vicinity of colonies of the prototrophic strain. To identify new pheromone-like molecules, we started comprehensive analyses employing a gene deletion mutant collection. We performed a genome-wide screen and identified 37 strains that showed growth defect on synthetic media but recovered their growth in the vicinity of colonies of the prototrophic strain. Of these, 26 strains were not restored by supplementation with any of known growth recovery molecules such as NSF, arginine, choline, or cysteine. We will present our recent findings on cysteine secretion and involvement of auxotrophy in cell-cell communication.

pheromone-like molecule, growth recovery, fission yeast

講演番号：3F07-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

酸化酵素 laccase を用いた高効率チロシン残基特異的修飾の開発

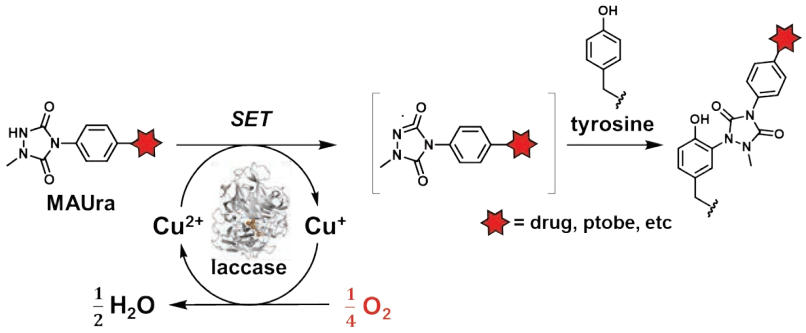
Development of Highly efficient tyrosine-specific labeling using laccase

○中根 啓太[1]、宮野 翔伍[1]、友重 秀介[1]、石川 稔[1]、佐藤 伸一[1,2] ([1]東北大院　生命、[2]東北大　学際研)

○Keita NAKANE[1], Shogo Miyano[1], Shusuke Tomoshige[1], Minoru Ishikawa[1], Shinichi Sato[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, [2]Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

天然のアミノ酸残基を標的とした化学修飾法は、ペプチド・タンパク質と修飾剤分子を共有結合により連結する技術である。ペプチド・タンパク質に対して機能性分子を連結することで新たな機能の付与が可能であり、アミノ酸残基の化学修飾技術は広く生命科学研究に使用されている。我々は、酸素分子を駆動力として、一電子酸化を触媒する酵素 laccase に注目し、図に示すチロシン残基修飾反応を開発した。この手法は空気中の酸素分子を利用でき、弱酸性（pH 6.0）条件下で反応容器のふたを開けて振盪することにより、効率的かつ特異的にチロシン残基を修飾することが可能である。反応性を精査したところ、laccase は修飾剤である MAUra（1-methyl-4-arylurazole）を一電子酸化することで、チロシン残基を特異的に修飾すること、既知のチロシン残基修飾法と比較して最も効率的にチロシン残基を修飾できることを明らかにした。さらに、本法を用いて機能性ペプチドおよびタンパク質の高効率かつチロシン残基特異的な機能化に成功した。本法を用いて修飾した炭酸脱水素酵素およびグルコースオキシダーゼの酵素活性を評価したところ、酵素の機能が保持されていることを確認した。本講演ではさらに、上記のチロシン残基修飾法が残基特異的かつ高効率に進行するという特徴を活かし、本手法をプロテオミクス解析手法へと応用したので合わせて報告する。

Chemical modification of natural amino acid residues is a technique functionalizing peptides and proteins and is widely used in life science research because new functions can be introduced to peptides and proteins. We focused on the laccase catalyzing SET (single-electron transfer) driven by oxygen molecules and developed the tyrosine modification reaction shown in the figure. In this method, tyrosine-specific modification proceeds efficiently. This study discovered that laccase oxidized 1-methyl-4-arylurazole (MAUra), a tyrosine labeling reagent by SET. Furthermore, we succeeded in the highly efficient and tyrosine-specific functionalization of peptides and proteins. The enzymatic activities of carbonic acid dehydrogenase (CA) and glucose oxidase (GOx) modified by this method were evaluated, and these proteins were functionalized without impairing their enzymatic activity.



Tyrosine, protein labeling, laccase

講演番号：3F07-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

カイコ休眠誘導シグナルの同定とシグナル制御化合物の探索

Identification and chemical control of diapause-inducing signal in silkworm

○山田 早人[1]、天池 一真[1]、伊丹 健一郎[1,2] ([1]名大院理、[2]名大 ITbM)
○ Hayato YAMADA[1], Kazuma AMAIKE[1], Kenichiro ITAMI[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM))

昆虫の休眠は、不良環境を生き延びるためにプログラムされた発育停止現象である。休眠研究が先行するカイコでは、母蛾の胚期での温度や日長といった環境情報に基づき次世代卵の休眠性が決定される。具体的には、母蛾が蛹期に分泌した休眠ホルモン (diapause hormone; DH) が卵巣のDH受容体に作用することで次世代卵の休眠が誘導される。近年、DHシグナル下流で休眠誘導に機能する因子としてPNDおよびPND-2が同定されたが、その分子メカニズムの詳細は明らかでない。

我々はバイオインフォマティクス解析により、PNDとPND-2はそれぞれ哺乳類のIL-17とその受容体 (IL-17R) の構造相同体であることを見出した。カイコ由来培養細胞における一過性発現解析の結果、PND-2は細胞膜上に局在し、PNDはPND-2と共局在することが示された。これは、PNDとPND-2がリガンド–受容体ペアとして休眠誘導シグナルの発動に機能することを示唆している。我々はさらに、IL-17R阻害剤であるシアニジンがPND/PND-2相互作用に対しても阻害効果を持つことを突き止めた。これは、シアニジンがカイコの休眠誘導を阻害する候補化合物であることを示唆している。これらの研究成果は、カイコ休眠の自在制御や害虫に対する休眠撹乱農薬の開発につながると期待される。

Diapause is a programmed developmental arrest in insects to survive unfavorable environmental conditions. Diapause research is most advanced in the domestic silkworm *Bombyx mori,* and they induce embryonic diapause beyond generations as a maternal effect. Offspring diapause is determined by the environmental temperature and photoperiod during the embryonic development of the mother moths. Female moths destined to produce diapause eggs release diapause hormone (DH) into hemolymph during the pupal-adult stages. DH acts on a DH receptor in the ovaries to induce offspring diapause. Recently, *pnd* (*pigmented and non-diapausing*) and *pnd-2* have been identified as the downstream factors of DH signaling. However, the molecular mechanism of diapause regulation through the PND and PND-2 signals is still unclear.

Our bioinformatic analysis found PND and PND-2 are structural homologs of mammalian IL-17 and its receptor (IL-17R), respectively. Transient expression analysis in *B. mori*-derived cells demonstrated that PND-2 localized on the cell membrane and PND co-localized with PND-2. These results indicated PND and PND-2 may act as a ligand-receptor pair to induce diapause. We have further shown that cyanidin, an IL-17 signaling inhibitor, can also inhibit PND/PND-2 interaction, meaning the cyanidin may work as a diapause inhibitor. Our findings lead to the complete control of silkworm diapause and the development of diapause-disrupting pesticides.

silkworm, diapause

発表責任者：山田早人（h-yamada@chem.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F07-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

Kujigamberol とその構造類縁体は IFN-γ と IL-2 の発現を阻害する

Kujigamberol and its structural derivatives inhibit IFN-γ and IL-2 expression

○山口 梨夏子[1]、谷垣 里穂[1]、YARANGSEE Waraluk[1]、東 幸奈[1]、木村 賢一[2]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大学・応生、[2]岩手大院・総合科学)
○Rikako YAMAGUCHI[1], Riho TANIGAKI[1], Waraluk YARANGSEE[1], Yukina HIGASHI[1], Ken-ichi KIMURA[2], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ.)

【目的】Interferon-γ (IFN-γ)は、主に細胞傷害性 T 細胞などから産生される炎症性サイトカインであり、免疫反応を調節している。Kujigamberol は、岩手県久慈市産琥珀から単離された小分子化合物であり、抗アレルギー活性を有し、炎症性サイトカインで誘導される細胞接着因子の発現や糖鎖修飾に作用する [1–3]。我々は、kujigamberol が IFN-γ 発現を阻害することを見出した。本研究では、kujigamberol の作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】T-box 転写因子 Eomesodermin (Eomes)を安定的に発現させたマウスリンパ腫由来 BW5147 細胞トランスフェクタントを、kujigamberol もしくはその構造類縁体で 1 時間処理した後、T 細胞受容体を代替するホルボールエステルとカルシウムイオノフォアで 6 時間処理した。MTT 法で細胞生存率を測定し、IFN-γ mRNA 及び IL-2 mRNA の発現をリアルタイム PCR により測定した。
【結果】Kujigamberol は、細胞生存率に影響しない濃度で、IFN-γ mRNA の発現レベルを濃度依存的に低下させることを見出した。さらに、kujigamberol 及びその構造類縁体である kujigamberol B、kujiol A、kujigamberoic acid A、spirolactone dinorterpenoid は、いずれも IFN-γ mRNA 及び IL-2 mRNA の発現を阻害したが、その中でも kujigamberol と kujiol A が高い阻害効果を示した。

Interferon-γ (IFN-γ) is an inflammatory cytokine produced primarily by cytotoxic T cells and plays an essential role in the regulation of immune responses. Kujigamberol, isolated from Kuji amber, exerts anti-allergic activity and interferes with pro-inflammatory cytokine-induced expression of and N-glycan modifications to cell adhesion molecules [1–3]. In mouse lymphoma BW5147 cells transfected with the T-box family transcription factor Eomesodermin (Eomes), IFN-γ expression is induced by phorbol esters and calcium ionophores. We found that kujigamberol inhibited the expression of IFN-γ mRNA at concentrations that did not affect cell viability in Eomes-transfected BW5147 cells. Kujigamberol and its structural derivatives (i.e., kujigamberol B, kujiol A, kujigamberoic acid A, spirolactone dinorterpenoid) inhibited the expression of IFN-γ mRNA and IL-2 mRNA, while kujigamberol and kujiolA exerted stronger inhibitory activities.

[1] Kimura, K. *et al.*, *Fitoterapia* **83**, 907–912 (2012)
[2] Maruyma, M. *et al.*, *Fitoterapia* **127**, 263–270 (2018)
[3] Fukuhara, S. *et al.*, *Int. Immunopharmacol.* **62**, 313–325 (2018)

kujigamberol, kujiolA, IFN-γ

発表責任者：片岡孝夫（takao.kataoka@kit.ac.jp）

講演番号：3F07-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム F

ポリカチオンイソペプチド修飾した中分子ペプチドの細胞膜透過性と生理活性の評価

Cell penetration and bioactivity of peptides natural products modified with polycationic isopeptides

○鈴木 海渡、小倉 知也、武内 大和、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大院生物資源）
○ Kaito SUZUKI, Tomoya OGURA, Yamato TAKEUCHI, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

一般的に分子量 1,000 を超える中分子ペプチドは細胞膜を透過しない。そこで、中分子ペプチドの細胞膜透過性を改善することができれば、新しい生理活性中分子ペプチドを探索できると考えた。我々は既に、放線菌が生産する ε-poly-L-α-lysine と ε-oligo-L-β-lysine が細胞膜透過性ポリカチオンイソペプチド（PIECEs）として機能することを見出している。そこで本研究では、中分子ペプチドのモデル化合物として、動物細胞に毒性を示さないバシトラシン（BAC）とダプトマイシン（DAP）を用い、PIECE 修飾することで細胞膜を透過し、動物細胞へ毒性を示すか検証した。

BAC および DAP のアミノ基に有機化学的にアルキン基を導入し、アジド基を有する PIECE とのクリックケミストリーにて中分子ペプチドの PIECE 修飾を行った。各種動物細胞に対する生理活性を評価したところ、興味深いことに PIECE-BAC、PIECE-DAP は細胞毒性を示した。特に PIECE-DAP は浮遊細胞、接着細胞ともに強い細胞毒性を示した。以上の結果から、中分子ペプチドのポリカチオン修飾は細胞膜透過性を改善し、新しい生理活性の創出につながることが示唆された。

Generally, most peptide natural products with a molecular weight of more than 1,000 do not readily cross cell membranes. Therefore, improving their cell membrane permeability would be a promising strategy to screen more bioactive peptide natural products. Recently, we showed that the ε-poly-L-α-lysin and ε-oligo-L-β-lysin produced by *Streptomyces* strains showed cell-penetrating activities; we propose the name *polycationic isopeptides entering cells (PIECEs)* for them. To address our expectation, in this study, we employed two model peptides exhibiting no cytotoxicities against mammalian cells: bacitracin (BAC) and daptomycin (DAP). We further examined whether these two peptides show cell-penetrating activities and cytotoxicities after the chemical modification with PIECEs.

An amino group of BAC and DAP was derivatized with an alkyne group, and then the resulting peptides were attached to PIECEs with an azide group by click chemistry. The cytotoxicities of the resulting peptides, PIECE-BAC and PIECE-DAP, were evaluated in various mammalian cells. Interestingly and expectedly, PIECE-BAC and PIECE-DAP showed potent cytotoxicities, suggesting that PIECE modification of peptides improves cell membrane permeability and leads to the creation of new bioactivities.

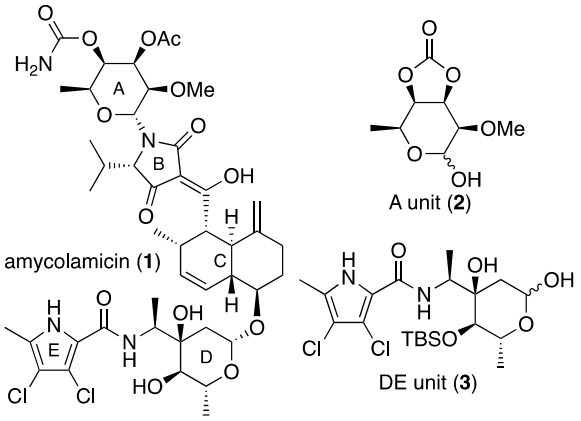
permeation, peptide, cell membrane

講演番号：3F09-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

抗生物質 amycolamicin の A および DE ユニットの合成

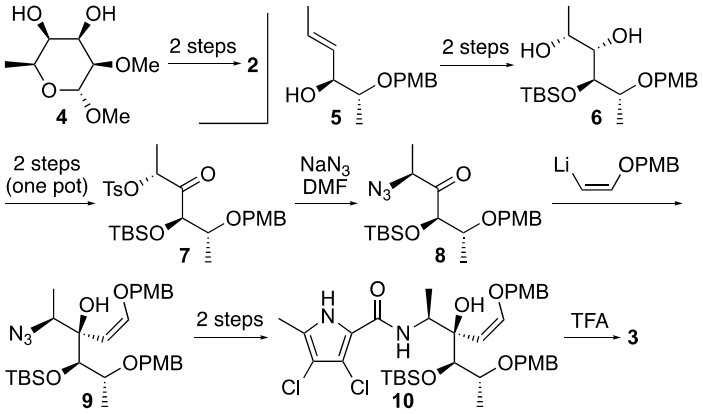
Synthesis of the A and DE units of amycolamicin, a potent broad-spectrum antibiotic

○桑原 重文、目黒 康洋（東北大院農）
○Shigefumi KUWAHARA, Yasuhiro MEGURO (Tohoku Univ.)



【背景と目的】Amycolamicin（**1**）は放線菌が生産する抗生物質であり, MRSA, VRE など, 広範な薬剤耐性菌に強力な抗菌作用を示す [1]。5 つの環状構造ユニット（A～E）が連なった前例の無いハイブリッド構造を有し, 既存薬とは異なる作用機序を持つとともにマウス急性毒性も示さないことから, 全く新規な抗菌薬リード化合物として注目されている。本講演では, **1** の A unit（**2**）および DE unit（**3**）の合成について報告する（同じ Session で全合成も発表する）。

【方法と結果】既知物質 **4**[1]の環状カーボネート化と加水分解により **2** を得た。**3** については, 不斉エポキシ化を経由する以前の方法 [2]を改良して, 大幅な収率向上を実現した。即ち, 既知物質 **5** の Sharpless 不斉ジヒドロキシル化を経て **6** とした後, 選択的トシル化と酸化により **7** に導いた。**7** をアジド **8** に変換後, ビニルリチウム試薬の立体選択的付加により **9** を得た。**9** のアジド基の還元と E ユニットとの縮合で **10** とした後, 酸処理により **3** を得た。



Amycolamicin (**1**), produced by the soil actinomycete *Amycolatopsis* sp MK575-fF5, exhibits potent broad-spectrum antibiotic activity against various drug-resistant bacteria including MRSA, QRSA, and VRE with no apparent toxicity in mice.[1] Prompted by the unique hybrid structure composed of five ring systems (A–E) as well as the pharmacologically promising properties, we embarked on the total synthesis of **1**. In this presentation, we report the preparation of its A and DE units (**2** and **3**, respectively). The A unit (**2**) was prepared from known glycoside **4** via protection and hydrolysis. The DE unit (**3**), on the other hand, was prepared from known allylic alcohol **5** in 48% overall yield through eight operational steps involving the Sharpless asymmetric dihydroxylation (**5** → **6**) and a highly diastereoselective addition of a vinyl lithium species to azido ketone intermediate (**8** → **9**). The completion of the total synthesis of **1** will be presented in this same session by Yasuhiro Meguro.

1) Sawa et al., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15772. 2) Meguro et al., *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7474.

total synthesis, antibiotic, amycolamicin

発表責任者：桑原重文（shigefumi.kuwahara.e1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3F09-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

抗生物質 amycolamicin の全合成

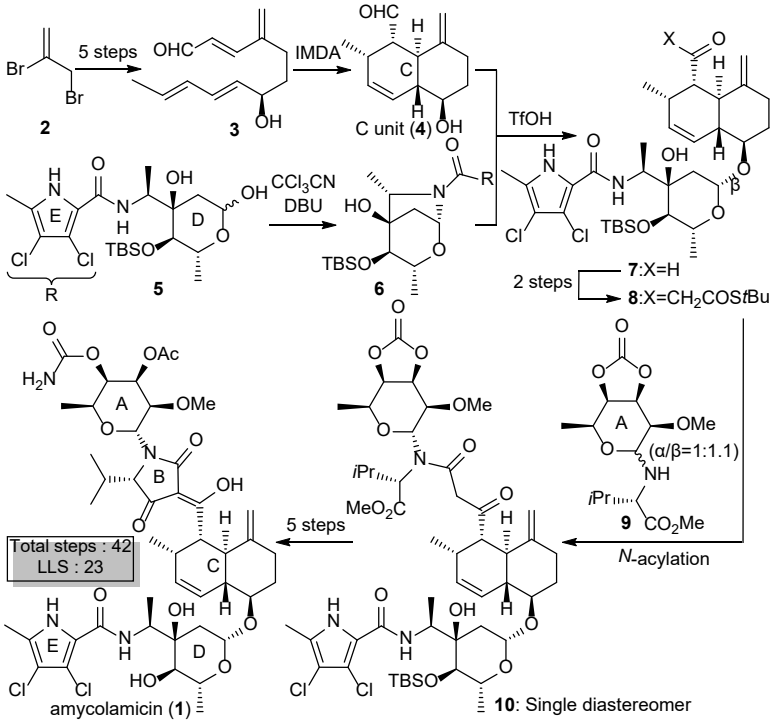
Total synthesis of amycolamicin, a potent broad-spectrum antibiotic

○目黒 康洋、伊藤 隼哉、仲川 清隆、桑原 重文 (東北大院農)
○Yasuhiro Meguro, Junya Ito, Kiyotaka Nakagawa, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

【背景と目的】Amycolamicin (**1**)は希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. MK575-fF5 および *Kibdelosporangium* sp. MA7385 が生産する抗生物質であり MRSA、VRE を始め極めて広範なグラム陽性・陰性の薬剤耐性菌に対して強力な抗菌作用を示す[1]。**1** は 2 つの新規単糖ユニットを含む A~E unit が連結した過去に類例の無いハイブリッド型化学構造を有しており、有機合成化学的見地からも挑戦的な合成標的である。今回、我々は収束的合成法を駆使した **1** の初の全合成を達成したので、詳細を報告する。

【方法と結果】市販原料 **2** から不斉還元を含む 5 工程の変換を経て **3** を得た後、分子内 Diels–Alder 反応(IMDA)により高立体選択的に C unit (**4**)へ導いた。次に、DE unit の TBS 保護体 **5**[2]から誘導した **6** により **4** をグリコシル化して β-グリコシド **7** を主生成物として得た後、アルドール反応による増炭と酸化を行って **8** に導いた。**8** と A unit 誘導体 **9** の *N*-アシル化反応は A unit のアノマー位において立体収束的に進行し、β-ケトアミド **10** を単一生成物として与えた。最後に、B unit の構築を含む 5 工程の変換により **1** の全合成を達成した (総工程 42 steps, 最長直線工程 23 steps)。

Amycolamicin (**1**), which exhibits potent antibacterial activity, was discovered from the soil actinomycete *Amycolatopsis* sp. MK575-fF5.[1] The challenging molecular architecture of **1** prompted our efforts toward its total synthesis. Herein, we report a convergent total synthesis of **1**. The preparation of **4** was achieved from **2** in 6 steps including an asymmetric reduction and an intramolecular Diels-Alder reaction (**3** → **4**). Glycosylation of **4** with bicyclic *N*,*O*-acetal **6** derived from **5**[2] proceeded in a β-selective manner to provide **7**, which was then converted into **8** in 2 steps. *N*-acylation of **8** with A unit derivative **9** gave β-keto amide **10** stereoconvergently as a single diastereomer. Finally, a five-step sequence involving the formation of the tetramic acid moiety (B unit) completed the first total synthesis of **1**.



1) R. Sawa *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15772-15781.
2) Y. Meguro *et al.*, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7474-7479.

total synthesis, antibiotic, amycolamicin

発表責任者：目黒康洋（yasuhiro.meguro.e6@tohoku.ac.jp）

講演番号：3F09-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

Amphidinin C の合成研究

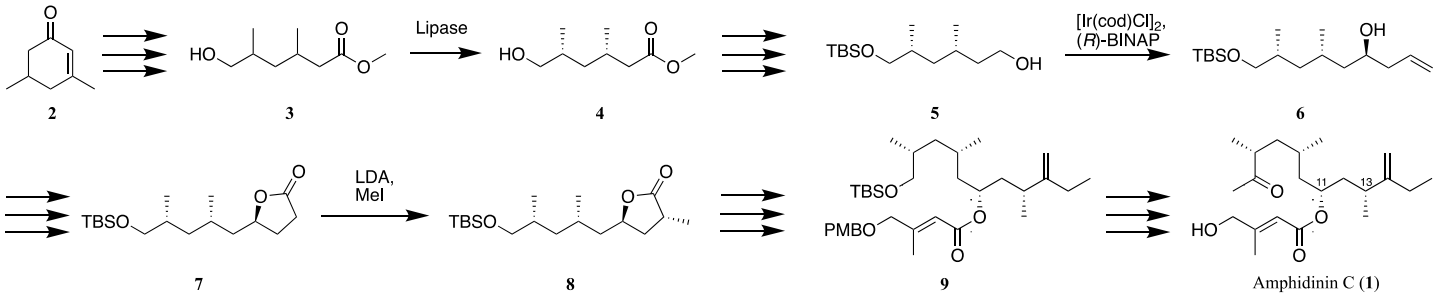
Synthetic studies of amphidinin C

○小野寺 壮太[1]、渡邉 侑李[2]、曽根 実奈美[2]、斉藤 竜男[3]、勝田 亮[3]、石神 健[3]、矢島 新[3]([1]東農大院生命、[2]東農大農、[3]東農大生命)

○Souta ONODERA[1], Yuri WATANABE[2], Minami SONE[2], Tatsuo SAITO[3], Ryo KATSUTA[3], Ken ISHIGAMI[3], Arata YAJIMA[3] ([1]Department of Chemistry for Life Science and Agriculture, Graduate school of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, [2]Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, [3]Department of Chemistry for Life Science and Agriculture, Faculty of Life sciences, Tokyo University of Agriculture)

Amphidinin C (**1**)は小林らによって沖縄県産の海産アコヤガイの体内に生息する薄鞭毛藻 *Amphidinium* sp.から単離された化合物である。Amphidinin C の立体構造の決定と生物活性に関する研究が行われた結果、水虫の原因となる白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* に対して抗菌活性を示すことが明らかとなった。本研究では amphidinin C の不斉合成経路を確立し、続いて誘導体の合成研究を通じて amphidinin 類の構造活性相関に関する知見を得ることを目的とした。

全合成にあたり、まず酵素の光学分割を鍵段階とし、**4** を高収率かつ、高立体選択的に合成することに成功した。また 11 位に該当する不斉炭素は、イリジウム触媒を用いた不斉アリル化反応、次に 13 位に該当する不斉炭素はγ-ラクトンへのジアステレオ選択的アルキル化反応で構築した。現在化合物 **9** の合成に成功しており、これまでの合成研究の結果について報告する。



Amphidinin C (**1**) was isolated by Kobayashi et al. from the dinoflagellate, *Amphidinium* sp., inhabiting the body of the marine pearl oyster, *Pinctada fucata*, from Okinawa, Japan. Amphidinin C has been shown to have antibacterial activity against *Trichophyton mentagrophytes*. This study aimed to establish the asymmetric synthetic pathway of amphidinin C and gain insight into the structure-activity relationship of amphidinins through synthetic studies of its derivatives.

In the total synthesis of amphidinin C, we succeeded in synthesizing hydroxyester **4** in high yield and high stereoselectivity, using the enzymatic kinetic resolution as a key step. The asymmetric carbon at position 11 was constructed by iridium-catalyzed asymmetric allylation, and the asymmetric carbon at position 13 was constructed by diastereoselective alkylation to γ-lactone **7**. We have now succeeded in synthesizing compound **9**, and will report the results of our synthetic studies of amphidinin C.

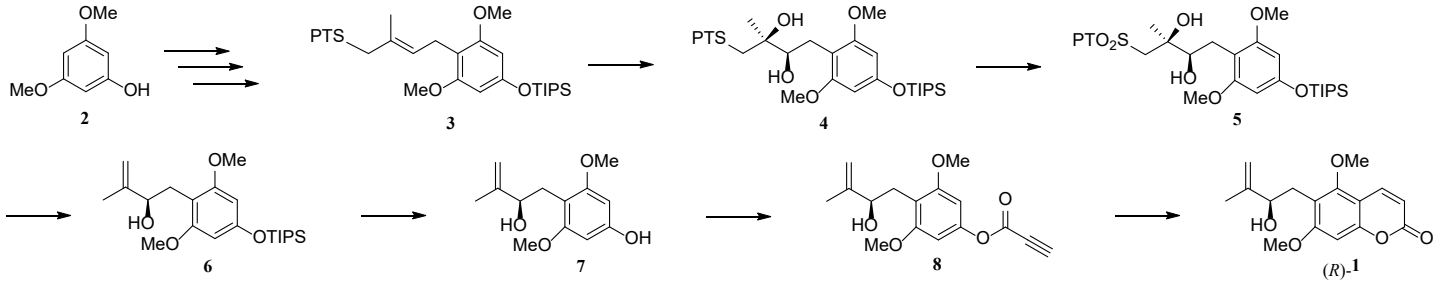
Synthetic studies, Enzymatic resolution, Antibacterial

講演番号：3F09-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

Toddanol の全合成
Total synthesis of toddanol

○中田 浩基[1]、木本 果歩[2]、斉藤 竜男[2]、矢島 新[2] ([1]東農大院生命、[2]東農大生命)
○Hiroki NAKATA[1], Kaho KIMOTO[2], Tatsuo SAITO[2], Arata YAJIMA[2] ([1]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Graduate School of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Faculty of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture)

Toddanol (**1**)は、ミカン科に属する蔓性の有刺低木であるサルカケミカン *Toddalia asiatica* の根皮から単離された化合物である。その類縁体はインスリン抵抗性改善効果があるとの報告があるため、本化合物にも同様の効果が期待されているが、詳細な生物活性は調査されていない。本研究では toddanol (**1**)の全合成を指向し、特徴的な側鎖部分構造の立体選択的構築法の開発と未だ明らかとなっていない天然物の絶対立体配置の決定を行うこと、次に合成品を用いて医薬品リード化合物としての可能性を検討することを研究目的とした。**2** から 5 工程で導いた **3** に対して、Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応および Smiles 転位を鍵反応として用いることで、エナンチオ選択的に toddanol の特徴的な側鎖部分構造の構築を達成した。その後、フェノール **7** の再結晶による光学純度の向上を経て、エステル **8** に導いた後、金触媒を用いたクマリン環形成により toddanol (**1**)の全合成を達成した。合成品と天然物の比旋光度の比較から天然物の絶対立体配置を明らかにした。鏡像異性体や誘導体の合成についても併せて報告する。



Toddanol (**1**) was isolated from the root bark of the Rutaceae, *Toddalia asiatica*. Although its analogs have been reported to be effective in improving insulin resistance, the detailed biological activities of **1** have not been investigated. In this study, we aimed at the total synthesis of toddanol, the determination of the unknown absolute configuration of the natural product, and the investigation of the potential of toddanol as a pharmaceutical lead compound.

The enantioselective construction of the characteristic side chain moiety of toddanol was achieved by using the Sharpless asymmetric dihydroxylation and Smiles rearrangement as key reactions. Subsequently, the total synthesis of toddanol was accomplished by gold-catalyzed coumarin ring formation of **8**. The synthesis of the enantiomer and some derivatives will also be reported.

Total synthesis, Toddalia asiatica, Coumarin

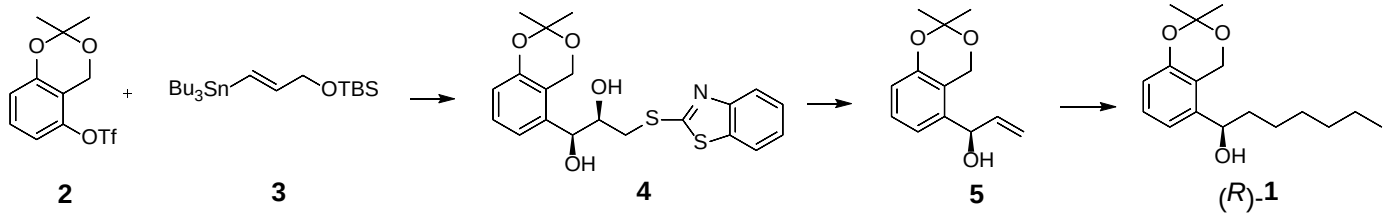
講演番号：3F09-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

Violaceoid D の全合成
Total Synthesis of Violaceoid D

○庄司 篤史[1]、荒井 佑香[2]、淺川 竜輝[3]、斉藤 竜男[2]、倉持 幸司[3]、矢島 新[2]([1]東農大院生命、[2]東農大生命、[3]東理大理工)
○Atsushi SHOJI[1], Yuka ARAI[2], Ryuki ASAKAWA[3], Tatsuo SAITO[2], Kouji KURAMOCHI[3], Arata YAJIMA[2] ([1]Depurtment of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Graduate school of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, [2]Depurtment of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Faculty of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, [3]Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science)

Violaceoid 類は菅原らによって苔と共存する *Aspergillus violaceofuscus* の培養液より単離された化合物群である。その中で violaceoid D (**1**)は、いくつかの白血病細胞株に対して細胞毒性を有することが報告されている。本研究では violaceoid D の不斉合成経路を確立し、不明である天然物の絶対立体配置を決定すること、次に確立した合成法を応用することで側鎖部位に関する誘導体を合成し、構造活性相関に関する知見を得ることを目的とした。

アリールトリフラート **2** とビニルスズ **3** の Stille カップリング、Sharpless 不斉ジヒドロキシル化に続く Smiles 転位反応を鍵段階として鍵中間体 **5** を高立体選択的に合成することに成功した。続いて **5** と交差メタセシス反応により種々の側鎖部位を導入し、violaceoid D 及びいくつかの誘導体の全合成を達成した。合成品と天然物の比旋光度の比較から天然物の絶対立体配置は *R* であることを明らかにした。構造活性相関に関する知見についても合わせて報告する。



Violaceoids were isolated from the culture medium of *Aspergillus violaceofuscus* coexisting with moss. Among them, violaceoid D (**1**) has been reported to be cytotoxic to several leukemia cell lines. This study aimed to establish an asymmetric synthetic route for violaceoid D, determine the absolute configuration of the natural product, and then apply the established synthetic method to synthesize derivatives related to the side chain moiety and gain insight into the structure-activity relationship.

Stille coupling of aryl triflate **2** with vinyltin **3**, followed by Sharpless asymmetric dihydroxylation and Smiles rearrangement, gave the key intermediate **5** in enantiomerically pure form. Subsequently, various side chain moieties were introduced by cross-metathesis reaction with **5**, and the total synthesis of violaceoid D and several derivatives was achieved. Comparison of the specific optical rotation of the synthesized and natural products revealed that the absolute configuration of the natural product is *R*. Results on the structure-activity relationship will also be reported.

Total synthesis, Cross coupling, Cytotoxicity

講演番号：3F09-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

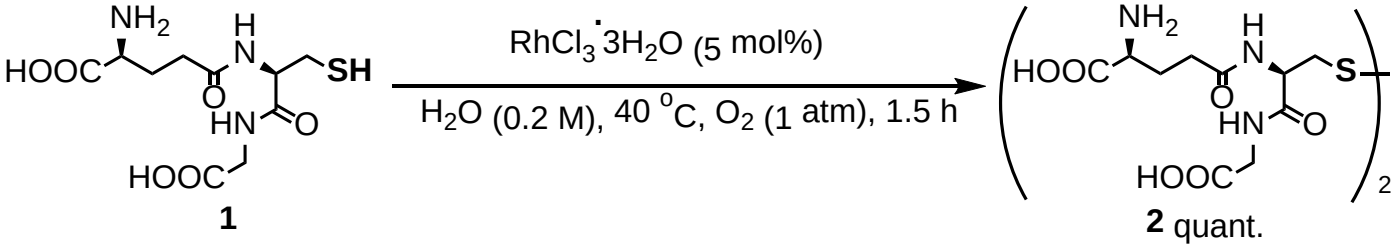
無保護ペプチドチオールのロジウム触媒的水均一系酸素酸化反応

Rhodium-Catalyzed Oxidation of Unprotected Peptide Thiols to Disulfides with Oxygen in Water

○福本 昂平、有澤 美枝子（九大院農）
○Kohei FUKUMOTO, Mieko ARISAWA (Kyushu Univ.)

タンパク質の三次元構造構築に伴う新しい生物機能発現が期待できるため、タンパク質中のチオール基のジスルフィド結合への酸化反応は重要である。ペプチド鎖中のチオール基のみを選択的に酸化する目的で、酸素を利用するロジウム触媒酸化法の開発を行なった。その結果、塩化ロジウム触媒を用いると、酸素雰囲気下水中均一系で、無保護ペプチドチオールをペプチドジスルフィドに酸化できることを見出した。[1)]

$RhCl_3・3H_2O$ (5 mol%) を用いて、酸素 (1 atm) 雰囲気下、無保護の還元型グルタチオン **1** を水 (0.2 M) 中、40 ℃で 1.5 時間反応させたところ、酸化型グルタチオン **2** が定量的に得られた。$RhCl_3・3H_2O$ 触媒の添加が必須である。本法は、1) 入手容易な $RhCl_3$ の利用、2) 触媒の回収再利用が可能、3) 水中均一系反応、4) 常圧の酸素を利用、5) 酸化剤の除去が不要、6) 全アミノ酸残基を利用可能、7) 定量的な酸化、8) 広範な液性 pH 1~10 に適用できる特徴がある。反応機構的には、高反応性のスルフェン酸の生成を伴うことを示す結果を得た。



Disulfides R–S–S–R are an important functional group for the construction of the tertiary structures of peptides and proteins; therefore, oxidation of cysteine group for their disulfide bond formation is an interesting subject. The peptide disulfides are synthesized by rhodium-catalyzed oxidation of unprotected peptide thiols in homogeneous water under an oxygen atmosphere. This method employs oxygen as an oxidizing reagent, and can be used for the oxidation of peptide thiols containing various amino acids.

When this unprotected glutathione (Reduced Form) **1** was reacted in water under an ambient pressure of oxygen (1 atm) in the presence of $RhCl_3・3H_2O$ (5 mol%) at 40 ℃ for 1.5 h, glutathone disulfide **2** was obtained in quantitatively yield. The mechanism involving the formation of unstable sulfenic acid is provided.

1) Arisawa, M.; Fukumoto, K.; Yamaguchi, M. *ACS Catal.*, **2020**, *10*, 15060. Highlighted by *Synfacts*, **2021**, *17*, 347. Selected as Syfacts of The Month.

Rh-catalyzed oxidation, Peptide disulfide, Sulfenic acid

発表責任者：有澤美枝子（arisawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3F09-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

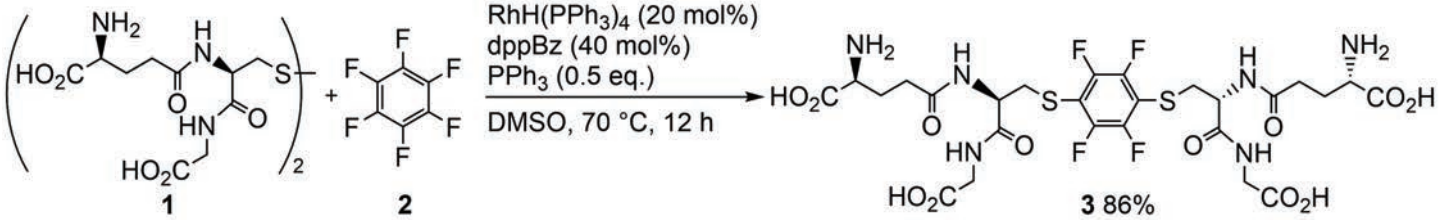
無保護ペプチドジスルフィドへのロジウム触媒アリール基挿入反応

Rhodium-Catalyzed Aryl Insertion Into Unprotected Peptide Disulfides

福本 昂平、○矢崎 雅菜、山田 直隆、有澤 美枝子（九大院農）
Kohei FUKUMOTO, ○Masana YAZAKI, Naotaka YAMADA, Mieko ARISAWA (Kyushu Univ.)

ペプチドジスルフィド S–S 結合間への官能基挿入反応は、タンパク質の三次元構造を損なうことなく化学修飾できる点で有用である。しかし、従来の挿入反応は、ペプチドジスルフィドを還元剤によりチオールに変換した後に実施する二段階反応である。これまでに当研究室では、ロジウム触媒を用いて有機ジスルフィド化合物 S–S 結合間にアリール基を挿入する反応を報告した。[1] 今回、私はロジウム触媒を用いることにより無保護ペプチドジスルフィド S–S 結合間に直接アリール基を挿入する方法を開発した。

$RhH(PPh_3)_4$ 触媒 (20 mol%)、1,2-ビスジフェニルホスフィノベンゼン (dppBz, 40 mol%)、トリフェニルホスフィン (0.5 eq.) 存在下、酸化型グルタチオン **1** とパーフルオロベンゼン **2** (4 eq.) を DMSO 中 70 ℃ で 12 時間反応させると、酸化型グルタチオン S–S 結合間にアリール基が挿入した生成物 **3** が収率 86% で得られた。本法は多様なアミノ酸残基を有する無保護ペプチドジスルフィド[2] に適用可能で、ペプチドジスルフィド S–S 結合を直接アリール化した初めての例である。



The disulfide-bridge is essential in the three-dimensional structure of proteins. Conventional methods for disulfide-bridge modifications involve two-step procedures via reduction of disulfides to thiols followed by nucleophilic reactions. Previously, we reported rhodium-catalyzed substitution reaction of aryl fluorides with disulfides.[1] Based on these backgrounds, rhodium-catalyzed insertion reaction of perfluoroarene to unprotected peptide disulfides was developed.

In the presence of $RhH(PPh_3)_4$ (20 mol%) and 1,2-bis(diphenylphosphino)benzene (dppBz, 40 mol%), oxidized glutathione **1**, hexafluorobenzene **2** (4 equiv.), and PPh_3 (0.5 equiv.) were reacted in DMSO at 70 °C for 12 h giving the corresponding tetrafluoroarene inserted product **3** in 86% yield. The reaction can be applied to unprotected peptide disulfides[2] with various amino acid residues.

1) Arisawa, M.; Suzuki, T.; Ishikawa, T.; Yamaguchi, M. *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, *130*, 12214.
2) Arisawa, M.; Fukumoto, K.; Yamaguchi, M. *ACS Catal*., **2020**, *10*, 15060.

rhodium-catalyzed insertion, peptide disulfide, hexafluorobenzene

発表責任者：有澤美枝子（arisawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3F09-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

ヘキサフェニルヘキサアルシンを用いる環状アザアルシン誘導体のロジウム触媒合成

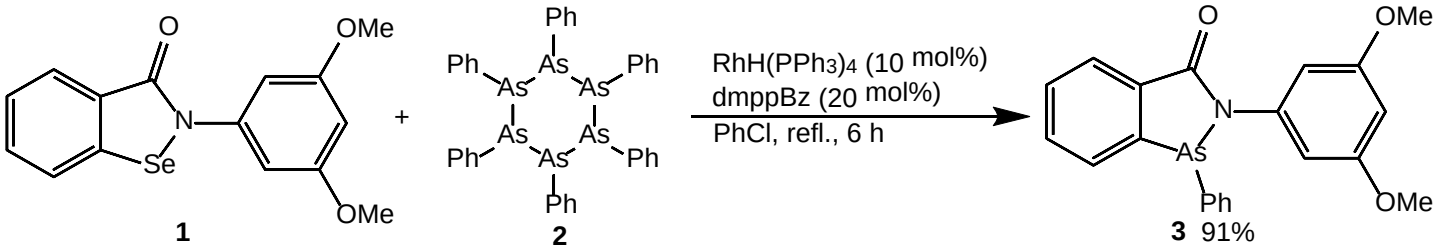
Rhodium-catalyzed synthesis of cyclic azaarsenic derivatives using hexaphenylhexarsane

矢崎 雅菜[1]、○宮本 将志[1]、澤畑 恭佑[1]、大橋 慶一朗[2]、山田 直隆[1]、有澤 美枝子[1] ([1]九大院農、[2]東北大院薬)

Masasna YAZAKI[1], ○ Masashi MIYAMOTO[1], Kyosuke SAWAHATA[1], Keiichiro OHASHI[2], Naotaka YAMADA[1], Mieko ARISAWA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Tohoku Univ.)

有機ヒ素化合物には、医農薬用途および機能性材料としての新機能が期待できる。しかし、多様な有機ヒ素化合物を自在に合成する手段がないために、有用な有機ヒ素化合物の探索研究が進んでいない。今回、抗炎症作用を示すエブセレンに着目し、ロジウム触媒を用いてセレン原子をヒ素原子に置換した環状アザアルシン化合物の合成法を開発した。ここでは、容易に合成が可能なシクロヘキサフェニルアルシン *cyclo*-(AsPh)$_6$ を利用した。

RhH(PPh$_3$)$_4$ 錯体 (10 mol%) と、1,2-ビス(*p*-メトキシフェニル)ホスフィノベンゼン配位子 (dmppBz, 20 mol%) 存在下、3,5-ジメトキシフェニル基を有するエブセレン **1** と *cyclo*-(AsPh)$_6$ **2** (1/6 equiv.) をクロロベンゼン中 6 時間加熱還流すると、**1** 中のセレン原子がフェニルアルシニル基 (PhAs-) に置換された環状アザアルシン誘導体 **3** を収率 91% で与えた。収率よく生成物 **3** が得られたことから、**2** 中の 6 つの PhAs 基は全て効率的に反応に利用される。



Organoarsenic compounds are expected to be useful for novel drugs, pesticides, and materials. However, these compounds are quite rare, because efficient and versatile synthetic method has not been known. Rhodium-catalyzed synthesis of cyclic azaarsenic derivatives was conducted using ebselen, which has an anti-inflammatory effect. In this reaction, an easy-to-handle 1,2,3,4,5,6-hexaphenylhexarsane *cyclo*-(AsPh)$_6$ **2** was used as an arsenic reagent, which exchanged AsPh group with the selenium atom in ebselens.

When 2-(3,5-dimethoxyphenyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one **1** was reacted with *cyclo*-(AsPh)$_6$ **2** (1/6 eq.) in the presence of RhH(PPh$_3$)$_4$ (10 mol%) and dmppBz (20 mol%) in refluxing chlorobenzene for 6 h, cyclic azaarsenic product **3** was obtained in 91% yield. It was noted that six PhAs groups of **2** were effectively exchanged with the selenium atom in **1**.

hexaphenyl hexarsane, rhodium-catalysis, cyclic azaarsenic compounds

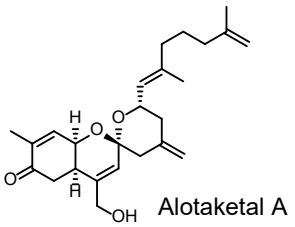
発表責任者：有澤美枝子（arisawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3F09-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

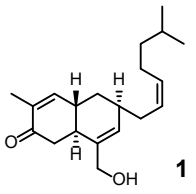
アロタケタール類のトランスデカリン型単純化アナログの合成と PKC 結合活性

Synthesis and PKC binding of a *trans*-decalin type-simplified analogue of alotaketals

○眞木 準平[1]、押村 亜沙美[1]、塚野 千尋[1]、柳田 亮[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]香川大農)
○Jumpei MAKI[1], Asami OSHIMURA[1], Chihiro TSUKANO[1], Ryo C. YANAGITA[2], Kazuhiro IRIE[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ.)



プロテインキナーゼ C (PKC) を標的とした医薬品開発は、抗がん剤、抗アルツハイマー病薬、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染症治療薬として精力的に検討されている。しかしながら、8 種の PKC アイソザイムを区別できる PKC リガンドの開発が困難であることから、炎症などの好ましくない作用を抑制することが難しく、医薬品への応用は限定的である。この課題を解決するためには、PKC リガンドになりうる新規骨格の探索が有効である。最近、榊原教授（慶大理工）および齋藤博士（産総研）との共同研究により開発された機械学習モデルと、当研究グループの PKC 結合ドメインに関する知見[1)] に基づく絞り込みから、海綿由来天然物であるアロタケタール A[2)] が新規骨格を有する PKC リガンドと推定した。



まず、アロタケタール類の基本骨格が PKC リガンドとして機能することを確認するため、スピロケタール酸素原子を炭素原子に置換したデカリン型単純化アナログ **1** を設計した。縮環部は、PKCδ-C1B ドメインとのドッキングシミュレーションならびに合成の難易度に鑑み、天然物とは異なるトランス型とした。このアナログ **1** を、(*R*)-carvone を出発原料として最長直線工程数 21 段階で合成した。本発表では、これらの合成と PKC 結合能について報告する。

Protein kinase C (PKC) is one of the targets of drug discovery for refractory diseases, such as cancers, Alzheimer's disease, and HIV-1 infection disease. It is, however, difficult to discover PKC ligands which have PKC isozyme selectivity which might suppress undesired effects such as inflammation. To overcome this problem, it is a pressing need to search for new skeletons of PKC ligands. Recently, we speculated that alotaketal A could be a PKC ligand with a new skeleton by our pharmacophore knowledge and a machine learning model in collaboration with Professor Sakakibara (Keio Univ.) and Dr. Saito (AIST).

We designed and synthesized a simplified analog of alotaketal A, a decalin type analogue **1**, on the basis of the docking simulation against PKCδ-C1B domain. We accomplished the synthesis of **1** from (*R*)-carvone by 21 steps (longest linear steps). The synthetic route and PKC isozyme binding ability of **1** will be reported.

1) Irie, K. and Yanagita, R. C., *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 251–267; Irie, K. *et al., Chem. Rec.* **2005**, *5*, 185–195.
2) Forestieri, R. *et al.*, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5166–5169.

protein kinase C, alotaketals, organic synthesis

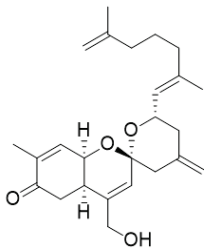
発表責任者：入江一浩（irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3F09-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

アロタケタール類のシスピラン環型単純化アナログの合成と PKC 結合活性

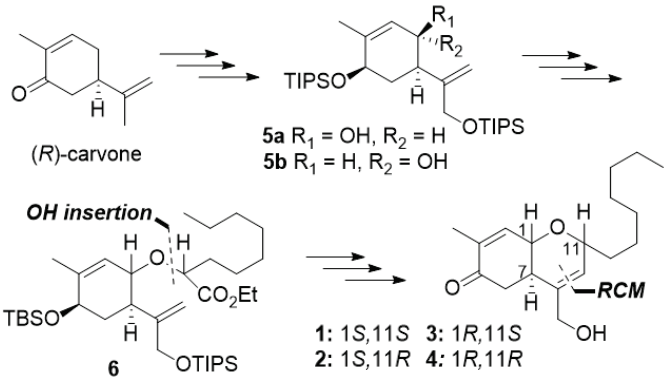
Synthesis and PKC binding of a *cis*-pyran type-simplified analogue of alotaketals

○奥田 創元[1]、塚野 千尋[1]、柳田 亮[2]、入江 一浩[1] ([1]京大農、[2]香川大農)
○Sogen OKUDA[1], Chihiro TSUKANO[1], Ryo YANAGITA[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ.)



当研究グループでは、新規骨格をもつプロテインキナーゼ (PKC) 活性化剤候補化合物として、海綿由来アロタケタール類に着目し、その構造最適化に取り組んでいる。本研究ではアロタケタール A[1)]のスピロケタール構造のピラン環、ならびにその縮環部の立体化学の重要性について明らかにするため、単純化アナログ **1** ～ **4** を設計した。これらの PKC アイソザイム結合選択性を評価することにより、アロタケタール類の構造簡略化による新規 PKC 活性化剤の創出を目指した。

まず、アナログ **1 ~ 4** の系統的な合成経路について、種々検討した。その結果、(*R*)-カルボンより合成した化合物 **5a** または **5b** に対し、金属カルベノイドの OH 挿入により化合物 **6** とし、閉環メタセシスを含む数工程でピラン環を構築することに成功した。本発表では、アナログ **1 ~ 4** の合成およびそれらの PKC アイソザイム結合能について報告する。



Alotaketals, isolated from a marine sponge *Hemigera* sp., are structurally characterized by a tricyclic skeleton containing [6.6] spiroketal moiety. We focused on these natural products as potential protein kinase C (PKC) activators with novel skeletons. Pyran-type simplified analogs **1** ~ **4** were designed to disclose the importance of the pyran-ring and stereochemistry of the adjacent condensed-ring of alotaketal A [1)] on the PKC-binding ability.

The synthesis of analogs **1** ~ **4** started from (*R*)-carvone. The pyran ring was successfully constructed through OH insertion of a metal carbenoid into compounds **5a** and **5b,** followed by ring-closing metathesis. The synthetic procedure and the PKC-binding ability of **1** ~ **4** will be reported.

1) Forestieri, R. *et al*., *Org.Lett.* **2009**, *11*, 5166–5169.

Protein Kinase C, Alotaketal, AIDS

発表責任者：入江一浩（irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.ac.jp）

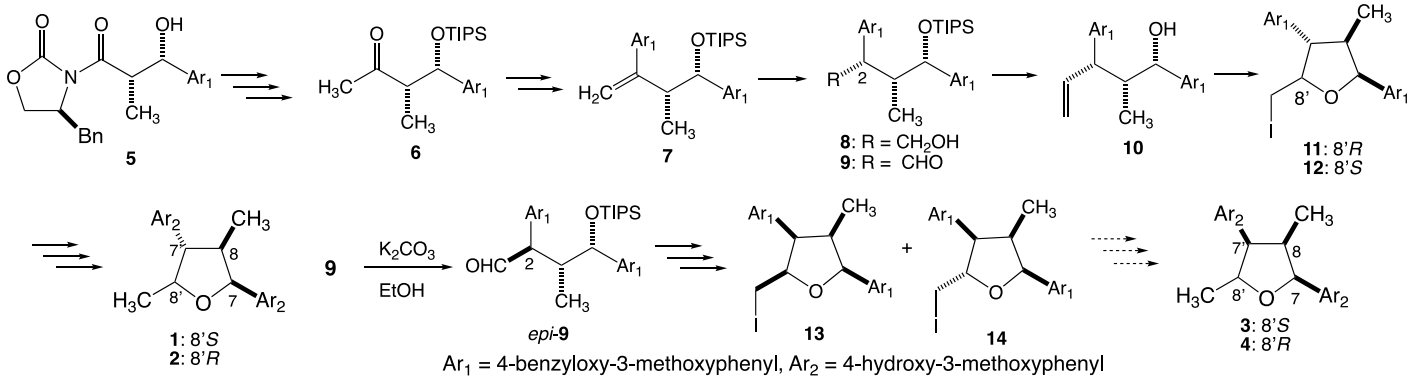
講演番号：3F09-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

４置換テトラヒドロフラン型リグナンである 7,8'-epoxy-8,7'-neolignan の立体異性体の合成

Syntheses of stereoisomers of tetra-substituted tetrahydrofuran lignan, 7,8'-epoxy-8,7'-neolignan

○田中 美葉、西脇 寿、山内 聡 (愛大院農)
○Miyo Tanaka, Hisashi Nishiwaki, Satoshi Yamauchi (Ehime Univ.)

細胞毒性、植物生長調節活性、抗かび活性が期待される、7,8'-epoxy-8,7'-neolignan の立体異性体の生物活性の比較を行う事を目的として合成研究を行なった。Evans の *syn* アルドール縮合物 **5** からメチルケトン **6** を経てスチレン誘導体 **7** へ変換後、BH_3・SMe_2 との反応を行うと立体選択的に１級アルコール **8** が得られた。SO_3・Pyr 酸化によりアルデヒド **9** とし、Wittig 反応、脱シリル化により **10** を得た。次に、CH_3CN 中でヨードエーテル化を行うと立体異性体 **11** のみが得られ、THF 中で行うと立体異性体 **11** と共に **12** が得られた。それぞれの $NaBH_4$ 還元、脱ベンジル化によって立体異性体 **1** 及び **2** を得た。アルデヒド **9** の 2 位のエピ化を利用した **13**, **14** への変換後、 **3**, **4** の合成を目指している。



The syntheses of stereoisomers of 7,8'-epoxy-8,7'-neolignan, which are expected as cytotoxic, plant growth regulatory, and antifungal compounds, were attempted. To obtain the stereoisomers **1**-**4**, Evans's *syn*-aldol product **5** was selected as a starting material. The conversion to **6** was achieved by reductive cleavage of chiral auxiliary, oxidation, reaction with CH_3MgBr, and oxidation. The reaction with 4-benzyloxy-3-methoxyphenyllithium, followed by dehydroxylation gave alkene **7**. The stereoselective hydroboration to **7** was achieved, giving primary alcohol **8**. The alkene **10** was obtained by the oxidation of **8** to aldehyde **9**, followed by Wittig reaction. The exposure of **10** to iodoetherification in MeCN gave **11** as a single stereoisomer. On the other hand, iodoetherification of **10** in THF gave **11** along with **12**. The stereoisomers **11** and **12** were converted to 7,8'-epoxy-8,7'-neolignan **1** and **2**, respectively. After the epimerization of **9**, conversions to iodide **13** and **14** were successful, respectively. The stereoisomers **3** and **4** would be provided from **13** and **14**, respectively.

lignan, neolignan, tetrahydrofuran lignan

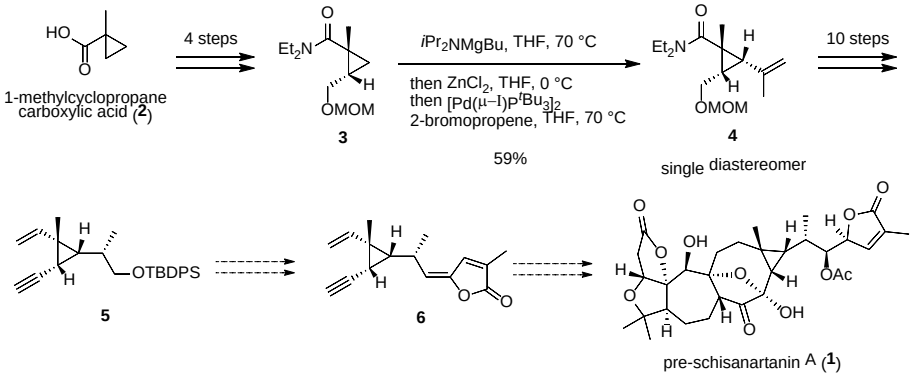
発表責任者：田中　美葉（mi4.au26@gmail.com）

講演番号：3F09-12
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム F

Pre-schisanartanin A の右側フラグメント合成
Synthesis of the right-hand fragment of pre-schisanartanin A

○八木田 凌太郎、入江 一浩、塚野 千尋（京大農）
○Ryotaro YAGITA, Kazuhiro IRIE, Chihiro TSUKANO (Kyoto Univ.)

Pre-schisanartanin A (**1**) は, 2007 年に Sun らによって朝鮮五味子 *Schisandra chinensis* より単離されたノルトリテルペノイドであり，抗 HIV 活性が報告されている (EC_{50} = 13.81 μg/ mL).[1] 構造的特徴としては 3, 5, 7, 8 員環が縮環した新奇五環性骨格と，シクロプロパン環の主鎖置換基が同一面に位置している全シス置換シクロプロパン構造が挙げられる．我々はその特異な構造と生物活性に興味をもち **1** の全合成研究に着手し，左半分の合成を報告した.[2] 全合成にあたって，**1** の歪んだ 3 員環構造を，アミドを配向基とする立体選択的メタル化を鍵とした根岸カップリング反応により構築することを計画した.[3] 市販の **2** から 4 工程で **3** を合成し，**3** を根岸カップリング反応条件に供したところ，単一のジアステレオマーとして全シス置換シクロプロパン **4** が得られた． 続く 10 工程でアルキン **5** へと誘導し，現在，ラクトン部位を導入した **6** への変換を検討している．本発表では，全シス置換シクロプロパン **4** の合成と続く **6** への誘導の詳細を説明する．



Pre-schisanartanin A (**1**), which belongs to *Schisandra* nortriterpenoid, was isolated from *Schisandra chinensis* by Sun and coworkers in 2007.[1] Its structure is characterized by a novel pentacyclic skeleton with a 3-5-7-8-membered ring system and an all-*cis* substituted cyclopropane, where the main chain substituents are located on the same face. It demonstrates anti-HIV activity with an EC_{50} = 13.81 μg/mL. We have started the total synthesis of **1** because of its unique skeleton and important biological activity, and reported the synthesis of the left-hand fragment of **1**.[2] We have succeeded in the synthesis of all-*cis* substituted cyclopropane **4** through stereocontrolled metalation of cyclopropanecarboxamide **3** followed by Negishi coupling with 2-bromopropene.[3] Herein, we will present a detail of the synthesis of **4** and further transformation toward compound **6**, the right-hand fragment of **1**.

1) Huang, S. X. *et al., Org. Lett.* **2007**, *9*, 2079. 2) Yagita, R. *et al., Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 4269.
3) Yasui, M. *et al., Org. Lett.* **2018**, *20*, 7656.

total synthesis, triterpene, anti-HIV activity

発表責任者：塚野　千尋（tsukano.chihiro.2w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G01-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

糖類の摂取が尿中グルコース排泄量に与える影響の解析

Study on the effect by sugar intake on urinary glucose excretion.

○岡田 和花、佐藤 洸希、大川 咲希、大崎 雄介、駒井 三千夫、白川 仁（東北大・院農・栄養学）
○ Waka OKADA, Koki SATO, Saki OHKAWA, Yusuke OHSAKI, Michio KOMAI, Hitoshi SHIRAKAWA (Lab. Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【背景】近年、グルコース-ナトリウム共輸送体 2 の阻害によって腎臓でのグルコース再吸収を阻害し、尿中への排泄を促進することにより血糖のコントロールを改善させる糖尿病治療薬が上市されている。我々はこれまでに、正常および糖尿病モデルラットへのガラクトース添加飼料の給餌が尿中グルコース排泄を増加させることを明らかとしている。今回我々は、ラットにおいて他の糖類の摂取が尿中グルコース排泄に及ぼす影響を明らかとするために以下の検討を行った。
【方法】4 週齢の Wistar 系ラットにコントロール飼料、ならびに 10%グルコース、ガラクトース、フルクトース、マンノース添加飼料を与えて 3 日間の飼育を行った。また、試験飼料の影響を除くために 6 時間絶食させた別のラットにグルコース溶液またはガラクトース溶液を経口投与(1.5 g/匹)した。それぞれ、代謝ケージにより 24 時間尿を回収し、尿中グルコース排泄量を測定した。
【結果】飼料中に添加した糖類の中では、ガラクトースのみが尿中グルコース排泄量増加作用を有していた。ガラクトースの単回経口投与は有意に尿中グルコース排泄を上昇させた一方で、グルコース溶液投与では尿中グルコース排泄の上昇を認めなかった。
【結論】今回検討した糖類の中では、ガラクトースだけが尿中グルコース排泄量増加作用を示した。

[Background] We have found that dietary galactose supplementation may increase urinary glucose excretion in normal and diabetic rats, but the detailed mechanism has not been elucidated. This study was conducted to clarify the effect of other sugar intakes on urinary glucose excretion.
[Methods] Male Wistar rats were fed a control diet or diets supplemented with 10% glucose, galactose, fructose, or mannose for 3 days. Glucose or galactose solutions were orally administered to other Wistar rats to avoid the effects of dietary intake. Rats were placed in a metabolic cage for 24 hours and urine was collected to evaluate urinary glucose extraction.
[Results] Dietary galactose supplementation significantly increased urinary glucose excretion compared to a control diet. Other sugar supplements did not increase urinary glucose excretion. A single oral dose of galactose solution significantly increased urinary glucose excretion compared to glucose administration.
[Conclusion] Galactose administration may increase urinary glucose extraction, while the other sugars investigated in this study did not increase urinary glucose excretion.

urinary glucose excretion, galactose, sugars

発表責任者：白川仁（shirakah@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G01-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

片側腎うっ血モデルに対するピリドキサミン投与の影響の解析

Study on the effect of pyridoxamine administration on a unilateral renal congestion model

○小堀 涼[1]、大崎 雄介[1]、内田 朝理[1]、森 建文[2]、白川 仁[1]([1]東北大・院農・栄養学、[2]東北医科薬科大・医・腎内)
○ RYO KOBORI[1], YUSUKE OHSAKI[1], ASATO UCHIDA[1], TAKEFUMI MORI[2], HITOSHI SHIRAKAWA[1] ([1]Lab Nutrition, Dept. of agricultural science, Tohoku Univ., [2]Tohoku medical and pharmaceutical univ.)

【背景】うっ血性心不全による腎機能低下・腎障害機序の一つとして、虚血により誘導されるカルボニルストレスの関与が示唆されているが、十分には解明されていない。本検討では、カルボニルストレスを消去するとの報告があるピリドキサミンを腎うっ血モデルラットに投与することにより、カルボニルストレスの消去が腎静脈血流のうっ滞により誘導される腎障害に与える影響の解明を試みた。
【方法】Wistar 系雄性ラットの左腎静脈を麻酔下にて内空幅 0.20 mm のシルバークリップにより狭窄させ、片側腎うっ血モデルとした。術後、コントロール群には蒸留水を、ピリドキサミン群にはピリドキサミン(100 mg/kg bw/day)を連日経口投与し、2 週間の飼育を行った。試験期間終了時に左右腎を摘出して、腎皮質領域の障害マーカーを RT-PCR 法により評価した。
【結果】うっ血腎では対側のコントロール腎と比較して尿細管障害マーカーであるオステオポンチン mRNA 発現量が有意に上昇し、この発現量上昇はピリドキサミン投与により有意に抑制された。腎間質線維化マーカーであるフィブロネクチン(FN) mRNA 発現量も、腎うっ血により有意に上昇し、ピリドキサミン投与により有意に低下した。
【結論】ピリドキサミンの投与は腎うっ血により生じる腎障害を改善する可能性が示された。
[Background] Carbonyl stress has been suggested as one of the mechanisms of renal injury caused by congestive heart failure, which is not fully elucidated. In this study, we attempted to elucidate the effect of carbonyl stress reduction on renal injury caused by renal venous congestion by administering pyridoxamine, which has been reported to scavenge carbonyl stress, to renal congestion model rats. **[Methods]** The left renal veins of Wistar male rats were occluded with a silver clip (0.20 mm inner space width) to prepare a model of unilateral renal congestion under anesthesia. Distilled water or pyridoxamine (100 mg/kg bw/day) were administered for 2 weeks, then the left and right kidneys were removed and the mRNA expression of renal injury markers were evaluated by RT-PCR. **[Results]** Expression levels of osteopontin (OPN) mRNA, a marker of renal tubular injury, were significantly increased in the congested (left) kidney compared to the control (right) kidney. Pyridoxamine treatment significantly reduced OPN mRNA expression level in the congested kidney compared to distilled water treatment. Renal congestion also significantly increased one of renal interstitial fibrosis marker, fibronectin, mRNA expression, which was attenuated by pyridoxamine treatment. **[Conclusion]** These results indicate that pyridoxamine treatment could attenuate renal injury induced by renal congestion.

renal congestion, renal injury, pyridoxamine

発表責任者：大崎雄介（yusuke.ohsaki.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G01-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

フルクトース誘導 *in vitro* モデル系を用いた非アルコール性脂肪肝を予防する食品成分の探索及び解析

Search and analysis of food components that prevent non-alcoholic fatty liver disease using a fructose-induced *in vitro* model system

○太田 晴佳[1]、波津 優花[1]、本松 由衣[2]、薩 秀夫[2]（[1]前橋工大院工、[2]前橋工大工）
○Haruka OTA[1], Yuka HAZU[1], Yui MOTOMATSU[2], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. Technol.)

【目的】近年食の欧米化による肥満やメタボリックシンドロームに伴い、アルコール性脂肪肝に類似した症状である非アルコール性脂肪肝（NAFLD）の患者数が増加している。NAFLD は肝硬変や肝細胞がんへと悪化するリスクがあることから、NAFLD の段階で食品成分による予防が期待される。本研究では、フルクトースによる新規 *in vitro* NAFLD モデル系を用いて NAFLD の予防が期待される食品成分の探索・解析を進めることとした。
【方法・結果】24well plate に培養したヒト肝モデル HepG2 細胞に食品成分のみを含んだ培地を添加し 3 時間インキュベート後、フルクトースと食品成分を含む培地を添加しさらに 3 時間インキュベートした。その後 RNA 抽出、cDNA 合成後、real-time PCR で TNF-α など炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定することで、フルクトースによる炎症性サイトカイン mRNA 発現亢進を抑制する食品成分を探索した。その結果、フルクトース添加によって HepG2 細胞における TNF-α の mRNA 発現が亢進されたが、その亢進は、Luteolin などいくつかのフィトケミカルによって抑制された。現在、抑制作用のみられたフィトケミカルについて、さらに解析を進めている。
[Objectives] In recent years, the number of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is a symptom similar to alcoholic fatty liver disease, has been increasing due to obesity and metabolic syndrome caused by westernization of the diet. Since NAFLD has a risk of worsening to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, the prevention of NAFLD by food components is expected. In this study, we searched for and analyzed food components which could suppress NAFLD, using a novel fructose-based *in vitro* NAFLD model system.
[Methods and Results] Human hepatic HepG2 cells on 24 well plates were incubated for 3 hours in a medium containing only food components. The cells were then incubated for another 3 hours in a medium containing fructose and food components. After RNA extraction and cDNA synthesis, the mRNA expression level of inflammatory cytokines such as TNF-α was measured by real-time PCR to search for food components that suppress the increase in inflammatory cytokines induced by fructose. The results showed that fructose increased mRNA expression of TNF-α in HepG2 cells, but this increase was suppressed by several phytochemicals such as luteolin. The phytochemicals that showed suppressive effects are now being further analyzed.

nafld, fructose, flavonoid

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3G01-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

腸管における胆汁酸輸送機作の解析

The Mechanism of Intestinal Bile Acid Absorption System

○高島 優季[1]、宮脇 里奈[1]、荻原 琢男[2]、三坂 巧[1]、小林 彰子[1] ([1]東大農、[2]高崎健大薬)
○ Yuki TAKASHIMA[1], Rina MIYAWAKI[1], Takuo OGIWARA[2], Takumi MISAKA[1], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Takasaki Univ.)

【背景】　腸管に分泌された胆汁酸の 95%は小腸下部に発現する Apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)によって再吸収され、肝臓で再利用される。この再吸収機構の解明は体内コレステロール恒常性調節を明らかにする上で重要である。胆汁酸の主成分はタウロコール酸（TC）及びグリココール酸（GC）である。しかし、今までの胆汁酸の輸送を扱った研究では主に TC が用いられており、GC の腸管における吸収特性は解析されていなかった。そこで本研究では、ヒト腸管 ASBT における TC と GC の吸収特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】　ヒト腸管上皮吸収モデル Caco-2 細胞及びトランスフェクションにより hASBT を過剰発現させた COS-7 細胞を用いて、[^{3}H]-TC 及び[^{3}H]-GC の取り込みを測定した。濃度依存性試験を行い、非線形最小二乗法により *Km* 及び *Vmax* 等のパラメーターを算出した。また、Caco-2 細胞での輸送におけるナトリウム依存性を評価した。
【結果及び考察】　Caco-2 細胞では TC、GC 共にナトリウム依存型の吸収特性を示した。ASBT はナトリウム共輸送型トランスポーターであることから、Caco-2 細胞における TC 及び GC の取り込みは ASBT が担うと判断した。Caco-2 細胞および hASBT 過剰発現細胞におけるこれらの取り込みは飽和し、典型的なトランスポーター輸送機作を示した。Km 値から、ASBT に対する親和性は TC > GC であり、実際の腸管においても GC より TC の方が多く取り込まれていることが推定された。ASBT における TC 及び GC の親和性を速度論的に解析し、比較したのは本研究が初めてである。

Over 95% of intestinal bile acid is reabsorbed though the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) in the terminal ileum, and returned to the liver (enterohepatic circulation). The elucidation of the system is important in understanding cholesterol homeostasis. Although bile acids include taurocholic acid (TC) and glycocholic acid (GC), the transport mechanism of GC has not been fully clarified compared to TC. Thus, this study investigated the absorption mechanism of GC using Caco-2 cells as a human intestinal epithelium model and COS-7 cells overexpressing hASBT. Since both TC and GC were absorbed in a sodium-dependent manner, they were considered mainly to be absorbed through ASBT. Furthermore, the bile acid concentration-dependent uptake assay revealed that the affinity to ASBT was higher in TC than in GC.

glycocholic acid, taurocholic acid, apical sodium-dependent bile acid transporter

発表責任者：小林彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3G01-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

安定同位体標識によるトリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の解明

Elucidation of absorption and metabolism of triacylglycerol hydroperoxide by stable isotope labeling

○高橋 巧[1]、加藤 俊治[1]、伊藤 隼哉[1]、吉永 和明[2]、桐明 絢[3]、後藤 直宏[4]、仲川 清隆[1]([1]東北大、[2]福島大、[3]秋田大、[4]東京海洋大)
○Takumi TAKAHASHI[1], Shunji KATO[1], Junya ITO[1], Kazuaki YOSHINAGA[2], Aya YOSHINAGA-KIRIAKE[3], Naohiro GOTOH[4], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Fukushima Univ., [3]Akita Univ., [4]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology)

【緒言】食品に含まれる脂質の大部分はトリアシルグリセロール（TG）であり、TG が酸化されると、酸化一次生成物である TG ヒドロペルオキシド（TGOOH）となる。過去に我々は HPLC-MS/MS を用いて、未開封の市販食用油脂中にも微量の TGOOH が含まれることを明らかにした[1]。故に、ヒトは食事を通じて TGOOH を日常的に摂取していると推察でき、その吸収代謝に興味が持たれている。こうした背景の下、我々はごく最近、普段の食事に含まれる程度（0.01% w/w TG）の TGOOH をラットに与え、その後の生体試料から TGOOH を初めて検出した。この結果から、摂取した TGOOH の一部が腸管吸収された可能性、あるいは、TGOOH とともに含まれていた未酸化の TG が腸管吸収時に酸化され、TGOOH となった可能性が想定された[2]。したがって、TGOOH の吸収代謝を解明するためには、投与したものと、TG の生体内酸化で生じ得るものとを区別して測定することが重要と考えられた。そこで本研究では、安定同位体標識（重水素：D_2）TGOOH を合成し、それをラットに与え、生体試料を HPLC-MS/MS で分析することで、TGOOH の吸収代謝解明を目指した。

【方法・結果】既報[3]を応用し、D_2-トリオレオイルグリセロールヒドロペルオキシド（OO-D_2-(HpOME)-TG）の標準品（OOH 基位置、*cis-trans* および αβ 異性体から成る 12 種）を合成した。これを 0.01% w/w TG となるようトリオレオイルグリセロール（OOO-TG）に添加し、タウロコール酸 Na とアルブミンを含む水溶液を加え、超音波処理し、エマルションを調製した。胸管リンパカニュレーション手術を施した Sprague-Dawley 系ラット（n=7）の胃にエマルションを投与し（20 nmol OO-D_2-(HpOME)-TG）、胸管からリンパ液を回収した。リンパ液を HPLC-MS/MS で分析した結果、OO-D_2-(HpOME)-TG は殆ど検出されなかったため（定量下限 0.5-10 fmol）、摂取した TGOOH はそのままの形では腸管吸収されないことが示唆された。対して、OOO-TG の酸化物にあたる OO-(HpOME)-TG の異性体（とくに、OO-(9-HpOME)-TG および OO-(10-HpOME)-TG）がリンパ液から明瞭に検出され、生体内での TG の酸化（即ち、TGOOH の生体内生成）が示唆された。興味深いことに、TG の酸化はラジカルや一重項酸素（$^1O_2$）等によって開始されるが、リンパ液から検出された TGOOH 異性体はいずれも $^1O_2$ 酸化産物であった。この背景として、摂取物（TGOOH あるいは TG）が $^1O_2$ 産生機構の一つである免疫応答（好中球浸潤等）を誘発させた可能性が考えられ、現在その検証を進めている。

[1] Kato, S., *et al*., *npj Science of Food,* 2 (2018), [2] Keewan, E. *et al. Antioxidants*, 9(10) (2020), [3] Yoshinaga, K. *et al., Anal Chem*, 92(13) (2020)

To elucidate the absorption/metabolism of triacylglycerol hydroperoxide (TGOOH), a lipid emulsion containing TG added with newly synthesized deuterium-labeled TGOOH was administered to lymph-cannulated rats. Analysis of the collected lymph fluid implied that TGOOH itself was not absorbed *in vivo*, but rather suggested that peroxidation of TG could occur during intestinal absorption.

Triacylglycerol hydroperoxide, Stable isotope labeling, HPLC-MS/MS

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G01-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

かぼすヘキサン抽出物は分化脂肪細胞 3T3-L1 での脂肪滴蓄積を抑制する
Hexane extract of Citrus sphaerocarpa suppresses the accumulation of lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes
○生野 彰宏[1]、辻 威彦[2]、早川 琢也[1,2,3]、籠谷 和弘[2,3]、勝崎 裕隆[1]、竹林 慎一郎[1]、奥村 克純[1]([1]三重大生資、[2]辻製油株式会社、[3]辻 H&B サイエンス研究室)
○ Akihiro Ikuno[1], Takehiko Tsuji[2], Takuya Hayakawa[1,2,3], Kazuhiro Kagotani[2,3], Hirotaka Katsuzaki[1], Shin-ichiro Takebayashi[1], Katsuzumi Okumura[1] ([1]Mie Univ., [2]Tsuji Oil Mills Co., Ltd., [3]Tsuji Health & Beauty Science Laboratory)

肥満は高血圧や糖尿病を引き起こす深刻な基礎代謝疾患であり、今後も増加が危惧されている。様々な医療的な肥満の治療も進められているが、食生活を基本とした肥満の改善や予防が望まれる。

本研究では、柑橘類のヘキサン抽出物の抗肥満作用について、前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化誘導系を用いて細胞内の脂肪滴の蓄積を評価した。その結果、ゆずやすだち抽出物と異なり、かぼすヘキサン抽出物(CSHE)が濃度依存的に脂肪滴の蓄積を抑制した。

さらに、CSHE の抗肥満作用に関連する遺伝子やメカニズムの解明と関連する成分の探索を行った。RNA-Seq 法によって、CSHE は脂肪細胞の分化と共通する 1180 遺伝子の発現に影響を及ぼした。

また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて、CSHE を分画したところ、ヘキサン：エタノール= 9：1 (v / v)の溶出画分に活性を示す成分が含まれていることが明らかとなった。この画分について LC/MS 解析を行った結果、水酸基をもつポリメトキシフラボン類(PMFs)が検出された。先行研究も合わせて、本研究の結果から、抗肥満を示す柑橘類の成分は主に PMFs であり、その中でもヒドロキシル化されたものが特に強い影響を与える可能性があると考えた。

This study demonstrated that the hexane extract of *Citrus sphaerocarpa* (CSHE) suppresses the accumulation of lipid droplets in a dose-dependent manner using 3T3-L1 adipocytes. Furthermore, RNA-Seq analysis showed that CSHE treatment affected the expression of the 1180 genes, which are common to adipocytes differentiation. Gene expression information proposed that adipogenesis may be suppressed by CSHE treatment, because Glycolysis/Gluconeogenesis and *β*-oxidation were down and up regulated, respectively, via Insulin, PI3K/Akt, PKA/AMPK, and Glucagon signaling pathways. In addition, the elution fraction of *n*-hexane: ethanol = 9:1 (v/v) from CSHE using silica gel column chromatography contained active components. As a result of LC/MS analysis, we estimated that this fraction contains polymethoxyflavones (PMFs) with hydroxyl groups. From the results of this study, together with previous studies, we considered that the components of citrus fruits showing anti-obesity are mainly PMFs, and among them, hydroxylated ones may have a particularly strong effect.

Obesity, *Citrus sphaerocarpa*, Hydroxylated polymethoxyflavones

発表責任者：奥村克純（katsu@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3G01-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

ゆずポリフェノールの NAFLD 予防機能の解明

Elucidation of preventive function of NAFLD by Yuzu polyphenol

○米山 拓良、長田 恭一（明治大農）
○Takurou YONEYAMA, Kyoichi OSADA (Meiji Univ.)

【背景】ゆずに多く含まれているナリンジンは、抗酸化作用、脂質代謝改善作用、糖代謝改善作用などを持つ機能性成分であり、NAFLD を予防する可能性がある。そこで本研究では、NAFLD モデルラットを作成し、NAFLD モデルラットに対するゆずポリフェノール（YPP）の NAFLD 予防機能を検討した。
【方法】実験①：4 週齢 Wistar 系雄性ラットに AIN76 基準食（C 群）、5%casein-果糖食（LP 群）、LP 食＋1%YPP 添加食（LPY 群）を 10 日間与え、成長パラメータ、脂質代謝パラメータ、肝機能パラメータを解析した。実験②：4 週齢 Wistar 系雄性ラットに AIN76 基準食（N 群）、メチオニンコリン非添加 10%casein 及びラード-果糖添加食（P、Y 群）を 2 週間与え、成長パラメータ、脂質パラメータ、肝機能パラメータを解析した。なお、Y 群には毎日 200 mg の YPP を胃内強制投与した。
【結果、考察】実験①：C 群と比べて LP 群は肝臓重量及び肝臓トリアシルグリセロール（TG）レベルが有意に増加したが、実際の NAFLD 症状とは異なり、体重の減少が認められた。また、YPP 摂食により、腎周囲脂肪重量が有意に減少したが、肝障害、肝臓重量及び肝臓 TG レベルに有意差はみられなかった。この原因は混餌法の為、ナリンジン摂取によって総摂食量が減少したことが影響したと考えられた。そこで、実験②では、体重減少を抑制するために飼料中の casein の割合を 5%から 10%に増加し、10%のラードを添加した。さらに、メチオニンコリンを含まないビタミン混合物を用いて NAFLD モデル食として使用した。また、YPP は 0.5%CMC に溶解してゾンデ管を用いて胃内強制投与を行った。実験②：N 群と比べて P 群の AST および LDH 活性値は有意に増大したが、P 群と比べて Y 群の各活性値は有意に低下した。さらに、P 群と比べて Y 群の血漿総コレステロールレベルが有意に減少した。以上の結果から、YPP は肝臓保護効果があると考えられる。現在、そのメカニズムを解明するため、炎症関連因子の遺伝子発現およびタンパク質レベルを解析中である。

In this study, we examined the preventive function of NAFLD by Yuzu polyphenol (YPP) in NAFLD model rats. Rats were fed diet contained 10% casein, lard and fructose without methionine and choline. Liver function parameter was improved by administration of 200mg of YPP daily. Therefore, YPP may have a hepatoprotective effect.

NAFLD, naringin, liver function

講演番号：3G01-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

アルクチゲニンとノビレチンの併用による相乗的抗肥満作用の検証

Study on the synergistic anti-obesity effects induced by the combination of arctigenin and nobiletin

○与儀 彪[1]、岩崎 公典[2]、屋 宏典[2] ([1]琉大農、[2]琉大熱)
○Takeshi YOGI[1], Hironori IWASAKI[2], Hirosuke OKU[2] ([1]Dep. of Agr, Univ. of the Ryukyus, [2]TBRC Univ. of the Ryukyus)

当研究室ではこれまでArctigenin(ARC)とNobiletin(NOB)の併用による相乗的な抗腫瘍活性についての研究を進めてきた。その結果 ARC と NOB の併用は細胞毒性を伴わない栄養代謝抑制を誘導することを明らかにした。そこで本研究では、ARC、NOB 併用による栄養代謝制御を抗肥満作用へ応用することを目的とした。

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を脂肪細胞に分化させる過程における ARC＋NOB の影響を評価した。3T3-L1 の処理期間のうち、プレインキュベーション（Pre)、分化誘導期間（Dif)、成熟期間（Mnt）において段階的に ARC＋NOB 処理を施し、蛍光指示薬による脂肪蓄積量の測定を行った。また、全期間処理した 3T3-L1 細胞についてはリアルタイム PCR により分化誘導マーカーを定量した。

脂肪蓄積抑制において ARC＋NOB は Dif の期間に作用させることが必須条件であることが示された。この結果から、ARC＋NOB は脂肪細胞への分化を抑制していることが強く示唆された。また、Pre と Mnt における処理も分化誘導に補助的に作用しており、栄養代謝抑制が間接的に分化誘導に影響している可能性も示唆された。分化マーカーの結果からは、ARC、NOB の併用は脂肪細胞への分化を抑制していることが示された。今回の結果により、ARC と NOB の併用は脂肪細胞の栄養代謝あるいは分化を抑制することで、予防的な抗肥満作用を示すことが期待された。

We have been studying the synergistic anti-tumor activity of Arctigenin (ARC) and Nobiletin (NOB) in combination. These are nutrient metabolism inhibitors without cytotoxicity. In the present study, we aimed to apply the regulation of nutrient metabolism by the combined use of ARC and NOB to anti-obesity activity.

We evaluated the effect of ARC+NOB on the differentiation process of 3T3-L1 pre-adipocytes. 1) Pre-incubation, 2) Differentiation, and 3) Maintenance of 3T3-L1 were treated with ARC and NOB step by step, and the fat accumulation was measured.

The results suggest that ARC+NOB treatment is essential for the inhibition of fat accumulation during differentiation, and that inhibition of nutrient metabolism may indirectly affect differentiation induction. ARC and NOB may exert a preventive anti-obesity effect by inhibiting adipocyte nutrient metabolism or differentiation.

anti-obesity, phytochemical, combination

発表責任者：岩崎　公典（hiwasaki@comb.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3G01-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

発酵茶による抗酸化機能及び脂質と糖質吸収阻害作用の比較

Antioxidant effect and inhibitive activities of lipids or carbohydrate absorption from intestine by fermented teas

○新藤 万里、塚田 明日香、畔上 優太、西出 夏来沙、長田 恭一 (明治大農)
○Mari SHINDO, Asuka TUKADA, Yuta AZEGAMI, Nagisa NISHIDE, Kyoichi OSADA (Meiji Univ.)

(背景・目的) 烏龍茶等の発酵茶は肥満予防あるいは糖尿病予防作用を示すことが報告されているが、発酵段階の異なる発酵茶の機能性を同条件下で比較した研究はほとんどない。本研究では、異なる発酵茶を同条件下で in vitro、ex vivo、さらに、in vivo で種々の機能性を比較することを目的とした。
(実験方法) In vitro では、高濃度にポリフェノールを含む黒茶、紅茶、烏龍茶及び白茶を調製し、脂質のミセル形成阻害活性、α グルコシダーゼ、α アミラーゼ阻害活性及びリパーゼ阻害活性を調べた。また、反転腸管法による脂質と糖の吸収抑制作用を調べた。動物試験は、4 週齢の Wistar 系雄性ラットに AIN76 基準食に 10%ラードを加えた食事（C 群）、基準食に 10%ラードを加えた食事にカテキン相当濃度が 0.1（前半 2 週間）あるいは 0.2%（後半 2 週間）の未精製の白茶（W 群）、烏龍茶（O 群）、紅茶（B 群）、黒茶（P 群）を添加した食事を与えて 4 週間飼育し、成長パラメータ、血漿と肝臓の脂質代謝パラメータ、血糖値、糞中の炭水化物排泄量等を測定した。
(結果) in vivo では、各発酵茶は濃度依存的に脂質のミセル形成を阻害し、また、α グルコシダーゼと α アミラーゼの活性、ならびにリパーゼ活性阻害作用を発揮した。反転腸管法では、トリアシルグリセロール（TG）吸収レベルが対照と比較して白茶、烏龍茶、紅茶及び黒茶を小腸内容液に添加すると有意に低くなった。一方、グルコース吸収レベルは、対照と比較して紅茶と白茶を添加すると有意に低くなった。動物試験では、肝臓脂質パラメータについては、TG レベルが C 群と比較して B 群で減少傾向となった。血漿脂質パラメータは、総コレステロールレベルが C 群と比較して B 群で有意に減少し、W 群で減少傾向となった。血糖値レベルは、C 群と比較して P 群で減少傾向となった。現在、他のパラメータを解析中である。
(考察) in vivo 及び ex vivo での結果から、各発酵茶には脂質と糖の吸収を抑制する作用があることが示された。一方、動物試験では前者等の強い機能性は現在のところ認められていない。今後は、各発酵茶を個々に摂取濃度を変えて投与し、個別に機能性を検証したいと考えている。

Antioxidant effect and inhibitive activities of lipids or carbohydrate absorption from intestine by fermented teas including white tea, oolong tea, black tea and pu'er tea were examined in this study. Each tea inhibited micelle formation of lipids and activities of glycolytic enzyme or lipase in vitro. However, these observations were not clearly shown in animal experiment.

Fermented tea, Lipid absorption, Carbohydrate digestion

講演番号：3G01-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム G

フキノトウ抽出物の血糖値上昇抑制成分の同定および定量

The active components in the extract of Japanese butterbur (*Petasites japonicus*) for suppressing postprandial blood glucose elevation in mice

○近藤（比江森） 美樹[1]、山口 真帆[1]、春木 優菜[1]、新居 美香[2] ([1]徳島文理大、[2]徳農技セ)
○Miki Hiemori-Kondo[1], Maho Yamaguchi[1], Yuuna Haruki[1], Mika Nii[2] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]Tokushima Agric. Fores. Fishes. Tec Support. Cent.)

【目的】フキの花蕾であるフキノトウの 80%エタノール抽出物は、糖負荷後の血糖値の上昇を抑制する。本研究は、その有効成分を単離・同定し、さらに、花蕾、葉柄、および葉に含まれる有効成分を定量することを目的とした。

【方法】フキノトウの凍結乾燥・粉砕試料から 80%エタノールを用いて成分を抽出し、濃縮乾固後、蒸留水に再溶解したものをフキノトウ抽出物とした。次いで、抽出物を酢酸エチルおよびブタノールで順次分画し、溶媒除去後、スクロース（2 g/kg BW）とともに雄性 ICR マウス（6 週令, n=5）に経口投与し、糖負荷後 120 分までの血糖値を経時的に測定した。糖のみを負荷した対照群と比較して血糖値の上昇が抑制された画分を HPLC 分析に供し、含有成分を標準物質との比較から同定した。また、それら成分の α-glucosidase 阻害活性を測定した。さらに、花蕾、葉柄、および葉から 80%エタノールを用いて成分を抽出し、有効成分の含有量を HPLC により測定した。

【結果および考察】フキノトウエキスに含まれる血糖値上昇抑制成分として、5-*O*-caffeoylquinic acid, fukinolic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid を同定した。このうち、caffeoylquinic acid 類は既知の血糖値上昇抑制成分であるが、fukinolic acid の抑制効果は初めての報告である。また、花蕾および葉は、葉柄に対して 4 倍量の有効成分を含むことが明らかになり、花蕾に加えて廃棄されることの多い葉に高い利用価値があることを示した。

The extract of *Petasites japonicus* buds suppresses the elevation of postprandial blood glucose in mice. In this study, the active compounds in the extract were investigated and identified. Moreover, the active components in buds, stems, and leaves were quantified. The 80% ethanol extract of the buds was fractionated with ethyl acetate and then butanol, and those fractions were administered to ICR mice simultaneously with sucrose. The components in the fractions that suppressed the elevation in blood glucose levels were identified by HPLC and MS/MS analysis. Moreover, the inhibitory effects of the components on α-glucosidase activity were examined using sucrose and maltose as substrates. The active components were 5-*O*-caffeoylquinic acid, fukinolic acid, and 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid. The contents of active components in flower buds and leaves were 4 times higher than those in stems. This is the first report on the suppressive effect of fukinolic acid on the elevation of blood glucose levels. These findings show that extracts obtained from flower buds and leaves of *P. japonicus* help to maintain glycemic control in cases of hyperglycemia.

Petasites japonicus, postprandial blood glucose level, fukinolic acid

講演番号：3G03-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

乳酸の経口摂取は ROS 産生を介して UCP1 発現を誘導する

Administration of lactate induces UCP1 expression via ROS production

○江崎 菜々、稲葉 美咲、津田 孝範（中部大院・応生）
○Nana ESAKI, Misaki INABA, Takanori TSUDA (Chubu Univ.)

乳酸は糖分解に伴い産生し、エネルギー源や糖新生の前駆体、さらにシグナル分子として多様な機能の発現に関与すると考えられている。演者らは、アミノ酸混合物の摂取と運動の併用は鼠径部白色脂肪組織（iWAT）において褐色脂肪細胞化を誘導するが、この誘導には血漿乳酸濃度の上昇が関与することを見出した [1]。この背景から乳酸を経口摂取すれば、同様の効果が得られるのではないか、さらに運動と同等の恩恵も得られるのではないかと考えた。この検証のため C57BL/6J マウスに乳酸を 4 週間経口摂取させた。その結果、iWAT において褐色脂肪細胞化に特徴的な多房化が顕著に認められ、UCP1 および乳酸脱水素酵素 B の発現レベルは有意に上昇した。この機構としてミトコンドリアでの ROS 産生が UCP1 を誘導することが報告されていることから [2, 3]、乳酸の投与と ROS 産生について検討した。乳酸を脂肪細胞へ投与すると ROS 産生と UCP1 発現は有意に上昇した。しかしながら抗酸化剤（NAC）の投与による ROS の消去は UCP1 の発現誘導を有意に低下させた。以上の結果から乳酸は経口摂取することで ROS 産生を増加させ、UCP1 の発現を誘導すると考えられた。現在、さらにこの経路に関与する分子の挙動に加えて、運動と乳酸摂取を併用した場合についても併せて検討中である。

[1] *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 67: 225–233 (2021)., [2] *Diabetes* 65: 2639–2651 (2016).
[3] *J. Biol. Chem.* 291: 7754–7766 (2016).

Lactate is produced during glycolysis and is thought to be involved in the expression of various functions as an energy source, a precursor of glycogenesis, and a signaling molecule. We found that the combined intake of amino acid mixture and exercise significantly induced beige adipocytes formation in inguinal white adipose tissue (iWAT), and this induction was associated with significant elevation of plasma lactate concentration [1]. Based on this background, we hypothesized that oral intake of lactate would produce similar effects and also provide exercise-mediated various benefits. To verify this, we orally administered lactate to mice for 4 weeks. As a result, oral administered lactate significantly induced UCP1 and lactate dehydrogenase B expression in iWAT. Several reports demonstrated that ROS production in mitochondria induces UCP1 expression [2, 3]. Administration of lactate to adipocytes resulted significant increase in ROS production and UCP1 expression. However, co-administration of antioxidant (NAC) decreased in the induction of UCP1 expression. These results suggest that oral intake of lactate induces UCP1 expression via ROS production.

lactate, UCP1, adipocyte

講演番号：3G03-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

大豆タンパク質（β-コングリシニン）摂取と運動の併用による褐色脂肪細胞化誘導と FGF21 発現
Combination of β-conglycinin and exercise induces beige adipocyte formation in mice.

○加藤 暉士、北村 泰聖、津田 孝範（中部大院・応生）
○Teruto KATOU, Taisei KITAMURA, Takanori TSUDA (Chubu Univ.)

大豆タンパク質の生理機能については、国内外で多様な報告がある。東京大をはじめとする研究グループは、マウスにおいてタンパク質源をすべて大豆タンパク質（β-コングリシニン ; β-Con）に置き換えた食餌の摂取は体脂肪蓄積を抑制し、この効果には FGF21 の発現誘導が関わること、さらにこの誘導と食餌中のメチオニン量の関連を報告している [1, 2]。この背景を踏まえて本研究では、運動と β-Con 摂取を併用すれば、多用な効果（褐色脂肪細胞化誘導）が得られるのではないかと考え、この点を検証することを目的とした。はじめに C57BL/6J マウスの食餌中の β-Con 添加量を検討し、タンパク質源として必要なミルクカゼインの半分を β-Con に置き換えた食餌（50β-Con）群では、褐色脂肪細胞化の誘導は認められないことを確認した。次にこの 50β-Con 食摂取と運動を併用した時の褐色脂肪細胞化誘導を検証した。その結果、50β-Con 食と運動の併用群では、鼠径部白色脂肪組織の UCP1 発現を相乗的に上昇させ、さらに血漿 FGF21 濃度も併用群で相乗的に上昇した。タンパク質源をすべて大豆タンパク質のみで賄うことは現実的に食事では困難な場合もあるため、50β-Con 食摂取と運動の併用がさらに多様な効果が得られるのかを検討する必要がある。現在、各組織での FGF21 発現レベルと UCP1 の誘導への関与、さらに他の関連分子について検討を行っている。

[1] *大豆たん白質研究* 18: 12–16 (2015)., [2] *Sci. Rep.* 6: 28183 (2016).

A research group led by the University of Tokyo reported that dietary replacement of all protein sources with soy protein (β-conglycinin; β-Con) significantly suppressed body fat accumulation and induction of FGF21 expression in mice. Furthermore, the induction of FGF21 expression was associated with amount of methionine content in β-Con diet [1, 2]. Based on this background, we hypothesized that the combination of exercise and intake of β-Con would induce beige adipocyte formation. First, we confirmed that no induction of beige adipocyte formation in inguinal adipose tissue (iWAT) was observed in mice fed the 50β-Con diet (diet in which half of the casein was replaced by β-Con). The combination of exercise and intake of 50β-Con diet synergistically induced beige adipocyte formation in iWAT, and also synergistically increased plasma FGF21 concentration. The expression level of FGF21 in the relevant tissues and its involvement in the induction of UCP1 is now under investigation.

β-conglycinin, UCP1, exercise

講演番号：3G03-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

フェルラ酸の褐色脂肪細胞化誘導とシクロデキストリン包接化による生体内吸収性の向上

Dietary ferulic acid induces beige adipocyte formation and the effect of cyclodextrin-complex ferulic acid on bioavailability in mice.

○田中 純平、山下 紗那、津田 孝範（中部大・応生）
○Jumpei TANAKA, Sana YAMASHITA, Takanori TSUDA (Chubu Univ.)

フェルラ酸（FA）は小麦粒に豊富に存在し、米ぬかにもオリザノールの形で含有する成分である。FA は水難溶性で生体内吸収性が低いことが知られているものの、FA の摂取は体脂肪蓄積を抑制するとの報告がある [1, 2]。しかしその機構は不明である。この背景から、FA の体脂肪蓄積抑制は褐色脂肪細胞化の誘導から説明できるのではないか、さらに水溶性と生体内吸収性を高めた素材であれば、低用量でも FA の機能発現が可能ではないかと考えた。C57BL/6J マウスへ FA を含む餌を 4 週間摂取させると鼠径部白色脂肪組織（iWAT）に褐色脂肪細胞化に特徴的な多房化が認められ、UCP1 発現レベルは有意に上昇した。次に FA の水溶性と生体内吸収性を改善するために、シクロデキストリン（CD）で包接化した FA（CD-FA）を用いて、マウスへの経口単回投与後の生体内吸収性を非包接化 FA と比較した。その結果 CD-FA 群では、非包接化 FA 群と比較して有意に投与後の FA の血漿濃度および iWAT への移行が上昇した。現在、CD-FA を用いれば低用量の FA でも褐色脂肪細胞化が誘導されるのかを検討中である。

[1] *PLoS One* 10: e0118135 (2015). , [2] *J. Agric. Food Chem.* 67: 4250–4258 (2019).

Ferulic acid (FA) is abundantly present in wheat grains and rice bran. It has various physiological functions, and has been reported that administration of FA significantly suppressed accumulation of body fat [1, 2], but the molecular mechanism remains unclear. In the present study, we investigated whether the suppression of body fat accumulation by FA can be explained by the induction of beige adipocyte formation, and formulation of highly water soluble and bioavailable FA can effectively induce beige adipocyte formation even at low doses. Mice fed FA-supplemented diet resulted in significant beige UCP1 induction in inguinal white adipose tissue (iWAT). Administration of cyclodextrin (CD)-complex FA (CD-FA) significantly increased in plasma and iWAT concentration of FA compared with that of native FA. We are investigating whether CD-FA can induce beige adipocyte formation even at low doses of FA.

ferulic acid, UCP1, cyclodextrin

講演番号：3G03-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

合成メラニンおよびイカスミによる白色脂肪細胞分化抑制の機序解析

Analysis of the inhibitory effect of white adipose differentiation by synthetic melanin and squid ink.

○川本 善之[1]、古橋 由唯[1]、武田 湖州恵[1]、吉川 祐人[2]、高村 佳明[3]、上野 有紀[4] ([1]中部大生命健康科学、[2]株式会社タイショーテクノス、[3]日本葉緑素株式会社、[4]愛知学院大心身科学)
○Yoshiyuki KAWAMOTO[1], Yui FURUHASHI[1], Kozue TAKEDA[1], Yuto YOSHIKAWA[2], Yoshiaki TAKAMURA[3], Yuki UENO[4] ([1]Chubu Univ., [2]TAISHO TECHNOS Co., Ltd., [3]JAPAN CHLORPHYLL Co,.Ltd, [4]Aichi Gakuin Univ.)

白色脂肪細胞は肥満など多くの疾患に関与している。我々は合成メラニンがマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化を強く抑制することを見出した。分化誘導刺激剤と同時にメラニンを投与すると、C/EBP-α、PPAR-γの処理濃度依存的な発現低下が認められ、細胞内脂肪滴の形成が有意に抑制された。分化誘導初期に一過的に発現される Cyclin D タイプの発現を調べた結果、Cyclin D1 の発現応答が極めて抑制されていることが見出された。従って、メラニンによる脂肪細胞分化抑制には、Mitotic clonal expansion(MCE)機構の抑制が関与していることが考えられた。またイカスミ（イカ墨）には多量のメラニンが含有されるが、合成メラニン同様、3T3-L1 の分化を抑制し、より微粒子化処理したイカスミはさらに強く分化を抑制した。さらに高脂肪食モデルマウスにおいてメラニンを経口投与した結果、増大した脂肪組織の抑制および体重増加の有意な抑制効果が見られた。
以上の結果から、メラニンおよびメラニン源は脂肪細胞分化の抑制を介して、抗肥満効果に寄与する可能性が示された。

White adipocytes involved in many diseases such as obesity. We found that a synthetic melanin strongly suppressed the differentiation of murine 3T3-L1 preadipocytes. When melanin was treated together with differentiation-inducing agents (insulin, dexamethasone, IBMX), the expression of C/EBP-α, PPAR-γ and the formation of intracellular lipid droplets was significantly suppressed depending on the treatment concentration of melanin. Among the Cyclin D-type, which are transiently expressed in the early stage of differentiation, Cyclin D1 was strongly suppressed. Therefore, it was considered that the suppression of adipocyte differentiation by melanin is involved in the suppression of the Mitotic clonal expansion (MCE) mechanism. In addition, squid ink, in which a large amount of melanin was contained, also suppressed the differentiation of 3T3-L1 like synthetic melanin, and the squid ink treated with micronized particles further suppressed the differentiation. Moreover, oral administration of melanin in high-fat diet model mice showed a significant inhibitory effect on increased adipose tissue and weight gain.
These results indicate that melanin and melanin sources may contribute to anti-obesity effects through suppression of adipocyte differentiation.

melanin, ikasumi, adipocyte

発表責任者：川本善之（ykawa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3G03-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

ガジュツ（*Curcuma zedoaria*）50%メタノール抽出物の 3T3-L1 細胞に対する分化促進作用

Curcuma zedoaria 50% methanol extracts promotes adipocyte differentiation in 3T3-L1 Cells

○山崎 一諒、栗山 磯子、細川 敬三（兵庫大学）
○Kazuaki Yamasaki, Isoko Kuriyama, Keizo Hosokawa (Hyogo Univ.)

【背景・目的】糖尿病や動脈硬化症等、多くの生活習慣病は内臓脂肪型肥満とそれに伴う慢性的な炎症・インスリン抵抗性によって引き起こされる。ガジュツ（*Curcuma zedoaria*）は紫ウコンとも呼ばれ、クルクミン類を含まない特徴的なウコン属である。本研究では、抗肥満素材としてのガジュツの有用性を検討するため、ガジュツが脂肪モデル細胞 3T3-L1 の分化に及ぼす影響を評価した。
【方法】ガジュツは国産の乾燥粉末を購入した。ガジュツ乾燥粉末は 50%メタノールを用いて抽出し、ろ過後、減圧濃縮、凍結乾燥により粗抽出物を得た。3T3-L1 脂肪前駆細胞は定法に従い分化誘導・促進して成熟 3T3-L1 脂肪細胞とした。分化誘導および促進時に、細胞毒性を示さない濃度（10、100、200 μg/mL）でガジュツ抽出物を添加した場合の脂質蓄積量、グリセロール 3-リン酸脱水素酵素（GPDH）活性、培養液中のグルコース残存量、培養液中へのアディポネクチン分泌量を評価した。
【結果・考察】3T3-L1 細胞の脂質蓄積量は、ガジュツ抽出物の添加量に依存して増加した（脂質蓄積量（%）：100.0±35.7、117.6±36.2、199.9±33.4、236.3±30.9（非添加群、10 μg/mL-、100 μg/mL-、200 μg/mL 添加群））。脂質合成活性の指標である GPDH 活性についても、ガジュツ抽出物添加群で亢進していた。分化誘導から 7 日目の培養液中のグルコース残存量はガジュツ抽出物添加群で低く、細胞への糖取り込みの亢進が示唆された。さらに抗炎症・インスリン抵抗性改善作用を示すアディポネクチンの培養液中への分泌量は、ガジュツ抽出物添加群で高かった。これらの結果は、日々の食生活による肥満や生活習慣病の予防・改善にガジュツが有用である可能性を示している。

Curcuma zedoaria, also called gajutsu, is a characteristic curcuma genus that does not contain a curcuminoid. In order to clarify the utility of the *C. zedoaria* for anti-obesity material, we determined the effect of *C. zedoaria* 50% methanol extracts (CZe.) on the differentiation of 3T3-L1 cells. TG accumulation in 3T3-L1 cells was enhanced by the addition of CZe. during differentiation, and this tendency was depending on the CZe. concentration. Also, enhancing GPDH activity was confirmed the cells treated with CZe. In addition, a decrease in glucose concentration and an increase in secretion of adiponectin were observed in the culture medium of CZe. treated groups. The present results indicate that the *C. zedoaria* may useful for prevention and improvement of obesity and subsequent lifestyle-related diseases such as diabetes, and atherosclerosis

Curcuma zedoaria, 3T3-L1, Lifestyle-related diseases

講演番号：3G03-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

メタボローム解析による代謝物一斉評価系を用いたトマトに含まれるアディポネクチン様活性化合物の探索

Comprehensive screening for adiponectin-like compounds in tomato using activity-based metabolite evaluation system with non-targeted metabolite analysis

○毛利 晋輔[1]、高橋 春弥[1]、坂井 麻衣子[1]、脇 尚子[2]、高橋 慎吾[2]、相澤 宏一[2]、菅沼 大行[2]、荒武[1]、真鍋 祐樹[1]、菅原 達也[1]、松村 康生[1]、柴田 大輔[1]、後藤 剛[1]、河田 照雄[1]([1]京大院農、[2]カゴメ・イノベーション本部)

○ Shinsuke MOHRI[1], Haruya TAKAHASHI[1], Maiko SAKAI[1], Naoko WAKI[2], Shingo TAKAHASHI[2], Koichi AIZAWA[2], Hiroyuki SUGANUMA[2], Takeshi ARA[1], Yuki MANABE[1], Tatsuya SUGAWARA[1], Yasuki MATSUMURA[1], Daisuke SHIBATA[1], Tsuyoshi GOTO[1], Teruo KAWADA[1] ([1]Agric., Kyoto Univ., [2]Innovation Division, KAGOME CO., LTD.,)

アディポネクチン(Ad)は、アディポネクチン受容体(AdipoR)を介した AMPK リン酸化により、血糖値の改善等に寄与するアディポカインであるが、肥満時の血中濃度低下が報告されている。そのため、Ad 様活性を有する食品成分は、肥満に伴う糖代謝異常の改善に寄与し得る。本研究では、メタボローム解析とバイオアッセイ系の融合により構築した代謝物一斉評価法を用いて、トマトに含まれる Ad 様活性化合物の探索を試みた。

メタボローム解析により、トマトから 721 成分を推定した。メタボローム解析と同分析条件で得た HPLC 分画物の Ad 様活性として、AdipoR 依存的な AMPK リン酸化亢進について、培養細胞及び *AdipoR1* siRNA を用いて評価した。得られた成分情報と Ad 様活性について、溶出時間を基準とした紐づけを行うことで、トマトに含まれる成分を一斉評価し、最終的に 4 つのカロテノイドを Ad 様活性化合物として同定した。同定カロテノイドは、AdipoR 下流シグナルとして AMPK リン酸化を亢進させ、この亢進は *AdipoR1* siRNA 処理、Ca^{2+}キレート及び CaMKK 阻害剤処理により抑制された。また、当該化合物は、ACC, p38 リン酸化及び *AdipoR1* 依存的な糖取り込み能も亢進させた。加えて、*cis-trans* 異性体における構造活性相関について検討したところ、同定カロテノイドの *cis* 異性体は、all-*trans* 体より AMPK リン酸化を強く亢進させた。

Adiponectin (Ad), an adipokine, regulates glucose metabolism via the adiponectin receptor (AdipoR). Ad activates AMPK by their phosphorylation, thereby modulating glucose metabolism. Previous studies have shown that the plasma levels of Ad are reduced in obesity. Accordingly, screening for Ad-like compound including food represents a valuable approach for the treatment of glucose metabolism disorder in obesity.

In this study, we searched Ad-like compounds in tomato. By integrating the activity of HPLC fractions on AMPK phosphorylation and the 721 metabolites (metabolomic data) based on their retention times of liquid chromatography, we identified four carotenoids as Ad-like compounds. The identified carotenoids induced AMPK phosphorylation through AdipoR, Ca^{2+} influx and CaMKK, in addition to glucose uptake via AdipoR. Additionally, the identified carotenoids caused an increase in ACC and p38 phosphorylation. All the observed activities are characteristic of Ad. Furthermore, the AMPK phosphorylation activity of *cis-trans* isomers of identified carotenoids was determined to explore their structure-activity relationships for Ad-like biological activity. *Cis*-isomers of carotenoids were favoured as Ad mimetics.

adiponectin, carotenoid, metabolomics

講演番号：3G03-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

加齢に伴う油脂摂取に対する感受性変化と長鎖脂肪酸受容体シグナル
Nutritional signaling via dietary fat sensing receptor GPR40 and GPR120 with aging
○森本 深玖[1]、宮本 潤基[1]、田邉 はるか[2]、五十嵐 美樹[1]、木村 郁夫[1,2] ([1]東農工大農、[2]京大生命科学)
○ Miku MORIMOTO[1], Junki MIYAMOTO[1], Haruka TANABE[2], Miki IGARASHI[1], Ikuo KIMURA[1,2] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Kyoto Univ.)

生体の代謝恒常性維持に重要な栄養シグナルは、加齢に伴って減衰することが知られており、加齢を起因とする代謝性疾患の一因である可能性が考えられる。従って、栄養センシングやそのシグナル伝達経路を明らかにすることは加齢関連疾患の予防法や治療法の開発に必要不可欠である。特に G タンパク質共役受容体の一つである長鎖脂肪酸受容体の GPR40 と GPR120 は、食用油を構成する長鎖脂肪酸の感知に関わることが知られており、油脂摂取を介したインスリン分泌制御により、生体エネルギー恒常性維持に重要な役割を果たしている。そこで本研究では、加齢に伴う長鎖脂肪酸受容体の機能変化が代謝恒常性に与える影響を調べることを目的として、野生型および長鎖脂肪酸受容体遺伝子欠損の若齢マウスと加齢マウスにおける油脂摂取時の代謝機能変化について検討を行った。結果、加齢時特異的にみられる油脂摂取に対する応答性変化が、野生型マウスと比較して、いずれの欠損マウスにおいても異なることを確認した。従って、加齢に伴う栄養センシングの変化が長鎖脂肪酸受容体を介して、代謝恒常性に影響を及ぼすことが示唆された。今後、更なる研究によって、高齢者における食用油に対する感受性低下回復、そして健康増進や寿命延伸の実現に繋がる知見の提供が期待される。

Nutritional signaling plays important roles in maintain of energy homeostasis. However, the response, which is gradually attenuated along with aging, leads to various chronic diseases including metabolic disorder such as obesity and type 2 diabetes. Long-chain fatty acid (LCFA) receptor GPR40 and GPR120, as dietary fat sensing receptors, promotes insulin and gut hormone secretion through dietary fat intake, and thereby maintaining energy homeostasis. Here, we investigated influence of dietary fat and LCFA receptors on energy homeostasis with aging by using GPR40- or GPR120-deficient mice and performing comparison between young and aged mice under short-term high-fat diet (HFD) feeding. We found that each of GPR40- and GPR120-deficient aged mice exhibited different age-related metabolic phenotypes compared with wild-type aged mice under HFD-feeding. These results may provide the novel insight for the further understanding of the molecular mechanism between diet, nutrition, and aging, and contribute to preventive and preemptive medicine.

aging, dietary fat, GPCRs

講演番号：3G03-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

中鎖脂肪酸油の質の違いによる代謝機能変化を制御する脂肪酸受容体 GPR84

Energy regulation via medium-chain fatty acid receptor GPR84 by MCTs intake

○野仲 葉月[1]、北野(大植) 隆司[2]、増島 侑紀[2]、五十嵐 美樹[1]、木村 郁夫[1,2] ([1]東農工大農、[2]京大生命科学)

○ Hazuki NONAKA[1], Ryuji OHUE-KITANO[2], Yuki MASUJIMA[2], Miki IGARASHI[1], Ikuo KIMURA[1,2] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Kyoto Univ.)

食生活の変化に伴う油脂の過剰摂取は、肥満や糖尿病に代表される生活習慣病発症の主要因子として知られるが、近年、その代替油として、脳機能改善作用や抗肥満効果等の機能性が相次いで報告されている中鎖脂肪酸油（MCT オイル）が注目されている。MCT オイルの構成脂肪酸である中鎖脂肪酸（C8:0 カプリル酸、C10:0 カプリン酸、C12:0 ラウリン酸）は、様々な生理調節作用への関与が示唆されており、高齢者や未熟児への栄養補給や小児のてんかん治療等を目的に医療用食品としても利用される。しかしながら、中鎖脂肪酸の質の違い（鎖長差）による機能性発現については未だ不明な部分が多く、科学的にも正確な作用機序の解明が喫緊の課題である。そこで本研究では中鎖脂肪酸特異的脂肪酸受容体 GPR84（主として長鎖脂肪酸の受容体である GPR40 と異なり、GPR84 は C10:0 と C12:0 の中鎖脂肪酸にのみ反応する）に着目し、鎖長の異なる 3 種の MCT オイル摂取による代謝機能改善作用について、*Gpr84* 遺伝子欠損マウスを用い比較検討を行った。結果、MCT オイル、特に C10:0 摂取が GPR84 を介した糖代謝制御を伴って代謝改善効果を発揮する、MCT オイルによる作用機序の一端を明らかにした。本研究の成果は、機能性油の独自性・個別化による各種疾患予防を目的とした食品への応用開発や、GPR84 を標的とした代謝性疾患治療薬開発に繋がることが期待できる。

Dietary triglycerides are important energy source, but their excess intake causes to metabolic diseases such as obesity and diabetes. Medium-chain triglycerides (MCTs) as triglycerides form of medium-chain fatty acids (MCFAs) are applied to meet the energy demands for the elderly, and people with stunted growth, because MCFAs are efficiently converted into energy for immediate utilization by the organs and do not accumulate as fat. Although MCTs intake exhibits metabolic beneficial effects, the detailed mechanism in regulating metabolic homeostasis by MCFAs are still unclear. Regarding the physiological effects of MCFAs, recent studies demonstrated that MCFAs act as endogenous ligands for free fatty acid receptor GPR84. In this study, we focused on MCT oil to investigate the effects of MCFAs on metabolic phenotypes via GPR84. We found that MCTs intake showed resistance to obesity, and MCFA-GPR84 signaling-mediated hormone secretion may contribute to glucose homeostasis. These results will provide valuable insights into the development of functional food using MCTs and novel therapeutic targets for metabolic disorders.

MCTs, GPR84, GLP-1

講演番号：3G03-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

オレアミドは狭小ケージで行動範囲を制限したマウスにおいて誘発される肥満を抑制する

Dietary oleamide suppresses obesity in mice housed in small cages.

○窪田 舞[1]、小林 恭之[1]、杉本 圭一郎[2,3]、北風 智也[1]、原田 直樹[1]、山地 亮一[1,3] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]長岡香料、[3]大阪府大・生資センター)
○Mai Kubota[1], Yasuyuki Kobayashi[1], Keiichiro Sugimoto[2,3], Tomoya Kitakaze[1], Naoki Harada[1], Ryoichi Yamaji[1,3] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Nagaoka Co., Ltd., [3]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Pref. Univ.)

【目的】座りがちな現代の生活習慣による慢性的な運動不足は，筋萎縮や肥満を誘発する。我々は，マウスにオレアミド（*cis*-9,10-octadecenamide）を経口摂取させると，行動範囲を制限するために狭小ケージで飼育して誘発される筋萎縮が抑制されることを見出している[1)]。本研究では，行動範囲を制限して飼育したマウスにおける肥満におよぼすオレアミドの影響を検討することを目的とした。
【方法・結果】7 週齢の雄性 ddY マウスを通常のケージ内で飼育したコントロール群，1/6 の床面積の狭小ケージで行動範囲を制限した行動制限群，行動制限したマウスへオレアミド（50 mg/kg/day）を経口投与したオレアミド群の 3 群に分け，3 ヶ月間飼育した。行動制限群において，体重，内臓脂肪組織重量，脂肪細胞サイズが増加したが，オレアミド投与によりそれらの増加は抑制されたので，内臓脂肪組織に着目して評価した。脂質の合成と分解の関連因子の mRNA 発現が行動制限群で減少したが，オレアミドによる影響は受けなかった。また，炎症関連因子である *Mcp-1*，*Tnf-α*，*Pai-1* の mRNA 発現は行動制限群において増加または増加傾向であったが，オレアミド投与によりそれらの増加が抑制された。以上の結果より，行動範囲を制限したマウスでは肥満が誘発されるが，オレアミドの投与は抗肥満作用を示し，行動制限群における炎症の増加を抑制することが示唆された。
【Objectives】Insufficient physical activity due to a sedentary lifestyle induces muscle atrophy and obesity. We found that dietary oleamide (*cis*-9,10-octadecenamide) rescues tibialis anterior muscle atrophy induced in mice housed in small cages[1)]. In this study, we investigated the effect of dietary oleamide on obesity in mice housed in small cages. 【Methods and Results】 Male ddY mice were bred in 3 groups (control group housed in normal cages; sedentary group housed in small cages; and sedentary-oleamide group) for 3 months. Oleamide was orally administered. Housing in small cages led to increases in body weight, visceral adipose tissue weight and adipocyte size, and oleamide attenuated the increases. In visceral adipose tissue, the mRNA expression of inflammation-related factors (*Mcp-1, Tnf-α, and Pai-1*) was increased or tended to increase in the sedentary group, and oleamide attenuated the increases. These results suggest that dietary oleamide has an anti-obesity effect and suppresses the increased expression of inflammation-related factors in mice housed in small cages.
1) Kobayashi Y. et al., Br. J. Nutr. (2021) 126, 481-491

oleamide, obesity, sedentary behavior

発表責任者：山地亮一（yamaji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3G03-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

骨格筋細胞における AMP キナーゼ活性化因子としてのペプチドの解析

Analysis of AMP kinase-activated peptide in skeletal muscle cells

○榊原 悠起[1]、山田 海生[2]、深澤 知夏[2]、柴田 貴広[3]、内田 浩二[4]、片吉 健史[5]、内藤 健太郎[5]、草野 由理[1,2] ([1]中部大院・応用生、[2]中部大・応用生、[3]名大院・生命農、[4]東大院・農生科、[5]（株）DHC・第二研究所)

○Yuki SAKAKIBARA[1], Mio YAMADA[2], Chika FUKAZAWA[2], Takahiro SHIBATA[3], Koji UCHIDA[4], Takeshi KATAYOSHI[5], Kentaro NAITO[5], Yuri KUSANO[1,2] ([1]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ, [2]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ, [3]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ, [4]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Tokyo Univ, [5]DHC Corporation Laboratories, Division 2)

AMP キナーゼ（AMPK）はαサブユニット内の Thr172 へのリン酸化により活性化し、細胞内の糖・脂質代謝の制御因子として働く。AMPK の活性化を骨格筋において誘導できれば、効率よく代謝改善効果が期待できる。AMPK 活性化因子の探索にはマウス骨格筋由来筋芽細胞株 C2C12 細胞が汎用されている。今回この評価系を用いて、乳タンパクを利用し、AMPK のリン酸化を誘導するトリペプチドを見出したので報告する。

C2C12 筋管細胞における AMPK のリン酸化レベルを Western blotting 法により評価した。乳タンパクの中でも β-ラクトグロブリン（BLG）存在下で C2C12 筋管細胞を培養すると、AMPK のリン酸化レベルが亢進していた。このリン酸化はトリプシンまたはキモトリプシン消化された BLG 由来の複数のペプチドによって誘導されること、さらに BLG の 125-127 番目のアミノ酸からなる合成トリペプチドによっても誘導されることを明らかにした。またこのトリペプチドによって誘導される AMPK リン酸化は、Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ（CaMKK）の阻害剤である STO-609 の濃度依存的に阻害された。以上の結果から、今回見出したトリペプチドは CaMKK を AMPK キナーゼとし、骨格筋細胞内の AMPK 経路の活性化を誘導するのではないかと考えている。

AMP kinase (AMPK) acts as a regulator of glucose and lipid metabolism. Its activation in skeletal muscle is pivotal in improving metabolism. Mouse myoblast-derived C2C12 cells are widely used to identify AMPK activators, which have been discovered in some food ingredients. Using this system, we report the discovery of an AMPK-activated tripeptide from milk proteins.

The level of AMPK phosphorylation in C2C12 myotube cells was evaluated using Western blotting analysis. Exposure to β-lactoglobulin (BLG) among the milk proteins for up to 3 h resulted in increased levels of phosphorylated AMPK. This phosphorylation was also induced by multiple peptides derived from trypsin- or chymotrypsin-digested BLG and also by the synthetic tripeptide corresponding to amino acid residues 125–127 of BLG. AMPK phosphorylation induced by the tripeptide was inhibited in a concentration-dependent manner by STO-609, an inhibitor of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK). These findings suggest that the tripeptide might promote increased AMPK phosphorylation in skeletal muscle cells through the activation of CaMKK.

peptide, AMPK, skeletal muscle cells

発表責任者：榊原　悠起（gr21015-5005@sti.chubu.ac.jp）

講演番号：3G03-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム G

Lacticaseibacillus paracasei K71 摂取による抗肥満効果 ―ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験―

Anti-obesity Effect of *Lacticaseibacillus paracasei* K71 –A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group Trial–

○山本 佳奈、齊藤 雄飛、三原 敏敬、内山 公子、髙橋 肇（亀田製菓）
○ Kana YAMAMOTO, Yuhi SAITO, Toshihiro MIHARA, Kimiko UCHIYAMA, Hajime TAKAHASHI (KAMEDA SEIKA CO., LTD.)

Lacticaseibacillus paracasei（旧分類 *Lactobacillus paracasei*）K71（LpK71）は、日本酒の酒粕から単離された乳酸菌であり、Th1 応答誘導活性を示すことが確認されている。我々はこれまでに、LpK71 の投与は、遺伝性肥満マウス（*ob/ob* マウス）の内臓脂肪重量の増加を抑制する効果があることを報告している。そこで、LpK71 の摂取がヒトにおいても抗肥満効果を示すか検討することを目的とし、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間試験を実施した。BMI が 23 以上 30 未満の健康な成人男女を 66 名選抜後、ランダム化し、加熱殺菌した LpK71 を 50 mg（およそ 1×10^{11} 個）含む被験食品またはプラセボ食品を 12 週間摂取させた。有効性は、摂取前後の内臓脂肪面積、腹囲、体重、BMI、総コレステロール、中性脂肪（TG）、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、体脂肪率、筋肉量、腹部 CT、部位別周囲長および皮下脂肪厚の変化量にて評価した。その結果、被験食品群はプラセボ群と比較して、体重、BMI および体脂肪率の増加が有意に抑制され、TG は有意に減少した。また、HDL-コレステロールが有意に増加した。以上の結果より、LpK71 の摂取は、健康な被験者に対して抗肥満効果を有することが示された。

Lacticaseibacillus paracasei (formerly designated as *Lactobacillus paracasei*) K71 (LpK71) isolated from sakekasu (sake lees) was found to serve as an inducer of Th1 responses. In this study, we investigated the anti-obesity effect of LpK71 intake in humans. This randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial selected 66 healthy male/female subjects with body mass index (BMI) ≥ 23 and < 30 and randomly allocated them to two groups, a test food group and a placebo group. Subjects ingested either a test food containing 50 mg (approximately 1×10^{11} bacteria) of LpK71 or a placebo food for 12 weeks. Visceral fat area, waist circumference, body weight, BMI, total cholesterol, triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, body fat percentage, muscle mass, abdominal computed tomography (CT), body part circumference, and subcutaneous fat thickness were evaluated. Compared with the placebo group, the test food group showed significantly decreased body weight, BMI, body fat percentage, and TG level, and significantly increased HDL-cholesterol level from that before ingestion. These results suggest that the continuous intake of LpK71 has an anti-obesity effect on healthy subjects.

Lacticaseibacillus paracasei K71, anti-obesity, clinical study

講演番号：3G05-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

リゾリン脂質がヒト腸管上皮細胞の生存に及ぼす影響の解析

The influence of lysophospholipids on the viability of a human intestinal epithelial cell line

○大澤 ひかり[1]、高橋 恭子[2]、戸田 雅子[1] ([1]東北大農、[2]日大生物資源科学)
○Hikari OSAWA[1], Kyoko TAKAHASHI[2], Masako TODA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nihon Univ.)

リゾリン脂質は、細胞膜の主要な構成成分であり、脂質メディエーターとして機能する。これまでに我々は、アレルギー性腸炎モデルマウスの糞便中で 14:0-LysoPC、18:2-LysoPC、16:0-LysoPG などのリゾリン脂質が増加していることを観察している。リゾリン脂質は様々な細胞種で多様な生理活性が報告されている一方で、腸管上皮細胞に及ぼす影響については詳しく調べられていない。そこで本実験では、ヒト大腸上皮細胞株（HT-29）を用いて、リゾリン脂質が腸管上皮細胞に与える影響の解析を目的とした。HT-29 を 14:0-LysoPC、16:0-LysoPC で処理した場合には、細胞増殖活性が濃度依存的に低下し、アポトーシスが誘導された。また、ミトコンドリア内 ROS 産生の増加やミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9 の活性化が確認された。一方で、LysoPG ではアポトーシスの誘導がみられなかった。上皮組織におけるアポトーシスの誘導は、Damage-associated molecular patterns (DAMPs) を含む細胞内容物の放出を促進し周囲の炎症を惹起する。14:0-LysoPC、16:0-LysoPC は、腸管上皮細胞に過剰なアポトーシスを誘導することによって腸炎発症に寄与することが示唆された。本研究で得られた知見は腸炎の予防や治療法の確立に貢献するものである。

Lysophospholipids are a main component of cell membranes and play an important role as lipid mediators. We previously showed that the levels of lysophospholipids are increased in the stool samples of allergic enteritis mice. However, while diverse physiological activities of lysophospholipids are reported in various cell types, their influence on intestinal epithelial cells have not been investigated in detail. Based on the background, we aim to investigate the influence of lysophospholipids in viability of intestinal epithelial cells, using a human colon epithelial cell line HT-29. The cells were treated with 14:0-lysophosphatidylcholine (LysoPC), 16:0-LysoPC, 18:0-LysoPC or 16:0-lysophosphatidylglycerol (LysoPG), and applied for FACS analysis to measure apoptosis. Among tested lysophospholipids, 14:0-LysoPC, 16:0-LysoPC reduced the viability of HT-29 significantly, and inducted apoptosis. In addition, we observed increase the mitochondrial ROS production, the mitochondrial depolarization, and activation of caspase-8, caspase-9 upon the treatment of the LysoPCs. The results suggest that excessive apoptotic cells could release DAMPs from epithelial cells and thereby trigger development of inflammation. This study could contribute to establish a strategy for prevention and treatment for intestinal inflammation.

lysophospholipids, apoptosis, intestinal epithelial cells

講演番号：3G05-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

アントシアニジンによる代謝物感受性受容体 GPR35 の活性化

Activation of metabolite-sensing receptor GPR35 by anthocyanidins.

○下村 沙也子[1]、服部 浩之[1]、若林 万由香[1]、DIDIK HUSWO Utomo[1]、北 将樹[1]、井上 飛鳥[2]、内田 浩二[3]、柴田 貴広[1]（[1]名大院生命農、[2]東北大院薬、[3]東京大院農生科）
○ Sayako SHIMOMURA[1], Hiroyuki HATTORI[1], Mayuka WAKABAYASHI[1], Utomo DIDIK HUSWO[1], Masaki KITA[1], Asuka INOUE[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Tokyo Univ.)

【目的】
GPR35 は腸管に高発現している G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。これまでの研究から、GPR35 の内因性および合成アゴニストは数多く同定されているものの、食事由来のアゴニストに関する報告は少ない。本研究では、GPCR の活性化測定法であるトランスフォーミング増殖因子α (TGFα) 切断アッセイにより、GPR35 を活性化する食品成分の探索を行った。腸管は食品成分と最も高濃度かつ直接的に接しうる器官であることから、食を通した疾病の予防・改善に繋げることを目的としている。
【方法・結果】
食品中に多く含まれることで知られるフラボン，フラボノール，フラバノン，アントシアニジン，ビタミン，含硫化合物などの食品成分を使用し、GPR35 に対する活性評価を行った。その結果、アントシアニジンのひとつであるシアニジンによって GPR35 が強く活性化されることが明らかになった。そのため、構造中におけるフェノール性水酸基の数や位置、官能基が異なるさまざまなアントシアニジンを用いて同様の検討を行った。その結果、ペラルゴニジンが GPR35 に対して最も強い活性を示すことが明らかになった。また、アントシアニジンの構造活性相関や MOE による分子間相互作用解析の結果から、アントシアニジンがもつ B 環のフェノール性水酸基や C 環 3 位の水酸基が GPR35 の活性化に重要な役割を果たすことが示唆された。
【結論】
本研究から、ペラルゴニジンとシアニジンが GPR35 を活性化することが明らかになった。GPR35 は腸管に高発現することが知られている GPCR であり、炎症性腸疾患の新規治療標的として注目を集めている受容体である。本研究の結果から、ペラルゴニジンやシアニジンを多く含む食品の摂取により、腸管に発現する GPR35 を活性化することで、炎症性腸疾患の予防および改善に寄与する可能性が期待される。

【Abstract】
G protein-coupled receptor 35 (GPR35) is highly expressed in the gastrointestinal tract, plays an important role in gut homeostasis. Although many endogenous/synthetic agonists of GPR35 were identified/developed, food-derived agonists have not yet been fully investigated. In this study, we searched for the GPR35 agonists in various dietary phytochemicals using transforming growth factor α shedding assay, a method for evaluating GPCR activation, and identified anthocyanidins, especially pelargonidin, as novel potent agonists of GPR35. Structure-activity relationship analysis and docking simulations suggested that the hydroxyl group in the B and C-ring of pelargonidin plays an important role in the interaction with GPR35.

Anthocyanidin, Metabolite-sensing GPCR, GPR35

講演番号：3G05-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

5,7-ジメトキシフラボンは、ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞のオクルディンを増加、クローディン-2 を減少させてバリア機能を高める

5,7-Dimethoxyflavone enhances barrier function by increasing occludin and reducing claudin-2 in human intestinal Caco-2 cells

ユニカ マヤングサリ[1]、真野 千夏[2]、作田 智洋[2]、山本 祥也[1]、○鈴木 卓弥[1] ([1]広大院統合生命、[2]（株）資生堂 みらい開発研究所)
Mayangsari Yunika[1], Chinatsu Mano[2], Tomohiro Sakuta[2], Yoshinari Yamamoto[1], ○Takuya Suzuki[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Shiseido Co., Ltd MIRAI Technology Institute)

腸管バリアの損傷は、管腔内の異物の体内への侵入を許し、炎症を基盤とした種々の疾患につながる。よって、腸管バリア機能を保護・増強する食品成分は、疾患予防の新たな手段になりうる。本研究では、ヒト腸管上皮Caco-2細胞を用いて、黒ショウガに多く含まれる5,7-ジメトキシフラボン(DMF)による腸管バリア増強作用を検証した。DMF（～100 μM）をCaco-2細胞に作用させると、腸管上皮バリアの指標である経上皮電気抵抗値の上昇と蛍光デキストラン透過性（分子量10、70 kDa）の低下が認められ、腸管バリア機能が増強した。このとき腸管バリアに重要なタイトジャンクション構造のタンパク質発現を解析したところ、DMFは細胞骨格画分のOccludinとClaudin-1（バリア形成型）を増加させるとともに、Claudin-2（ポア形成型）を減少させた。DMFはOccludinのmRNAレベルを変動させなかったが、Claudin-2のmRNAレベルを減少させた。DMFによるOccludinタンパク質発現の増加は、転写阻害剤ActinomycinD存在下でも確認されたが、翻訳阻害剤CycloheximideやmTOR阻害剤Rapamycinにより消失した。DMFはClaudin-2の転写活性を減少させなかったが、Claudin-2 mRNAを標的とするmiRNAのうち、miR-16-5pの発現を高めた。以上の結果より、DMFは腸管上皮Caco-2細胞のタイトジャンクションバリア機能を増加させること、その作用機序として少なくとmTORを介したOccludinの翻訳上昇、miR-16-5pを介したClaudin-2 mRNAの不安定化が関わることが示唆された。

Defects in intestinal tight junction (TJ) barrier cause intestinal inflammation. We investigated the effects of 5,7-dimethoxyflavone (DMF), abundantly found in black ginger (*Kaempferia parviflora*), on the TJ barrier in human intestinal Caco-2 cells. DMF reinforced TJ barrier integrity, indicated by increased transepithelial electrical resistance and reduced dextran permeability in Caco-2 cells. Immunoblot analysis revealed that the increases in the barrier-forming TJ molecules occludin and claudin-1 and the decrease in pore-forming claudin-2 in the cytoskeletal fraction of the cells were responsible for the TJ regulation. Increased occludin expression was sensitive to cycloheximide (an inhibitor of protein translation) and rapamycin (mechanistic target of rapamycin [mTOR] inhibitor). DMF reduced Cldn2 mRNA levels without suppressing its transcriptional activity; the reduction was associated with the upregulation of miR-16-5p. Thus, DMF-mediated reinforcement of intestinal TJ barrier was partly involved in the induction of occludin protein translation via mTOR and silencing Cldn2 mRNA via miR-16-5p.

intestinal barrier, tight junction, 5,7-dimethoxyflavone

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3G05-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

オーツ麦由来食物繊維による腸内微小環境の変動と実験的腸炎の抑制

The impact of oat-derived dietary fiber on intestinal microenvironment and experimental colitis

○中段 晴太、石橋 璃子、古澤 之裕、生城 真一、西川 美宇、長井 良憲（富県大工）
○seita chudan, riko ishibashi, yukihiro furusawa, shinichi ikushiro, miyu nishikawa, yoshinori nagai (Toyama Pref. Univ.)

【目的】
先進国では炎症性腸疾患の患者数が年々増加の一途を辿っており、欧米型食生活による食物繊維摂取不足が一因と考えられている。食物繊維は腸内細菌に資化され腸内環境を改善する特徴をもつが、いずれの食物繊維が腸炎の発症予防に寄与するかは不明な点が多い。本研究では、食物繊維を高含有することで知られるオーツ麦に着目し、マウスモデルを用いて、オーツ麦由来食物繊維が腸内微小環境と実験的腸炎に与える影響を調べた。
【方法】
セルロースまたはオーツ麦由来食物繊維含有餌を C57B6/J マウスに給餌し、ガスクロマトグラフィーによる盲腸内容物中・糞便中の短鎖脂肪酸解析、フローサイトメーターによる大腸制御性 T 細胞（Treg）の測定を行った。また薬剤誘発性大腸炎モデルを作製し、オーツ麦由来食物繊維が体重減少や大腸の炎症スコアに与える影響を検討した。
【結果】
オーツ麦由来水溶性食物繊維摂取群において短鎖脂肪酸が増加し、特に酪酸の増加が顕著であった。オーツ麦由来水溶性食物繊維摂取群では、大腸における末梢誘導型 Treg の増加がみられ、薬剤誘発性腸炎モデルでの体重減少と炎症スコアの軽減が認められた。
【結論】
以上の結果から、オーツ麦由来水溶性食物繊維は腸管の酪酸濃度を増加させ、大腸 Treg 細胞を誘導し、腸炎発症予防効果を示すと考えられた。現在、オーツ麦由来食物繊維が腸内細菌叢に与える影響について研究を進めている。

The rising incidence of immune disorder in the developed countries has notably paralleled with changing lifestyle habits. Particularly, lowfiber diet has been recognized as major risk factors for inflammatory bowel disease (IBD) that is attributed to the changes in the intestinal microenvironment. The purpose of this study was to investigate the effect of oats-derived dietary fibers (DFs) on the colonic microenvironment (e.g., luminal short-chain fatty acids (SCFAs) production, and proportion of colonic regulatory T cells (Treg), and experimental colitis in mice). Soluble oats-DF rather than insoluble one elevated the concentration of luminal SCFAs, in particular butyrate. Soluble oats-DF increased colonic peripherally-induced Treg (pTreg) and showed remarkable anti-inflammatory property in chemically-induced mouse model of colitis. These results raise the possibility that the supplementation with oats-derived soluble DFs may be promising strategy for the prevention of IBD onset. Currently, we are now investigating the impact of soluble oats-DFs on commensal microbiota.

dietary fiber, gut microbiota, regulatory T cell

発表責任者：中段晴太（t816027@st.pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3G05-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

酪酸は GPCR 経路とエピジェネティック制御を介して皮膚疾患乾癬を緩和する

Butyrate ameliorates a skin disease psoriasis via GPCR-signaling and epigenetic regulation

○廣木 郁美、長田 和樹、八須 匡和、西山 千春（東理大先進工）
○IKUMI HIROKI, KAZUKI NAGATA, MASAKAZU HACHISU, CHIHARU NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

短鎖脂肪酸は食物繊維の腸内細菌代謝産物である。腸の恒常性維持にとどまらず、喘息や多発性硬化症など全身の様々な臓器で起こる免疫疾患も緩和することが報告されている。短鎖脂肪酸の一種である酪酸は HDAC 阻害活性を持つが、乾癬の治療に用いられるフマル酸ジメチルやナイアシンと同様に GPR109A に対するリガンド活性も有する。これらの知見から本研究では、未だ不明な点が多い乾癬に対する短鎖脂肪酸の作用を検証した。イミキモド(TLR7 リガンド)塗付により乾癬様症状を発症させる乾癬マウスモデルを用いた。酪酸を経口投与したマウスでは乾癬の症状である皮膚肥厚が有意に緩和することが明らかとなった。この時、炎症部位のサイトカイン産生が酪酸摂取群で減少する傾向が示され、所属リンパ節(dLN)細胞の総細胞数が減少すると共に制御性 T 細胞(Treg)の割合が増加していた。酪酸存在下で T 細胞分裂が阻害されたことから、HDAC 阻害活性による Treg 誘導が引き起こされたと考えられた。一方、TLR7 リガンド R848 刺激により炎症性サイトカインを分泌する樹状細胞(DC)活性化反応は、短時間の酪酸処理で顕著に抑制された。トリコスタチン A 短時間処理の実験から、HDAC 阻害活性が IL-6 など一部のサイトカイン産生抑制に寄与することが示された。また、酪酸の即効性効果が DC の *Gpr109a* ノックダウンで減弱化することも明らかとなった。以上、本研究により、短鎖脂肪酸が乾癬の病態を緩和することが明らかになり、その分子機構として、GPR109A 経路活性化や HDAC 阻害活性による免疫細胞機能調節の可能性が示された。

Short chain fatty acids (SCFAs), which are intestinal bacterial metabolites of dietary fiber, are beneficial not only for intestinal homeostasis, but also for prevention of the immune-related diseases. Although the effect of SCFA including butyrate on a skin inflammatory disease, psoriasis, are largely unknown, we hypothesized that butyrate, which possesses HDAC inhibitory activity and functions as a ligand of GPR109A, like as dimethyl fumarate and niacin used for treatment of psoriasis. *In vivo* experiments using an imiquimod-induced psoriasis mouse model revealed that ear swelling, a symptom of psoriasis, was significantly alleviated by oral administration of butyrate accompanied with reduced levels of cytokine production at the inflamed site, reduced number of whole leukocytes and increased frequency of Tregs in draining lymph nodes. R848 (TLR7 ligand)-induced inflammatory cytokine production of dendritic cells (DCs) was suppressed by butyrate, and butyrate-mediated suppression was reduced by *Gpr109a* knockdown. Taken together, we indicate that butyrate administration improves the symptom of psoriasis by suppressing the cytokine production in DCs via GPR109A.

SCFA, Psoriasis, Inflammation

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3G05-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

小腸刷子細胞に発現する Gprc5c 受容体欠損マウスの免疫系における表現型解析

Phenotypic analysis of Gprc5c-deficient mice expressed in small intestinal tuft cells in the immune system

○鈴木 遼、中北 智哉、戸田 安香、石丸 喜朗（明大農）
○Ryo SUZUKI, Tomoya NAKAGITA, Yasuka TODA, Yoshiro ISHIMARU (Meiji Univ.)

近年、小腸上皮に存在する刷子細胞がアレルギー性疾患や寄生虫感染に対する 2 型自然免疫応答、及び、エネルギー代謝に関与することが明らかになった（Ushima et al., 2016;von Moltke et al., 2016; Gerbe et al., 2016; Howitt et al., 2016; Sasaki et al., 2019）。寄生虫感染を感知した刷子細胞から産出される IL-25 が ILC2（2 型自然リンパ球）を活性化し、2 型自然免疫応答を亢進させて寄生虫を排除する。また、原虫が分泌するコハク酸は刷子細胞に発現する GPR91 受容体に受容され、2 型自然免疫応答が始動する(Nadjsombati et al., 2018)。我々は、刷子細胞頂端部に局在することを見出した Gprc5c 受容体に着目し、その欠損マウスの免疫系における表現型を明らかにすることを目的とした。

野生型（WT）及び Gprc5c 受容体欠損（KO）マウスにおいて、小腸粘膜固有層(SI LP)に存在する ILC2(PI^-、$Lineage^-$、$CD45^+$、PE^+、$Sca\text{-}1^+$)の細胞数を FACS を用いて測定した。さらに、100 mM コハク酸を 4 日間投与し、2 型自然免疫応答が亢進した状態においても同様の方法で比較解析した。

通常飼育下では、WT と KO マウス間で ILC2 の細胞数に有意差はなかった。一方で、コハク酸投与下においては、KO マウスは WT マウスより ILC2 の細胞数が多かった。以上より、炎症時において Gprc5c 受容体は 2 型自然免疫応答を抑制することが示唆された。

Recently, tuft cells in the small intestinal epithelium have been shown to be involved in type 2 innate immune responses to allergic diseases and parasitic infections. IL-25 produced by tuft cells sensing parasite infection activates ILC2, which enhances the type 2 innate immune response to eliminate the parasite. In addition, succinate secreted by protozoa is accepted by GPR91 receptors expressed in tuft cells, which triggers the type 2 innate immune response. We focused on the Gprc5c receptor, which we found to be localized at the apical tips of the tuft cells, to elucidate the phenotype of its deficiency in the immune system of mice. In wild-type and Gprc5c receptor-deficient mice, the number of ILC2 cells in the small intestinal lamina propria was measured using FACS. In addition, we also compared WT and KO mice when 100 mM succinate was administered for 4 days to enhance the type 2 innate immune response. Under normal conditions, there was no significant difference in the number of ILC2 cells between WT and KO mice, but under succinate treatment, the number of ILC2 cells was higher in KO mice than in WT mice. These results suggest that the Gprc5c receptor may suppress the type 2 innate immune response during inflammation.

tuft cell, ILC2, FACS

講演番号：3G05-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

盲腸リンパ節 B 細胞の抗体発現における腸内細菌の影響

The effect of gut microbiota on the expression of antibodies on B cells in the cecal patches.

○岡田 開[1]、津田 真人[1]、小島 菜月[1]、石濱 史也[1]、溝口 拓海[1]、服部 菜々子[1]、森 清彰[1]、高橋 宜聖[2]、八村 敏志[3]、細野 朗[1]([1]日本大学、[2]感染研　治療薬・ワクチン開発研究センター、[3]東京大学・食の安全研究センター)

○Hiraku OKADA[1], Masato Tsuda[1], Natsuki Kojima[1], Toshiya Ishihama[1], Takumi Mizoguchi[1], Nanako Hattori[1], Kiyoaki Mori[1], Yoshimasa Takahashi[2], Satoshi Hachimura[3], Akira Hosono[1] ([1]Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, [2]Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases, [3]Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

腸管関連リンパ組織（GALT）は，小腸に存在するパイエル板（PP），大腸に存在する盲腸リンパ節（CeP），結腸リンパ節（CoP）から構成される．PP では主に免疫グロブリン A（IgA）が誘導され，病原体の侵入阻止や腸内細菌叢の制御に重要な役割を果たす．CeP や CoP も抗体産生誘導組織として重要なリンパ組織であると考えられるが，その役割については不明な点が多い．そこで本研究では，大腸 GALT の抗体産生における役割を明らかにすることを目的とした．

通常 BALB/c マウスを用いて小腸および大腸 GALT において，B 細胞の増殖やクラススイッチの場である胚中心 B 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析したところ，CeP で最も高い発現割合を示した．また，B 細胞中の抗体発現は，PP は他の組織と比較して，IgA^+ B 細胞を最も多く有するのに対して，CeP には $IgG2b^+$ B 細胞が多い特徴を示した．さらに，通常マウスの各 GALT の細胞培養中に産生された腸内細菌反応性抗体量を ELISA 法により測定した．腸内細菌反応性 IgA は CeP と CoP 細胞において高産生され，腸内細菌反応性 IgG2b は CeP 細胞により強く産生された．次に，各 GALT における抗体産生に対する腸内細菌の影響を明らかにするために，腸内細菌の存在しない無菌 BALB/c マウスを用いて解析したところ，通常マウスと比較して，どの組織においても胚中心 B 細胞の割合と B 細胞中の抗体発現が有意に低下した．

これらの結果から，大腸 GALT である CeP は，PP とは異なる抗体産生誘導の特徴を有していること，PP における IgA^+ B 細胞の誘導と同様に，CeP における $IgG2b^+$ B 細胞の誘導にも腸内細菌の存在が重要であることが示唆された．

In this study, we investigated the ability of gut-associated lymphoid tissues from small and large intestines to produce of antibodies. We analyzed the cellularity of germinal center (GC) B cells and the expression of the dominant antibody isotype on B cells from the GALTs in CV mice. The frequency of $CD95^+GL7^+B220^+$ GC B cells in CePs was higher than PPs and CoPs. In addition, PPs possessed more IgA^+ B cells than other GALTs, whereas-the frequency of $IgG2b^+$ B cells in CePs was highest in the GALTs from small and large intestines. Next, we evaluated the levels of antibodies that are reactive to commensal bacteria in the culture supernatant produced from the GALT cells. We found that the production of commensal bacteria-reactive IgG2b was highest for the mononuclear cells from CePs. Furthermore, we compared CV and GF mice to clarify the effect of gut microbiota on the antibody production in GALT. The frequency of GC B cells and the expression of IgG2b as well as IgA on B cells in each GALT from GF mice were lower than that of CV mice. These results suggest that CePs have different property to generate class-switched isotype antibodies from those of PPs.

IgG2b, gut associated lymphoid tissue, gut microbiota

講演番号：3G05-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

バラ香気成分 Damascone-β による免疫抑制作用と分子機構の解明

Immunosuppressive effects of rose-derived compound damascone-ß and the molecular mechanism

○兒玉 直輝[1]、岡田 光[1]、八代 拓也[1]、長田 和樹[1]、八須 匡和[1]、市原 学[2]、西山 千春[1]([1]東理大先進工、[2]東理大薬)
○NAOKI KODAMA[1], HIKARU OKADA[1], TAKUYA YASHIRO[1], KAZUKI NAGATA[1], MASAKAZU HACHISU[1], GAKU ICHIHARA[2], CHIHARU NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. Sci. Dept. Biolog. Sci. Tech., [2]Tokyo Univ. Sci. Dept. Pharmacy)

食品や香水等に広く用いられる香料化合物は、世界的に数千種類存在すると言われているが、多くは生理活性が不明である。近年、シソの葉に含まれるペリルアルデヒドや、ウコンに含まれるクルクミンといった植物由来の香気性成分が摂取したヒトや動物に有益な作用を発揮することが報告されている。そこで今回、免疫反応を調節する香料化合物を探索し、見出された化合物の作用機序を分子レベルで解析すると共に生体の免疫応答への効果を検証した。

抗原依存的 T 細胞活性化を指標に約 200 種類の香料成分をスクリーニングした結果、薔薇香気主成分であるダマスコン-β (DB) が免疫抑制物質として選出された。DB は樹状細胞に作用し、炎症性サイトカイン産生や Th1 分化誘導活性を抑制することが判明した。さらに DB 処理により、樹状細胞の Nrf2 タンパク量や HO-1 mRNA 量が増加したことから、DB が Keap1-Nrf2 経路を活性化する可能性が示された。Nrf2-/-樹状細胞では、野生型樹状細胞に比べて炎症性サイトカイン産生や Th1 分化誘導能が亢進し、DB による抑制効果が低減していた。最後に生体応答への作用を評価した結果、DB の経口摂取によりマウス接触性皮膚炎が緩和することが確認された。

Although thousands of flavor compounds, are widely added in foods or perfumes, the biological significance of almost flavor compounds are largely unknown. Recently, several studies reported that plant-derived aroma compounds, such as perillaldehyde in perilla leaves and curcumin in turmeric, have beneficial effects on humans and animals that ingest them. In this study, we performed a screening of immunomodulators from flavor compounds, and investigated the molecular mechanism in vitro and evaluated the effect in vivo.

By a screening system using an antigen-dependent T cell proliferation assay, damascone-ß (DB) was selected from about 200 components. DB suppressed inflammatory cytokine production of dendritic cells (DCs) and DC-dependent Th1 differentiation. In addition, DB treatment increased the levels of NRF2 protein and *Hmox1* mRNA in DCs, indicating that DB activates the Keap1-NRF2 pathway. $Nrf2^{-/-}$ DCs exhibited enhanced activity of inflammatory cytokine production and Th1 differentiation in comparison with wild-type DCs, and the suppressive effects of DB were reduced by Nrf2 deficiency. Finally, we evaluated the effects of DB on contact dermatitis in mice and found that oral administration of DB alleviated the pathology.

Fragrance, Dendritic cells, Inflammation

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3G05-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

クレソンに含まれる 1,3-ジフェネチルウレアの摂取がマウス脂質メディエータに与える影響
Comprehensive analysis of lipid mediators in plasma and liver of mice fed PE-UR in watercress

○中屋 慎[1,2]、濱野 未宇[1]、瀬尾 朱未[1]、北村 進一[2]([1]大手前栄養学院専門学校、[2]大阪府立大学)
○ Makoto Nakaya[1,2], Miu Hamano[1], Akemi Seo[1], Shinichi Kitamura[2] ([1]Otemae College of Nutrition, [2]Osaka Prefecture University)

葉物野菜として知られるクレソン（*Nasturtium officinale*）は抗炎症効果などの種々の健康増進効果を示すことが知られている。我々は、クレソンに含まれる微量物質 1,3-ジフェネチルウレア（PE-UR）が抗炎症的に作用することをマウスを用いた動物実験により新たに見出し、PE-UR による可溶性エポキシドヒドロラーゼ（sEH）阻害により抗炎症効果がもたらされることを *in vitro* 及び *in vivo* 試験により明らかにした。研究過程で、PE-UR は、CYP 経路の sEH に対する阻害だけでなく、シクロオキシゲナーゼ（COX）経路やリポキシゲナーゼ（LOX）経路に影響を与える可能性が示された。そこで、マウス血清及び肝臓に存在する脂質メディエータを網羅的に解析した。

C57BL/6 マウスに PE-UR を 4 週間自由摂取させ、血清及び肝臓に含まれる脂質メディエータを LC-MS^2 法により網羅的に解析した。血清及び肝臓に共通した傾向として、アラキドン酸（AA）から生成し炎症促進的に作用するエイコサノイドのうち、CYP 経路に属し sEH の生成物である DHETs 量や LOX 経路の 5-HETE 量は低減し、COX 経路の $PGF_{2\alpha}$ 代謝物量は増加した。AA に由来しない脂質メディエータでは、ホスファチジルコリンから生成しアレルギー反応惹起物質の前駆体となる Lyso-PAF 量やジホモ-γ-リノレン酸から生成し抗腫瘍作用を有する PGE_1 量が有意に変化した。これらの結果は、PE-UR が sEH 阻害だけでなく広範囲の脂質メディエータに影響を与えることを示唆する。我々は、PE-UR がクレソンの多岐にわたる健康増進効果の主たる機能性成分のひとつであると考えている。

Watercress (*Nasturtium officinale*, family Brassicaceae) is a traditional food plant in Europe that has beneficial effects for human health and is becoming popular in Japan as a healthy vegetable. In our previous study, we found that 1,3-diphenethylurea (PE-UR) in watercress has soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitory activity and an anti-inflammatory effect in mice fed a high-fat and high-sugar diet. In this study, we identified the effect of PE-UR on lipid mediators in the plasma and liver of mice. PE-UR increases metabolites of $PGF_{2\alpha}$ that belong to the COX pathway and decreases 5-HETE that belongs to the LOX pathway in both plasma and liver. These mediators are known to have an anti-inflammatory effect. We also found that the amounts of a precursor of PAF that causes an allergic reaction and PGE_1 that has an anti-tumor effect were changed in PE-UR-fed mice. We suspect that PE-UR contributes to the beneficial effects of watercress not only by sEH inhibition but also by control of lipid mediators.

watercress, 1,3-diphenetylurea, lipid mediator

発表責任者：中屋　慎（mnakaya@otemae.ac.jp）

講演番号：3G05-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

植物マイクロ RNA による TGFβシグナル伝達経路抑制を介した肺線維化抑制作用
Inhibitory action of pulmonary fibrosis by plant microRNAs through suppression of TGFβ signaling pathway

○渡邉 凌矢[1]、疋田 愛[1]、小川 史代[1]、島田 優[1]、熊添 基文[1]、藤村 由紀[1]、中曽根 光[2]、米倉 円佳[2]、立花 宏文[1]([1]九大院農院・生機科、[2]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部)
○Ryoya WATANABE[1], Ai HIKIDA[1], Fumiyo OGAWA[1], Yu SHIMADA[1], Motofumi KUMAZOE[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Akari NAKASONE[2], Madoka YONEKURA[2], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]TOYOTA Motor Corporation ・ Agriculture and Biotechnology business div.)

【目的】マイクロ RNA は約 20 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA であり、標的 mRNA に相補的に結合することで遺伝子の機能を制御する。近年、食餌性の植物 miRNA が動物体内において作用する可能性が示され、界を越えた miRNA の機能が注目されている。当研究室ではこれまでに、ヒト血液中で存在が確認されている植物 miRNA である osa-miR172d-5p が TGFβシグナルに重要な TGF-beta activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1) と高い相補性を有し、マウスにおいて、Bleomycin 投与による肺線維化の進行を抑制することを見出した。そこで今回は osa-miR172d-5p が TGFβシグナル伝達経路に与える影響を評価することを目的とした。
【方法および結果】Bleomycin 投与により肺線維化を誘導したマウスを用いて osa-miR172d-5p が TAB1 の発現に与える影響を免疫組織化学染色法にて評価したところ、Bleomycin 投与による TAB1 の発現増加が osa-miR172d-5p mimic 投与により抑制された。また、osa-miR172d-5p が TGFβ誘導性線維化関連遺伝子である collagen type 1 alpha 1 chain (COL1A1) の発現に与える影響を免疫組織化学染色法にて評価したところ、Bleomycin 投与による COL1A1 の発現増加が osa-miR172d-5p mimic 投与により抑制された。以上より、osa-miR172d-5p は TAB1 を標的として TGFβシグナル伝達経路を抑制することによりコラーゲンの蓄積を阻害し、肺線維化を予防する可能性が示された。

MicroRNAs (miRNAs) are small single-stranded 18-25 nucleotide RNAs and act as gene regulators. Recent studies show that intake of plant-derived miRNAs regulate mammalian gene expression by potential cross-kingdom action. Here, we found that osa-miR172d-5p, one of rice-derived miRNA, detected in human blood and inhibit pulmonary fibrosis by targeting TGF-β activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1). Also, osa-miR172d-5p mimic treatment suppressed the expression of TAB1 and collagen type 1 alpha 1 chain (COL1A), TGFβ-induced fibrosis-related gene, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice. These results indicate that osa-miR172d-5p inhibits collagen accumulation and ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing TGFβ signaling pathway by targeting TAB1.

plant microRNA, fibrosis, TGFβ

講演番号：3G05-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム G

茶由来サポゲニン R_1-barrigenol はミクログリア細胞における LPS 誘導性の炎症応答を抑制する

R_1-barrigenol, a tea sapogenin suppresses the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia cell

○林 遼太郎[1,2]、福光 聡[1]、横田 貴弘[3]、間 和彦[1]、小林 彰子[2]([1]（株）ニップン　中研　イノベーションセンター、[2]東大農、[3]（有）東阜)
○Ryotaro HAYASHI[1,2], Satoshi FUKUMITSU[1], Takahiro YOKOTA[3], Kazuhiko AIDA[1], Shoko KOBAYASHI[2] ([1]Nippn Corporation, Central Laboratory, Innovation Center, [2]Tokyo Univ., [3]Tobu Ltd.)

【背景】
神経炎症は神経変性疾患のリスク要因の１つであり、中枢神経系の免疫細胞であるミクログリアの炎症を抑制することで神経変性疾患の予防や治療が期待できる。本研究では茶(*Camellia sinensis*)に含まれる主要サポゲニンの１種である R_1-barrigenol(R1B)の神経炎症抑制効果について評価した。
【方法】
マウス由来のミクログリア細胞(BV2 細胞)にリポポリサッカライド(100ng/ml)および R1B(10-40μM)を添加した。24 時間培養後、培地中の一酸化窒素(NO)を Griess Reagent 法、炎症性サイトカインを ELISA 法で、細胞の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法、細胞のタンパク質発現をウェスタンブロット法により評価した。
【結果・考察】
R1B の添加により培地中の NO、IL-6、TNF-αが減少し IL-6、TNF-αmRNA 発現が抑制された。これらの遺伝子は M1 型(傷害性)ミクログリアのマーカーであり、R1B が LPS によるミクログリアの M1 型への変移を抑制している可能性が考えられた。また細胞中の ＩκＢα タンパク発現が R1B の添加により増加していた。NF-κB シグナルは M1 型への極性変移を誘導することが知られており、R1B は NF-κB シグナルの抑制による M1 型への極性変移を抑制している可能性が考えられた。以上の結果は茶に含まれるサポゲニンが脳内炎症を抑制する可能性を示唆するものである。

Neuroinflammation is associated with neurodegenerative diseases. Microglia, the major immunocompetent cells of the central nervous system play an important role in neuroinflammation. In this study, we investigated the role of R_1-barrigenol (R1B; a major tea sapogenin) on the microglia-induced inflammatory response.
Mouse-derived microglial cells (BV2 cells) were incubated with lipopolysaccharide and R1-barrigenol for 24 hours. Nitric oxide and inflammatory Cytokines in the culture medium and mRNA expression of the cells were evaluated. R1B decreased nitric oxide levels, IL-6, and TNF-α in the culture medium and suppressed IL-6 and TNF-α mRNA expression. Gene and protein expression analysis suggested that R1B may suppress the inflammatory response through a polarity shift to M1 type by suppressing NF-κB signaling.

neuroinflammation, microglia, tea sapogenin

発表責任者：林　遼太郎（r-hayashi@nippn.co.jp）

講演番号：3G06-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

DI-EI-MS メタボロミクスによるブルーベリー葉・茎の機能性評価

Evaluation of blueberry leaf / stem functionality by DI-EI-MS metabolomics

○甲斐 久博[1]、荒木 理佐[1]、後藤 陽[2]、中山 貴之[2]、菅本 和寛[3]、森下 和広[4]、國武 久登[5]([1]九州保福大薬、[2]株式会社ビオラボ、[3]宮崎大工、[4]宮崎大医、[5]宮崎大農)
○Hisahiro KAI[1], Risa ARAKI[1], Yo GOTO[2], Takayuki NAKAYAMA[2], Kazuhiro SUGAMOTO[3], Kazuhiro MORISHITA[4], Hisato KUNITAKE[5] ([1]Kyushu Univ. of Health and Welfare, [2]Biolabo Co.,Ltd, [3]Miyazaki Univ. Faculty of Engineering, [4]Miyazaki Univ. School of medicine, [5]Miyazaki Univ. Faculty of Agriculture)

天然素材におけるメタボロミクスとは、含有成分を個々に同定せず、混合物の状態で MS などの分析機器を用いて網羅的な解析を行う手法である。これまで、我々は直接導入型電子イオン化質量分析（DI-EI-MS）メタボロミクスにより、ブルーベリー葉の機能性（成人 T 細胞白血病の予防効果）に寄与する相対質量電荷数比（*m/z*）を列挙した。最近、ブルーベリー茎が葉よりも高い機能性を有することを見出したが、含有成分の差異を従来の単離精製で同定していくことは困難である。そこで、含有成分の網羅的な解析を行う目的で、ブルーベリーの葉、茎、葉と茎の混合物の DI-EI-MS メタボロミクスに取り組んだ。ブルーベリーの葉、茎、葉と茎の混合物、各 10 検体ずつ熱水抽出物を作製し、機能性を評価した。また、各抽出物の DI-EI-MS を測定し、統計解析ソフト（JMP Pro 14.2）を用いたメタボロミクス解析を実施した。DI-EI-MS の *m/z* 50~500 における各ピーク強度と機能性の値について二変量解析を行った結果、機能性に寄与する特徴的な *m/z* が列挙された。本結果を活用することで、DI-EI-MS データから機能性の強弱を予測できる可能性が示唆された。

Metabolomics in natural materials is a method of performing comprehensive analysis using an analytical instrument such as MS on a mixture of materials without identifying the contained components individually. We have used direct-introduced electron-ionized mass spectrometry (DI-EI-MS) metabolomics to search *m/z* that contributes to blueberry leaf functionality (preventive effect on adult T-cell leukemia). Recently, it has been found that blueberry stems have higher functionality than leaves, but it is difficult to identify the differences in the components contained by conventional isolation and purification. Therefore, for the purpose of comprehensive analysis of the contained components, we performed DI-EI-MS metabolomics on blueberry leaves and stems, and a mixture of leaves and stems. Hot water extracts were prepared for each of 10 blueberry leaves, stems, and a mixture of leaves and stems, and their functionality was evaluated. In addition, DI-EI-MS of each extract was measured, and metabolomics analysis was performed using statistical analysis software (JMP Pro 14.2). From the result of bivariate analysis of each peak intensity and functional value at *m/z* 50 to 500 of DI-EI-MS, characteristic *m/z* that contribute to functionality was listed. It was suggested that by utilizing this result, it is possible to predict the strength of functionality from DI-EI-MS data.

metabolomics, blueberry, adult T-cell leukemia

発表責任者：甲斐久博（hkai@phoenix.ac.jp）

講演番号：3G06-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

ボイセンベリーアントシアニンが結腸がん細胞の増殖に及ぼす影響

Effect of Boysenberry anthocyanins on the growth of colon cancer cells

○鈴木 晶貴[1]、水木 徹[4]、三浦 健[1,2,3] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学、[3]東洋大・ ライフイノベーション研究所、[4]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Aki SUZUKI[1], Toru MIZUKI[4], Takeshi MIURA[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University, [4]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景・目的】世界的な健康志向の上昇により、様々な食品および食品含有成分において健康への影響の研究が進められている。多くの果実に含まれているアントシアニンは、抗酸化作用・抗炎症作用を有することで広く知られており、近年ではがん細胞の増殖を抑制するという報告もあがっている。アメリカ原産であるボイセンベリーはアントシアニンを 4 種と豊富に含んでおり、アントシアニンによる健康効果が期待できる。本研究では、ボイセンベリーアントシアニンがもたらす結腸がん細胞（DLD-1）の増殖への影響を解析することを目的とし、細胞の生存率の測定と細胞死のメカニズム解析を行った。
【結果・考察】DLD-1 の培養時にボイセンベリーアントシアニンを添加したところ、細胞の生存率が減少した。また、ボイセンベリーアントシアニン 4 種のうち 2 種類を異なる濃度で配合して添加したところ、配合量によって同じ組み合わせでも細胞の生存率に差が見られた。このことから、ボイセンベリーアントシアニンががん細胞増殖抑制効果を有すること、また、配合量によって違う影響が見られることが分かった。その一方で、電気泳動によって断片化 DNA を確認した。よって、ボイセンベリーアントシアニンの添加でアポトーシスが誘導されていることが明らかになった。がん細胞増殖抑制効果のメカニズムについては、発表にて詳細に述べる。

The effects on health of various foods and ingredients of foods have been actively studied around the world due to increasing health-consciousness. It is widely known that anthocyanins contained in various fruits are widely known to have antioxidant and anti-inflammatory effect, and it has been reported that they inhibit the growth of cancer cells especially in recent years. Boysenberry, which is native to the USA, is rich in four types of anthocyanins, therefore, its health benefits are expected. The purpose of this study is to analyze the effect of boysenberry anthocyanin on the growth of colon cancer cells (DLD-1).
We have shown that the viability of DLD-1 cells has been reduced in culture supplemented with boysenberry anthocyanins, furthermore, the cell viability changes depending on the mixing ratio and amount of the added anthocyanins. It has been clarified that boysenberry anthocyanins induce apoptosis of DLD-1 cells by detection of fragmented DNA. The mechanism of the cancer cell growth inhibitory effect will be described in detail in the presentation.

berry, anthocyanin, cancer

発表責任者：鈴木晶貴（s39102010028@toyo.jp）

講演番号：3G06-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

中国産食用茸ツブイボダケ（*Thelphora vialis*）含有 vialinin A の HCT116 細胞における アポトーシス誘導効果の検討

Vialinin A, isolated from a Chinese edible mushroom *Thelphora vialis*, induces apoptosis in HCT116 colon cancer cells.

○附柴 央織[1]、小野瀬 淳一[1,2]、菅谷 紘一[1,2]、阿部 尚樹[1,2]（[1]東農大院・健康、[2]東農大・応生・健康）
○Hironori TSUKESHIBA[1], Jun-ichi ONOSE[1,2], Kouichi SUGAYA[1,2], Naoki ABE[1,2] ([1]Dept. of Nutri. Sci & Food Safety, Grad. Sch. of Applied Bio Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Faculty of Applied Bio Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

当研究室において中国産ツブイボダケ（*Thelphora vialis*）より単離、構造決定した vialinin A が ubiquiti-specific peptidase 5（USP5）の活性を阻害することを明らかにしている。一方、近年 USP5 を抑制することにより癌抑制タンパク質 p53 が安定化するという知見が報告された。そこで vialinin A 処理することにより USP5 活性を抑制することで、p53 を安定活性化して癌細胞にアポトーシスを誘導することを想定した。そこで、本研究では野生型 p53 発現ヒト大腸がん由来細胞株 HCT116 を用いて vialinin A のアポトーシス誘導能について評価することを目的とした。MTT 法により vialinin A 処理 HCT116 細胞の生存率を測定した結果、100 μM で 50%程度まで低下したことから、フローサイトメーターを用いてアポトーシス細胞数を評価した結果、濃度依存的に初期アポトーシスと後期アポトーシス及びネクローシス状態の細胞を増加が認められた。次に caspase 3 の活性型である cleaved-caspase3 の量をウエスタンブロッティングを用いて検討したところ、濃度依存的な上昇が確認された。以上の結果から vialinin A はアポトーシスによる細胞死を誘導していることが示唆された。さらに、p53 および p21 に対する vialinin A 処理による安定化についても検討している。

Vialinin A, isolated from a Chinese edible mushroom, *Thelphora vialis*, shows inhibitory activity against TNF-α secretion. Furthermore, USP5, an intracellular target molecule of vialinin A is suggested to be a key molecule of TNF-α production. On the other hand, it was reported that p53 is stabilized by regulating USP5. Based on these findings, a hypothesis was assumed that with vialinin A allowed the induction of apoptosis in cancer cells by stabilizing and activating p53 through inhibition of USP5 activity. In this study, it was investigated that the induction of apoptosis in HCT116, expressing wild-type p53, through p53 activation by vialinin A treatment. As a result, vialinin A showed 50% cell viability at 100 μM. Examining cell death using flow cytometry showed a marked increase in early and late apoptotic cells compared to controls. Western blotting with the cleaved-caspase 3 antibody showed an increase in active caspase with time. The finding suggested that vialinin A treatment induced apoptosis in HCT116 cells, and expected to be a promising candidate as cancer drug with a novel mechanism of action.

Thelphora vialis, Vialinin A, apoptosis

発表責任者：附柴央織（10720012@nodai.ac.jp）

講演番号：3G06-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

ボイセンベリー葉抽出物ががん細胞へ及ぼす影響

Effect of boysenberry leaf extracts on cancer cells

○中村 聡太[1]、橋本 奈々美[2]、水木 徹[4]、三浦 健[1,2,3] ([1]東洋大学・生命科学、[2]東洋大院・生命科学、[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所、[4]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Sota NAKAMURA[1], Nanami HASHIMOTO[2], Toru MIZUKI[4], Takeshi Miura[1,2,3] ([1]Faculty of Life Science, Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo Univ., [4]BNERC, Toyo Univ.)

ボイセンベリーはカリフォルニア北部を原産地とする果実で、東洋大学板倉キャンパス近隣の群馬県館林市でも特産品のひとつとして生産が行われている。果実には特有のアントシアニンやエラグ酸、葉酸など美容や健康に良いとされる化合物が多く含有されており、機能性食品として注目を浴びている。一方ボイセンベリー葉にもケルセチンやエラグ酸などのポリフェノールや、フラボノイドの 1 種であるケンフェロールが含まれている。ポリフェノールはその抗酸化作用や抗がん作用を有することが報告されるとともに、食餌療法への応用についても研究が進められている。本研究ではボイセンベリー葉成分ががん細胞へ及ぼす影響の解析を目的とした。

ボイセンベリー葉を凍結乾燥しソックスレー抽出機を用いて加熱することで葉成分抽出液を取得した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した後、各分画液を減圧乾燥し抽出サンプルを調製した。各サンプルの細胞毒性を Presto Blue 試薬を用いて測定したところ、がん細胞のみに強い毒性を示す画分が確認された。ボイセンベリー葉抽出物が細胞内機構に及ぼす影響の解析結果も含め発表する。

Boysenberry is known as a hybrid of three berries; blackberry, raspberry and loganberry. The fruit of boysenberry contains many compounds that are considered to have beneficial effect on beauty and health such as specific anthocyanins, ellagic acid and folic acid. The leaves also have polyphenols and a flavonoid such as quercetin, ellagic acid and kaempferol as components. It has been reported that polyphenols have antioxidant and anticancer effects, and in recent years, their application to diet therapy has been actively studied. In this study, we aimed to analyze the effect of boysenberry leaves components on cancer cells.

We obtained leaf components mixture by heat-extracting freeze-dried leaves with soxhlet extractor. After purifying the mixture by silica gel column chromatography, fractions were dried up with centrifuge evaporator. We measured the cytotoxicity of each fraction by presto blue assay, and have confirmed that a certain fraction showed a growth inhibitory effect only on cancer cells. We will discuss the effect of boysenberry leaf extracts on the intracellular mechanism of cancer cells in the presentation.

leaf extracts, cancer cells, boysenberry

発表責任者：中村聡太（s19201801192@toyo.jp）

講演番号：3G06-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

高リン負荷による肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響

Effect of high-phosphorus stimulation on hepatic lipid metabolism related gene expression

○前多 隼人[1,2]、柴田 真樹[1]、永長 一茂[2]、岡田 晋治[3]、中井 雄治[2] ([1]弘大院農、[2]弘大地域戦略、[3]東京大院農)
○ Hayato MAEDA[1,2], Masaki Shibata[1], Kazushige Nagaosa[2], Shinji Okada[3], Yuji Nakai[2] ([1]Hirosaki Univ. Agr., [2]Hirosaki Univ. IRI, [3]Tokyo Univ. Agr.)

本研究では高リン食の単回摂取がラット肝臓に及ぼす影響を検討した。更にヒト肝細胞(HepG2)を高リン含有培地にて培養し、脂質代謝に関与する因子の変化について分析を行った。

5 週齢の Wistar 系雄ラットを、1 日 8 時間の制限給餌で 7 日間飼育した。8 日目にコントロール食(0.3%リン)群と高リン食(1.2%リン)群に分け、8 時間給餌した後解剖を行い、肝臓から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。細胞実験は HepG2 細胞を通常 DMEM 培地または高リン酸培地で 24 時間培養後に total RNA を回収し、FGF21 mRNA 発現量を定量 PCR 法にて、培地中 FGF21 濃度を ELISA 法にて分析した。

血清中無機リンは高リン食群で有意に高く、高リン状態の誘導が確認されたが、PTH 濃度に有意差はなかった。肝臓の DNA マイクロアレイ解析の結果、主に脂質代謝に関わる遺伝子が発現変動していた。血清中 FGF21 濃度の上昇も確認された。培養細胞試験では、高リン酸培地では FGF21 は mRNA・タンパク質共に発現上昇していた。また、脂質代謝制御に関与する PPARα の mRNA 発現も上昇した。以上の結果から、肝臓では PTH によって間接的に高リン刺激の影響を受けるのではなく、高リン刺激を直接的に感知して脂質代謝関連遺伝子の発現変動が起こることが示唆された。

The effects of a single intake of a high phosphorus diet on rat liver were examined. Moreover, we cultured HepG2 in medium containing high phosphorus and analyzed the changes in factors involved in lipid metabolism.

Five-week-old male Wistar rats were divided into a control and a high phosphorus diet groups and fed for 8 hours. Total RNA was then extracted from the excised livers and subjected to DNA microarray analysis. In the cell experiment, HepG2 cells were cultured in normal DMEM medium or high phosphate medium for 24 hours. Then both FGF21 mRNA and protein expression levels were analyzed.

Serum inorganic phosphate was significantly higher in the high-phosphorus diet group, showing a hyperphosphatemia. On the other hand, there was no significant difference in PTH levels. DNA microarray analysis in the liver showed that the expressions of lipid metabolism related genes were changed. Cell experiment showed that both mRNA and protein expression of FGF21 were up-regulated in high phosphate medium cultured cells. In addition, the expression of PPARα mRNA was also increased.

These results suggest that the liver directly sensed the stimulus of high-phosphorus and changes in the expression of genes related to lipid metabolism was induced.

phosphorus, lipid metabolism, DNA microarray

発表責任者：前多　隼人（hayatosp@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3G06-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

マルトビオン酸カルシウムと牛乳の同時摂取が健常成人男女のミネラル吸収効率に与える影響

Effect of simultaneous intake of calcium maltobionate and milk on mineral absorption efficiency in healthy adults

○森脇 勇一郎[1]、高峰 弘起[2]、末廣 大樹[3]、深見 健[3]、大西 素子[1,2]([1]中部大院　応生、[2]中部大　応生、[3]サンエイ糖化（株））
○ Yuichiro MORIWAKI[1], Hiroki TAKAMINE[2], Daiki SUEHIRO[3], Ken FUKAMI[3], Motoko OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]Dept. Biological Chemistry, Chubu Univ., [3]San-ei Sucrochemical Co., Ltd.)

カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、亜鉛(Zn)、鉄(Fe)は、20 代の日本人において不足しがちな栄養素である。マルトビオン酸(MB)は、グルコースにグルコン酸がα1,4 結合した二糖であり、各種ミネラルとイオン結合して高い水溶性を維持する特徴を持つ。MB の Ca 塩であるマルトビオン酸 Ca(MBCa)は、ラットにおいて、Ca、Mg および Fe の吸収促進効果が報告されている。本研究ではミネラルの吸収性に優れる牛乳と MBCa を同時摂取した際のミネラル吸収効率について、ヒト臨床試験にて検証することを目的とした。健康な大学生 23 人を対象としたクロスオーバー比較試験を行った。試験当日は、マルトース＋炭酸 Ca(炭酸 Ca 群)、牛乳＋炭酸 Ca(牛乳＋炭酸 Ca 群)、牛乳＋MBCa(牛乳＋MBCa 群)を朝食と一緒にそれぞれ摂取させた。摂取後 2 時間毎に採尿し、尿中 Ca、Mg、Zn および Fe 含量を測定した。牛乳＋炭酸 Ca 群および牛乳＋MBCa 群における摂取 2 時間後の尿中の各ミネラル量は、炭酸 Ca 群と比較して有意な高値を示した。更に摂取 4、6 時間後では、牛乳＋MBCa 群のみで継続して有意に高い値であった。以上の結果より牛乳と MBCa の同時摂取は、ミネラル吸収促進効果が長時間持続することで、牛乳単独摂取よりも更に効率的に吸収可能であることが示唆された。

Calcium (Ca), magnesium (Mg), zinc (Zn) and iron (Fe) are often deficient in Japanese people in their 20s. Maltobionic acid (MB) is a disaccharide consisting of glucose and gluconic acid linked by alpha 1,4 bonds, and shows excellent solubilization stability in calcium and other mineral salts. The Ca salt of MB, maltobionic acid Ca (MBCa), has been reported to enhance the absorption of Ca, Mg and Fe in rats. The aim of this study was to investigate the efficiency of mineral absorption by simultaneous intake of MBCa and milk, which has excellent mineral absorption properties, in a human clinical trial. A cross-over comparative study was performed on 23 healthy university students. On the day of the study, subjects consumed maltose + $CaCO_3$ ($CaCO_3$ group), milk + $CaCO_3$ (milk + $CaCO_3$ group) or milk + MBCa (milk + MBCa group) with breakfast, respectively. Urine was collected every 2 hours after ingestion and urinary Ca, Mg, Zn and Fe contents were determined. The urinary Ca, Mg, Zn and Fe contents of the milk + $CaCO_3$ group and the milk + MBCa group were significantly higher than those of the $CaCO_3$ group after 2 hours of ingestion. Furthermore, after 4 and 6 hours of ingestion, only the milk + MBCa group continued to have significantly higher levels of each mineral contents. These results suggest that the simultaneous consumption of milk and MBCa has a long-lasting effect on mineral absorption, which is even more efficient than the consumption of milk alone.

oligosaccharide, minerals, calcium

発表責任者：大西素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3G06-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

許容一日摂取量以下のニコチンアミドの単回投与で健常者血中 NAD+量が増加する

A single oral supplementation of nicotinamide within the daily tolerable upper level increases blood NAD+ levels in healthy subjects

○伊藤 孝[1]、吉田 稔[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]東大院農・応生工)
○TAKASHI ITO[1], Minoru Yoshida[1,2] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

（日本語の要旨を記載される場合には、上部を日本語、下部を英語として下さい。）
生物で普遍的に利用される補酵素 NAD+は真核生物において加齢で減少し、その補充で広くモデル生物の寿命が延長する。ビタミン B3(ニコチンアミド、ニコチン酸)は理論的には生体内で NAD+に変換され得るが、実際にヒトでの投与が NAD+量増加につながるか実証されていなかった。我々は健常被験者にニコチンアミドを一日の推奨摂取量(約 15 mg)より高く、重篤な副作用が起きないことが長年に渡る試験で判明している投与量(2000 mg 未満)の範囲内で単回投与するデザインで臨床試験を行った。ニコチンアミド 200 mg の経口投与した際、約 17%は血中に滞留し、2%は尿中に放出されることを確認した。ニコチンアミド 200 mg、500 mg 単回投与で血中 NAD+濃度は有意に上昇し、100 mg もしくは水のみ服用では有意な変化は確認されなかった。血中水溶性メタボローム解析で 12h、24h 後に有意な代謝物群の変化がみられ、48h 後に投与前の組成に一致した。血中リピドーム解析において、投与前は実験群間で有意に量が異なる脂質種はなかったが、100mg 、500 mg ニコチンアミド投与後 12h で約 20%(277/1463 脂質種)が変化した。以上の結果は、200-500 mg 単回投与でニコチンアミドは健常者で血中 NAD+を増加するとともに、脂質種の構成を大きく変える作用があることを示す。
The coenzyme NAD+ decreases with age in eukaryotes, and boosting NAD+ levels widely prolongs the lifespan of model organisms. Vitamin B3 (nicotinamide, nicotinic acid) can theoretically be converted to NAD+ in vivo, but it has not been demonstrated whether administration in humans leads to an increase in NAD+ levels. We found that single oral supplementation of nicotinamide between 200 mg and 500 mg in healthy subjects was sufficient to increase their blood NAD+ levels. In addition, blood-soluble metabolome analysis showed significant changes in metabolites 12 h and 24 h after administration, and returned to the pre-treatment levels at 48 h. In blood lipidome analysis, about 20% (277/1463 lipid species) changed 12 h after administration of 100 mg or 500 mg nicotinamide, although no lipid species were significantly different among the experimental groups before administration. These clinical trials show that oral supplementation of nicotinamide within the daily tolerable upper level is an effective way to transiently increase NAD+ levels and affect the composition of blood lipids.

nicotinamide, NAD+, clinical trial

発表責任者：伊藤　孝（takashi.ito.cj@riken.jp）

講演番号：3G06-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

ビタミン B_{12} 欠乏が引き起こす酸化ストレス誘導の分子メカニズムの解明
Elucidation of the molecular mechanism of oxidative stress induced by B_{12} deficiency
○陳 霽戎、谷川 尚子、美藤 友博、薮田 行哲、渡辺 文雄（鳥取大院持続）
○JIXU CHEN, Shoko Tanigawa, Tomohiro Bito, Yukinori Yabuta, Fumio Watanabe (Tottori Univ.)

［背景と目的］ビタミン B_{12} (B_{12})は葉酸とともに赤血球の形成、成熟、及び DNA の合成に必要であり、神経機能の維持にも重要な役割を果たしている。細胞内に取り込まれた B_{12} は補酵素型である CH_3-B_{12} と $AdoB_{12}$ へと変換される。CH_3-B_{12} は細胞質でメチオニンの生合成に関与し、$AdoB_{12}$ はメチルマロニル CoA ムターゼによるミトコンドリア内の奇数脂肪酸の分解とスクシニル CoA の合成に関与する。近年、線虫 *Caenorhabditis elegans* の生育に B_{12} が必要であり、B_{12} 欠乏は酸化ストレスを引き起こすことが報告された。しかしながら、その誘導メカニズムは不明である。そこで本研究ではこのことを明らかにするため、B_{12} 代謝に関わる *metr-1*、*mmcm-1*、 *mmaa-1*、*cblc-1* の四つの遺伝子破壊線虫を用いて、メチルマロン酸(MMA)、ホモシステイン(Hcy)および、活性酸素(ROS)のレベルを測定した。また、これらの遺伝子破壊線虫の寿命についても調べた。

［方法］ 大腸菌 OP50 と HT115 を食餌とし線虫に与え、MMA 及び Hcy の蓄積量を測定した。また、線虫の寿命を測定した。さらに、O_2^- の消去に関わる *sod-3* のプロモーターに GFP を連結した *sod-3p*:::GFP 線虫とそれぞれの遺伝子破壊線虫を交配した株の蛍光を観察した。

［結果］ OP50 を与えた N_2 線虫は HT115 を与えた場合と比較して、MMA、Hcy 量の増加、寿命の短縮や蛍光強度の有意な差が認められた。このことから OP50 を与えた場合 B_{12} 欠乏を呈することから、遺伝子破壊線虫には HT115 を与える事とした。*mmaa-1*、*mmcm-1*、*cblc-1* 遺伝子破壊株では、N_2 線虫と比較すると MMA の蓄積量は大幅に増加した。Hcy の蓄積量は *cblc-1* 遺伝子破壊株のみで増加していた。また、*mmaa-1*、*mmcm-1*、*cblc-1* 遺伝子破壊株の寿命は N_2 線虫と比較し短縮し、*sod-3p*:::GFP と交配した線虫の蛍光強度の有意な上昇が認められた。一方で、*metr-1* 遺伝子破壊株では、MMA と Hcy の蓄積、寿命や蛍光強度の有意な変化が認められなかった。以上の結果より、B_{12} 欠乏により、MMA および Hcy の蓄積が酸化ストレスの誘導に寄与していることが示唆された。

It has been well known that vitamin B_{12} deficiency cases induction of oxidative stress. However, the mechanism of its induction has not been elucidated yet. Here, we investigated the mechanism using four types of gene-deficient *C. elegans* mutants involved in B_{12} metabolism. Our results indicated that MMA and Hcy in these mutants, except for *metr-1* mutants accumulated and those lifespans shortened. Furthermore, these mutants show a significant increase in ROS accumulation, suggesting the MMA and Hcy accumulation by B_{12} deficiency induces oxidative stress.

Caenorhabditis elegans, Reactive oxygen species, Vitamin B_{12}

講演番号：3G06-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

ビタミン E 類の側鎖構造による細胞内取り込み量の違い：アルブミンとの親和性に着目して

Differences in cellular uptake of vitamin E analogs depending on their side-chain structures: Focusing on their affinity with albumin

○中冨 毅[1]、板谷 麻由子[1]、堀越 洋輔[2]、永塚 貴弘[1]、田中 良和[3]、松浦 達也[2]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]鳥取大医、[3]東北大院生命)
○Takashi NAKATOMI[1], Mayuko ITAYA[1], Yosuke HORIKOSHI[2], Takahiro EITSUKA[1], Yoshikazu TANAKA[3], Tatsuya MATSURA[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tottori Univ. Med., [3]Tohoku Univ. Life Sci.)

【目的】 ビタミン E はクロマン環に側鎖が結合した分子構造で、飽和側鎖を持つトコフェロール (Toc) と不飽和側鎖を有するトコトリエノール (T3) に大別され、抗酸化等の様々な生理作用は、Toc よりも T3 の方が強いことが多くの細胞実験で報告されている。これは、T3 の細胞内取り込み量が Toc よりも多いことが要因の一つと考えられているが、その機構の詳細は不明な点が多い。こうした中、当研究室では、種々の食品成分の細胞内取り込みが培地中のアルブミンに影響を受ける現象を見出しており、本研究ではアルブミンが Toc と T3 の細胞内取り込みに影響を与えるか検証した。
【方法と結果】 まず、ヒト単球細胞 (THP-1 細胞) を用いて α-Toc と α-T3 の細胞内取り込み試験を行ったところ、10% FBS 添加培地で α-Toc よりも α-T3 の取り込み量が多くなった。さらに、無血清培地に種々の濃度のウシ血清アルブミン (BSA) を加えて検討すると、特定の BSA 濃度で α-T3 の取り込み量が顕著に増加した。次に、α-Toc/T3 を低温 (4°C) での取り込み試験に供すると、このような α-T3 の取り込みは確認されなくなった。なお、クロマン環構造が異なる Toc と T3 (β-、γ-、δ- 類縁体) の間でも、37°C の細胞内取り込み試験において同様の傾向が認められた。さらに、蛍光クエンチング法により得られたビタミン E 類縁体と BSA の親和性は、α-、β-、γ-、δ-のいずれでも Toc < T3 となり、ドッキングモデル解析でも同様の結果が示された。
【考察】 Toc と T3 の細胞内取り込み量の違いにアルブミンが関与し、特に T3 でアルブミンを介する能動輸送が顕著に生じることが示唆された。このような取り込みの違いはクロマン環の構造によらず確認され、Toc と T3 の側鎖構造の違いによる寄与が考えられた。蛍光クエンチング法、および、ドッキングモデル解析より、Toc と T3 のアルブミンとの親和性が側鎖構造で異なることが見出され、アルブミンによる能動輸送が Toc と T3 の取り込み量に違いを引き起こす要因の一つと考えられた。

Vitamin E analogs, tocopherols (Toc) and tocotrienols (T3), structurally differ by their side-chain structures, and previous studies have demonstrated that the cellular uptake of T3 is higher than that of Toc. In this study, we found by cellular uptake tests that albumin-mediated active transport significantly affected cellular uptake of T3 (but not significantly in Toc). Furthermore, the affinity with albumin was shown as Toc < T3 from fluorescence quenching and docking model analysis, suggesting that such difference in affinity is related to the difference in their albumin-mediated active transport.

vitamin E, cellular uptake, albumin

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G06-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

PQQ によるコロナウイルス感染抑制

Pyrroloquinoline quinone disodium suppresses coronavirus infection

○池本 一人、辻 シャフィカ、中村 友恵 (三菱ガス化学)
○Kazuto IKEMOTO, Nur Syafiqah Mohamad Ishak, Tomoe Nakamura (Mitsubishi Gas Chemical Co.)

新型コロナウイルス感染症 COVID-19 は感染者 2 億 3700 万人、死者 480 万人（2021 年 10 月時）を出し、社会に大きなダメージを残している。このウイルスに対して様々な食品成分による感染抑制の可能性が報告されている。ピロロキノリンキノンジナトリウム（PQQ）は、ミトコンドリア新生や脳機能改善等様々な機能が知られている。我々は PQQ に注目し、コロナウイルスの感染抑制について調べた。コロナウイルス複製に重要なメインプロテアーゼ（3 CL-pro）阻害は感染抑制の標的機構である。ドッキングシュミレーション、酵素アッセイ実験は PQQ の 3CL-pro 阻害活性を示した。さらにモデルとしてネココロナウイルスとネコ培養細胞（CRFK 細胞）を使って感染抑制試験を行った。実験は食品 GMP で製造されている BioPQQ を使用した。無添加（Control）ではウイルスによるプラーク形成がみられ、PQQ 添加によってプラーク形成は抑制されていた（Fig 1）。PQQ はコロナウイルスの感染抑制効果を有していた。



PQQ

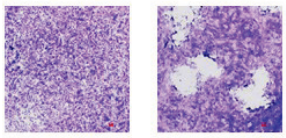


Fig 1

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has infected 237 million people and caused 4.8 million (October 2021), significantly damaging the society. It has been reported that various food components may suppress SARS-CoV-2 infection. Pyrroloquinoline quinone disodium (PQQ) has various functions such as mitochondrial neoplasia and brain function improvement. Therefore, we investigated the PQQ-mediated SARS-CoV-2 infection suppression. PQQ suppresses infection by inhibiting the main protease (3CL-pro) that is important for SARS-CoV-2 replication, as shown through docking simulation and enzyme assay. Furthermore, an infection suppression test was conducted using feline coronavirus and cultured cat cells (CRFK cells) as models and BioPQQ manufactured in food GMP. Viral plaque formation was observed with no addition (Control), which was suppressed by PQQ addition (Fig. 1). Thus, PQQ suppressed coronavirus infection.

PQQ, coronavirus, COVID-19

発表責任者：池本一人（kazuto-ikemoto@mgc.co.jp）

講演番号：3G06-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム G

Pyrroloquinoline quinone により活性化される G タンパク質共役型受容体の同定
Identification of GPCR activated by pyrroloquinoline quinone

○金森 星[1]、若林 万由香[1]、下村 沙也子[1]、服部 浩之[1]、赤川 貢[2]、井上 飛鳥[3]、内田 浩二[4]、柴田 貴広[1] ([1]名大院生命農、[2]大阪府大院生命環境、[3]東北大院薬、[4]東大院農生科)
○Akari KANAMORI[1], Mayuka WAKABAYASHI[1], Sayako SHIMOMURA[1], Hiroyuki HATTORI[1], Mitsugu AKAGAWA[2], Asuka INOUE[3], Koji UCHIDA[4], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Life & Environmental Sci. Osaka Pref. Univ., [3]Grad. Sch. of Pharm. Sci. Tohoku Univ., [4]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

Pyrroloquinoline quinone(PQQ)は様々な食品中に含まれる成分であり，これまでに抗酸化機能をはじめとした様々な生理機能が多数報告されているが，その詳細な作用機序は明らかになっていない。また近年，食品由来成分やその代謝物などをアゴニストとする代謝物感受性 GPCR が同定され，様々な生理機能を調節していることが明らかとなりつつある。そこで本研究では，GPCR の活性化を高感度かつ高精度に検出可能なトランスフォーミング増殖因子α(TGFα)切断アッセイを用いて，PQQ がアゴニストとして働く代謝物感受性 GPCR の探索を行った。食品が高濃度に接する腸管に発現する代謝物感受性 GPCR を 6 種選択し，それぞれの GPCR に対する PQQ のリガンド活性を測定した。その結果，6 種の受容体のうち GPR35 のみが PQQ によって活性化された。この活性は PQQ の処理濃度依存的に増加し，GPR35 特異的アンタゴニストである CID2745687 によって阻害されることを確認した。次に，光親和性標識実験により生細胞環境下における PQQ と GPR35 の相互作用を検討した。PQQ にベンゾフェノンを導入した光親和性プローブを作製し，Halo タグ融合 GPR35 を発現させた HEK293 細胞に対する標識実験を行ったところ，光親和性プローブによって Halo タグ融合 GPR35 が捕捉された。以上の結果から，PQQ は GPR35 に特異的に結合し，活性化する可能性が示唆された。

Pyrroloquinoline quinone (PQQ), a redox cofactor, has been found in various fruits, vegetables, and even mammalian animal tissues. In this study, we attempted to identify the metabolite-sensing G protein-coupled receptors (GPCRs) activated by PQQ using the TGF-alpha shedding assay. Among the six kinds of GPCRs we tested, GPR35 was significantly activated by PQQ. We also confirmed that PQQ-induced activation of GPR35 was inhibited by the pretreatment of a specific GPR35 antagonist. To examine the interaction between PQQ and GPR35 in living cell systems, we synthesized a benzophenone derivative as a PQQ photoaffinity probe. When Halo-tagged GPR35-expressing HEK293 cells were treated with the PQQ photoaffinity probe and irradiated UV, the photoaffinity probe captured Halo-tagged GPR35 protein. These findings suggest that GPR35 might act as a receptor of PQQ.

Pyrroloquinoline quinone, GPR35, GPCR

講演番号：3G08-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

梅由来ケイ皮酸類の皮膚老化抑制効果

Anti-skin-aging activity of cinnamic acid derivatives from *Prunus mume*

○奥野 祥治[1]、上田 有里子[1]、宇都宮 洋才[2]、河野 良平[2]([1]和歌山高専、[2]和歌山医大)
○Yoshiharu OKUNO[1], Yuriko UEDA[1], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2], Ryouhei KONO[2] ([1]National Institute of Technology, Wakayama College, [2]Wakayama Medical Univ.)

皮膚の老化現象であるシワやタルミは、皮膚の弾力性やハリを保つうえで重要な成分であるコラーゲンが、コラゲナーゼにより分解されることが主な原因である。そのため 、コラゲナーゼの活性を阻害することはシワやタルミなど皮膚の老化予防に有用な手段であると考えられている。これまで、植物抽出物から多くのコラゲナーゼ阻害物質が見出されており、我々も、2020 年度大会において梅干し、梅干し果肉抽出物のコラゲナーゼ阻害効果について報告した。そこで、本研究では梅干し果肉に含まれるコラゲナーゼ阻害物質の探索およびその阻害形式について検討した。

コラゲナーゼ阻害試験を指標として梅干し果肉抽出部の分画を行い、*trans*-coumaric acid (**1**)を阻害物質として単離、構造決定した。化合物 **1** は 120 μM で 56%のコラゲナーゼ阻害活性を示し、IC50 は 112 μM であった。また、HPLC 分析により梅干しには類似化合物である *tans*-cinnamic acid (**2**)、 *trans*-caffeic acid (**3**)および *trans*-ferulic acid (**4**)が含まれていた。これら 4 種の化合物のコラゲナーゼ阻害効果を比較したところ、**2** 以外の化合物が阻害活性を示し、特に **3** が最も強い阻害活性を示した。このことから、阻害効果には芳香環の水酸基の増加が関与していることが考えられた。また、阻害形式について検討したところ、化合物 **1** および **4** は非競合的、**3** は競合的に阻害することが示唆された。さらに **1**、**3** および **4** はヒト由来のコラゲナーゼに対しても阻害活性を示した。

Collagen is broken down by collagenase, and it is an important factor in skin aging. A lots of collagenase inhibitors has been isolated and identified from plant extracts. In this study, we report the structure of collagenase inhibitors in pickled of *Prunus mume* and there mode of action.

The methanol extract from pickled of *P. mume* inhibited the collagenase activity. The fractionation of extracts was carried out with collagenase assay as a guide, and *trans*-coumaric acid (**1**) was isolated and identified as collagenase inhibitor. Compound **1** exhibited 56% of inhibitory effects at a concentration of 120 μM and IC50 value was 112 μM. In HPLC analysis, *trans*-cinnamic acid (**2**), *trans*-caffeic acid (**3**) and *trans*-ferulic acid (**4**) were contained in *P. mume*, and inhibitory effects of these four compounds **1** – **4** were determined. Compounds **1**, **3** and **4** showed potent inhibitory effect, but **2** did not. From this result, it was considered that the increase of hydroxyl group on aromatic ring were important factor for activity. The inhibition mode of active compounds were investigated by Lineweaver-Burk plot. Compounds **1** and **4** exhibited non-competitive type, while **3** exhibited competitive type. Furthermore, **1**, **3** and **4** showed inhibitory effect against human collagenase activity.

Prunus mume, Anti-skin-aging, Collagenase inhibitor

発表責任者：奥野祥治（okuno@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：3G08-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

スイカ摘果幼果から単離した新規フェノール配糖体による抗光皮膚老化作用

Citrulluside H and citrulluside T from young watermelon fruit attenuate ultraviolet B radiation-induced matrix metalloproteinase expression through the scavenging of generated reactive oxygen species in human dermal fibroblast

○伊藤 智広[1]、藤田 信吾[2]、纐纈 守[3]、橋詰 利治[2] ([1]三重大院生資、[2]萩原農場、[3]岐阜大工)
○Tomohiro ITOH[1], Shingo FUJITA[2], Mamoru KOKETSU[3], Toshiharu HASHIZUME[2] ([1]Mie Univ., [2]Hagihara Farm Co., [3]Gifu Univ.)

【目的】スイカ栽培時に副産物として生じる摘果幼果から抗酸化活性を示す２種の新規化合物 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4-β-D-glucopyranosyloxy-3-hydroxybenzyl ester (Citrulluside H), 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4-β-D- glucopyranosyloxybenzyl ester (Citrulluside T)をそれぞれ単離した。これら新規化合物の UV-B 照射後のヒト新生児正常皮膚線維芽細胞おける光皮膚老化抑制効果について検証した。

【方法】ヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF)に Citrulluside H および T を添加し 24 時間前培養した後， UV-B を 25 mJ/cm^2 照射した。照射 24 時間後，細胞を回収し，光皮膚老化の指標であるコラーゲン分解酵素 MMP-1 の mRNA 及びタンパク質発現を定量的リアルタイム PCR 法ならびウエスタンブロット法にてそれぞれ解析した。また，UV-B 照射後の細胞内活性酸素量，AP-1 転写活性，カルボニル化タンパク質の産生量をルシフェラーゼレポーターアッセイ法，蛍光強度測定および Protein Oxidation Detection Kit にてそれぞれ評価した。

【結果及び考察】単離した Citrulluside H および T は，UV-B 照射後の NHDF 細胞における MMP-1 発現を遺伝子レベルで下方制御した。UV-B 照射後の MMP-1 発現シグナルの律速分子である細胞内の活性酸素種量ならび紫外線照射により活性化された MMP-1 発現シグナル分子である p38 MAP キナーゼや SAPK/JNK, NF-κB の活性化も有意に減弱し，下流の AP-1 の転写活性も伴って低下した。また，カルボニル化タンパク質のレベルもこれら物質の処理により有意に低下した。以上の結果から，Citrulluside H および T が持つ抗酸化能が光皮膚老化を抑制に関わっているものと推察された。

Excessive exposure to ultraviolet radiation (UV-R) contained in sunlight induces skin photoaging, which can lead to skin cancer. When UV radiation hits the skin, reactive oxygen species (ROS) are produced, and the expression of molecules involved in melanin synthesis and the oxidative stress defense systems are promoted. Prolonged exposure to UV-R disrupt oxidative stress defense systems, and these ROS cause oxidative damage to DNA, proteins, carbohydrates and lipids due to the inability to scavenge excess ROS. Therefore, in order to complement the antioxidant system, complementary therapies using antioxidant components such as polyphenols contained in natural products are attracting attention.

For the purpose of finding effective utilization of plucked-young watermelon (*Citrullus lanatus*) fruits, we recently isolated two novel phenolic glycosides that exhibit antioxidative activity, 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4'-β-D-glucopyranosyloxy-3'-hydroxybenzyl ester (citrulluside H) and 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4'-β-D-glucopyranosyloxybenzyl ester (citrulluside T) which have an antioxidative activity. In this study, the expression of MMP-1 and MMP-3, which are matrix metalloproteinases deeply involved in wrinkle formation, was further evaluated as an index to determine whether these components show suppression of skin photo-aging. Citrulluside H and citrulluside T significantly downregulated the protein and mRNA expressions of these MMPs through the attenuation of MAPK/AP-1 and NF-κB signalings in UV-B-irradiated normal human dermal fibroblasts. Furthermore, both citrullusides decreased the production of intracellular ROS that activate MAPK/AP-1 and NF-κB signalings and the levels of oxidatively modified proteins by generated ROS. Collectively, these our findings suggest that both citrullusides isolated plucked-young watermelonfruits could be beneficial agents for alleviating of UV-R-irradiated skin photoaging.

UV radiation, skin photo-aging, phenolic glycosides

発表責任者：伊藤智広（titoh@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3G08-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

じゃがいも皮抽出物は UVB 照射および酸化ストレスにより誘導される I 型コラーゲン産生量低下を改善する

Potato peel extract improves decreases of typeI collagen production　in normal dermal fibroblast induced by UVB exposure and oxidative stress

○須藤 麻里[1]、増冨 裕文[1]、石原 克之[1]、正木 仁[2]([1]カルビー（株）、[2]東京工科大)
○Mari SUTO[1], Hirofumi MASUTOMI[1], Katsuyuki ISHIHARA[1], Hitoshi MASAKI[2] ([1]Calbee, Inc., [2]Tokyo Univ. of Tech.)

【目的】生理的および光老化皮膚では、真皮上層においてコラーゲン線維は著しい減少を示し、この減少がシワやたるみの原因となると考えられている。皮膚老化の改善及び予防においては、真皮線維芽細胞のコラーゲン合成と分解のバランスを調整することが重要である。演者らはこれまでに、じゃがいも皮抽出物（PPE）が、正常ヒト真皮線維芽細胞（NHDF）においてI型コラーゲンの産生量を増加させることを見出している。そこで本研究では、UVB 照射や酸化ストレスを受けた NHDF に対する影響を検討し、知見を得たので報告する。
【方法】UVB（30 mJ/cm^2）を照射した NHDF に PPE を添加し 24 時間培養後、培養上清中のI型コラーゲン量を ELISA 法にて測定した。過酸化水素（300 μM）を 1 時間処理した NHDF についても、I型コラーゲン量および MMP-1 量を ELISA 法にて測定した。
【結果】UVB 照射した NHDF ではI型コラーゲン産生量は有意に低下したが、UVB の照射前後に PPE を添加すると、I型コラーゲン産生量の低下を濃度依存的に改善した。PPE の最適な添加タイミングを検討したところ、照射直後に PPE を添加した場合に改善作用が確認された。さらに過酸化水素を処理した NHDF においては、PPE は低下したI型コラーゲン産生量を有意に改善し、増加した MMP-1 分泌量を有意に低下した。この結果から、PPE には UVB 照射および酸化ストレスによって崩れるコラーゲンの合成と分解のバランスを改善する効果が期待される。

In aged and photoaged skin, which is characterized by wrinkles and sagging, a drastic loss of collagen fibers in the dermis is observed. To prevent and improve these symptoms, the regulation of a balance between collagen synthesis and degradation is important. Previously we found that potato peel extract (PPE) increases type I collagen production in normal human dermal fibroblasts (NHDF). In this study, we investigated the effects on NHDF induced by UVB exposure and oxidative stress. We measured the levels of type I collagen using ELISA in NHDF after UVB irradiation. NHDF that were treated with PPE after UVB irradiation improved type I collagen production in a concentration-dependent manner. Furthermore, in hydrogen peroxide-treated NHDF, PPE significantly improved the decreased type I collagen production and significantly decreased the increased MMP-1 secretion. These results suggest that the PPE is expected to improve the balance between the synthesis and decomposition of collagen that is disrupted by UVB irradiation and oxidative stress.

Potato, Collagen, Fibroblast

発表責任者：須藤麻里（m_suto2@calbee.co.jp）

講演番号：3G08-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

食薬・油糧植物由来成分の皮膚老化改善効果

Anti-skin aging effect of plant-derived factors

○鎌田 菜摘[1]、小櫃 実由[1]、ハフィダ ボウアママ[2]、ガディ ケムセドハ[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院・生資環、[2]カディ・アヤド大学、[3]九大農学院)
○Natsumi KAMATA[1], Miyu OBITSU[1], Bouamama Hafida[2], Chemseddoha Gadhi[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Cadi Ayyad Univ., [3]Fac.Agric.,Kyushu Univ.)

これまでに我々は、モロッコ原産の植物から水蒸気蒸留法により抽出した Essential oil が、ヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞において、長寿遺伝子 SIRT1 の発現量を増加させることを明らかにした。皮膚における SIRT1 の活性化は、皮膚バリア機能や保湿機能へ働きかけることが期待されている。そこで本研究では、表皮細胞における SIRT1 の機能性に着目し、Essential Oil による SIRT1 増強を通じた表皮分化促進効果と表皮の脂質合成増強効果の検証を行い、皮膚バリア機能を増強する可能性を検証した。まず、HaCaT 細胞における内在性 SIRT1 発現を増強する Essential oil を 7 種選定し、その中でも 4 種の Essential oil が HaCaT 細胞における表皮分化に関わる遺伝子の発現を増強した。次に、BODYPI を用いて上記 Essential oil の HaCaT における脂肪酸合成効果を検証した結果、Essential oil が脂質合成を促進することが認められた。以上の結果から、食薬・油糧植物由来の Essential oil 4 種は HaCaT 細胞における長寿遺伝子活性化を通じて表皮分化関連遺伝子発現及び脂質合成を増強することが明らかとなった。現在その機能性の分子基盤を明らかにするための研究を行っている。

So far, we have shown that essential oil extracted from plants native to Morocco by steam distillation increases the expression level of the longevity gene SIRT1 in human epidermal keratinized cells HaCaT cells. Activation of SIRT1 in the skin is expected to act on the skin barrier function and moisturizing function. Therefore, in this study, we focused on the functionality of SIRT1 in epidermal cells, verified the effect of promoting epidermal differentiation through the enhancement of SIRT1 by Essential Oil and the effect of enhancing lipid synthesis in the epidermis, and verified the possibility of enhancing the skin barrier function. .. First, seven types of essential oils that enhance endogenous SIRT1 expression in HaCaT cells were selected, and among them, four types of essential oils were clarified to enhance the expression of proteins involved in epidermal differentiation in HaCaT cells. Next, as a result of verifying the fatty acid synthesis effect of the above essential oil in HaCaT using BODYPI, it was confirmed that the essential oil promotes lipid synthesis. From the above results, it was clarified that four essential oils derived from foods and oil plants enhance epidermal differentiation-related gene expression and lipid synthesis through longevity gene activation in HaCaT cells. Currently, we are conducting research to clarify the molecular basis of its functionality.

anti-aging

講演番号：3G08-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

皮膚改善効果を有する食品成分の探索とその機能性解明

Search for anti-sking aging foods and its functionalities

○安野 貴絵[1]、酒井 菜摘[1]、片倉 喜範[2] ([1]九大院・生資環、[2]九大農)
○Kie ANNO[1], Natsumi SAKAI[1], Yoshinori KATAKURA[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】シミ形成抑制には、表皮角化細胞での活性酸素抑制とメラノサイトでのα-MSH に応答したメラニン合成抑制が重要である。そこで本研究では、表皮角化細胞における長寿遺伝子 SIRT3 やグルタチオンの活性化を介した細胞内活性酸素抑制とメラノサイトにおけるα-MSH 応答性メラニン合成を指標とし、美白効果を有する食品成分の探索を行った。【方法】モデル細胞として、ヒト表皮角化細胞 HaCaT、マウス悪性黒色腫細胞 B16F10 を用いた。食品成分のスクリーニングでは、直接 HaCaT へ添加する直接添加法を採用し、SIRT3 および細胞内還元型グルタチオン（GSH）、紫外線 B 照射後の細胞内活性酸素（ROS）消去能の評価を行った。さらに、B16F10 内遺伝子の発現変化を定量 RT-PCR 法により検証した。【結果】食品成分スクリーニングでは、SIRT3 または GSH を活性化する食品成分が確認できた。また、B16F10 細胞でのメラニン合成抑制試験において、メラニンの分泌・蓄積を抑える食品成分が認められた。

The purpose of this study was to investigate the effect of SIRT3 and glutathione activation on intracellular ROS in epidermal keratinocytes and α-MSH-responsive melanin synthesis in melanocytes. In this study, we searched for food ingredients with whitening effects by using intracellular ROS suppression via activation of the longevity genes SIRT3 and glutathione in epidermal keratinocytes and α-MSH-responsive melanin synthesis in melanocytes as indicators. We used human epidermal keratinocyte HaCaT and mouse malignant melanoma cell B16F10 as model cells. In the screening of food ingredients, the direct addition method was adopted, and the SIRT3, intracellular reduced glutathione (GSH), and intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging ability after UV-B irradiation were evaluated. In addition, changes in gene expression in B16F10 were verified by quantitative RT-PCR. In the screening of food ingredients, food ingredients that activate SIRT3 or GSH were identified. In the inhibition test of melanin synthesis in B16F10 cells, food ingredients that suppressed the secretion and accumulation of melanin were found.

HaCaT, Skin improvement, polyphenols

発表責任者：片倉　喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3G08-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

大豆フィトアレキシン Glyceollin-1 は Nrf2 のメチル化修飾を介して生体内恒常性を維持する

Soy phytoalexin Glyceollin-1 maintains in vivo homeostasis via methylation of Nrf2

○井上 博文、森本 洋武、田中 未央里、高橋 信之、上原 万里子（東京農大）
○Hirofumi INOUE, Hiromu MORIMOTO, Miori TANAKA, Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】活性酸素などによる酸化ストレスに対し、細胞は生体防御分子である NF-E2 related factor 2 (Nrf2)を活性化することで恒常性を維持している。そのため、Nrf2 の活性低下は老化促進や加齢性疾患と強く関わっている。Nrf2 は、酸化ストレスやポリフェノールなどの異物を認識すると、細胞質から核内に移行し、抗酸化酵素群の発現を誘導する転写因子として機能しており、Nrf2 を活性化させる食品成分や薬剤の探索が行われている。我々は Nrf2 を活性化させる食品成分として、イソフラボンにプレニル基が一つ付加されたプテロカルパンである Glyceollin-1(Gly-1)に着目した。Gly-1 は治療抵抗性を示す再発乳がん細胞の細胞死を誘導し、増殖を抑制するとした報告のある大豆フィトアレキシンの一種である。しかしながら、Gly-1 による Nrf2 活性化メカニズムに関しての報告はない。そこで本研究では、Gly-1 が基底レベルにおいても Nrf2 を活性化するのか否かについて検討することを目的とした。【方法・結果】まず、ラット肝臓由来細胞株である Fao 細胞を用いて、Gly-1 の Nrf2 に対する影響として、ルシフェラーゼアッセイおよび核内移行による Nrf2 の活性状態を評価した結果、Gly-1 は濃度依存的に Nrf2 を活性化した。同様に、Nrf2 が誘導する抗酸化分子群(HO-1, NQO1)発現についても real time PCR および western blot 法にて解析した。その結果、Gly-1 処理による Nrf2 の活性化に伴い、HO-1 と NQO1 発現も増加した。興味深いことに、Nrf2 の活性化にによる訳後修飾であるメチル化が関与していることが報告されている。そこで Gly-1 が Nrf2 のメチル化修飾を介して活性化するのではないかとの仮説を立て、Nrf2 のメチル化/活性化状態の検討およびメチル化阻害剤 AMI-I を用いた解析を行った。その結果、Gly-1 処理により Nrf2 のメチル化が誘導されたが、AMI-I 処理によりメチル化および活性化が低下した。【結論】以上より、Gly-1 が Nrf2 を活性化させる新たな食品成分として同定され、Nrf2 活性化には PRMT1 を介したメチル化修飾が関与していることを明らかにした。

Glyceollin-1 (Gly-1), a kind of novel phytoalexins biosynthesized from soy, has recently been demonstrated as a novel antiestrogen that binds to estrogen receptor. However, the effects of Gly -1 under physiological conditions are not clearly investigated. Here, we found glyceollin-1 dose-dependently activated Nrf2 and subsequently induced detoxification genes, such as HO-1 and NQO1. Interestingly, Gly-1 activated Nrf2 signal by modulating methylation, whereas this phenomenon was cancelled by AMI-1, a specific methylation inhibitor. Our data suggest that glyceollin-1 exerts antioxidant system through Nrf2 methylation.

Soy phytoalexin Glyceollin-1, Nrf2, methylation

発表責任者：井上博文（h5inoue@nodai.ac.jp）

講演番号：3G08-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

Chaga(*Inonotus obliquus*)水熱処理抽出物の MEF への酸化ストレスに対する保護効果

Protective effect of hydrothermal extracts of Chaga (*Inonotus obliquus*) on MEF cells against oxidative stress

○串崎 明日香[1]、松田 康平[1]、ハムサン ハズワニー[2]、野間 誠司[3]、出村 幹英[3]、松本 陽介[4]、辻田 忠志[3]、林 信行[3] ([1]佐大院・農、[2]鹿児島連大、[3]佐大・農、[4]（株）フォーエス)
○Asuka Kushizaki[1], Kohei Matsuda[1], Hazwanee Hamsan[2], Seiji Noma[3], Mikihide Demura[3], Yosuke Matsumoto[4], Tadayuki Tsujita[3], Nobuyuki Hayashi[3] ([1]Graduated school of agriculture, Saga Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Agriculture, Saga Univ., [4]Four-s Inc.)

ロシアで伝承薬として用いられてきた食用菌類であるチャーガ（*Inonotus obliquus*）の水熱抽出物の機能性を調べた。まず、微粉砕粉末（500μm 以下）を室温（4 時間）、100℃・50 分あるいは 150- 180 ℃・5- 40 分の条件で抽出し、可溶化物収率、総ポリフェノール量、抗酸化活性および粗糖量・β-グルカン量を調べた。抗酸化活性は 150℃、粗糖量・β-グルカン量は 180℃の水熱抽出において最も高い値を示した。これら種々の条件での結果を踏まえ、50 ℃で熱水抽出を行ない、チャーガの有用成分と言われている SOD（Superoxide Dismutase）などタンパク質成分等を抽出したのち、さらに 150 ℃ の水熱処理で抗酸化物質を抽出後、180 ℃で多糖類を加水分解させる、三段階抽出を至適条件として抽出物を調製した。続いてマウス胎児繊維芽細胞株（MEF）を用いて細胞毒性が認められない濃度（50 μg/mL）で 24 時間暴露後に抽出した RNA の網羅的 RNA シーケンス解析を行った。その結果、Keap1/Nrf2 経路の標的遺伝子（Hmox1, Nqo1, Cat, GCLC など）に有意な発現変動が観察された。さらに、過酸化水素および紫外線誘発の酸化ストレスに対する保護効果を CCK-8 アッセイにより評価したところ、チャーガ抽出物で 24 時間前処理を行なった細胞は、過酸化水素あるいは UV 照射処理した細胞と比較して細胞生存率の低下が抑制された。さらに、チャーガ抽出物は、Keap1/Nrf2 シグナル伝達経路の標的遺伝子の発現レベルを増加させた。これらの結果から、チャーガ三段階抽出物が抗酸化シグナル伝達経路である Keap1/Nrf2 を活性化し、下流の標的遺伝子の発現を調節することで、MEF における過酸化水素および紫外線誘発の酸化ストレスに対して保護効果を示すことが示唆された。

The functional properties of the hydrothermal extract of Chaga (*Inonotus obliquus*) were investigated. Based on the results of various extraction conditions, a three-step extraction, which is the condition with the highest antioxidant activity and glucan content, was adopted as the optimal condition. RNA sequence analysis using a mouse fetal fibroblast cell line (MEF) showed some significant expression changes in the target genes of the Keap1 / Nrf2 pathway (Hmox1, Nqo1, Cat, GCLC, etc.) at the safe concentrations of Chaga extracts treatments. Furthermore, the protective effect against oxidative stress caused by hydrogen peroxide and UV was evaluated by CCK-8 assay, and it was confirmed that pretreatment with Chaga extract for 24 hours prevented the decrease in cell viability. In addition, Chaga extract increased the expression levels of target genes in the Keap1 / Nrf2 signaling pathway. From these results, the three-step Chaga extract has a protective effect against oxidative stress caused by hydrogen peroxide and UV in MEF cell by activating the antioxidant signaling pathway Keap1 / Nrf2 and regulating the expression of downstream target genes.

Chaga, Hydrothermal extract, Anti-oxidant activity

発表責任者：林信行（yurika@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3G08-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

Chaga (*Inonotus obliquus*) 水熱抽出物の RAW264.7 に対する抗炎症作用の評価
Evaluation of anti-inflammatory effect of hydrothermal extract of Chaga (*Inonotus obliquus*) on RAW264.7 cells

○松田 康平[1]、串崎 明日香[1]、Hamsan Hazwanee[2]、野間 誠司[3]、出村 幹英[3]、松本 陽介[4]、辻田 忠志[3]、林 信行[3] ([1]佐大院・農、[2]鹿児島連大、[3]佐大・農、[4]（株）フォーエス)
○KOHEI MATSUDA[1], ASUKA KUSHIZAKI[1], Hazwanee Hamsan[2], SEIJI NOMA[3], MIKIHIDE DEMURA[3], YOSUKE MATSUMOTO[4], TADAYUKI TSUJITA[3], NOBUYUKI HAYASHI[3] ([1]Graduated school of agriculture, Saga Univ., [2]United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University, [3]agriculture, Saga Univ., [4]Four-s INC.)

シラカバの寄生真菌である Chaga（*Inonotus obliquus*）は種々の生理活性を有し伝承薬に用いられてきた。本研究ではまず可溶化収率、総ポリフェノール含有量、抗酸化能、粗糖量及び *β*-グルカン量を指標として至適抽出条件の検討を行った。結果から、50 ℃→150 ℃→180 ℃の順に抽出する三段階抽出法を採用した。続いて、マウス胎児線維芽細胞（MEF）を用いて、毒性を示さない終濃度 50 μg/mL の抽出物で 24 時間刺激後、網羅的 RNA シーケンスを行った。その結果、693 の DEGs（Differentially Expressed Genes；発現上昇が 486 遺伝子、発現減少が 207 遺伝子）を見出した。クラスタリング解析では炎症、抗ウイルス作用、酸化ストレス等の遺伝子群に有意な発現変動が見られた。さらにマウスマクロファージ様細胞株（RAW264.7）に対する抽出物の抗炎症評価を NO および TNF-α 産生量で調べた結果、24 時間前処理で抗炎症作用が示唆された。また炎症関連遺伝子（iNOS, COX2）の変動を RT-qPCR で確認した。これは RNA シーケンスで変動が確認された Nlrc5 が上流で NF-kB 活性を阻害していることに起因すると現在考察している。

Chaga (*Inonotus obliquus*), a parasitic fungus of birch, has been used as a traditional medicine because of its various bioactivities. In this study, we first examined the optimal extraction conditions using solubilization yield, total polyphenol content, antioxidant capacity, crude sugar content, and *β*-glucan content as indicators. Based on the results sequential stepwise extraction in the order of 50 ˚C → 150 ˚C → 180 ˚C was adopted as the optimum extraction condition. After stimulation of mouse fetal fibroblasts (MEFs) for 24 hours with the extract at a non-toxic final concentration of 50 μg/mL, exhaustive RNA sequencing was performed. As a result, 693 DEGs (Differentially Expressed Genes; 486 genes with increased expression and 207 genes with decreased expression) were found. Clustering analysis showed significant expression changes in genes related to inflammation, antiviral effects, and oxidative stress. Furthermore, anti-inflammatory evaluation of the extract against the mouse RAW264.7 macrophage cell line by NO and TNF-α production suggested anti-inflammatory effects after 24 hours of pretreatment. Variation in inflammation-related genes (iNOS, COX2) was also confirmed by RT-qPCR. This was attributed to the upstream inhibition of NF-kB activity by Nlrc5, which was found to be altered by RNA sequencing.

Chaga, hydrothemal extract, anti-inflammatory effect

発表責任者：林信行（yurika@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3G08-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

津山産アピオス長期摂取の肝機能への影響

Influence of a long-term diet including Tsuyama-grown apios on liver function

○森岡 優衣[1]、儀間 章託[1]、坂本 実由[1]、小原 瑞祈[1]、林 香里[1]、山本 汐里[1]、松永 祐介[2]、渡邉 理江[1] ([1]美作大、[2]津山工業原料)
○Yui MORIOKA[1], Shota GIMA[1], Miyu SAKAMOTO[1], Mizuki OHARA[1], Kaori HAYASHI[1], Shiori YAMOTO[1], Yusuke MATSUNAGA[2], Rie WATANABE[1] ([1]Mimasaka Univ., [2]Tsuyama Kogyo Genryo Co.,Ltd)

【目的】アピオス(Apios americana Medikus)は、マメ科ホドイモ属の植物で、抗酸化物質であるゲニステインや SOD 様活性を持つ DDMP サポニンを含んでいることが知られている。アピオスは、ヤーコン、キクイモなどの健康野菜の 1 つとして知られているものの、その有効性や安全性は不明な点が多い。そこで、本研究では、フリーズドライ製法にて作製した乾アピオスの含有食餌を用い、マウスへの長期的な経口負荷実験を行い、体重・血液成分や肝臓の脂肪蓄積への影響を検討した。

【方法/結果】津山産アピオスおよび対照としてジャガイモをフリーズドライ加工粉砕後、通常食餌に 20%混合させて経口負荷試験食餌を作製した。8 週齢 C57BL/6 マウスに対し経口負荷を 62 週間行った。HbAlc 値、血液成分を測定した。結果、ジャガイモ食群に比べ、アピオス群の AST 値と ALT 値は低下傾向、HDL 値は有意な上昇を示した。アピオス食群では、肝臓の脂肪滴サイズの低減が認められ、アピオスは 70 週齢マウス肝臓における脂肪蓄積を低減することが示唆された。

[Aim] Apios americana Medikus is a member of the legume family Apios fortune and contains an antioxidant genistein and DDMP saponin with SOD-like activity. Apios is known as one of vegetables (e.g., Polymnia sonchifolia and Helianthus tuberosus) with health-promoting benefits, while its efficacy and safety are not fully understood. In this study, we identified food ingredients of Tsuyama-grown Apios. Additionally, wild mice were fed Apios powder-containing diets in order to evaluate the effects and safety of Apios. [Methods/Results] Apios and potato (as a control) were freeze-dried, powdered and admixed with a standard powdered feed at a final concentration of 20% (w/w). Wild mice (C57BL/6, 8 weeks old) were fed 10% Apios or potato powder-containing diets ad libitum for 62 weeks. HbAlc values and blood composition were determined. In the Apios group, AST and ALT values decreased, and HDL value significantly increased compared to the potato group. In addition, the Apios diet reduced sizes of lipid droplets in liver, suggesting Apios decreases fat accumulation in the livers of 70-week-old aged mice.

apios, liver

発表責任者：渡邉理江（watanabe-rie@mimasaka.ac.jp）

講演番号：3G08-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム G

津山産アピオス長期摂取の小腸機能への影響

Influence of a long-term diet including Tsuyama-grown apios on intestinal function

○儀間 章託[1]、森岡 優衣[1]、小原 瑞祈[1]、坂本 実由[1]、山本 汐里[1]、林 香里[1]、松永 祐輔[2]、渡邉 理江[1] ([1]美作大学、[2]津山工業原料)
○Shota GIMA[1], Yui MORIOKA[1], Mizuki OHARA[1], Miyu SAKAMOTO[1], Shiori YAMAMOTO[1], Kaori HAYASHI[1], Yusuke MATSUNAGA[2], Rie WATANABE[1] ([1]Mimasaka Univ., [2]Tsuyama Kogyo Genryo CO., LTD.)

【目的】アピオス（Apios americana Medikus）は、マメ科ホドイモ属の植物で、イソフラボンや DDMP サポニンなどの含有、弱めのα-グルコシダーゼ阻害効果が機能性成分活性として示唆されている。これらの機能性成分活性により、生体防御効果や抗がん作用、抗炎症作用、血糖値上昇抑制作用が報告されているが詳細なエビデンスはまだ乏しい。そこで、本研究では、アピオスの効果および毒性などを評価するため、実験マウスに対するアピオス添加食餌を用いた経口負荷実験を行った。

【方法/結果】津山産アピオスおよび対照としてジャガイモをフリーズドライ加工粉砕後、通常食餌に 20%混合させて経口負荷試験食餌を作製した。8 週齢 C57BL/６マウスに対し経口負荷を 62 週間行った。結果、ジャガイモ食群に比し、アピオス食群で食餌摂取量は増加傾向を示すが、体重は有意に低下した。また、1 絨毛当たりの杯細胞の細胞数の増加が認められ、小腸におけるムチン分泌量の増加が示唆された。

[Aim] Apios americana Medikus is a member of the legume family Apios fortune, containing isoflavones and DDMP saponins, and also showing a weak alpha-glucosidase inhibitory effect as its functional activities. The activities of these functional components have been reported to indicate biological defense, anti-cancer, anti-inflammatory and anti-hyperglycemic effects. However, detailed mechanistic understanding and evidence for efficacy and safety of Apios components are limited. In this study, wild mice were fed Apios powder-containing diets in order to evaluate the effects and safety of Apios. [Methods/Results] Apios and potato (as a control) were freeze-dried, powdered and admixed with a standard powdered feed at a final concentration of 20% (w/w). Wild mice (C57BL/6, 8 weeks old) were fed 10% Apios or potato powder-containing diets ad libitum for 62 weeks. Compared to the potato group, the Apios group tended to increase food intake, while its body weight significantly decreased. In addition, the number of goblet cells in intestinal villus increased in the Apios group, suggesting an increase in mucin secretion in the small intestine of the Apios group.

apios, intestine, goblet cells

発表責任者：渡邉理江（watanabe-rie@mimasaka.ac.jp）

講演番号：3H02-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

イチジク果実からのセリンプロテアーゼの精製

Purification of subtilisin-like serine protease from *Ficus carica* fruit

○床並 実津希[1]、上島 直生[1]、西村 耕作[2]、滝田 禎亮[1]、保川 清[1]([1]京大院・農、[2]（公財）東洋食品研究所)
○Mizuki Tokonami[1], Naoki Ueshima[1], Kosaku Nishimura[2], Teisuke Takita[1], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Toyo Institute of Food Technology)

【目的】イチジク（*Ficus carica* L.）の樹液や組織は、システインプロテアーゼであるフィシンに代表されるタンパク質分解酵素を含み、肉軟化剤などに用いられてきた。我々はこれまでに、(公財)東洋食品研究所で栽培しているイチジク 23 品種すべてに、フィシンだけでなくセリンプロテアーゼ（以下、FSP と呼称）が含まれていることを報告した[1)]。我々はさらに、FSP を樹液から二次元電気泳動で精製し、その部分アミノ酸配列を決定し、FSP がズブチリシン様セリンプロテアーゼであることを示した[2)]。本研究では、FSP の性状解析を行うために、イチジク果実から FSP の精製を試みた。
【方法】1. 活性測定：合成基質 MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR を基質として、システインプロテアーゼ阻害剤 E-64 存在下、pH 8.0、37℃で反応を行い、基質分解に伴う蛍光強度の変化を追跡した。2. 精製：イチジクの 1 品種、桝井ドーフィン果実の破砕液に塩化カルシウムを加え、ペクチンを不溶化させて除去した。続いて 5 段階のカラムクロマトグラフィー（陰イオン交換 2 回、陽イオン交換、疎水性相互作用、ゲルろ過）を行った。
【結果と考察】精製 FSP は SDS-PAGE で 67 kDa の均一なバンドを示した。現在、精製 FSP の各種解析を行っている。
【文献】1. K. Nishimura et al. (2020) *J. Food Sci.* 85, 535-544
2. K. Nishimura et al. (2021) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85, 1147-1156

[Purpose] Fig (*Ficus carica* L.) contains proteolytic enzymes such as a cysteine protease ficin and has been used as a meat tenderizer. We reported that both ficin and a serine protease were present in all of 23 fig cultivars cultivated in Toyo Institute of Food Technology, Japan.[1)] We purified FSP from the latex by two-dimensional electrophoresis and determined its partial amino acid sequence, showing that FSP is a subtilisin-like protease.[2)] In this study, to characterize FSP, we attempted to purify FSP from *F. carica* fruit.
[Methods] 1. Measurement of activity. The reaction was carried out with synthetic substrate MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR in the presence of a cysteine protease inhibitor E-64 at pH 8.0, at 37℃. The fluorescence of reaction solution was monitored. 2. Purification. Fruits from *F. carica* cultivar Masui Dauphine were homogenized. Pectin was removed from the homogenate by adding calcium chloride. Then, five steps of column chromatography were carried out.
[Results and Discussion] On SDS-PAGE, purified FSP revealed homogeneous 67-kDa band. Characterization purified FSP is currently underway.
[References] 1. K. Nishimura et al. (2020) *J. Food Sci.* 85, 535-544
2. K. Nishimura et al. (2021) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85, 1147-1156

enzyme purification, serine protease, *Ficus carica*

講演番号：3H02-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

広い特異性を有する L-アミノ酸オキシダーゼの探索と生産酵素の諸性質

Isolation of L-amino acid oxidase with broad specificity and some properties of its producing enzyme

○田中 佑弥[1]、宮田 良介[1]、川端 隆[1]、青木 秀之[2]、尾山 廣[1] ([1]摂大理工、[2]池田食研株式会社)
○Yuya TANAKA[1], Ryosuke MIYATA[1], Takashi KAWABATA[1], Hideyuki AOKI[2], Hiroshi OYAMA[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Research Laboratory, Ikeda Food Research Co., Ltd.)

【背景・目的】食品の美味しさは、味、香り、触感、色が複雑に組み合わさり、生み出されている。遊離アミノ酸は重要な呈味成分であり、魚介類などの天然素材の味に関与している。我々は、食品中の呈味性アミノ酸のコントロールを目的に、幅広い基質特異性を有する L-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)生産菌を土壌より探索し、分離菌株の同定、酵素精製及び酵素の諸性質を明らかにした。
【方法・結果・考察】LAO の活性は各種アミノ酸を基質とし、生じた過酸化水素をもとに POD/トリンダ―試薬系を用いた系と溶存酸素の減少速度から算出した。16s rRNA 解析により *Rhodococcus* 属と同定された RM-25 株を YM 液体培地で振盪培養し、得られた菌体を超音波破砕して調製した菌体抽出液から陰イオン交換及び疎水クロマトグラフィーで酵素を精製した。酵素の至適 pH は 7、最適反応温度は 30~40℃で、40℃まで安定、pH6~8 付近で安定であり、分子量は SDS-PAGE で 55~60kDa と算出された。Native-PAGE の活性染色では 1 か所に強い活性が認められ、ほぼ単一に精製できていた。L-Leu、L-Lys、L-His、L-Met に高い活性、L-Ala に微弱な活性で、既存の *Rhodococcus* 属起源の LAO とは基質特異性が異なっていた。活性のない Gly が高濃度に存在しても L-Leu に対する活性は変化せず、食品中に含まれる遊離アミノ酸群から L-Leu などの苦味アミノ酸を除去できる可能性が示唆された。

Background and aims: The deliciousness of food is created by a complex combination of taste, aroma, and texture. Free amino acids are one of important taste components and are involved in the taste of natural ingredients such as fish and shellfish. To control the taste of amino acids in foods, we obtained by screening a L-amino acid oxidase (LAO)-producing bacterium with wide substrate specificity from soil. In addition, we identified the strains of it, purified the enzymes, and clarified various properties of the enzymes. Methods, Results, and Discussion: The LAO activity was assayed by two methods; the POD/Trinder system and the decrease rate of dissolved oxygen. The isolated RM-25 strain was identified as *Rhodococcus* by 16s rRNA sequencing. The enzyme was purified by anion exchange and hydrophobic chromatographies from the cell-free extracts. The optimum pH and temperature of the enzyme were 7 and 30 to 40℃, and the molecular weight was calculated to be 55 to 60 kDa by SDS-PAGE. The enzyme purity was verified by the active staining with Native-PAGE. The enzyme showed high activity against L-Leu, L-Lys, L-His, and L-Met and weak against L-Ala, indicating that novel type of *Rhodococcus* LAO. These activities were maintained even in the presence of high Gly content, suggesting that the enzyme could be used to remove bitter amino acids such as L-Leu from free amino acids in foods.

Free amino acid, Taste improvement, Rhodococcus

発表責任者：尾山　廣（oyama@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3H02-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

カルボキシペプチダーゼの特性とタンパク質加水分解物の苦味低減

Characterization of carboxypeptidase and reduction of bitterness of protein hydrolysate by carboxypeptidase

○中村 梨乃、安齊 恵里、髙根澤 幸奈、種村 昂洋、渡邉 雅貴、山中 慎太、金澤 桜、林 清（東洋大学）
○ RINO NAKAMURA, ERI ANZAI, YUKINA TAKANEZAWA, TAKAHIRO TANEMURA, MASAKI WATANABE, SHINTA YAMANAKA, SAKURA KANAZAWA, KIYOSHI HAYASHI (Toyo Univ.)

タンパク質を加水分解すると溶解性、消化吸収性が増すため、タンパク質加水分解物は栄養補助食品等に利活用されている。しかし、タンパク質を加水分解すると分子内部に存在する疎水性アミノ酸を主成分とするペプチドが生成することにより苦味が生じ、食品利用の妨げとなっている。特に、ペプチドの末端に疎水性アミノ酸残基が存在すると強い苦味を呈することが報告されている。そこで、ペプチドの末端に存在する疎水性アミノ酸残基をエキソペプチダーゼにより切り離し、苦味を低減させることを試みた。これまでに、酵素剤プロテアックス（天野エンザイム株式会社）から精製したアミノペプチダーゼ（AMP、GI:2055400650）によるカゼイン加水分解物の苦味除去を検討した。AMP 反応が進むにつれて苦味は低減（苦味スコア 3.52 → 1.71（反応 4 時間））したが、反応 4 時間以降は苦味の変化はほとんどなく、苦味は残っていた（苦味スコア 1.60（反応 21 時間））。そのため、本研究では、カゼイン加水分解物をアミノペプチダーゼで 4 時間作用させてもそれ以上低減しなかった 4h AMP 処理液を対象に、カルボキシペプチダーゼによるさらなる苦味の低減化を検討した。また、使用した酵素は放線菌由来酵素剤であり、酵素剤から陽イオン交換体 Giga Cap S-650M を使用した FPLC によりカルボキシペプチダーゼを精製し、特性解析を行った。精製したカルボキシペプチダーゼの特性及び脱苦味試験の結果は、本講演で詳しく報告する。

Protein hydrolysates are used in foods because proteins become more soluble and digestible and absorbable when hydrolyzed. However, hydrolysis of proteins results in the formation of peptides composed mainly of hydrophobic amino acids inside the molecule, which causes a bitter taste and hinders food utilization. Therefore, we attempted to reduce the bitterness by truncating the hydrophobic amino acid residues at the end of the peptide using exopeptidase. We have previously examined the removal of bitterness from casein hydrolysate by aminopeptidase (AMP、GI:2055400650) purified from the enzyme Proteax (Amano Enzyme Co., Ltd.) The bitterness decreased as the AMP reaction proceeded, but the bitter taste remained after 4 hours of reaction (bitterness score 3.52 → 1.60 (21 hours of reaction)). Therefore, in this study, we investigated the reduction of bitterness by carboxypeptidase in 4h AMP-treated solution, which was not further reduced even after 4h of action of aminopeptidase on casein hydrolysate.

bitterness, protein hydrolysate, carboxypeptidase

発表責任者：中村梨乃（s3C102000072@toyo.jp）

講演番号：3H02-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

イミダゾールジペプチドの高速・高感度な定量分析法の開発

Development on high-speed and sensitive quantitative analysis method for imidazole dipeptides

○慶徳 紗希、宮崎 多恵子、柴田 敏行（三重大院・生資）
○Saki KEITOKU, Taeko MIYAZAKI, Toshiyuki SHIBATA (Mie Univ.)

イミダゾールジペプチド（IDP）とは，イミダゾール基を有するアミノ酸結合体の総称であり，アンセリン，バレニン，カルノシンがよく知られている。これらは，抗酸化作用や抗疲労効果などの生理機能を持つため新しい生理活性物質として注目されている。本研究では，従来法（HPLC 法）と比較してシンプルな分離条件で高速かつ高感度な定量分析法（LC/MS 法）の開発を目的とした。

市販のポリマー系 HILIC カラムと溶離液に 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル（40:60, *v/v*）を使用し，アイソクラティック送液にてアンセリン，バレニン，カルノシンの分離条件を検討した。確立した分離条件を LC/MS へ適用し，保持時間，ピーク面積値，直線性，検出限界，定量限界，真度の項目を指標に分析法の性能評価を行った。その結果，6 分以内の分析時間で 3 種の IDP を完全に分離・検出することが出来た。検出限界（S/N=3）は，10.0～50.0 ng/mL，定量限界（S/N=10）は，33.0～165 ng/mL の範囲にあり，従来法を最大約 34 倍上回る感度であることが分かった。以上の結果より，IDP の新しい定量分析法の開発に成功したと結論づけた。

The imidazole dipeptide (IDP) is a generic name for amino acid conjugate having an imidazole group. Anserine, balenine, and carnosine are well known as typical IDPs. These compounds are attracting attention as novel bioactive substances because they have physiological functions such as antioxidant and anti-fatigue effects. The purpose of this study was to develop a high-speed and sensitive quantitative analysis method (LC/MS method) with simple separation compared to the conventional method (HPLC method). Using a HILIC column and a mixture of ammonium formate buffer-acetonitrile as an eluent, the separation of anserine, balenine, and carnosine were examined by isocratic elution. The performance of the established LC/MS method was evaluated for the data on retention time, value of peak area, linearity test, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), and recovery rate. As a result, it was able to completely separate and detect the each of IDP within an analysis time of 6 minutes or less. The LOD (S/N=3) was in the range of 10.0 to 50.0 ng/mL, and the LOQ (S/N=10) was in the range of 33.0 to 165 ng/mL. As a result of comparison with the values in the previous studies, it was found that the established LC/MS method has a sensitivity up to about 34 times higher.

Imidazole dipeptides, Liquid chromatography mass spectrometry, Quantitative analysis

発表責任者：柴田 敏行（shibata@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3H02-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

京野菜のポリアミン含有量と耐熱性の確認及びポリアミン摂取における抹茶のメリット

Confirmation of polyamine content and heat resistance of Kyoto vegetables and benefits of matcha in ingesting polyamine

○木下 郁心、藤原 有希、鈴木 秀之（京都工芸繊維大応用生物）
○Ikumi KINOSHITA, Yuki FUJIWARA, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology)

最近、ポリアミンの一種であるスペルミジンが健康寿命伸長に有効であるという報告が相次いでいる。人は体内でオルニチンからプトレッシンを経てスペルミジン、スペルミンを合成できるほか、スペルミンをスペルミジンにすることも可能である。しかし、加齢とともにプトレッシンの合成能が低下し、生活習慣病に結びつくとされている。幸い人は食品に含まれるポリアミンや腸内細菌が合成したポリアミンを吸収して利用することができる。そのため、食品中のポリアミン含量について調べた報告がいくつかあるが、京野菜についての報告はなかった。本研究では、京野菜のポリアミン含量を比較するとともに、その収穫時期や調理法によるポリアミン量の違いを調べた。
【方法】野菜 1 g 当たり 5 mL の 5% TCA を加えてホモジネイトし、4℃で 1 時間置いた後、遠心した上清を Polyaminepak カラムを装着した HPLC で分析した。
【結果】京野菜のうち、万願寺とうがらしと丹波系黒大豆の枝豆である京夏ずきん・紫ずきんが多くのスペルミジンを含有していることが分かった。収穫時期によりポリアミン含量は変化するが、加熱調理によるポリアミン含量の変化はほとんどなかった。一方、宇治産の緑茶にはスペルミジンとともにスペルミンが多く含まれているが、お湯でお茶をいれた場合には、それらのごく一部しか抽出されないことが分かった。ポリアミンは酸によって食品からよく抽出されるため、茶葉全量を摂取する抹茶のポリアミンは胃酸で抽出されるため、抹茶はポリアミンを摂るための優れた食品と言える。
Recently papers reported spermidine has positive effects of spermidine on healthy longevity. Humans can make spermidine from ornithine via putrescine. It is known that the ability of putrescine synthesis is lower with older. Fortunately, we are able to use polyamine within food and made of enteric bacteria. There are some researches of food's polyamine. But there is nothing research of Kyoto vegetables so this research compared theirs and investigated harvest time and cooking.
【Method】The sample were homogenated in 5% TCA 5mL/g and centrifuged supernatants were analyzed using HPLC with Polyaminepak.
【Result】We found the polyamine contents of several vegetables peculiar to Kyoto are high. Spermidine content of "Manganji-pepper" and raw Tanba black soybeans, "Natsuzukin and Murasakizukin" were high. Spermidine and spermine contents of green tea of Uji were very high, while they were not extracted by hot water, but extracted effectively by artificial stomach acid. Polyamine contents were influenced by harvest time but not by cooking.

polyamine, vegetable, green tea

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：3H02-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

ポリフェノール修飾タンパク質に対する高親和性ペプチドの解析

Development of high-affinity peptides for polyphenol-modified proteins

○山本 広史、佐々木 栄太、板倉 正典、内田 浩二（東大農）
○Hiroshi YAMAMOTO, Eita SASAKI, Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (Univ. of Tokyo)

ポリフェノールの酸化体はタンパク質を化学修飾する。一方でその生体内における機能には不明な点が多い。そこで本研究では、ペプチド提示ファージディスプレイ法を用いた、ポリフェノール修飾タンパク質と相互作用するタンパク質の同定を始めとする、ポリフェノール修飾タンパク質の生理機能解明を目的とした。赤ワイン由来のポリフェノールである Piceatannol(Pic)で修飾したウシ血清アルブミン(Pic-BSA)に対して、ランダム 15 アミノ酸を提示する T7 ファージライブラリーを結合させた。Pic-BSA と結合したファージを増幅し、この結合・増幅サイクルを繰り返すことで、Pic-BSA に高い親和性を示すペプチド配列を複数獲得した。得られた配列は高いアルギニン含有率を示したため、アルギニンを多く含む配列を有する数種のタンパク質について該当配列を緑色蛍光タンパク質に融合し、Pic-BSA との相互作用を評価した。その結果、特に血小板由来増殖因子(PDGF)に由来する配列が Pic-BSA との高い親和性を示した。そこで PDGF との相互作用を介した Pic-BSA の生理作用を検証したところ、Pic-BSA は成熟体ヒト PDGF-AA,BB に対しても強い親和性を示した。更に Pic-BSA は PDGF の細胞への結合を阻害することで、PDGF の惹起する細胞増殖作用を抑制することが明らかとなった。以上より Pic 修飾タンパク質が PDGF を介した生理作用を発揮する可能性が示唆された。

Oxidized polyphenols react with proteins. However, the biological functions of such protein modifications remain elusive. Here, we aimed to elucidate the physiological functions of polyphenol-modified protein through the identification of proteins that interact with polyphenol-modified proteins by a phage display method. Bovine serum albumin (BSA) was incubated with piceatannol (Pic), the resulting modified protein, Pic-BSA, was applied to a T7 phage library presenting 15-mer amino acids to identify peptide sequences with a high affinity for Pic-BSA. Since sequences of the obtained peptides showed a significantly high appearance ratio of arginine residues, we focused on arginine-rich sequence regions of endogenous proteins. Sequences derived from platelet-derived growth factor (PDGF) particularly had a high affinity to Pic-BSA. Pic-BSA also interacted with recombinant human PDGF. Furthermore, Pic-BSA inhibited the binding of PDGF to cells, thereby suppressing the cell proliferation induced by PDGF. These results suggest that Pic-modified proteins may exert physiological functions through the interaction with PDGF.

Polyphenol-modified protein, Phage display, Peptide

発表責任者：内田　浩二（a-uchida@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H02-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

ポリフェノールによるヒストン凝集メカニズムと病態生理学的意義の解明

The molecular mechanisms and pathophysiological significances of histone aggregation induced by polyphenols

○塚本 萌南、山口 公輔、板倉 正典、内田 浩二（東大農）
○Mona TSUKAMOTO, Kosuke YAMAGUCHI, Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (Univ. of Tokyo)

近年、エピガロカテキンガレート (EGCG) などのポリフェノールがタンパク質を化学修飾し、タンパク質の機能性を変化させることが明らかとされてきた。当研究室ではこれまでに、ポリフェノール修飾タンパク質の結合分子としてヒストンタンパク質を同定しているが、その相互作用の生理学的意義は未だ明らかとされていない。本研究では、糖化修飾タンパク質がヒストン結合性および凝集性を示すという先行研究結果に基づき、ポリフェノール修飾タンパク質のヒストン凝集への関与とそのメカニズムの解明を試みた。複数のポリフェノール修飾アルブミンとヒストンを混合し凝集体形成を評価した結果、EGCG やピセアタンノール (PIC) などによって修飾されたアルブミンとヒストンの凝集が観察された。また化学量論的解析の結果、これらのポリフェノール修飾アルブミンとヒストンの凝集には多価相互作用が寄与していることが示唆された。一方で、ポリフェノール単体とヒストンの凝集については、EGCG は凝集性を示したものの PIC では凝集が認められず、ポリフェノールの種類によってヒストン凝集の機序が異なることが示された。現在は、ポリフェノール修飾タンパク質によるヒストン凝集の病態生理学的意義の解明を試みている。

Polyphenols, such as epigallocatechin-3-*O*-Gallate (EGCG), can modify proteins and alter their functions. We have previously shown that polyphenol-modified proteins bind to histone proteins, however, the pathophysiological significance of this interaction remains largely obscure. In this study, based on our findings that glycated proteins bind to histones and form aggregation, we attempted to elucidate the relationship of polyphenol-modified proteins to the aggregation with histones and the mechanism of aggregation. We evaluated the aggregation by incubating histones with several polyphenols-modified albumin and found that EGCG-modified and piceatannol (PIC)-modified albumin formed co-aggregates with histones. In addition, stoichiometric analysis indicated that multivalent interactions could contribute to the aggregation of histones with polyphenol-modified albumin. On the other hand, in the case of free polyphenols, the aggregation of histones was observed when incubated with EGCG, but not with PIC, indicating that the mechanisms of aggregation might depend on the type of polyphenols. We intend to analyze the pathophysiological functions of polyphenol-modified proteins through the formation of histone aggregates.

polyphenols, histones, aggregation

講演番号：3H02-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

システイン添加によるメロン果汁の瓜臭の低減

Removal of C9-aldehydes and alcohols from melon juice via cysteine addition

○網干 貴子[1]、成田 こなみ[1]、勝見 直行[2]、太田 智弥[1]、村山 哲也[1] ([1]山大農、[2]山形県農総研セ)
○ Takako ABOSHI[1], Konami NARITA[1], Naoyuki KATSUMI[2], Tomoya OHTA[1], Tetuya MURAYAMA[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

【目的】C9 アルデヒドなどからなる瓜臭成分は，メロンの香りを特徴づける重要な成分であるが，匂いが強すぎると消費者から忌避されることがある。瓜臭成分を制御することができれば，メロンの加工製品の改良につながると期待される。そこで本研究では，システインがアルデヒドと結合しやすい性質をもつことに注目し，システイン添加によるメロン果汁の瓜臭成分への影響を調べることとした。
【方法】アンデスメロンの果汁より揮発成分を SPME で捕集し，GC-MS で分析した。システインを添加した果汁についても GC-MS で分析し，システイン添加による揮発成分の変化を調べた。また，システイン添加果汁を LC-MS で分析し，瓜臭成分と結合しているシステインを探した。
【結果】メロン果汁からの揮発成分として(*Z*)-6-nonenal，(*E*)-2-nonenal などの C9 アルデヒドや(*E*)-2-nonenol, (*E*,*Z*)-2,6-nonadienol などの C9 アルコールを検出した。果汁にシステインを添加すると，C9 アルデヒドと一部の C9 アルコールの量が減少した。システインを添加した果汁を LC/MS で分析すると，C9 アルデヒドにシステインが結合した成分が検出された。システイン添加により，瓜臭成分が減少することが示された。

The aroma of a melon fruit is among the most crucial qualities that influence consumer preferences. It has been demonstrated that esters, alcohols, and nine-carbon aldehydes containing nine-carbon chains contribute significantly to the aroma of muskmelon. However, strong grassy and cucumber-like aromas can prevent consumer acceptance. Further, several studies have revealed that aldehydes exhibit a high affinity toward cysteine. Thus, the effect of adding cysteine to volatile compounds to melon juice was investigated.

The volatile compounds, which were released from the melon juice, were analyzed via solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry (SPME/GC–MS) after 0.5, 5, and 24 h of adding cysteine. The results indicated that the aldehydes, such as (*E*, *Z*)-2,6-nonadienal and (*E*)-2-nonenal, in melon juice were reduced via cysteine addition at all the analyzed times. Additionally, cysteine also reduced two alcohols, namely (*E*)-2-nonenol and (*E*, *Z*)-2,6-nonadien-1-ol, from the aldehydes. To confirm the binding of cysteine with the aldehydes, two cysteine adducts were analyzed via liquid chromatography–MS (LC–MS) employing (*E*)-2-nonenal in the melon juice after the addition of cysteine. This study proposed that cysteine addition was a beneficial strategy for reducing the grassy and cucumber-like aromas of melon juice.

melon juice, cysteine, C9 aldehyde

講演番号：3H02-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム H

マルチコレクター型誘導結合プラズマ質量分析法を用いた食品・環境標準物質中ストロンチウム同位体比分析

Determination of Sr isotopic ratios in food and environmental reference materials using MC-ICP-MS

○有賀 智子[1]、下田 玄[2]、三浦 勉[1]、後藤 孝介[2]、野々瀬 菜穂子[1]([1]産総研・計量標準、[2]産総研・地調)
○ Tomoko ARIGA[1], Gen SHIMODA[2], Tsutomu MIURA[1], Kosuke GOTO[2], Naoko NONOSE[1] ([1]AIST/NMIJ, [2]AIST/GSJ)

食の安全性に対する消費者の関心が益々高まる中、食品の産地表示の正しさを担保する産地判別技術の開発が求められている。ストロンチウム（Sr）の天然同位体は ^{84}Sr、^{86}Sr、^{87}Sr、^{88}Sr の 4 核種があり、このうち ^{87}Sr は ^{87}Rb の β 壊変によって生成する。地質年代が古いほど ^{87}Sr/^{86}Sr が大きくなることから、^{87}Sr/^{86}Sr は地質学の分野では岩石・鉱物の形成年代を知るためのトレーサーとして広く用いられている。また、植物中の ^{87}Sr/^{86}Sr は栽培土壌の ^{87}Sr/^{86}Sr を一部反映するため、^{87}Sr/^{86}Sr は食品と産地を結びつけるトレーサーとしても有用であると考えられている。同位体比の測定には、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）がしばしば用いられている。ICP-MS を用いた ^{87}Sr/^{86}Sr の測定においては、測定試料に含まれる Rb が ^{87}Sr に対して深刻な同重体干渉を引き起こすため、試料前処理によって Rb を完全に除去することが必須となる。特に、複雑な試料マトリクスを有する食品試料の測定を行う際には、Sr と Rb の分離精度が測定値に大きく影響してしまう。

本研究では、食品の産地判別技術の高度化を目指して、ICP-MS を用いた ^{87}Sr/^{86}Sr 測定における最大の技術課題である Sr と Rb の分離手法を最適化するとともに、非常に高精度な同位体比測定が可能なマルチコレクター型 ICP-MS を用いた ^{87}Sr/^{86}Sr 測定の条件を最適化した。最適化した手法の妥当性確認のため、アメリカ国立標準技術研究所（NIST）並びに産総研地質調査総合センター（GSJ）が頒布している標準物質のうち複数の先行研究において ^{87}Sr/^{86}Sr 測定値が報告されている NIST SRM 1515 Apple Leaves、NIST SRM 1400 Bone Ash、GSJ CRM JCp-1 Coral 等を分析し文献値と測定値が良く一致することを確認した。また、食品あるいはそれと類似した試料マトリクスを有する NIST 1567 Wheat Flour、NIST 1547 Peach Leaves 等についても ^{87}Sr/^{86}Sr を測定した。

In this study, optimization of protocols for matrix separation using an Eichrom Sr resin and for highly precise determination of ^{87}Sr/^{86}Sr values by using multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry were carried out. To confirm the validity of the optimized protocols, ^{87}Sr/^{86}Sr values of several kinds of reference materials (RMs) for which ^{87}Sr/^{86}Sr values have been reported in previous studies were determined. The measured values were in good agreement with the literature values. In addition, new ^{87}Sr/^{86}Sr values of several food matrix or food-like matrix RMs were determined.

Strontium isotope ratio, Geographical traceability, Multi collector ICP mass spectrometry

発表責任者：有賀　智子（t-ariga@aist.go.jp）

講演番号：3H04-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

緑藻類スジアオノリのβカロテン含有量への水温と光強度の影響

Effects of water temperature and light intensity on the ß-carotene content of the green alga, Ulva prolifera

○谷山 友規[1]、黒須 泰行[1]、本間 悠里[1]、團 昭紀[2]、垣田 浩孝[1]([1]日大院・総合基、[2]徳島大・産業院)
○Tomoki TANIYAMA[1], Yasuyuki KUROSU[1], Yuuri HONMA[1], Akinori DAN[2], Hirotaka KAKITA[1] ([1]NihonUniv. Graduate School of Integrated basic Sciences, [2]Tokushima Univ. Industry – University R&D startup Leading Institute)

緑藻類スジアオノリの β–カロテン含有量は緑黄色野菜よりは少ないが淡色野菜より多い。β–カロテンは体内で 2 分割されビタミン A に変換される。ビタミン A は夜間視力増強や粘膜強化効果があるため、近年サプリメントとして注目されている。スジアオノリは河川や河口で養殖されているが問題点も多い。環境因子の変動や外的損傷によりスジアオノリが成熟してしまし、藻体が喪失してしまうことが大きな問題である。そこで本研究ではスジアオノリの生産技術向上のための基礎的情報の集積を目指して、スジアオノリが成熟せずに成長する環境条件（水温と光強度）の解明を目的とした。海藻は徳島県吉野川で採取し、人工海水中で洗浄後、培養した。水温実験は 10 ºC から 22 ºC まで行った。水温 18 ºC で最も成長が良く、水温 22 ºC では成熟が観測された。光強度実験は 20 μmol･m^{-2}･s^{-1} から 200 μmol･m^{-2}･s^{-1} まで行った。光強度が上昇するほど成長率は高くなったが、100 μmol･m^{-2}･s^{-1} で β カロテン含有量が最大となった。これらの結果を受けて、環境条件による藻体中の主な色素の詳細な変動を現在調査中である。

The β-carotene content in the green alga, *Ulva prolifera* is lower than that of green-yellow vegetables but higher than that of light-colored vegetables. β-carotene is divided into two parts in the body and converted to vitamin A. Vitamin A has been attracting attention as a supplement in recent years because it has the effects of enhancing night vision and strengthening mucous membranes. *Ulva prolifera* is cultivated in rivers and estuaries, but there are many problems. The major problem is that the algae are lost after the maturation due to changes in environmental factors and external damage. Therefore, in this study, we aimed to collect basic information for improving the algal production technology and aimed to elucidate the environmental conditions (water temperature and light intensity) in which *U. prolifera* grows without maturity. Algal specimens were collected in Yoshino River in Tokushima prefecture, washed with artificial seawater, and cultured in artificial seawater. Temperature experiment was conducted from 10 ºC to 22 ºC. Algal growth was best at a water temperature of 18 ºC, and maturity was observed at a water temperature of 22 ºC. Light experiment was performed from 20 μmol･m^{-2}･s^{-1} to 200 μmol･m^{-2}･s^{-1}. The growth rate increased as the light intensity increased, but the β-carotene content became the maximum at 100 μmol･m^{-2}･s^{-1}. Based on these results, we are currently investigating the detailed changes in the main pigments in the *U. prolifera* due to environmental conditions.

Seaweed, Temperature, ß-carotene

講演番号：3H04-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）によるアントシアニン市販試薬の純度測定

Absolute purity determination of anthocyanin reagents by using external calibration qNMR (EC-qNMR)

○西崎 雄三[1]、建部 千絵[1]、吉田 久美[2]、杉本 直樹[1]、佐藤 恭子[1] ([1]国立衛研、[2]名古屋大学)
○Yuzo NISHIZAKI[1], Chiye TATEBE[1], Kumi YOSHIDA[2], Naoki SUGIMOTO[1], Kyoko SATO[1] ([1]NIHS, [2]Nagoya Univ.)

外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。試薬会社から販売されているシアニジン塩化物（Cy 塩化物）及びシアニジン 3-グルコシド塩化物（Cy3G 塩化物）をモデル試料として，測定溶媒の最適化を行った．最適化した測定溶媒を用いて，Cy 塩化物 6 試料及び Cy3G 塩化物 7 試料に対して，EC-qNMR を実施したところ，試料間で約 25%程度の純度差が確認された．このうち，純度が低かった試料では，Cl 含量が他の試料よりも高いことが，イオンクロマトグラフィーにより明らかとなった．このことから，アントシアニン純度が低かった試料では，塩化物化する際に，過剰な Cl が最終製品に残留したと考えられた．算出した EC-qNMR 純度を用いて，各試料中のアントシアニン濃度を補正し，LC-PDA における絶対検量線を作成したところ，それぞれの検量線は互いに近似した．そのため，本研究で算出した EC-qNMR 純度は，正しい純度を算出していることが支持された．検討した試料のうち，最も高い EC-qNMR 純度は，Cy 塩化物が 96.0%、Cy3G 塩化物が 91.9%で，残りの成分は水分であることが，Cy 塩化物及び Cy3G 塩化物の水分吸脱着分析により示唆された．

External calibration quantitative NMR (EC-qNMR) for anthocyanin purity determination was examined. Using cyanidin chloride (Cy chloride) and cyanidin 3-glucoside chloride (Cy3G chloride) supplied from reagent companies as model samples, deuterated solvents for EC-qNMR were optimized. EC-qNMR showed about 25% purity differences between both six Cy chlorides and seven Cy3G chlorides. Of these, the sample with low purity was found to have a higher Cl content than the other samples by using ion chromatography. From the results, it was guessed that excess Cl generated during chlorination was contaminated to the final product in the low purity Cy chloride and Cy3G chloride. Calibration curves, corrected by using EC-qNMR purities, of each sample on LC/PDA were close to each other. Therefore, it was supported that the EC-qNMR purity values reflect true values. Among the samples examined, the highest EC-qNMR purity was 96.0% for Cy chloride and 91.9% for Cy3G chloride. The water sorption-desorption analysis showed that the remaining component in Cy chloride (100%-96.0%) and Cy3G chloride (100%-91.9%) seem to be just water.

anthocyanin, qNMR, absolute purity

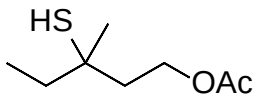
講演番号：3H04-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

レモン精油からのトロピカルフルーツ様香気成分 3-mercapto-3-methylpentyl acetate の同定
Identification of a tropical fruit-like aroma compound, 3-mercapto-3-methylpentyl acetate, from lemon essential oil

○中西 啓、川口 賢二、小林 宗隆（長谷川香料(株)）
○Akira NAKANISHI, Kenji KAWAGUCHI, Munetaka KOBAYASHI (T.HASEGAWA CO.,LTD)

レモンは、世界中の老若男女に愛される香りを有しており、その香気を解明すべくこれまでに多くの香気成分分析が行われているが、いまだ未知の香気成分は多く存在している。今回、新規香気成分の探索を目的として、イタリア産のレモン精油の香気分析を行った。

レモン精油をシリカゲルクロマトグラフィーによって無極性部と極性部に分け、極性部を蒸留した。得られた留分に対し、極性カラムでの GC-O を行ったところ、主香気成分である neral のレモン様香気が感知されるのと同じ箇所で、特徴的なトロピカルフルーツ様香気が感知されることが分かった。香調から含硫黄化合物であると予想し、レモン精油を銀イオン担持イオン交換樹脂で処理することによって精製し、GC-MS 分析によって目的成分のマススペクトルを得ることに成功した。マススペクトルから構造を推定し、合成標品との分析データを比較することで、トロピカルフルーツ様香気成分を 3-mercapto-3-methylpentyl acetate と同定した。本成分はこれまでに報告例のない新規化合物であり、香気成分としての報告も今回が初めてである。本講演では、3-mercapto-3-methylpentyl acetate の官能的な効果に関しても紹介する。



To further understand the aroma of lemon (*Citrus limon*), we investigated an aroma of Italian lemon essential oil in order to search for novel aroma compounds.

Lemon essential oil was divided into non-polar and polar parts by silica gel chromatography and, the polar part was distilled. The distillate was assessed by GC-O on a polar column, and while the lemon-like aroma of neral, the main aroma compound, was perceived, the characteristic tropical fruit-like aroma was also detected. We predicted that the aroma compound was a sulfur-containing compound based on its aroma, and purified the compound by treating lemon essential oil with an ion-exchange resin loaded with silver ions, and succeeded in obtaining the mass spectrum of the tropical fruit-like aroma component by GC-MS analysis. The target component was identified as 3-mercapto-3-methylpentyl acetate by comparison with the analytical data of the authentic sample whose structure was estimated from the mass spectrum. This is a novel compound that has never been reported before, and this is the first time it has been reported as an aroma compound.

lemon, aroma, tropical fruit

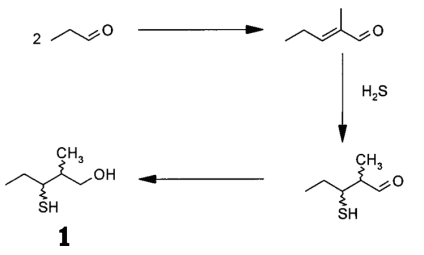
発表責任者：中西 啓（akira_nakanishi@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：3H04-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

加熱タマネギ由来の香気成分に関する研究

Study of the aroma compound from heated onion

○安藤 菜々花、藤谷 麻由、森光 康次郎（お茶の水女子大学大学院）
○Nanaka ANDO, Mayu FUJITANI, Yasujiro MORIMITSU (Ochanomizu Univ.)



(S. Widder, et al. 2000)

【背景・目的】タマネギは種々の酵素反応や加熱によって低閾値の香気物質である 3-mercapto-2-methylpentanol (1)を生成する。1 は肉汁様の香りを持つ。1 の生成経路は右図のように予想されているが、還元酵素が働くタイミングなど不明な点が多い。そこで本研究では 1 の生成経路について検討した。【方法】(1)種々のタマネギのアリイナーゼ活性、PRENCSO 含量、1 の生成量を測定し、アリイナーゼ活性及び PRENCSO 含量と 1 の生成量の相関を調べた。(2)タマネギ及びニンニクから酵素を精製し、合成基質を添加して加熱するモデル反応実験を行った。【結果】アリイナーゼ活性及び PRENCSO 含量と 1 の生成量の間に強い正の相関が見られた。モデル反応実験において、タマネギ粗酵素では 1 が生成したが、タマネギ精製酵素とニンニク酵素では 1 が検出されなかった。今後はモデル反応実験で 1 を増加させる条件の検討を行う。

【 Introduction 】 Onions produce 3-mercapto-2-methylpentanol (1), a low-threshold aroma compound, by various enzymatic reactions and heating. Compound 1 has a gravy-like aroma. Compound 1 production pathway is predicted as shown in the figure above, but the specific pathway has not been clarified.【Methods】1) Allinase activity, PRENCSO content, and compound 1 production of various onions were measured, and the correlation between allinase activity and PRENCSO content and compound 1 production was examined. 2) Model reaction experiments were conducted in which enzymes were purified from onion and garlic, and heated with synthetic compounds. 【Results】Strong positive correlations were found between allinase activity and PRENCSO content and compound 1 production. In the model reaction experiments, compound 1 was produced by the onion crude enzyme, but compound 1 was not detected by the onion purified enzyme and garlic enzyme. The increasing conditions for the formation of compound 1 in the model reaction experiments continue to be investigated.

onion, aroma compound, GCMS

発表責任者：森光康次郎（morimitsu.yasujiro@ocha.ac.jp）

講演番号：3H04-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

揚げたて唐揚げの経時的香気変化に関する研究

Study on time-dipendent aroma changes in freshly fried chicken

○齊藤 博則、森永 遼太、細貝 知弘、宮沢 紀雄、石崎 享（長谷川香料(株)）
○ hironori saito, ryota morinaga, tomohiro hosogai, norio miyazawa, susumu ishizaki (T.Hasegawa Co.,Ltd.)

【目的】唐揚げはテイクアウトやデリバリー需要の高まりもあり、近年市場が拡大している。しかし、調理から喫食までに時間が空くと、経時的に好ましい香気や食感が失われる。そのため、おいしさの向上や食品ロスの削減という観点からも「揚げたて感」の持続は重要なテーマである。前報では、揚げたておよび調理後時間が経過した唐揚げの香気分析を行い、「揚げたて唐揚げ」の香気に重要な成分を報告した。[1)]本研究では、唐揚げをホットボックス保管する際に水分が失われることに着目した。すなわち、水分と共に香気成分も失われることを見出し、損失水分を回収し分析することにより時間経過による香気変化および「揚げたて感」に寄与する香気成分の解明を試みた。
【方法】揚げたての唐揚げを約 70℃に保温後、微減圧により得られた留出水を 1 時間ごとに 5 時間後まで各フラクションとして捕集し、GC-MS 測定および GC においかぎ分析を行った。
【結果】唐揚げ保温時の損失水分には時間経過と共に 2,4-Decadienal 等の不飽和アルデヒド類や 2-Methylpyrazine 等のピラジン類が減少し、Hexanal 等の直鎖アルデヒド類が増加することが判明した。また、Methional、Phenylacetaldehyde、ラクトン類等が損失水分の香気を特徴づける成分、すわなち「揚げたて感」に寄与する成分であると明らかになった。これらの成分を維持または付与することにより、おいしさの向上につながると考えられる。

Maintaining the "freshly fried" aroma is an important theme from the perspective of improving the flavor and reducing food loss. In the previous study, we analyzed the aroma of freshly fried chicken and reported the components that are important for the aroma of "freshly fried". In this study, we focused on the loss of moisture when fried chicken are stored in a hot box. By collecting and analyzing the lost moisture, we attempted to elucidate the changes in aroma over time and the components that contribute to the "freshly fried" aroma.
It was found that unsaturated aldehydes such as 2,4-decadienal and pyrazines such as 2-methylpyrazine decreased and linear aldehydes such as hexanal increased with time. It was also clarified that methional, phenylacetaldehyde, and lactones, etc. were the components that characterized the aroma of lost moisture, namely, the "freshly fried" aroma.

1)森永ら、第 68 回日本食品科学工学会要旨集、3Aa07

fried chicken, freshly fried aroma, flavour

発表責任者：齊藤　博則（hironori_saito@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：3H04-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

咀嚼模擬装置を用いた牛ハンバーグにおけるレトロネーザル香分析

Analysis of retro-nasal flavor of beef pate using chewing simulator

○林 和寛[1]、中田 勇二[1]、セモン エティエンヌ[2]、サレ クリスチャン[2]([1]味の素(株)、[2]INRA, CSGA)
○Kazuhiro Hayashi[1], Yuji Nakada[1], Etienne Semon[2], Christian Salles[2] ([1]Ajinomoto Co. Inc., [2]INRA, CSGA)

レトロネーザル香気は口腔内で食品から放散された香気成分が気道を通じて鼻腔へと到達して感じられるものである。咀嚼時のレトロネーザル香気は咀嚼された際に食品から放散される香気成分を対象とするため、咀嚼中の食品構造の変化(破砕、すりつぶし、崩壊、溶融、唾液による希釈等)が強く影響する。そのため、レトロネーザル香のフレーバーリリースでは非常に多くの要因が関係することから、より簡素化した条件設定をして実験を行うために、咀嚼動作を模した模擬咀嚼装置を使用して実験を進める場合が多い。今回本研究では、固形物の咀嚼時の風味寄与を個人差無く、多検体解析するためのシミュレート手法(咀嚼モデル、Chewing Simulator、CS)を用い、咀嚼や唾液条件によるフレーバーリリースへの影響について牛ハンバーグをモデルとして、香気の物理化学特性値をベースにレトロネーザル香と食品のおいしさの関係を考察した。また、近年高齢化社会が進展する中で、摂食機能の低下により、食事を楽しめない高齢者が増えてきている。味覚・嗅覚などの知覚の低下が主要因である一方、咀嚼能力の低下，嚥下筋の筋力低下，唾液組成や分泌量の変化も一因であると言われている。本報告では更に、高齢者の喫食を考慮した咀嚼や唾液条件によるフレーバーリリースへの影響を CS の活用により検討した。

Retro-nasal aroma, aroma compounds radiated from the food in the oral cavity reaching the nasal cavity through the respiratory tract to be sensed. In the case of retro-nasal aroma, since the aroma compounds released from the food during chewing are targeted, the change of the food structure during chewing (crushing, grinding, disintegration, melting, dilution by saliva, etc.) strongly influences the release and thus the perception. Therefore, since there are a large number of factors involved in the flavor release of retro-nasal flavor, in order to conduct experiments with simpler conditions, it is often necessary to conduct experiments using a simulator that simulates the chewing movement. In this study, the relation between retro-nasal flavor and food deliciousness based on the physicochemical property values of flavor was examined. Beef pate was used as a model to study the effect on flavor release under controlled in vitro mastication and salivation conditions considering the consumption of solid foods and elderly people, using a chewing simulator to analyze multiple samples without individual differences in the contribution of flavor during mastication of solid materials.

aroma release, pate, chewing simulator

発表責任者：林　和寛（kazuhiro.hayashi.8uy@asv.ajinomoto.com）

講演番号：3H04-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

全ヒト嗅覚受容体の気相応答を指標とする牛肉香のプロファイリング

Comprehensive analysis of human olfactory receptor responding to beef odor

○内村 美里、尾城 一恵、寺田 祐子、伊藤 圭祐（静岡県大院薬食）
○Misato UCHIMURA, Ichie OJIRO, Yuko TERADA, Keisuke ITO (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 近年、持続可能な食料供給のために大豆などを原料とした代替肉の開発が進められている。肉に匹敵する、あるいはそれ以上においしい代替肉の開発のためには、肉のおいしさを分子レベルで理解することが重要である。肉のおいしさには香りの寄与が最も大きいことが報告されていることから、本研究では、香りに特徴のある黒毛和牛と外国産牛をモデルとして、389 種類の全ヒト嗅覚受容体の網羅的応答評価を実施し、牛肉の香りの感知に関わる受容体プロファイルを解析した。

【方法・結果・考察】 揮発性香気成分の受容体応答評価を可能とするため、まず初めにヒト嗅覚受容体の気相応答評価系を開発した。ヒト嗅覚受容体発現細胞を播種したウェルをサンプルが付着した濾紙で覆うことで、気相を介して香気成分を受容体に作用させ、細胞内 cAMP 量の増加を指標として受容体応答を評価する系である。本系により、アゴニスト濃度依存的な応答を経時的に測定可能であることが示された。続いて開発した気相応答評価系を用い、389 種類の全ヒト嗅覚受容体を対象として、加熱調理した黒毛和牛あるいは外国産牛の香気成分に応答する受容体を網羅的に解析した。検出された受容体数は外国産牛よりも黒毛和牛の方が顕著に多く、和牛香はより複雑な受容体応答パターンとして感知されることが示唆された。黒毛和牛と外国産牛の両方のサンプルに応答した hOR2C3 などの受容体は、牛肉に共通する香りの感知に関わるものと考えられた。また、どちらかのサンプルにのみ応答を示した受容体として hOR2B3、hOR10A2 などが検出された。これらは和牛香やグラス臭などの特徴的な香りの感知に関わる可能性がある。

以上より、気相応答評価系を用いた全ヒト嗅覚受容体の網羅的解析により、受容体応答パターンとして牛肉の香りをプロファイリングできることが示された。本技術は牛肉のおいしさの科学的理解に貢献するのみならず、代替肉を含む様々な食品の開発へ応用が期待できる。

Considering the impending protein crisis, molecular understanding of meat odor is important to develop meat substitute with high palatability. In this study, 389 of human olfactory receptor profile responding to beef odor was investigated using Japanese Black (Wagyu) cattle and American cattle. We first established a volatile-based human olfactory receptor assay system. Using the new method, we comprehensively evaluated response of 389 human olfactory receptors to baked beef odor and successfully identified the receptor profile.

olfactory receptor, beef odor, comprehensive analysis

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3H04-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム H

香気成分を生かしたイチゴのランナーの焙煎茶としての開発可能性

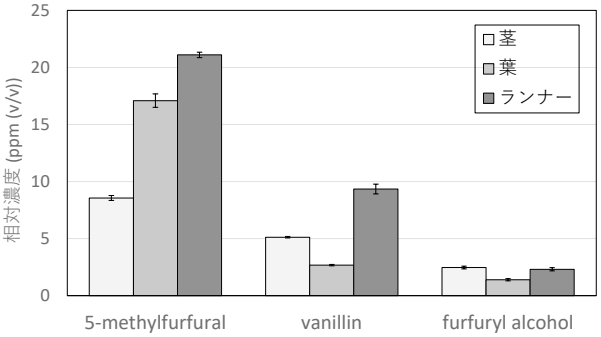
Development of strawberry runner roasted tea

○関口 光広[1]、篠田 清哉[1]、西脇 崚[1]、笹木 哲也[2]([1]石川県立大、[2]石川県工業試験場)
○ Mitsuhiro SEKIGUCHI[1], Seiya SHINODA[1], Ryo Nishiwaki[1], Tetsuya Sasaki[2] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Industrial Research Institute of Ishikawa)

イチゴは生食、ジャム、ケーキなど様々な用途のある果実的野菜であり、生産量も多く近年では輸出も盛んになってきている。イチゴの生産農家において、繁殖は一般的にランナー（匍匐枝）の先に着生する子株によって実施している。そのため、栽培の過程でランナー（匍匐枝）が大量に廃棄されている。そこで、農業資源の有効活用として、石川県の名産である加賀棒茶の製造に倣い、イチゴのランナーを焙じた焙煎茶の開発を検討した。

まず、製造した焙煎茶の官能評価を実施した（石川県立大学人権・倫理委員会承認)。イチゴのランナー、茎、葉から作成したほうじ茶を評点法にて比較したところ，焙煎したランナーは葉や茎と異なり香ばしく甘い特徴を有していることが判明した。

続いて、ガスクロマトグラフ質量分析を用いて香気成分の分析を実施した。ランナーの未焙煎、焙煎の成分を比較したところ、焙煎によって furfrural, 5-methylfurfural, furaneol などの成分が増加していることが判明した。続いて、焙煎した葉と茎とランナーの香気成分を測定し、主成分分析を実施したところ、焙煎したランナーには他の部位と比較して 5-methylfurfural, vanillin, furfuryl alcohol の香気成分が多く含まれることを明らかにした。現在この知見を活用して商品化の検討を進めており、この研究によって農業廃棄物の削減が進展することが期待される。



As one difficulty of strawberry cultivation, the large amounts of runners obtained during growth of offspring are discarded. Therefore, we attempted to develop strawberry runners as roasted tea to present an effective utilization method. Comparison of roasted teas made from runner, leaves, and stems demonstrated from sensory evaluation that roasted teas from runners produced both roast and sweet sensations. Their aroma components were identified using GC-MS. Results elucidated the possibility of producing roasted tea from strawberry runners. More effective use of runners can be expected to contribute to waste reduction.

strawberry, runner, roasted tea

発表責任者：関口　光広（m-seki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3H07-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

3T3-L1 細胞における苦味受容体タンパク質発現解析

Analysis of bitter taste receptor protein expression in 3T3-L1 cells

○鶴間 あい、木村 駿介、加藤 英介（北大院農）
○Ai TSURUMA, Shunsuke KIMURA, Eisuke KATO (Hokkaido Univ.)

苦味受容体（Tas2R）は、口腔内で発現して苦味の感知や毒物の忌避に役立っている。近年は Tas2R の口腔外での働きが注目されているが、それらの機能や役割についてはまだ不明なものが多い。我々は、マウス脂肪組織に *Tas2R* の mRNA の発現を確認しており、脂肪細胞株である 3T3-L1 脂肪細胞においても 5 種類の *Tas2R* が脂肪組織と共通して発現していることを確認している。しかし、タンパク質レベルで Tas2R が発現しているかは不明である。本研究では、3T3-L1 細胞の Tas2R 発現をタンパク質レベルで解析した。

3T3-L1 細胞において、分化前後の *Tas2R* の mRNA 発現量を比較したところ、分化後の細胞では *Tas2R* の mRNA 発現が上昇していた。そこで、分化前後の 3T3-L1 細胞のタンパク質をウェスタンブロッティングにより解析し、Tas2R タンパク質の発現を解析した。検出には、Tas2R の一部アミノ酸配列を標的として作成した抗体を用いた。結果、分化後の細胞において、分化前には検出されないバンドが見られ、Tas2R タンパク質が発現していることが示唆された。現在、検出されたバンドが Tas2R であるのかどうか検討中である。

Bitter taste receptors (Tas2Rs) are expressed in oral cavities and serve to detect bitter tastes and avoid poisonous compounds. Recently, T2Rs outside the oral cavity is attracting attentions, but their functions and roles are still unknown. We have confirmed the mRNA expression of *Tas2R*s in mouse adipose tissues, and five members of *Tas2R*s are commonly expressed in white adipose cell line 3T3-L1 adipocytes. However, it is still unclear whether the Tas2R proteins exist in 3T3-L1 adipocytes. In this study, we analyzed an expression of Tas2R in 3T3-L1 cells at a protein level.

Comparison of the mRNA expression levels of *Tas2R*s before and after differentiation of 3T3-L1 cells revealed that the mRNA expressions of *Tas2R* are upregulated after differentiation. Thus, we analyzed the Tas2R proteins in 3T3-L1 cells before and after differentiation by Western blotting. Antibodies that target partial amino acid sequences of Tas2Rs were used for the purpose. As a result, bands that were not detected in the cells before differentiation were found in the cells after differentiation, suggesting that Tas2R proteins are expressed. We are currently investigating whether the detected bands are Tas2Rs or not.

bitter taste receptor, adipocyte, taste 2 receptor

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3H07-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

脂肪細胞における苦味受容体（T2R）の遺伝子発現解析とその機能推定

Analysis of bitter taste receptor expression and their estimation of function in adipocytes.

○木村 駿介、鶴間 あい、加藤 英介（北大院農）
○Shunsuke KIMURA, Ai TSURUMA, Eisuke KATO (Hokkaido Univ.)

苦味受容体（T2Rs）は気道・消化管で毒物・異物の検知及びその排除を担っている。一方で、T2Rの遺伝子変異は肥満や糖尿病リスクに関わることが知られており、肥満や糖尿病と関係が深い組織でも機能しているのではないかと推定される。そこで本研究では、マウス脂肪組織や3T3-L1脂肪細胞を用いて、脂肪細胞におけるT2R機能解析を行った。

脂肪細胞においてT2Rが機能しているか推定するため、C57BL/6Jマウス脂肪組織の *T2R*発現を解析し、また絶食や苦味化合物による刺激により変動するか解析した。その結果、マウス脂肪組織には *T2R*が発現しており、絶食と苦味化合物刺激は一部の *T2R*発現を上昇させることが分かった。また、3T3-L1脂肪細胞についても、血清飢餓や苦味化合物刺激が一部の *T2R*発現を上昇させることを確認した。したがって、脂肪組織においてT2Rは機能しているのではないかと推定された。

次に、脂肪細胞におけるT2Rの機能推定のため、苦味化合物であるエピカテキンで刺激した3T3-L1細胞のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、分化に関わる転写因子である *Egr2*、*Nr4a* の発現の上昇を確認した。エピカテキンはT2R126のリガンドであり、3T3-L1細胞の分化を阻害することが報告されている。したがって、T2R126は、3T3-L1細胞の分化を調節している可能性が考えられた。そこで、3T3-L1細胞にT2R126を過剰発現させ、分化に与える影響を解析した。その結果、T2R126の過剰発現により3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化が抑制された。したがって、脂肪細胞においてT2R126は分化調節に関わっていると推定される。

Genetic mutation of bitter taste receptors (T2Rs) is suggested to relate with the risk of obesity and diabetes. In this study, we analyzed T2Rs of mice adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes.

Analysis of mRNA in adipose tissue of C57Bl/6J mice confirmed expression of several T2Rs in this tissue. Fasting and/or bitter tastant stimulation increased a part of these T2Rs expression. Also, serum starvation and bitter stimulation increased several of T2Rs expressed in 3T3-L1 cells.

Transcriptome analysis of epicatechin stimulated 3T3-L1 adipocyte revealed upregulation of *Egr2* and *Nr4a* genes, transcription factors related to differentiation of adipocyte. Overexpression of T2R126, a target of epicatechin, in 3T3-L1 cells suppressed differentiation of the cell. Therefore, we expect that T2R126 is involved in regulation of differentiation in adipocytes.

bitter taste receptor, adipocyte, taste 2 receptor

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3H07-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）含有ナス粉末の摂取による睡眠改善作用

Sleep improving effect of ingestion of eggplant powder rich in eggplant-derived acetylcholine

○小山 正浩[1]、後藤 和馬[2]、宮川 竜征[2]、王 文豪[3]、山口 翔平[3]、中村 浩蔵[2,3] ([1](株)ウェルナス、[2]信州大農、[3]信州大院総合医理工)
○ Masahiro KOYAMA[1], Kazuma GOTO[2], Ryusei MIYAGAWA[2], Wenhao WANG[3], Shohei YAMAGUCHI[3], Kozo NAKAMURA[2,3] ([1]Wellnas Co., Ltd., [2]Department of Agric., Shinshu Univ., [3]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

【目的】我々はナス（*Solanum melongena*）粉末の継続摂取がストレスを感じている血圧が高めの人の血圧と心理状態を改善することを実証し、ナスは健康効果を有する機能性野菜であることを明らかにした[1)]。関与成分はナスに他の栽培野菜と比較して約 3000 倍高含有なアセチルコリン（ACh）であり、ナス中の ACh は交感神経活動を抑制することで食品機能性を示すことが推察されている[2)]。交感神経活動の亢進など自律神経系の異常は、睡眠障害（入眠障害、早朝覚醒など）を引き起こす。そこで、本研究ではナスの新規な食品機能性として睡眠に与える影響を臨床試験により評価した。
【方法】被験者として睡眠に悩み（寝つきが悪い、眠りが浅いなどの軽度な睡眠障害を自覚）を持つ健常成人男女 25 名を対象に、プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー試験を実施した。被験食品にはナス粉末充填カプセル（ACh3.5 mg/day 含有）およびプラセボ食品としてデキストリン充填カプセルを用いた。土日を除く平日 10 日間のうち前半 5 日間と後半 5 日間に分け、被験者には前後半に異なるカプセルを就寝 1.5～2 時間前に摂取させた。被験者には試験期間中毎日、就寝時に脳波測定器を装着させ睡眠時の脳波を測定し、睡眠状態を評価した。
【結果】ナス粉末含有カプセルの摂取により、プラセボカプセルの摂取に対して全睡眠時間（入眠から起床までの時間、中途覚醒時間は除く）が有意に延長した。また、ナス粉末含有カプセル摂取においては、入眠時間が約 1 時間早まった。本試験により、ACh を含むナス粉末の摂取が、睡眠時間の延長や速やかな睡眠導入といった睡眠の質を改善することが明らかとなった。本結果にはナスに含まれる ACh による交感神経活動の抑制が関与している可能性がある。

We demonstrated that ingestion of eggplant (*Solanum melongena*) rich in acetylcholine (ACh) improved higher blood pressure and psychological states by a clinical trial[1)]. Oral ingestion of ACh in eggplant was estimated to cause suppression of sympathetic nervous activity in our previous animal study[2)]. In this study, effect of eggplant ingestion on sleep was investigated by randomized cross-over trial. Ingestion of capsules contained eggplant powder (ACh 3.5 mg/day) significantly extended sleep time and brought forward sleep introduction by 1 hour on individuals worrying about sleep. The effect on the autonomic nervous system of ACh in eggplant possibly contributed to the novel function of eggplant.

1) Nishimura, M., et al., (2019) Nutrients, 11, 2797. 2) Yamaguchi, S., et al., (2019) Food Chemistry, 276, 376-382.

eggplant, acetylcholine, sleep

発表責任者：(株)ウェルナス 代表取締役 小山正浩（mkoyama32@wellnas.biz）

講演番号：3H07-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

テレメトリー法を用いた経口投与アセチルコリンが交感神経活動に与える影響調査
Investigation of effects of orally administered acetylcholine on sympathetic nervous activity using telemetry method

○山口 翔平[1]、後藤 和馬[2]、宮川 竜征[2]、王 文豪[1]、中村 浩蔵[1,2]([1]信州大院総合医理工、[2]信州大農)
○ Shohei YAMAGUCHI[1], Kazuma GOTO[2], Ryusei MIYAGAWA[2], Wenhao WANG[1], Kozo NAKAMURA[1,2] ([1]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]Department of Agric., Shinshu Univ.)

【目的】アセチルコリン（ACh）はナス（*Solanum melongena*）をはじめとする食品中に広く存在する化合物である。所属研究室では、ACh を豊富に含むナス粉末の摂取が高めの血圧を改善することを臨床試験で実証し、関与成分が ACh であることを明らかにした[1)]。高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた研究では、ナス中 ACh の交感神経活動の抑制作用により抗高血圧作用を引き起こすことが示唆されている[2)]。本研究では経口投与 ACh が交感神経活動に与える影響をテレメトリー法により調査した。
【方法】テレメトリーセンサを留置した SHR を試験に供した。血圧センサは腹部大動脈内に挿入し、神経電極は腎交感神経あるいは腰部交感神経に装着し、それぞれ腎交感神経活動（RSNA）、腰部交感神経活動（LSNA）を測定した。ACh(10^{-8} mol/kg 体重)を単回経口投与し（n=6）、動脈圧と交感神経活動の変化をサンプリングレート 1000Hz で 12 時間記録、純水を投与した対照(n=6)と比較した。
【結果】ACh の経口投与は、対照と比べ血圧および LSNA を有意に低下させた。一方で、RSNA 測定個体では ACh の経口投与により血圧は有意に低下したものの RSNA に対照との有意な差異はなかった。また、ACh の経口投与は SHR の尿中ノルアドレナリンを有意に低下させたことから、ACh による急性の血圧低下は LSNA を含む交感神経活動の抑制により神経末梢からの昇圧性カテコールアミンの放出が抑制されたためであると考えられる。本研究結果では、交感神経の種類により経口投与 ACh に対して異なる応答が示された。この差異には、交感神経活動の調節により血圧を一定に維持する生体の圧受容器反射機能が関与していると考えられる。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

Eggplant (*Solanum melongena*) rich in acetylcholine (ACh) improved higher blood pressure (BP) in our clinical trial[1)]. We estimated that the antihypertensive effect of eggplant on spontaneously hypertensive rats (SHR) was due to reduction of the sympathetic nervous activity (SNA) by ACh[2)]. This study showed that oral ACh reduced BP and lumbar SNA but not renal SNA by using telemetry method. Oral ACh also reduced urinary noradrenaline level, demonstrating that the BP-lowering was due to the reduction of SNA including lumbar region. The baroreflex function could involve in the differential response of the lumbar and renal SNA by oral ACh.

1) Nishimura, M., et al., (2019) Nutrients, 11, 2797. 2) Yamaguchi, S., et al., (2019) Food Chemistry, 276, 376-382.

acetylcholine, antihypertensive effect, telemetry method

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3H07-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

高血圧自然発症ラットとウィスター京都正常血圧ラットにおける経口投与アセチルコリンの降圧作用の差異

Difference in antihypertensive effect of oral administrated acetylcholine between spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto normotensive rats

○中村 浩蔵[1,2]、後藤 和馬[2]、宮川 竜征[2]、王 文豪[1]、山口 翔平[1] ([1]信州大院総合医理工、[2]信州大農)
○ Kozo NAKAMURA[1,2], Kazuma GOTO[2], Ryusei MIYAGAWA[2], Wenhao WANG[1], Shohei YAMAGUCHI[1] ([1]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]Department of Agric., Shinshu Univ.)

【目的】脊椎動物の神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)は、血圧改善作用、気分改善作用などを有する新規食品機能性成分であり、有効用量は 1 日一人当たり 2.3mg である [1)]。高血圧自然発症ラット (SHR) において ACh は、過剰に亢進した交感神経活動を抑制して降圧作用を引き起こすと推定されている [2)]。ACh は栽培作物ではナスに多量に含まれており、臨床試験における血圧改善効果は正常高値血圧者よりも 1 度高血圧者の方が顕著であった [1)]。本研究では、SHR および正常血圧系統であるウィスター京都（WKY）ラットに ACh を経口投与して降圧作用の差異を明らかにすると共に降圧作用に差異が生じるメカニズムを考察した。
【方法】雄性 SHR/Izm、WKY/Izm ラットを代謝ケージで飼育し、ACh を経口ゾンデで単回経口投与し血圧および尿中カテコールアミンを測定した。血圧はテイルカフ法で計測、尿中カテコールアミンは LC-MS/MS で定量した。対照として両系統ラットに純水を投与し、同様に血圧および尿中カテコールアミンを測定した。
【結果】ACh 経口投与により、SHR の血圧および尿中カテコールアミンは有意に低下したが、WKY ラットでは血圧および尿中カテコールアミンの有意な低下は認められなかった。これらの結果は、経口投与 ACh が高血圧状態でのみ降圧作用を引き起こすことを示しており、高血圧状態における圧受容器反射の機能低下が関与していると考察された。体内に吸収されず正常血圧で降圧作用を引き起こさない ACh の安全性は高いと考えられる。本研究は農研機構生研支援センター革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト）の支援を受けて実施した。

Acetylcholine (ACh) is a novel food functional component having a blood pressure (BP) improving effect, and the effective dose is 2.3 mg/day[1)]. ACh suppresses excessively increased sympathetic nerve activity and causes BP lowering in spontaneously hypertensive rats (SHRs) [2)]. The BP improving effect of ACh was more effective in subjects with grade 1 hypertension than in those with normal-high BP in a clinical trial [1)]. In this study, we clarified the difference in the BP lowering effect by orally administered ACh in SHR and normotensive Wister Kyoto (WKY) rats, and considered the mechanism of the difference in antihypertensive effect. ACh was orally administered to male SHR/Izm and WKY/Izm rats, and BP and urinary catecholamines were measured. Oral administration of ACh significantly reduced BP and urinary catecholamines in SHRs, but no significant reduction in those was observed in WKY rats. These results indicated that orally administered ACh induced antihypertensive effects only in the hypertensive condition and the baroreceptor reflex is involved. ACh, which is not absorbed in the body and does not cause the antihypertensive action in normal BP, should be a highly safe food functional component.

1) Nishimura, M., et al., (2019) Nutrients, 11, 2797. 2) Yamaguchi, S., et al., (2019) Food Chemistry, 276, 376-382.

acetylcholine, antihypertensive effect, safety

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3H07-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

国産ナスの新規食品機能性成分アセチルコリンの含有量調査

Investigation on the content of novel functional ingredient acetylcholine in domestic eggplant

○王 文豪[1]、和具 なおみ[2]、山口 翔平[1]、小山 正浩[3]、中村 浩蔵[2]([1]信州大院総合医理工、[2]信州大農、[3]株式会社ウェルナス)
○ Wenhao WANG[1], Naomi WAGU[2], Shohei YAMAGUCHI[1], Masahiro KOYAMA[3], Kozo NAKAMURA[2] ([1]Graduate School of Med. Sci.Tech., Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ., [3]Wellnas. Co.,Ltd.)

【目的】ナス（*Solanum melongena*）には、アセチルコリン(ACh)が他の栽培作物の 2900 倍以上含まれており、国産 26 種類の平均 ACh 含有量は 3.8 mg/100 g 生鮮重量（F.W.）である[(1,2)]。また、臨床試験で 2.3 mg/人・日のナス由来 ACh を含むナス粉末の継続摂取による血圧が高めの被験者の血圧・心理状態改善作用が明らかにされ[(3)]、ACh が新規な食品機能性成分であることが実証されるとともに血圧（拡張期）改善をヘルスクレームとするナス機能性表示食品が誕生した。そこで本研究では、国内ナス産地の夏秋および冬春ナスの ACh 含有量を調査した。
【方法】ナス凍結乾燥粉末を希塩酸で振盪抽出、抽出液を陽イオン交換樹脂で固相抽出し、LC-MS/MS 分析による標準添加法で定量を行った。定量値は内部標準の回収率で補正した。ナス由来 ACh 含有量は生鮮重量 100 g 当たり含有量（100 g F.W.）で示した。
【結果】本研究で調査した全てのナスサンプルで高含有のナス由来 ACh を確認し、最高含有量は 11.5 mg/100 g F.W.、最低含有量は 5.4 mg/100 g F.W.であり、全て、機能性表示食品として販売中の生鮮機能性表示食品・高知なすの 1 日あたりの摂取目安量である 100 g で有効用量 2.3 mg を満たすことが明らかとなった。この結果から、調査対象地域の生鮮ナスは、夏秋ナス、冬春ナスを問わず機能性表示が可能であり、特に、特定地域の ACh 高含有品種は 1 日あたりの摂取目安量を減らすことが可能である。本研究で、日本各地で栽培されているナスを機能性野菜として健康維持増進に役立てられる可能性が示された。本研究の一部は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

We proved that the acetylcholine (ACh) was 2900 times more abundant in eggplant than that in other cultivated crops[(1,2)], and daily ingestion of ACh derived from eggplant at 2.3 mg/day improved human blood pressure and psychological state[(3)] . This study investigated the ACh content of eggplant in Japan. All eggplant samples contained abundant ACh more than the effective dose. Fresh eggplants in the survey area can be labeled the health claim as foods with functional claims.

(1) Wang, W., et al., (2020) *Foods*, 9, 1029.
(2) Wang, W., et al., (2021) *Foods*, 10, 81.
(3) Nishimura, M., et al., (2019) *Nutrients*, 11, 2797.

eggplant, choline ester, functional food

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3H07-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

漢方薬人参養栄湯の抗不安作用とその作用機序

Evaluation of anxiolytic effects of Ninjin'yoeito using zebrafish model

○竹野 日奈子[1]、久保 友理奈[2]、乾 明夫[3]、高橋 隆二[4]、塩崎 一弘[1,2]（[1]鹿大院農林水産、[2]鹿大水、[3]鹿大院医歯研、[4]クラシエ製薬漢方研）
○Hinako TAKENO[1], Yurina KUBO[2], Akio INUI[3], Ryuji TAKAHASHI[4], Kazuhiro SHIOZAKI[1,2]（[1]Grad, Sch, Agri, Forest, Fish., Kagoshima Univ., [2]Fac. Fish., Kagoshima Univ., [3]Grad, Sch, Med, Dent., Kagoshima Univ., [4]Kampo Res Lab., Kracie Pharma.）

コロナ禍における長期に制限された日常生活は、人々に多大な不安やストレスを与えている。漢方薬は体質改善や長期服用に適しており、一般的に副作用も少ないことから、コロナ禍における人々の不安緩和への応用が期待される。人参養栄湯は 12 種の生薬より構成され、体力回復に有効とされる漢方薬である。最近、人参養栄湯ではマウスにおける無気力回避やストレス耐性効果が報告されているが、その詳細は不明である。そこで本研究では、不安モデルゼブラフィッシュを用いて人参養栄湯の抗不安作用について解析した。

人参養栄湯添加飼料を与えたゼブラフィッシュを、急性ストレス（警報物質曝露）および慢性ストレスに曝露したところ、いずれのストレスに対しても不安行動の 1 つであるフリージングが抑制された。そこで急性ストレス曝露後の遺伝子発現変化について解析したところ、人参養栄湯添加飼料を与えたゼブラフィッシュの脳では、神経ペプチド Y、オレキシン、ミネラルコルチコイド受容体、チロシンヒドロキシラーゼ各遺伝子の発現低下が観察され、これにより視床下部-下垂体-副腎皮質および視床下部-交感神経-副腎髄質を中心としたストレス反応系の抑制が示唆された。さらに *keap1* 遺伝子の発現増加と、それに伴うカタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼの発現低下が観察されたことから、人参養栄湯による酸化ストレスの抑制が予想された。そこで人参養栄湯、およびその構成生薬の抗酸化活性を測定したところ、ビャクジュツ、シャクヤク、およびゴミシ等に高いラジカル消去活性が認められた。以上の結果から、人参養栄湯の抗ストレス作用とそのメカニズムが明らかとなった。

Ninjin’yoeito (NYT) is a Chinese herbal medicine consisting of 12 kinds of natural herbs. Recently, it has been reported that NYT is effective in avoiding lethargy and stress tolerance in mice, but the details are still unknown. In the present study, we analyzed the anxiolytic effects of NYT using an anxiety model zebrafish.

Zebrafish fed with NYT were exposed to acute and chronic stress. As a result, freezing, one of the anxiety behaviors, was suppressed in both stresses. We analyzed gene expression changes after acute stress exposure, and observed decreased expression of *npy*, *orx*, *mr*, and *th1* genes in the brains of zebrafish fed NYT, suggesting suppression of the stress response system centered on the HPA axis and SAM axis. In addition, NYT increased expression of *keap1* gene and decreased expression of catalase and superoxide dismutase were observed, suggesting suppression of oxidative stress. Therefore, we measured the antioxidant activity of NYT and its constituent herbs and found that some herbs showed high radical scavenging activity.

Chinese Medicine, anxiety, zebrafish

発表責任者：塩崎一弘（shiozaki.kagoshimalab@gmail.com）

講演番号：3H07-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

そばタンパク質の抗うつ作用と腸脳相関の関与

Antidepressant-like activity of buckwheat protein through brain-gut axis

○佐藤 史佳[1]、水重 貴文[2]、茗花 美幸[3]、金野 尚武[2]、前田 勇[2]、羽生 直人[2]、蕪山 由己人[2]([1]宇都宮大院地域創生科学研究科、[2]宇都宮大学学術院、[3]松屋製粉株式会社)
○ Fumika SATO[1], Takafumi MIZUSHIGE[2], Miyuki NABANA[3], Naotake KONNO[2], Isamu MAEDA[2], Naoto HABU[2], Yukihito KABUYAMA[2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Utsunomiya Univ. Acad. Assoc., [3]Matsuyaseifun Corp.)

【目的】我々はこれまで、マウスにおいて、高タンパク質そば粉の経口投与により抗うつ作用が認められることと糞中の酪酸・酢酸産生菌 *Lachnospiraceae* 科の割合が増加することを見出した。また、高タンパク質そば粉のペプシン分解物を投与した際、抗うつ作用が消失した。以上より、そばの難消化性タンパク質が抗うつ作用の活性成分であることが示唆された。本研究では、そばと他の穀物素材の抗うつ作用を比較検討した。さらに、高タンパク質そば粉のタンパク質画分の抗うつ作用を調べ活性成分の探索を試みた。【方法】［実験 1］5 週齢雄 ddY 系マウスにそば粉、高タンパク質そば粉、小麦粉、高タンパク質小麦粉、米粉を 1000 mg/kg 体重の用量で 3 日間にわたり、1 日 1 回経口投与した。最終投与から 3 時間後に強制水泳試験を行いうつ様行動への影響を評価した。また、最終投与から 24 時間分の糞を回収し、メタゲノム解析により腸内細菌叢を調べた。［実験 2］マウスに高タンパク質そば粉のグロブリン画分、アルブミン画分、プロラミン画分、グルテリン画分、最終沈殿物を高タンパク質そば粉 1000 mg/kg 体重相当の用量で 3 日間にわたり、1 日 1 回経口投与した。実験 1 と同様にうつ様行動への影響を評価した。【結果・考察】［実験 1］高タンパク質そば粉投与時のみで無動時間が有意に減少し、高タンパク質そば粉に特異的な効果であることが示唆された。高タンパク質そば粉投与時のみで *Lachnospiraceae* 科の割合が増加傾向を示した。［実験 2］プロラミン画分投与のみで無動時間が有意に減少し、他の画分には効果が認められなかった。以上の結果より、高タンパク質そば粉が腸脳相関を介した抗うつ作用を有し、その活性成分がプロラミンであることが示唆された。

Depression has been a mental health issue worldwide. We previously found that buckwheat with high-protein content suppressed depression-like behavior in a forced swim test and increased fecal butyric acid-producing bacterium (family *Lachnospiraceae*) in mice. In the present study, we compared the antidepressant-like activity and intestinal microflora with the other grains, wheat and rice. In addition, we investigated the active protein fraction in buckwheat with high-protein content. We found that buckwheat with high-protein content exhibited antidepressant-like activity and tended to increase fecal family *Lachnospiraceae* ratio, but other grains had no effect. Prolamin fraction in buckwheat also exhibited antidepressant-like activity, but not other fractions had no effect. Taken together, these results suggested that buckwheat with high-protein content has antidepressant-like activity through brain-gut axis and the active substance is prolamin.

buckwheat, depression, brain-gut axis

講演番号：3H07-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

うつ・不安症状に対する真珠層抽出成分の効果

Effect of the nacre extract from pearl oyster against depression and anxiety.

○大町 知輝、長谷川 靖 (室蘭工大院)
○Tomoki OMACHI, Yasushi HASEGAWA (Muroran Institute of Technology)

【背景・目的】
真珠は古くから生薬として利用されているが、作用機序や有効成分は明らかにはなっていない。以前、我々は真珠と同じ成分を含むアコヤガイ貝殻から抽出した真珠層抽出成分が、スコポラミン誘発記憶障害マウスの記憶障害を改善することを報告した。一方、認知症患者の多くでは記憶障害に伴い、うつ・不安症状の併発が報告されている。本研究では、老化促進モデルマウス(SAMP8)を用い、うつ・不安症状に対する真珠層抽出成分の効果について検討した。
【方法・結果】
SAMP8 およびコントロールマウスである SAMR1 に対して AIN95 基本食、または真珠層抽出成分(250mg/kg)を混ぜたものを三か月間与え、強制水泳試験や高架式十字迷路試験を用いてマウスのうつ・不安行動を評価した。その結果、SAMP8 は老化に伴い、うつ・不安行動を示し、真珠層抽出成分の投与でそれらの行動が抑制されることがわかった。また、マウスの大脳皮質を用いてリアルタイム PCR を行ったところ、セロトニン 1A 受容体の mRNA 発現量が真珠層抽出成分の投与で増加することが明らかになった。
【Purpose】
Since ancient time, pearl has been used as a Chinese traditional medicine, but its bioactive mechanism and substances remains unclear. We have shown that nacre extract from nacreous layer in Pearl oyster shells improves scopolamine-induced memory impairments. Dementia is characterized by not only memory impairments, but also depression and anxiety. In this study, we investigated the effect of nacre extract against depression and anxiety in senescence-accelerated mice P8(SAMP8).
【Methods and results】
SAMP8 and SAMR1(control) were fed a AIN95 basal diet without or with 250 mg/kg nacre extract for 3 months. The force swimming test and elevated plus-maze test were performed to evaluate depression and anxiety in mice. SAMP8 showed depressive and anxious behaviors accompanied by aging and oral administration of nacre extract suppressed these behaviors in SAMP8. Real-time PCR analysis showed that nacre extract significantly increased the mRNA expression of serotonin 1A receptor in the cortex of SAMP8.

Pearl, depression, SAMP8

発表責任者：大町知輝（20041012@mmm.muroran-it.ac.jp）

講演番号：3H07-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

アコヤガイ貝殻真珠層に含まれる硫酸酸性多糖のβアミロイド沈着抑制作用

Sulfated polysaccharide in nacre layer of pearl oyster suppresses ß-amyloid deposits.

○若生 真由美、四ッ屋 大翔、下村 七海、長谷川 靖（室蘭工大院）
○Mayumi WAKO, Yamato YOTSUYA, Nanami SHIMOMURA, Yasushi HASEGAWA (Miuroran Institute of Technology)

背景・目的）真珠は中国では古くから漢方薬として、日本では化粧品として使用されている。しかし、真珠がどのような作用メカニズムを示すのか明らかになっていない。当研究室では、真珠とほぼ同じ構造を持ち、水産廃棄物であるアコヤガイ貝殻真珠層に着目し研究を行ってきた。そして、この真珠層の有機成分が、スコポラミン誘発記憶障害マウスの記憶障害を改善させることを明らかにしてきた。さらに、記憶障害改善物質の探索を行った結果、高分子の硫酸酸性多糖（真珠層多糖）であることを明らかにした。本研究ではこの真珠層多糖のスコポラミンの長期投与で生じる海馬神経細胞の変性、脱落、そして脳内のβアミロイド沈着に対する作用について検討を行った。
方法・結果・考察）アコヤガイ貝殻の有機成分を抽出し、3 種類のカラムを用いて、真珠層多糖を精製した。スコポラミンで誘発した記憶障害マウスに対する多糖の作用機構を明らかにするため、脳内のβアミロイド沈着について検討したところ、多糖の投与はスコポラミン長期投与に伴う海馬神経細胞の変性・脱落、脳内のアミロイド沈着が抑制された。さらに、βアミロイドを分解するインスリン分解酵素やネプライシンの mRNA 発現量が真珠層多糖を投与した脳において有意に増加していることが分かった。また、βアミロイドを脳室内投与したモデルマウスにおいても、真珠層から抽出した成分がアミロイド沈着を抑制した。真珠層多糖はβアミロイドの沈着を抑制する物質として有効かもしれない。

Pearls, composed of the nacreous layer, have been used in Chinese medicine since ancient times. We have previously shown that extracts from the nacreous layer (nacre extract) improves scopolamine-induced memory impairment. In addition, we isolated sulfated polysaccharide as memory improving substance. Firstly we investigated the effect of sulfated polysaccharide against amyloid β deposits which is caused by chronic administration of scopolamine to male ICR mice. Chronic administration of scopolamine caused neuronal degeneration and loss in hippocampus neuron and deposits of amyloid β protein (Aβ) stained with Congo red. Treatment with sulphated polysaccharide suppressed the degeneration and decreased Aβ deposits. Real time PCR and western blotting studies showed that sulphated polysaccharide increased the expressions of Aβ-degrading enzymes (insulin degrading enzyme and neprilysin). In addition, we found that nacre extract also suppressed Aβ deposits in Aβinjection mouse model and increased mRNA expressions of Aβ-degrading enzymes. These results suggest that sulphated polysaccharide may be effective in suppressing Aβ deposits.

β-amyloid, memory, polysaccharide

発表責任者：若生真由美（21041073@mmm.muroran-it.ac.jp）

講演番号：3H07-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム H

ホエイ由来ペプチドβラクトリンはマウスおよびヒト iPS 細胞由来アルツハイマー病モデル神経細胞のミトコンドリア機能異常を改善する

β-Lactolin rescues mitochondrial dysfunction in Aβ-treated mouse hippocampal neuronal cells and a human iPSC-derived neuronal cell model of Alzheimer's disease

○綾部 達宏、髙橋 千佳、大屋 怜奈、阿野 泰久（キリン HD・中央研）
○Tatsuhiro AYABE, Chika TAKAHASHI, Rena OHYA, Yasuhisa ANO (Kirin Holdings Co., Ltd)

世界的な高齢化の進行でアルツハイマー病（AD）を含む認知症は大きな社会課題となっている。近年、AD の病態メカニズムの一つとしてミトコンドリア機能異常が着目されている。ホエイ由来ペプチドβラクトリン（Gly–Thr–Trp–Tyr）はミクログリアの機能調節により脳内炎症、認知機能低下などの AD 様病態を改善することが非臨床試験で、神経活動を改善して認知機能を改善することが臨床試験で確認されているが、神経細胞のミトコンドリア機能への作用は不明であった。本研究ではマウス由来およびヒト iPS 細胞由来 AD モデル神経細胞を用いて、β ラクトリンのミトコンドリア機能への影響を検証した。マウス神経細胞株 HT22 にアミロイド β_{42}（Aβ）を処理し、細胞外フラックスアナライザーにより酸素消費量を測定したところ、β ラクトリン（10 nM）は酸素消費量を増加させ、ミトコンドリア呼吸の活性化が示唆された。また、β ラクトリンは Aβ 処理により低下した細胞内 ATP 量を改善した。蛍光イメージング解析により、β ラクトリンは Aβ 処理によって生じるミトコンドリアの断片化、膜電位低下、酸化ストレス増加を抑制し、その結果 Aβ による細胞死を抑制することが確認された。RT-PCR 解析では、ミトコンドリア融合に関わる mitofusin 2 の遺伝子発現が上昇した。最後に、β ラクトリンはヒト iPS 細胞由来 PSEN1 変異 AD モデル神経細胞で生じるミトコンドリア形態や膜電位の異常を改善し、ヒトの AD 病態に対する有効性が示唆された。以上、β ラクトリンは AD 病態進行に伴う神経細胞のミトコンドリア機能異常を改善することが見出され、ニューロン・グリア双方への機能改善により、加齢に伴う認知機能低下や認知症予防に有効であることが期待される。

Mitochondrial dysfunctions are a key hallmark of Alzheimer's disease (AD). β-Lactolin, a whey-derived peptide, has been reported to prevent AD-like pathologies in a preclinical AD model. Here, we investigated the effects of β-lactolin on mitochondrial dysfunctions in AD model neurons. Adding β-lactolin to amyloid β (Aβ)-treated mouse neuronal cells increased oxygen consumption rate and cellular ATP levels. β-Lactolin attenuated Aβ-induced mitochondrial fragmentation, membrane potential decrease, and excess oxidative stress, eventually preventing neuronal cell death. β-Lactolin increased gene expression of mitofusin-2. Finally, we showed that β-lactolin attenuates impairments in both mitochondrial morphologies and membrane potentials in human iPS cell-derived AD model neurons. Together, β-lactolin improved AD-related neuronal mitochondrial dysfunctions and prevented neuronal cell death.

mitochondria, Alzheimer's disease, β-lactolin

発表責任者：綾部達宏（Tatsuhiro_Ayabe@kirin.co.jp）

講演番号：3H09-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

緑豆ペプチドによる骨格筋量の維持効果

Mung bean peptides maintain skeletal muscle mass

○吉岡 泰淳[1]、伊美 友紀子[2]、川畑 球一[2]、柴田 克己[2]、芦田 均[3]、寺尾 純二[2]、三好 規之[1]([1]静岡県大食品栄養、[2]甲南女子大医療栄養、[3]神戸大院農)
○ Yasukiyo YOSHIOKA[1], Yukiko IMI[2], Kyuichi KAWABATA[2], Katsumi SHIBATA[2], Hitoshi ASHIDA[3], Junji TERAO[2], Noriyuki MIYOSHI[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Konan Women's Univ., [3]Kobe Univ,)

近年の超高齢社会を背景に、運動器の障害は社会的な問題となっている。この予防の一つとして筋肉量の維持がある。緑豆は日本においても食経験のある食材であるが、緑豆のペプチドに関する機能性評価は十分ではなく、特に骨格筋量の維持に関する報告はまだない。そこで本研究では、骨格筋量の維持に寄与する緑豆由来ペプチドを探索し、その作用機序を解明した。緑豆のタンパク質粉末を消化し、限外ろ過に供することで低分子画分を得た。得られた画分を各種クロマトグラフィーに供し、ペプチドを精製した。アミノ酸配列の同定には ESI-TOF-MS を用いた。骨格筋量への効果を検討するために、マウス C2C12 筋芽細胞を筋幹細胞に分化させたものを使用した。緑豆ペプチドの処理は、タンパク質の合成に関わる mTOR および p70S6K のリン酸化を介し、タンパク質合成を増加させた。また、緑豆ペプチドは、デキサメタゾン (Dex) 誘導のタンパク質分解に対して抑制効果を示した。その抑制機構は、緑豆ペプチドが Dex の標的であるグルココルチコイドレセプターに競合的に直接結合していることであることが示唆された。緑豆ペプチドは、タンパク質合成の促進とタンパク質分解を抑制することで、骨格筋量の維持に寄与することが明らかとなった。

Musculoskeletal disorders have become a big problem in the super-aging society. The maintenance of muscle mass is one of the preventive measures. The functional evaluation of the peptide of mung bean is not sufficient on the maintenance of skeletal muscle mass. Therefore, in this study, we searched for mung bean peptides that contribute to the maintenance of skeletal muscle mass and elucidated their mechanism. The mung bean peptide was digested from its protein powder and subjected to various analytical instruments to purify and identify the peptide. To examine the effect on skeletal muscle mass, mouse fibroblasts C2C12 differentiated into myotubes were used. Treatment of mung bean peptides increased protein synthesis via phosphorylation of mTOR and p70S6K. In addition, the mung bean peptide showed an inhibitory effect on dexamethasone (Dex)-induced proteolysis. Its mechanism is competitive inhibition against Dex by directly bind to the glucocorticoid receptor. It was revealed that mung bean peptide contributes to the maintenance of skeletal muscle mass by promoting protein synthesis and suppressing proteolysis.

mungbean, muscle, glucocorticoid

発表責任者：吉岡泰淳（yoshiokay@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3H09-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

γ - アミノ酪酸はマウス筋芽細胞 C2C12 細胞の筋形成分化を促進する

γ-aminobutyric acid promotes myogenic differentiation in mouse myoblast C2C12 cells

○草野 由理[1,2]、烏山 将織[3]、宮村 かおり[3]、榊原 悠起[1]、寺島 亜子[2]、松本 裕子[3]、柴田 貴広[4]([1]中部大院・応用生、[2]中部大・応用生、[3]ヤマモリ（株）、[4]名大院・生命農)

○ Yuri KUSANO[1,2], Masaori UYAMA[3], Kaori MIYAMURA[3], Yuki SAKAKIBARA[1], Ako TERASHIMA[2], Yuko MATSUMOTO[3], Takahiro SHIBATA[4] ([1]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [3]Yamamori Incorporated, [4]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

γ-アミノ酪酸（GABA）は、運動時、骨格筋から分泌されることが示され、マイオカイン様低分子としての役割をもつことが示唆されている。本研究では骨格筋に対する GABA の直接作用を明らかにするために、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて GABA 対する細胞応答性を検討した。

骨格筋細胞の細胞増殖への影響を明らかにするために、GABA 存在下で細胞増殖期の C2C12 細胞を 24 時間培養し、その細胞数を比較した。その結果 10mM までの濃度において細胞数に変化は認められず、GABA は筋芽細胞の細胞増殖にほとんど影響しないことが明らかになった。骨格筋細胞は細胞融合した多核細胞であり、筋タンパク質はその細胞内に蓄積する。そこで GABA の細胞融合に対する作用を検討した。GABA 存在下において 24 時間培養した C2C12 細胞の核を Hoechst 33342 を用いて染色し、細胞融合亢進作用を検討したところ、100μM GABA 存在下において多核細胞数が有意に増加していた。さらにミオシン重鎖の発現を細胞染色法を用いて確認したところ、多核細胞においてその発現が確認された。以上の結果から GABA は骨格筋細胞に直接作用し、細胞融合の亢進、筋タンパク質の蓄積を介して筋力向上に寄与するのではないかと考えている。

γ-aminobutyric acid (GABA) is released from skeletal muscle during exercise, suggesting it functions as a myokine-like small molecule. In this study, to clarify the direct effect of GABA on skeletal muscle, we investigated the cellular response to GABA using mouse myoblast-derived C2C12 cells.

To assess the effects of GABA on myoblast growth, proliferating C2C12 cells were cultured for 24 h in the presence of GABA, and the cell numbers were analyzed. At concentrations up to 10 mM, there was no change in cell number, demonstrating that GABA did not affect myoblast proliferation. Next, we examined whether GABA promoted the formation of multinuclear myotubes. The number of multinuclear cells significantly increased in the presence of 100 μM GABA compared to that in the control group when nuclei of C2C12 cells, cultured for 24 h, were stained with Hoechst 33342. Furthermore, it was confirmed via immunocytochemical staining that the expression of a myosin heavy chain occurred in the multinucleated cells exposed to GABA for 48 h. The above results indicate that GABA acts directly on skeletal muscle cells as a myokine and contributes toward the improvement of muscle strength by promoting cell fusion and the accumulation of muscle proteins.

γ-aminobutyric acid (GABA), skeletal muscle cells, myogenic differentiation

発表責任者：草野由理（kusano@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3H09-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

バレレン酸類縁体が脂肪細胞に及ぼす影響

Effect of Valerenic acid and it's analogs on adipocytes

○萩原 真理[1]、神戸 理恵[1]、岡田 茉夕[1]、小西 良子[1]、只石 幹[1]、清水 誠[2]、服部 一夫[1]([1]東農大・応生、[2]東農大)
○ Mari HAGIWARA[1], Rie GOUDO[1], Mayu OKADA[1], Yoshiko SUGITA-KONISHI[1], Miki TADAISHI[1], Makoto SHIMIZU[2], Kazuo KOBAYASHI-HATTORI[1] ([1]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

我々はこれまでに、セイヨウカノコソウに特徴的に含まれる成分であるバレレン酸（VA）が、in vitro において脂肪細胞の分化促進作用やアディポネクチン産生促進作用を有することを報告した(Harada et al., *Plant Food Hum Nutr* 75, 103-9, 2020)。そこで本研究では、VA の類縁体に着目し、それらが脂肪細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。マウス由来 3T3-L1 脂肪細胞を培養し、培養培地中に VA およびその類縁体（アセトキシバレレン酸（AVA)、ヒドロキシバレレン酸(HVA)）を終濃度 1 , 10, 100 μM になるよう添加して 8 日間培養後、実験に用いた。 Oil red O 染色法、2-NBDG 取り込み試験を用いて、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化、成熟脂肪細胞におけるグルコース取り込み能を評価した。その結果、VA および HVA については 100 μM 添加群において脂肪滴の小型化が認められた。それに対し、AVA においては 1 μM 添加でさえ、小型脂肪滴が増加しており、強い分化促進作用を有することがわかった。そこで AVA に着目し、AVA の糖取り込み能をインスリン存在下で調べた結果、1 μM の AVA は コントロール（0.1% DMSO）と比して糖取り込み能が増加する傾向を示した。以上の結果から、バレレン酸およびその類縁体のうち、AVA が最も脂肪細胞の分化促進作用が強く、糖取り込み能も高めることが示唆された。

In our previous study, we have found that valerenic acid (VA), a component characteristically contained in *Valeriana officinalis*, had promoting effects of differentiation and adiponectin production *in vitro* (Harada et al., *Plant Food Hum Nutr* 75, 103-9, 2020). Therefore, in this study, we focused on the analogs of VA and aimed to clarify their effects on adipocytes. VA and its two analogs (hydroxyvalerenic acid (HVA) and acetoxyvalerenic acid (AVA)) were added to 3T3-L1 adipocytes at a final concentration of 1, 10, and 100 μM during 8 days of culture. An Oil red O staining showed that 100 μM of VA and HVA miniaturized lipid droplets. In contrast, AVA increased the number of small lipid droplets even at 1 μM, indicating that AVA had a strong differentiation-promoting effect. A 2-NBDG glucose uptake assay showed that 1 μM of AVA tended to increase the glucose uptake capacity compared to the control (0.1% DMSO) in the presence of insulin. Taken together, these results suggest that AVA had the highest differentiation-promoting effect among VA and its analogs and had the ability to increase glucose uptake.

3T3-L1 adipocyte, Acetoxyvalerenic acid

発表責任者：服部一夫（k2kobaya@nodai.ac.jp）

講演番号：3H09-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

筆柿葉茶ポリフェノール類の定量とそれらに対する消化液の影響（in vitro）

Investigation of polyphenol in leaves of Fudegaki persimmon (a type of PVNA) and effects of digestive fluid on them (in vitro)

○宮川 文[1]、青島 美穂[1]、清水 萌以[1]、菅井 碧乃[1]、中村 俊之[2]、中村 宜督[2]、矢田 友和[3]、保田 倫子[1,4] ([1]椙山大生活、[2]岡山大院環境生命科学、[3]JA あいち三河幸田、[4]椙山大院生活)
○ FUMI MIYAKAWA[1], MIHO AOSHIMA[1], MEI SHIMIZU[1], AONO SUGAI[1], TOSHIYUKI NAKAMURA[2], YOSHIMASA NAKAMURA[2], TOMOKAZU YADA[3], MICHIKO YASUDA[1,4] ([1]Sugiyama Univ., [2]Okayama Univ., [3]JA Aichi-mikawa, [4]Sugiyama Univ)

不完全甘柿の一種である筆柿は、愛知県三河地方に位置する幸田町とその周辺で栽培されている。一般的に柿の葉茶には、ポリフェノールが含まれていることが多数報告されている。そこで本研究では、筆柿葉茶のポリフェノール量と代表的なフラボノイドについて定量した。また、葉茶中のポリフェノールと、その中でもケンフェロール配糖体のアストラガリンの消化液による変化を *in vitro* で検討した。筆柿葉茶はお茶として飲むことを想定し、葉を蒸して乾燥させ、熱水に 10 分浸出後、ろ過したものを使用した。筆柿茶中の総ポリフェノール含量は、Folin-Ciocalteu 法で測定したところ、没食子酸当量で 55.4 μg/ml だった。カテキン、イソクエルシトリン、アストラガリンの含量を LC-MS/MS で測定したところ、それぞれ 3.92 μg/ml、5.12 μg/ml、8.03 μg/ml 含まれていた。筆柿葉茶は DPPH ラジカル消去活性を示すが、これらのフラボノイドについても活性を確認したところ、葉茶中のアスコルビン酸よりもフラボノイドが葉茶のこの活性に寄与していることが示唆された。筆柿葉茶の消化液処理を行ったところ総ポリフェノール量に変化はなかった。また、アストラガリンを筆柿葉茶中の濃度とほぼ同濃度の 20 μM で処理したところ、これについても口腔内消化液による影響はほとんどなかった。胃消化液、腸消化液による影響は現在検討中である。

Fudegaki persimmon is a type of pollination variant and non-astringent (PVNA). It has been less studied compared to other persimmons. In this study, we investigated the polyphenol contents and representative flavonoids of Fudegaki. The effects of digestive fluid simulated by saliva, gut fluid, and intestinal fluid, on the polyphenol content in Fudegaki leaves were investigated *in vitro*. Leaves were harvested, steamed, and dried, and this leaf extract samples were extracted with hot water. The total polyphenol content in the leaf extracts was 55.4 μg/mL, equivalent to that of gallic acid determined by the Folin–Ciocalteu method. Catechin, isoquercitrin, and astragalin were identified by LC-MS/MS, and their contents were 3.92, 5.12, and 8.03 μg/mL, respectively. The activities of these flavonoids were investigated. The leaf extracts exhibited 52.6% α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. The results showed that these flavonoids, rather than the ascorbic acid in the extract of leaves (4.15 μg/mL), might contribute to this activity. The total polyphenol content remained unaffected by any digestive fluid. The saliva-simulated fluid did not affect the astragalin content at the concentration equivalent to that in the leaf extract (20 μM). The investigation of other digestive fluids is in progress.

persimmon, astragalin, polyphenol

発表責任者：保田倫子（yasuda@sugiyama-u.ac.jp）

講演番号：3H09-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に及ぼす影響

Effect of branched-chain amino acids on intestinal epithelial cells

○香西 歩[1]、岩槻 健[1]、清水 誠[2]、小西 良子[1]、只石 幹[1]、服部 一夫[1]([1]東農大・応生、[2]東農大)
○ Ayumi KOZAI[1], Ken IWATSUKI[1], Makoto SHIMIZU[2], Yoshiko SUGITA-KONISHI[1], Miki TADAISHI[1], Kazuo KOBAYASHI-HATTORI[1] ([1]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

我々の先行研究 (Saito et al. *Biochem Biophys Res Commun* 488, 171-6 (2017)) において、バリン(Val)欠乏が、空腸由来マウス小腸オルガノイド(エンテロイド)の細胞増殖を抑制するという結果が得られた。しかし、Val をはじめとするアミノ酸と腸管機能の関係には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、エンテロイドを用いて、分岐鎖アミノ酸(Val、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile):BCAAs)の欠乏が腸管上皮細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、24 時間の Val 欠乏がエンテロイドの細胞増殖を抑制し、Lgr5-EGFP 陽性幹細胞数を有意に減少させることを見出した。また、Val 欠乏条件下では幹細胞においてアポトーシスが惹起されていた。一方で、Leu および Ile 欠乏では細胞増殖抑制、幹細胞数減少、幹細胞中のアポトーシスは認められなかった。次に、BCAAs が幹細胞からの分化に及ぼす影響を調べた。その結果、9 時間の Val 欠乏により MUC2(杯細胞マーカー)の mRNA 量が増加したのに対し、12～24 時間の Leu 欠乏で MUC2、ChgA(内分泌細胞マーカー)、SGLT1(吸収上皮細胞マーカー)が増加し、Ile 欠乏では MUC2、ChgA が増加した。蛍光免疫染色の結果、Ile 欠乏においては、ChgA 陽性細胞数の有意な増加も認められた。これらの結果は、個々の BCAAs が腸管上皮細胞に異なる影響を及ぼしていることを示した。以上より、Val は主に腸管幹細胞の維持に重要であり、Leu および Ile は Val よりも腸管上皮細胞の分化に大きく関与することが示唆された。

In this study, we investigated the effects of branched-chain amino acids (BCAAs: valine (Val), leucine (Leu), and isoleucine (Ile)) on intestinal epithelial cells using enteroids. We have found that 24 h of Val deprivation decreased cell proliferation activity and Lgr5-EGFP positive stem cell number of the enteroids. In addition, the Val deprivation induced apoptosis in the stem cells of enteroids. Next, the effect of BCAAs on differentiation from stem cells was examined. The Val deprivation for 9 h increased MUC2 (a goblet cell marker) mRNA, while 24 h of Leu and Ile deprivations elevated both MUC2 and ChgA (an endocrine cell marker). Leu also upregulated SGLT1 (an absorptive epithelial cell marker) mRNA. Consistent with these results, an immunofluorescence staining showed that the Ile deprivation also increased the number of ChgA-positive cells. Taken together, these results suggest that Val is mainly essential for the maintenance of intestinal stem cells, and Leu and Ile are more involved in intestinal epithelial differentiation than Val.

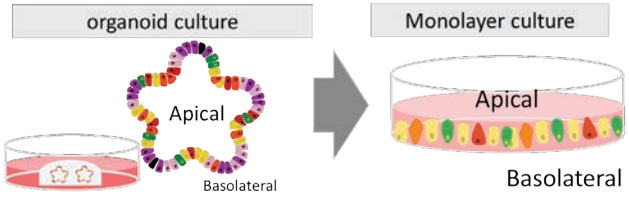
enteroids, branched-chain amino acids, stem cells

発表責任者：服部一夫（k2kobaya@nodai.ac.jp）

講演番号：3H09-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

霊長類消化管オルガノイド単層培養系の構築とヒト菌体成分に対する応答の解析
The establishment of a monolayer culture system and the analysis of the responses to human-derived bacterial components using non-human primate organoids.
○有永 理峰[1]、石原 理沙[1]、岩村 美緒[1]、佐藤 南帆[1]、稲葉 明彦[2]、田中 啓介[3]、今井 啓雄[2]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、岩槻 健[1]([1]農大 応生科、[2]京大 霊長類研、[3]農大 ゲノム解析センター)
○Ayane ARINAGA[1], Risa ISHIHARA[1], Mio IWAMURA[1], Minaho SATO[1], Akihiko INABA[2], Keisuke TANAKA[3], Hiroo IMAI[2], Takumi YAMANE[1], Yuichi OISHI[1], Ken IWATSUKI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Kyoto Univ., [3]NODAI Genome Research Center)

【背景・目的】外界と接する腸管は様々な食品因子や細菌、寄生虫などに晒されているため、腸管上皮細胞（IEC）は異物を認識し生体の恒常性維持する機能が備わっている。我々は最近、非ヒト霊長類腸管オルガノイドを用いて、ホルモンを分泌する内分泌細胞と寄生虫認識に関わる tuft 細胞を選択的に増やすことに成功した。しかしながら、腸管オルガノイドは球体であるため、内腔側からのアプローチに課題が残っていた。今回、腸管オルガノイドの単層化培養系の構築に成功し、ヒト菌体成分添加実験や GLP-1 などのホルモン分泌測定が可能となったので報告する。



【方法】非ヒト霊長類腸管オルガノイドを薄層マトリゲル上に播種することで、単層培養を開始した。単層が形成されたのち、ELISA 法を用いて培養上清中 GLP-1 濃度を測定した。また、17 種類のヒト由来腸内細菌成分を添加し、遺伝子発現量の変化を RNA-Seq、リアルタイム PCR にて確認した。
【結果・考察】タイトジャンクションマーカーの染色像から、単層培養化の内腔 - 基底側の細胞極性を確認した。単層培養の上清には GLP-1 が検出されたため、ホルモン分泌機能を有する内分泌細胞が存在することが示唆された。また、単層培養系にヒト菌体成分を添加した結果、炎症関連遺伝子の発現量がコントロール群に比べ有意に増加した。これらのことから非ヒト霊長類オルガノイドの単層培養系は、腸管内腔に流入した物質に対する腸管上皮細胞の機能解明に貢献すると考える。

Intestinal epithelial cells (IECs) have mechanisms of recognizing foreign substances to maintain homeostasis of the body. Although we have recently succeeded to selectively propagate enteroendocrine cells and tuft cells using non-human primate intestinal organoids, there remain an issue of exposing substances apically to the spherical organoid. In this study, we established a monolayer culture system of organoids in order to mimic the response of IECs to external substances coming into the intestinal lumen. We have measured the concentration of GLP-1 in the culture supernatant by ELISA and found that enteroendocrine cells exist in the monolayer culture system. Furthermore, we analyzed the effect of human-derived bacterial components to the culture system and found that gene expressions of inflammatory cytokines have increased significantly as compared with the control. We believed that our new monolayer system will contribute to analyze intestinal epithelial cells that are exposed to foreign substances.

organoid, microbiota, intestine

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：3H09-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

カシス抽出物が腸内環境に与える影響

The effects of black currant　extract on the intestinal environment.

石黒 七海[1]、林 貴之[1]、山口 大貴[2]、河野 麻実子[2]、川上 宏智[2]、光永 徹[1]、中村 浩平[1]、○稲垣 瑞穂[1] ([1]岐阜大応用生物、[2]森下仁丹株式会社)
Nanami ISHIGURO[1], Takayuki HAYASHI[1], Taiki YAMAGUCHI[2], Mamiko KOHNO[2], Hirosato KAWAKAMI[2], Tohru MITSUNAGA[1], Kohei NAKAMURA[1], ○Mizuho INAGAKI[1] ([1]Gifu Univ., [2]Morishita Jintan Co., Ltd.)

【目的】カシス（black currant）はヨーロッパを中心に親しまれている果実であり、民間薬としても使われてきた。これまでにヒト介入試験や動物食餌試験において、カシス摂取による腸内細菌叢の改善効果がいくつか報告されている。本研究では、ヒト糞便をスターターとする培養モデルを用いて、カシス抽出物が腸内環境に与える影響を評価することを目的とした。
【方法】試験には健常成人 6 名の糞便を用いた。GAM 培地を調製・滅菌後、降温しつつ N_2:CO_2=8:2 のガスに十分に置換した。カシス抽出物（4.76 mg/100 mL：1 日摂取目安量と培養体積をもとに算出）を培養開始直前に添加し、次いで糞便希釈液を播種し、培養を開始した。コントロールは、カシス抽出物を加えずに糞便希釈液を播種、培養した。培養中は培養液 pH の変動を記録し、48 時間後に培養液を回収した。得られた培養液は、短鎖脂肪酸の定量解析（酢酸・プロピオン酸・酪酸）、腐敗産物の定量解析（インドール・アンモニア）、細菌叢解析に供した。
【結果】カシス抽出物の添加により 48 時間後の培養液 pH が有意に低下した。短鎖脂肪酸産生に対する有意な影響は見られなかった。インドール濃度は減少する傾向が見られ、アンモニア濃度は有意に減少した。細菌叢解析では、*Bifidobacterium* 属系統の有意な増加が観察された。
【結論】カシスの摂取により、腸内細菌叢の改善と腸内腐敗産物の産生抑制が期待される。

【Purpose】To investigate the effects of black currant extract on the intestinal environment of six healthy subjects using a human fecal culture model.
【Method】Feces was inoculated into GAM medium with/without black currant extract, then fermented for 48h in anaerobic conditions. The fermented medium samples were analyzed for their microbial composition, production of short-chain fatty acids, and putrefactive products.
【Results】After 48h of fermentation, medium pH significantly decreased with the addition of black currant extract. All subjects exhibited suppressed efficacy of putrefactive ammonia production. In next-generation sequencing analysis, the read count corresponding to the *Bifidobacterium* genus was also increased. Our results suggest that black currant extract might potentially regulate putrefactive production.

black currant, gut microbiota, putrefactive production

発表責任者：稲垣瑞穂（mizuho@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3H09-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

抗生物質の投与が腸内環境に与える影響

The effects of antibiotic administration on the intestinal environment.

○高原 彩嘉、中村 浩平、稲垣 瑞穂 (岐阜大応用生物)
○Ayaka TAKAHARA, Kohei NAKAMURA, Mizuho INAGAKI (Gifu Univ.)

【背景】抗生物質の使用は腸内細菌叢が乱れる要因の一つとして挙げられる。しかしながら、抗生物質が腸内環境に与える影響は不明な点が多い。本研究では、ヒト腸内細菌叢培養モデルを用いて、抗生物質の投与に対する培養液 pH や短鎖脂肪酸産生への影響を調べることを目的とした。
【方法】成人 6 名の糞便を用いて GAM 培地で嫌気培養した。培養開始から 6 時間後に 0.5 mg のマクロライド系抗生物質を添加し、計 48 時間培養した。培養中は培養液の pH を記録し、サンプリングした培養液は短鎖脂肪酸解析および *Bifidobacterium* 属の定量分析を行った。対照では抗生物質を加えずに培養した。
【結果】抗生物質の投与により、全ての被験者において対照と異なる pH の変動が観察された。内 2 名は、対照培養にて pH が低下した時間帯において、抗生物質投与による pH の上昇が見られた。短鎖脂肪酸解析においては、酢酸とプロピオン酸の産生量では有意な差が見られなかった一方で、酪酸産生量では減少が観察された。また 6 名中 5 名の被験者で *Bifidobacterium* 属の減少が観察された。抗生物質の投与による腸内環境への影響には個人差があることが示唆された。

[Background] Antibiotic use is known to be one of the factors that disrupt the gut microflora. However, the direct effects of antibiotics on the intestinal environment are unclear. The purpose of this study was to investigate the effects of antibiotics on culture pH and short-chain fatty acids production using a human gut microbiota culture model.
[Methods] The feces of six adults were cultured using GAM medium. Six hours after the start of incubation, 0.5 mg of macrolide antibiotics was added, and incubation was continued for a total of 48 hours. During incubation, pH fluctuations were recorded, and the sampled culture medium was subjected to short-chain fatty acid analysis and quantitative analysis of *Bifidobacterium*. The culture without antibiotics was used as a control.
[Results] The administration of antibiotics recorded different pH fluctuation from their control in all subjects. In two of them, the antibiotic treatment caused an increase in pH during the time when the pH decreased in each of their control cultures. Short-chain fatty acid analysis showed a decrease in butyric acid production with the addition of antibiotics. In addition, a decrease in *Bifidobacterium* was observed in 5 of the 6 subjects compared to the control. The results suggest that there are individual differences in intestinal microflora response to antibiotic administration.

antibiotic administration, gut microbiota

発表責任者：稲垣瑞穂（mizuho@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3H09-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

コーン油への飽和脂肪酸の添加がフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境におよぼす影響

Effects of dietary addition of saturated fatty acids to corn oil on the colonic ALP activity and the luminal environment in rats fed fructo-oligosaccharides

○岡崎 由佳子、中谷 有希（藤女子大人間生活）
○Yukako OKAZAKI, Yuki NAKAYA (Fuji Women's Univ.)

近年小腸 ALP は抗炎症作用，メタボリックシンドローム予防作用，食品因子による誘導といった観点から研究されている。我々は，水溶性の発酵性難消化性糖質が共通して，高脂肪食摂取ラットの ALP 活性と遺伝子（*IAP-I*）発現を大腸特異的に増加させ，この上昇作用が腸管バリア機能の指標である糞中 Mucin 含量と正の相関関係にあることや，腸内細菌叢の変動と関連性がある可能性を示してきた。また，オリゴ糖による大腸 ALP 誘導作用は，コーン油や大豆油と比較して飽和脂肪酸量の多いラード食の条件で顕著なことを明らかにした。本研究では，コーン油への飽和脂肪酸の添加が，オリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性と他の腸内環境関連因子への影響について検討を加えた。

実験動物として SD 系雄ラットを用いた。実験食として 30%ラード食（HL），30%コーン油食（HC）および 30%ラード食とパルミチン酸とステアリン酸量が等しくなるように，コーン油の一部をトリパルミチン酸とトリステアリンに置き換えた飼料（HC-TPTS）を用い，それぞれの飼料に 4%フルクトオリゴ糖（FOS）を添加し 14 日間飼育した。その結果，大腸 ALP 活性と *IAP-I* 発現は，HL+FOS 群と比較して HC+FOS 群で有意に低かった。HC-TPTS+FOS 群も HL+FOS 群と比較して大腸 ALP 活性と *IAP-I* 発現が低値を示したが，ALP 活性については HC+FOS 群の低下を回復させる傾向を示した。糞中ムチン含量と *Lactobacillus* spp.の割合も HL+FOS 群と比較して HC+FOS 群で有意に減少したが，HC-TPTS+FOS 群はこの減少を有意に回復させた。以上より，FOS による大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境関連因子への影響に飽和脂肪酸量が部分的に関与している可能性が示された。

We recently reported that fermentable non-digestible carbohydrates commonly elevate colonic ALP activity and the *IAP-I* expression in rats and that the effect of oligosaccharides on colonic ALP activity is changed by the quality of dietary fats. This study aims to investigate whether dietary saturated fatty acids levels influence the effect of oligosaccharides on colonic ALP activity and the luminal environment in HF-fed rats. Male SD rats were fed a diet containing 30% lard (HL), corn oil (HC) or corn oil + tripalmitin + tristearin (HC-TPTS) with 4% fructo-oligosaccharides (FOS) for 14 days. Colonic ALP activity and *IAP-I* expression was significantly decreased in HC+FOS and HC-TPTS+FOS groups when compared with HL+FOS group, although HC-TPTS tended to increase the decrease in the ALP activity of HC+FOS group. Fecal mucins and the Lactobacillus spp. ratio were significantly lower in the HC+FOS group than in the HL+FOS group. The HC-TPTS+FOS diet significantly increased the decrease in fecal mucins and the *Lactobacillus* spp. ratio in the HC+FOS diet group.

Colonic ALP, Saturated fatty acids, Fructo-oligosaccharides

発表責任者：岡崎 由佳子（yokazaki@fujijoshi.ac.jp）

講演番号：3H09-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

乳酸菌 YRC3780 株の日常的な摂取が心理的ストレッサーに対する HPA 軸（視床下部-下垂体-副腎皮質系）のストレス反応に与える影響

Effects of Lactococcus lactis subsp. cremoris YRC3780 daily intake on the HPA axis response to acute psychological stress in healthy Japanese men

○内田 健治[1]、元島 英雅[1]、松浦 倫子[2]、山仲 勇二郎[2,3] ([1]よつ葉乳業株式会社　中央研究所、[2]北大院教育学研究院生活健康学研究室、[3]北大脳科学教育研究センター)
○ Kenji UCHIDA[1], Hidemasa MOTOSHIMA[1], Noriko MATSUURA[2], Yujiro YAMANAKA[2,3] ([1]Yotsuba Milk Products Co., Ltd. R&D Center, [2]Laboratory of Life & Health Sciences, Faculty of Education and Graduate School of Education, Hokkaido University, [3]Research and Education Center for Brain Science, Hokkaido University)

【目的】*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 株が体内時計に制御される HPA 軸の日内変動、心理的なストレッサーを与えた際の HPA 軸のストレス応答に与える影響を検証するために、成人男性を対象とした無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間試験を実施した。
【方法】成人男性 27 名を対象に、YRC3780 摂取群（n=14, YRC3780 を 10^{10} 個含むカプセル）とプラセボ摂取群（n=13, プラセボカプセル）の 2 グループに分け、ベースライン期間 2 週間、試験食摂取 8 週間で実施した。摂取終了後にストレス負荷試験（TSST）を実施し、試験前から試験終了 30 分後まで 10 分間隔で唾液を採取し、唾液中コルチゾル濃度を測定した。また、ベースライン最終日、試験食摂取 2, 4, 6, 8 週間後に起床から 2 時間おきに 8 回唾液を採取し、唾液中コルチゾル濃度リズムを測定した。さらに、2 週間おきに質問紙（PSQI, AIS, GHQ28, POMS）を用いて主観的な睡眠の質、気分状態、メンタルヘルスの測定を行った。
【結果】YRC3780 摂取群では，摂取開始から 6 週目および 8 週目に測定した唾液中コルチゾル濃度の日内変動において、午前中のコルチゾル濃度がプラセボ摂取群に対して有意に低値を示し（$p<0.05$）、日内変動が変化することが確認された。TSST 試験では、試験終了 30 分後の唾液中コルチゾル濃度がプラセボ摂取群に対して有意に低い値を示した（$p<0.05$）。また、AIS と GHQ28 の得点がプラセボ摂取群に対して有意に低値であった（$p<0.05$）。

【Background】Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 daily intake on the HPA axis response to acute psychological stress in healthy Japanese men.
【Methods】In this study, participants were divided into 2 groups, a YRC3780 intake group (n=14) and a placebo intake group (n=13). Participant flow throughout the study, which involved a baseline period of 2 weeks and daily ingestion of placebo or YRC3780 capsules for 8 weeks. After 8 weeks ingestion period, the participants completed the Stress Test (TSST). Every 2 weeks saliva samples collected at 2 h intervals throughout the day, starting immediately after waking. Participant conducted the Questionnaire (AIS, PSQI, GHQ-28, and POMS 2 TMD) every 2 weeks throughout the study.
【Results】At week 6, 8 of YRC3780 intake, salivary cortisol levels at the morning were significantly lower than those in the placebo group ($p<0.05$), diurnal rhythum of salivary cortisol were changed. Salivary cortisol concentration at 30 min after the TSST, AIS and GHQ28 scores were significantly lower in the YRC3780 group than in the placebo group ($p<0.05$).

lactococcus, stress, HPA

講演番号：3H09-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

in vitro 実験系を用いたフコイダンのヒト腸内細菌叢に対する効果の解析

Analysis of the effect of fucoidan on human intestinal microflora using an in vitro experimental system

○大野 波月[1]、中野 勇人[3]、柴崎 哲哉[3]、里山 俊哉[1]、宮﨑 義之[1,2]、中山 二郎[1]([1]九大院農、[2]NPO フコイダン研究所、[3](株)ヴェントゥーノ)
○Hazuki ONO[1], Hayato NAKANO[3], Tetsuya SHIBASAKI[3], Toshiya SATOYAMA[1], Yoshiyuki MIYAZAKI[1,2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ, [2]NPO Research Institute of Fucoidan, [3]Ventuno Co., LTD.)

【背景】フコイダンには、免疫賦活作用や抗腫瘍作用などの効果がある。先行研究では、マウスでの摂食試験において、ムチン産生量の増加や、*Akkermansia* 属の増加が確認され、本成分の腸内環境改善効果が示唆されたが、そのメカニズムは不明である。そこで本研究では、フコイダンがヒト腸内細菌に及ぼす影響の解明を目的とした。
【方法】糞便を pH 制御下で培養する「*In vitro* 腸管モデル」にて 48 時間培養した。培地には、Basal Component Medium(BCM 培地)(C 群)、ムチン添加培地(M 群)、ムチン・フコイダン添加培地(MF 群)を用い、細菌叢解析および短鎖脂肪酸の定量を行った。また、*Akkermansia* 属の生育に対するフコイダンの効果解明のため、モノカルチャー実験を行った。BCM 培地(C 群)、ムチン添加群(M 群)、フコイダン添加群 (F 群)、ムチン・フコイダン添加群(MF 群)で培養し、Lumitester C-110 にて ATP 量を測定した。
【結果】細菌叢解析の結果、C 群と比較して MF 添加群では短鎖脂肪酸生産菌が増加し、腸管感染症の原因菌の増殖が抑制された。短鎖脂肪酸の定量では、MF 群において酢酸や酪酸、プロピオン酸の増加が確認された。他方、フコイダン添加による *Akkermansia* 属の増殖の効果については、M 群、MF 群、C 群、F 群の順に ATP 量が多かった。以上の結果から、本成分による腸内細菌叢の改善効果が示唆されたが、先行研究での *Akkermansia* 属の増殖促進はフコイダンの直接的な効果ではなく、腸管内でのムチンの増加によるものであると考えられる。
【Background】Fucoidan has health benefits. In a previous study, the addition of fucoidan in a feeding test resulted in an increase in the production of mucin and the relative abundance of *Akkermansia*. These results suggest that fucoidan may improve the intestinal environment. However, the detailed mechanism is still veiled. In this study, we aimed to elucidate the effects and its mechanism of fucoidan on human intestinal bacteria.
【Method】Fucoidan was added to the "In vitro gut model" and incubated for 48 hours. The collected culture medium was used to analyze the intestinal flora and to quantify the amount of short-chain fatty acids. In order to clarify the effect of fucoidan on the growth of *Akkermansia* a monoculture experiment was conducted. To the amount of ATP was measured using Lumitester C-110.
【Result and Discussion】The results of bacterial composition showed that the abundance of SCFA-producing bacteria increased in the MF group. In the quantification of SCFA, acetate, butyrate, and propionate increased. On the other hand, for the effect of fucoidan addition on the growth of *Akkermansia*, the amount of ATP was higher in the order of M, MF, C, and F groups. These results suggest that fucoidan has an effect on the improvement of intestinal microbiota. However, fucoidan had no growth-promoting effect on *Akkermansia*.

Gut microbiota, in vitro gut model, Fucoidan

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3H09-12
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム H

脂肪酸組成の異なる高脂肪食の摂取が糞便中フェノール量に及ぼす影響

Effect of intake of high-fat diet with different fatty acid composition on the amount of phenol in feces

○小林 琢磨[1]、大石 水無瀬[2]、吉川 悠子[1,3]、吉岡 泰淳[1,2]、三好 規之[1,2]（[1]静県大院薬食、[2]静県大食品栄養、[3]日獣大獣）
○Takuma KOBAYASHI[1], Minase Oishi[2], Yuko Yoshikawa[1,3], Yasukiyo Yoshioka[1,2], Noriyuki Miyoshi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Integ. Pharm. Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka, [2]Sch. of Food Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka, [3]Sch. of Vet. Med., Nippon Vet. and Life Sci. Univ.)

生活習慣病は、日本人の三大死因であるがん・脳血管疾患・心疾患を含んでおり、これらは慢性的な炎症により生体機能に異常をきたすことで発症する。我々は、5 週齢の雄性 KK-*A*^{y} マウスに高脂肪食を摂取させることで、糞便中フェノール量が増加すること、および低濃度のフェノールは炎症性サイトカインの発現を誘導することを報告した。また近年、摂取する油脂を構成する脂肪酸組成と疾患の関係が注目されており、特に多価不飽和脂肪酸は心疾患発症リスク低減に関わることが報告されている。そこで本研究では、脂肪酸組成の異なる高脂肪食がフェノール産生に及ぼす影響を検討した。生後 2 日でストレプトゾトシンを投与した C57BL/6J マウスに、ラード、大豆油、ならびに魚油をそれぞれ脂肪エネルギー比 60%になるように調整した高脂肪食を 7 日間自由摂食させ、その後、普通食 AIN93M を 7 日間与えた。高脂肪食 7 日目と普通食 7 日目に代謝ケージを用いて、糞便を採取し、糞便中フェノール量を GC-MS を用いて測定した。その結果、高脂肪食摂取 7 日目のラード摂取群の糞便中フェノール量は、大豆油摂取群に比して 18.1 倍、魚油摂取群に比して 58.9 倍 に増加した。また、高脂肪食摂取 7 日目の糞便中フェノール量は、普通食7日目と比較して、ラード摂取群で 14.8 倍の高値を示し、大豆油摂取群で 0.7 倍、魚油摂取群で 0.1 倍の低値を示した。これらの結果より、高脂肪食摂取が誘導するフェノール産生において、飽和脂肪酸が産生促進に、多価不飽和脂肪酸が産生抑制に関わる可能性が示唆された。

Lifestyle-related diseases are caused by abnormalities in biological functions due to chronic inflammation. We have reported that the amount of phenol in the feces increased in 5-week-old male KK-*A*^{y} mice fed a high-fat diet, and phenol induced the expression of inflammatory cytokines. In recent years, polyunsaturated fatty acids particularly have been reported to be involved in reducing the risk of developing heart disease. In the present study, we investigated the effects of high-fat diets with different fatty acid compositions on phenol production. C57BL/6J mice were treated with streptozotocin at 2-day-old. The mice were fed a high-fat diet with three types of fatty acid composition (lard group, soybean oil group, fish oil group), that adjusted to a fat energy ratio of 60%, for 7 days and then fed a normal diet AIN93M for another 7 days. The feces were collected in metabolic cages on days 7 and 14 and measured the amount of phenol using GC-MS. As the results, the amount of phenol in the feces of the lard group on day 7 increased 18.1-fold (compared to the soybean group) and 58.9-fold (compared to the fish oil group). The amount of phenol in the feces on day 7 was 14.8-fold higher in the lard group, 0.7-fold lower in the soybean oil group, and 0.1-fold lower in the fish oil group than that on day 14. These results suggest that administration of saturated fatty acids might be involved to enhance phenol production, while poly unsaturated fatty acid suppresses phenol production.

Biomarker, High-fat diet, fatty acid composition

講演番号：3I01-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム I

フロクマリン低減イチジク茶が薬物代謝酵素に与える影響

Effect of furocoumarin-reduced fig tea on drug-metabolizing enzymes

○小山 ゆかり、阿部 竜也、西村 耕作（東洋食品研究所）
○ YUKARI KOYAMA, TATSUYA ABE, KOSAKU NISHIMURA (Toyo Institute of Food Technology)

【目的】イチジク（*Ficus carica* L.）の葉を原料とした茶にアトピー性皮膚炎緩和作用を見出しており、機能性表示食品としての開発を目指している。しかし、多くのイチジク品種にはフロクマリンが含まれており、高用量摂取時は光毒性作用や薬物代謝酵素阻害等の健康被害が懸念される。本研究では、イチジク茶の安全性向上のため、フロクマリンの除去方法を検討し、薬物代謝酵素 CYP3A4 への影響を評価した。
【方法】物性の異なる 13 種類の食品添加物グレードシリカを用いて、フロクマリンの吸着性を評価した。茶液に対して 2.0%のシリカを添加しフロクマリンを除去後、残存フロクマリン量を LC /MS で測定した。CYP3A4 活性は、CYP450 測定キットを用いて評価した。
【結果および考察】化学的吸着性に関与する表面シラノール基密度が小さいシリカほどフロクマリン除去率が高く、最大 97%除去された。フロクマリン除去前の茶液では CYP3A4 阻害作用が認められたが、シリカ処理茶液では阻害率が約 1/10 に低下した。この結果は、阻害作用がないと報告されているオレンジジュースより低い阻害率であった。以上の結果から、シリカを用いてフロクマリン除去することで CYP3A4 阻害作用を減弱でき、安全性の向上が期待される。
[Objective] We have previously discovered that tea infusion made from fig (*Ficus carica* L.) leaves has an allergy-relieving effect. However, many fig cultivars contain furocoumarins, such as psoralen and bergapten, which when ingested at high doses can cause phototoxicity and inhibit Cytochrome P450. In this study, we examined the removal method of furocoumarin and evaluated its effects on CYP3A4 activity.
[Method] To evaluate the adsorption of furocoumarin, we used 13 different types of silica with varying physical properties. Silica (2.0%) was added to the tea infusion to remove furocoumarin, and residual amount of furocoumarin was quantified by LC-MS. CYP3A4 activity was evaluated *in vitro* using an assay kit.
[Results and Discussion] The smaller the silica surface silanol group density, the higher the furocoumarin removal rate, with up to 97% eliminated. Inhibition of CYP3A4 was observed in the tea infusion before furocoumarin removal, however the inhibition rate was reduced to approximately 1/10 in the silica-treated tea infusion. This rate was lower than that of orange juice, which has been reported to have no inhibitory effect. We suggest that furocoumarin removal using silica can reduce CYP3A4 inhibition and improve safety when ingesting this tea infusion.

furocoumarin, fig tea, CYP3A4

講演番号：3I01-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム I

アミン酸化酵素とアルデヒド酸化酵素の共役反応による出汁中ヒスタミンの消去

Elimination of histamine in seafood soup stock by coupling reaction of fungal amine oxidase and bacterial aldehyde oxidase

○石原 瑞希[1]、河邉 真也[1]、足立 収生[2]、臼井 将勝[1]([1]水大校・食品科学、[2]山口大・生物機能)
○Mizuki ISHIHARA[1], Shinya KAWABE[1], Osao ADACHI[2], Masakatsu USUI[1] ([1]Fisheries Univ. Food science, [2]Yamaguchi Univ. Agriculture, biological chemistry)

【目的】我々は食品に発生する有害アミン類を安全・安価に消去できる方法として，麹カビのアミン酸化酵素（FAO）と酢酸菌のアルデヒド酸化酵素複合体（ALOX）との共役反応系（FAO/ALOX）を提案している。例えば，FAO/ALOX はヒスタミンをイミダゾール-4-酢酸（I4AA）へと酸化できる。他方，国内ではヒスタミン食中毒が散見され，2020 年 11 月には鰹節を原料とする出汁パックによる食中毒事例が発生している。そこで本研究では，市販の出汁を対象に FAO/ALOX によるヒスタミン消去効果について検討した。【方法】こんぶ，いりこ，あご，かつお出汁として市販されている風味調味料各 1 種を用いて，各商品記載の方法で出汁溶液を調製した。各出汁溶液に 250 nmol/mL となる様にヒスタミンを添加してヒスタミンが高濃度に発生した出汁溶液を模した。同溶液に FAO および ALOX をそれぞれ 0.025 unit/mL となる様に加え，20° C にて酵素処理した。【結果】FAO/ALOX 処理により，全てのヒスタミンを添加した出汁溶液でヒスタミンの消去と I4AA の生成が確認された。各出汁中のヒスタミン濃度は，酵素処理 10 分後に 1/3～1/2 まで減少し，24 時間後までに大半が消失した。しかし，FAO 活性は想定の約 1/2 に留まっていた。ヒスタミンの FAO/ALOX 処理の最終生成物の I4AA を分析した結果では，こんぶ出汁といりこ出汁で 24 時間後までに添加したヒスタミンのほぼ同モル濃度の I4AA が生成された。他方，あご出汁とかつお出汁ではそれぞれ 4/5，3/4 に留まった。以上の結果より，適切な FAO および ALOX の添加によって出汁中のヒスタミンを消去できることが示唆された。

A coupling reaction of fungal amine oxidase (FAO) and bacterial aldehyde oxidase (ALOX) can oxidize histamine to imidazole-4-acetic acid (I4AA). In this study, we investigated the histamine elimination effect of FAO/ALOX in seafood soup stocks. A soup stock solution was prepared by the method described for each product using commercially available soup stock. Histamine was added to each soup stock so that the final concentration was 250 nmol/mL to imitate the soup stock solution. FAO and ALOX were added to the same solution at 0.025 unit/mL, respectively, and the mixture was enzymatically treated at 20°C for 0, 10, 20, 30 minutes and 24 hours. In all histamine-added soup stock solutions, FAO/ALOX treatment eliminated histamine and produced I4AA. The histamine concentration in each soup stock was halved 10 minutes after the enzyme treatment and almost disappeared by 24 hours. About the same molar concentration of I4AA of added histamine was produced by 24 hours. These results suggested that the histamine produced in the soup stock could be eliminated by the appropriate addition of FAO and ALOX.

histamine elimination, seafood soup stock, fungal amine oxidase and bacterial aldehyde oxidase

発表責任者：臼井将勝（usuim@fish-u.ac.jp）

講演番号：3I01-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

肉腐敗菌の分離と生成される腐敗臭の分析

Isolation of meat spoilage microorganisms and analysis of volatile compounds associated with meat spoilage

○高島 健斗、村上 周一郎（明大農）
○kento Takashima, Shuichiro Murakami (Meiji Univ.)

輸入食肉で発生する腐敗臭は、微生物汚染による肉からの望ましくない揮発性有機化合物の生成が、原因の一つとして知られている。

腐敗臭の生成に関連する微生物を明らかにするために、腐敗した豚肉から分離した菌株を新鮮な豚肉に接種し、4℃で 20 日間培養して生成した香気を官能試験で評価することで、腐敗香気生成菌 28-1 株、28-3 株、28-4 株を得た。これらの腐敗香気生成菌について、16S rDNA の塩基配列に基づく同定試験に供した結果、3 株はいずれも腸内細菌科に属する菌株であり、そのうち 28-3 株と 28-4 株は *Rahenella inusitata* と同定した。一方 28-1 株は *Serraria* 属の複数種と 98.1%の同一性が見られたことから、*Serratia* sp.と同定した。

次に、これらの菌株を接種した豚肉から生成する香気成分を HS-SPME/GC-MS で分析したところ、dimethyl trisulfide、disulfide, bis（1,1,3,3-tetramethylbutyl）、phenylethyl alcohol、および低分子フェノール等が、これらの菌株を豚肉に接種することで増加することが明らかとなった。

The spoilage odor of imported meat is known to be caused in part by the production of undesirable volatile organic compounds from the meat due to microbial contamination.

In order to identify microorganisms associated with the production of spoilage odor, we isolated bacterial strains from spoiled pork and inoculated them onto fresh pork. After incubation at 4℃ for 20 days, microbial strains 28-1, 28-3, and 28-4 were selected as spoilage odor-producing bacteria by sensory tests. As a result of identification tests based on 16S rDNA sequences, all three strains belonged to the family Enterobacteriaceae, and strains 28-3 and 28-4 were identified as *Rahenella inusitata*. On the other hand, strain 28-1 was identified as *Serratia* sp. because that it showed 98.1% identities with those of several species of the genus *Serraria*.

HS-SPME/GC-MS analysis revealed that compounds such as disulfide, dimethyl trisulfide, bis(1,1,3,3-tetramethylbutyl), phenylethyl alcohol, and low molecular weight phenols were increased by the inoculation of the bacteria onto pork.

meat spoilage, *Serratia*, SPME

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：3I01-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム I

食品中の *Listeria monocytogenes* の分離と汚染調査

Distribution survey of *Listeria monocytogenes* in raw foods and food products

○安藤 恵[1,2]、栗木 花苗[3]、岸本 満[2]、中村 浩平[3] ([1]岐大連農、[2]名学芸大管栄、[3]岐大応生)
○Megumi ANDO[1,2], Kanae KURIKI[3], Michiru KISHIMOTO[2], Kohei NAKAMURA[3] ([1]Gifu Univ. United Grad. Sch. AS, [2]Nagoya Univ. of Arts and Sci. Fac. NS, [3]Gifu Univ. Fac. ABS)

Listeria monocytogenes（以下 LM）は食品と環境中に存在する食中毒菌である。欧米では LM による多数の食中毒事例が報告されており，患者の重症化率が大きいため問題視されている。日本では認知度が低いが，食品の汚染率は欧米と同程度であると考えられている。LM は食品の冷蔵保存中に緩やかに増殖し，食中毒の発症菌数に達する危険性がある。また，LM は高塩濃度環境下でも生存できる。そのため，乳製品と Ready-to-eat 食品（すぐに食べることができる非加熱の調理食品）が原因の LM による食中毒が懸念されている。さらに LM は食肉と果物等の生鮮食品からも検出される。しかし、現在国内における LM の生態と流通している食品の汚染状況には不明な点がある。

本研究では食品の LM 汚染のリスクを軽減するために LM の汚染実態と生態を明らかにすることを目的とし，培養法により食品から LM の野生株を分離・同定した。

市販の食品（鶏挽肉と豚挽肉，辛子明太子，マスカルポーネチーズ）から LM 様の野生株が検出された。分離された野生株について 16S rDNA と全ゲノム配列を調べ LM に特徴的な毒性遺伝子の存在等を調査し，野生株の遺伝子配列と生化学的性質をもとに基準株と比較した結果について報告する。

Listeria monocytogenes (LM) is a food poisoning bacterium that is found in various foods and environments. Many cases of food poisoning caused by LM were reported in Europe and the United States of America and is recognized as serious problems since LM food poisonings lead to severe illness. We do not pay attention to LM food poisoning in Japan as much as in Europe and USA, however, contamination rate of foods by LM is thought to be equal to those in Europe and the USA. A small number of cells of LM occurring in foods during refrigerated storages may reach at the level cause food poisoning because LM can grow slowly even in low temperature. Therefore, there is concern about food poisoning caused by LM from dairy products and ready-to-eat foods. However, the ecology of LM and its contamination of food distributed in Japan are still unclear.

In this study, we isolated and identified wild strains of LM from foods (chicken and pork meat, fresh cheese and Mentaiko). The 16S rDNA sequences and/or draft genome sequences of the isolated strains were determined. We report here genomic and biochemical characteristics of LM isolates and comparisons with reference strain of LM.

Listeria monocytogenes, food poisoning, virulence genes

発表責任者：安藤　恵（z6103001@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3I01-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム I

微生物熱測定によるフロロタンニン類の微生物増殖抑制効果の評価

Evaluation of microbial growth inhibitory effect of phlorotannins by microbial calorimetry

○千原 菜緒[1]、柴田 敏行[2,3]、田中 礼士[2,3]、三宅 英雄[2,3]（[1]三重大生資、[2]三重大院生資、[3]三重大海藻バイオリファイナリー）
○Nao Chihara[1], Toshiyuki Shibata[2,3], Reiji Tanaka[2,3], Hideo Miyake[2,3] ([1]Fac. Bioresour. Mie Univ., [2]Grad. Sch. Bioresour. Mie Univ., [3]Seaweed Biorefin. Res. Ctr, Mie Univ.)

【目的】フロロタンニン類は褐藻類に含まれる海洋植物由来のポリフェノールである。陸上植物由来のポリフェノールとして茶に含まれる茶カテキンがあり、微生物増殖抑制効果があることは知られているがフロロタンニン類では知られていない。そこで本研究では、微生物熱測定を用いて褐藻類であるクロメから抽出したフロロタンニン類とその基本骨格であるフロログルシノール、茶カテキンとその基本骨格である没食子酸の微生物増殖抑制効果を定量的に調べた。
【結果】微生物として大腸菌 JM109 を用いた。0.176~4.78×10^{-6} mol/L のフロロタンニン類、フロログリシノール、茶カテキン、没食子酸を含む培地を調製し、植菌後、微生物熱測定装置で増殖の際に生じる熱を経時的に測定した。得られたサーモグラムから最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。その結果、基本骨格であるフロログルシノールや没食子酸より、それらが重合したフロロタンニン類や茶カテキンのほうがより強い微生物増殖抑制効果を示した。フロロタンニン類の MIC は 1.04×10^{-3} mol/L であり、茶カテキンの 0.475 倍の微生物増殖抑制効果ではあるが、十分な微生物増殖抑制効果を持つことが分かった。

Phlorotannins are polyphenols from marine plants contained in brown algae. There are tea catechins contained in tea as a polyphenol from land plants, and it is known that it has the microbial growth inhibitory effects, but that of phlorotannins are not known. Therefore, in this study, we quantitatively investigated the microbial growth inhibitory effects of phlorotannins extracted from *Ecklonia kurome*, its basic structure, phloroglucinol, and tea catechins and its basic structure, gallic acid using microbial calorimetry.

Escherichia coli JM109 was used as a microorganism. Several media containing 0.176-4.78×10^{-6} mol/L phlorotannins, phloroglucinol, tea catechins, or gallic acid were prepared. After inoculation, each heat generated during growth was continuously measured by microbial calorimetry. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined from each thermogram. As a result, phlorotannins and tea catechins showed a stronger microbial growth inhibitory effect than phloroglucinol and gallic acid. The MIC of phlorotannins was 1.04 × 10^{-3} mol/L, which was 0.475 times the microbial growth inhibitory effect of tea catechins. Phlorotannins were found to have a sufficient microbial growth inhibitory effect.

phlorotannin, calorimetry, minimum inhibitory concentration

発表責任者：三宅 英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3I01-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム I

大気圧低温プラズマ照射による果物表皮のポストハーベスト農薬の分解

Degradation of postharvest pesticides by cold atmospheric pressure plasma on the surface of fruits

○福田 志津[1]、櫻井 康博[1,2]、井澤 真吾[1] ([1]京都工繊大・工芸科学、[2]誠南工業)
○ Shizu FUKUDA[1], Yasuhiro SAKURAI[1,2], Shingo IZAWA[1] ([1]Kyoto Inst. Technol., [2]Seinan Indusutries Co., Ltd.)

ポストハーベスト農薬の 1 つである thiabendazole (TBZ) は、真菌の β-チューブリンに結合し有糸分裂を阻害することで抗真菌効果を発揮する防カビ剤であり、主に輸入バナナや柑橘類に使用されている。大気圧低温プラズマ (cold atmospheric pressure plasma, CAP) は常温常圧下で電離したガスで、反応性が高く殺菌・抗真菌効果およびウィルスの不活化効果を持つ。CAP は熱変性を引き起こさず残留物質の問題もないため、生鮮食品に対する殺菌技術として注目されている。本研究では実用性を考慮し、空気を供給ガスに用いた CAP による TBZ の無毒化・分解効果と青果に及ぼす影響について検討した。TBZ の抗真菌効果は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育を指標に評価した。また、無毒化する CAP 照射条件 (印加電圧 6 kV、空気流量 0.5 slm、照射距離 1 cm、時間 20 分) で処理した TBZ の構造変化を核磁気共鳴法 (NMR) で確認した。さらに、青果表面への CAP 照射による外観および可食部への影響を検討した。その結果、TBZ を含む寒天培地は酵母の生育を強く阻害したが、CAP 照射後の培地では酵母の生育が認められ、CAP による TBZ の無毒化・分解が示唆された。次に、TBZ を methanol (プロトン性溶媒) 及び *N,N*-dimethylformamide (非プロトン性溶媒) に溶解し CAP 照射前後の NMR 測定を行なったところ、CAP 照射後は、いずれの NMR 信号からも窒素核のプロトン化が観測された。溶媒中の移動性プロトンの有無に関わらず CAP が TBZ のプロトン化を進行したことから、CAP 照射は水、アルコールなどを介さずに TBZ を分解することが示唆された。また、青果への CAP 照射後も表面および可食部に目立った外観上の変化は認められなかったことから、青果表面のポストハーベスト農薬の分解・無毒化を図る上での CAP の有用性が確認された。

CAP is an ionized gas that has high reactivity and fungicidal effects without heat denaturation. TBZ is one of the major postharvest pesticides. We herein examined the effects of CAP on the detoxification/decomposition of TBZ on the surface of fruits. The antifungal effects of TBZ were evaluated using the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an index. The structural changes of TBZ treated with CAP were analyzed by NMR. We also examined whether the CAP irradiation causes the adverse effects on the quality of fruits. Yeast cells proliferated on the TBZ-containing agar medium after CAP irradiation, suggesting that TBZ was detoxified by CAP. NMR analysis demonstrated that CAP caused significant changes in the structure of TBZ. CAP irradiation did not cause any significant changes in the appearance of the fruit surface and edible parts. These results showed the usefulness of CAP in degrading/detoxifying postharvest pesticides on the surface of fruits.

cold atmospheric pressure plasma, postharvest pesticides, thiabendazole

講演番号：3I01-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

市販長期熟成酒のカルバミン酸エチルおよび香気成分の分析

Quantitative analysis of ethyl carbamate and volatile compounds in commercial aged sake

○孛儿只斤 蘇日娜、磯谷 敦子、向井 伸彦（酒類研）
○SURINA BOERZHIJIN, ATSUKO ISOGAI, NOBUHIKO MUKAI (NRIB)

酒蔵内で数年から数十年間貯蔵した清酒を長期熟成酒という。長期熟成酒は色や味、香りが通常の清酒とは大きく異なる。近年、長期熟成酒を製造するメーカーが増えているが、長期熟成酒の品質と製造・貯蔵条件との関係については不明な部分があり、データの蓄積が必要と考えられる。本発表では、熟成期間が３～５３年間の常温熟成（自然熟成）酒２１点と低温熟成（１５度以下）酒２０点の市販長期熟成酒のカルバミン酸エチル（EC）及び熟成香に寄与する香気成分等の濃度と貯蔵条件との関係について報告する。【結果】EC 含量は低温熟成と常温熟成とも熟成期間に伴い増加傾向を示した。常温熟成酒の熟成期間１０年以下のカルバミン酸エチルの平均値は 200 ug/L（カナダの規制値）を示した。低温熟成酒は緩やかに増加し、熟成期間３１年以上で平均値は 200 ug/L を超えた。主要香気成分の酢酸イソアミルは経年減少する傾向を示したが、低温熟成酒は３～３０年間で閾値以上の値を保ち、常温熟成酒では１１年間以降は閾値以下の値を示した。熟成香に寄与が大きいとされているソトロン、DMTS、イソバレルアルデヒドは経年増加傾向を示した。常温熟成酒ではソトロン等の成分含量の立ち上がりが早く、１１～２０年の熟成期間でピークを迎える傾向がみられた。

Sake that has been aged for several years or decades at brewery before shipping is called aged sake. Recent years, the number of breweries that making aged sake is increasing. However, scientific insights of aged sake still have a huge space to fill out. This study examined the quantitative analysis of ethyl carbamate (EC) and the key volatile compounds in 41 bottles of commercial aged sake across a range of 3-53 vintage years, which includes 21 bottles of low-temperature aged sake (≤ 15°C) and 20 bottles of ambient-temperature aged sake. [Result] EC concentration increased along with the storage length of aged sake. The ambient-temperature aged sake showed an average concentration of 200 ug/L (Canadian regulation for sake) in less than 10 years' storage, while the same concentration of EC was detected in low-temperature aged sake after 31 years' storage. The volatile compounds of isoamyl acetate maintained a value above the threshold value in 3~30 years low-temperature aged sake, while it decreased below the threshold value in ambient-temperature aged sake after 10 years storage. The concentration of sotolon, DMTS, and isovaleraldehyde in ambient-temperature aged sake increased significantly faster, compared with that in low temperature aged sake, and showed the tendency to reach the maximum concentration level within 11~20 years' storage.

Aged sake, Ethyl carbamate, Volatile compounds

発表責任者：ボルジギン　ソリナ（surina@nrib.go.jp）

講演番号：3I01-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

MALDI-TOF MS を用いた食品希釈液からの直接同定方法の開発

Development of direct bacterial species identification from a food diluent using MALDI-TOF MS

○福本 沙弥、下平 潤、庵原 啓司（マルハニチロ株式会社）
○Saya FUKUMOTO, Jun SHIMODAIRA, Keishi IOHARA (Maruha Nichiro Corp.)

食品分野において、食品の品質や日持ち向上のために腐敗原因菌の特定は重要である。食品中で増殖している優占菌種を特定するには、対象食品の菌数を測定し、そこで用いた寒天プレートから複数のコロニーを釣菌し、純化したのちに菌種同定を行うのが一般的である。食品衛生検査指針では一般生菌数の検査温度を 35℃と定めているが、食品の流通温度帯によってはその温度帯で増殖に適さない菌が存在する。このような検体では、優占ではない菌を腐敗原因菌として特定してしまう可能性がある。

そこで我々は食品の一般生菌数試験で使用した食品希釈液やネトの懸濁液から優占菌種を MALDI-TOF MS で直接菌種同定を行う DSIM（Direct Species Identification using MALDI-TOF MS）法を開発した。本方法は食品から菌を単離する必要がないため、培養温度や培地の種類に左右されずに迅速かつ正確に優占菌種を同定することができる。

本講演では、モデル食品希釈液を用いた DSIM 法の精度検証と DSIM 法による各種食品検体からの直接菌種同定結果について報告する。

Identification of food spoilage microorganisms is important to improve food quality and shelf-life. To investigate the dominant spoilage bacteria, bacterial species of multiple isolates from an agar plate used in microbial enumeration test have to be identified. However, depending on food storage temperature (e.g. chilled food), it is possible that incubation temperature (35℃) employed in the enumeration test based on Standard methods of analysis in food safety regulation of Japan is not suitable for the growth of spoilage bacteria. In such cases, there is a risk of misidentification of spoilage bacteria.

We have developed DSIM (Direct Species Identification using MALDI-TOF MS) method which can directly identify spoilage bacteria from a food dilution solution and ropy slime suspension. This method can rapidly and accurately identify dominant bacteria regardless of culture conditions (temperature, media, etc.) because it is not necessary to isolate bacteria from foods.

In this symposium, the examination of accuracy and sensitivity of DSIM method using a model food diluent and the results of the direct identification from various food samples will be presented.

MALDI-TOF MS, food diluent, direct bacterial species identification

発表責任者：福本沙弥（s-fukumoto@maruha-nichiro.co.jp）

講演番号：3I01-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルーム I

渋柿の脱渋処理における可溶性成分の網羅的解析

Metabolome analysis of astringent persimmon during removal of astringency

○竹田 里咲子[1]、解良 康太[2]、牧野 照平[2]、増田 潤[2]、山口 和朗[2]、北條 雅也[3]、濵崎 貞弘[3]、飯嶋 益巳[1,2]、中山 勉[1,2]（[1]東農大院応、[2]東農大応、[3]奈良農研セ）
○Risako TAKEDA[1], Kota KERA[2], Syouhei MAKINO[2], Jun MASUDA[2], Kazuaki YAMAGUCHI[2], Masaya HOJO[3], Sadahiro Hamasaki[3], Masumi IIJIMA[1,2], Tsutomu NAKAYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch., Tokyo Univ of Agriculture, [2]Tokyo Univ of Agriculture, [3]Nara Agr.Res.Dev.Cen.)

柿の品質において、渋味は重要な管理項目である。特に、渋柿は収穫した成熟果であっても強い渋味を有するため、出荷前に二酸化炭素などを用いた脱渋処理が必要である。柿の渋味は、タンニン細胞に集積された渋味成分（プロアントシアニジンなどの可溶性ポリフェノール）が、口腔粘膜などと結合することに起因すると考えられている。また、脱渋の過程で、これら可溶性渋味成分が不溶化することで渋味を感じなくなると言われている。しかしながら、脱渋過程における成分変化については未解明な点が多く残されている。本発表では、国内の代表的な渋柿である刀根早生について、脱渋処理前後の成分を多変量解析により比較した結果について報告する。脱渋前後の果実から80%メタノールを用いて成分抽出し、固相カラム（C18）によって前処理したものを分析試料とした。分析試料の渋味について、リポソームを用いた渋味定量方法を用いた。成分分析には、液体クロマトグラフィー連結質量分析器を使用し、エレクトロスプレーイオン化法（陽イオンモード）で分析した。なお、データ解析には、PowerGet 及び MetaboAnalyst を使用した。

Astringency is an important factor to evaluate quality of persimmon fruits because of negative taste, particularly in astringent-type fruits. Astringent persimmons are generally treated with carbon dioxide gas or ethanol vapor to remove astringency before shipping. The astringent taste arises from interaction between oral mucosa and soluble tannins such as proanthocyanidins that accumulate in tannin cells. The soluble tannins are gradually transformed into insoluble, less astringent forms during removal of astringency. Nonetheless, the mechanisms and changes in the metabolite profile have not been investigated in detail. Here, we performed metabolite profiling of the major astringent persimmon “Tonewase” with or without carbon dioxide gas treatment. Extracts with 80% methanol were filtered using C18 solid-phase extraction cartridges. Astringency of filtered samples was estimated by liposome agglutination test. Samples were analyzed by lipid chromatography mass spectrometry (LC/Q-TOF) equipped with electrospray source operating in positive-ion mode.The data analysis was performed by PowerGet and MetaboAnalyst.

Persimmon, Astringency, Metabolome analysis

発表責任者：中山勉（tn206794@nodai.ac.jp）

講演番号：3I01-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

チョコレートの保存がフレバーリリース挙動と 油脂の結晶化に与える影響

Effect of chocolate storage on flavour release and fats crystallization

○達 美月、勝野 那嘉子、西津 貴久、今泉 鉄平（岐阜大院）
○MIZUKI TATSU, Nakako Katsuno, takahisa nishizu, Teppei Imaizumi (Gifu Univ)

【目的】チョコレートは口どけと香気が特徴的な食品である。口どけを感じる主な要因は油脂の融解挙動であり，香気の放出は油脂の融解が関係する。保存によって口どけ感は変化するがそれに伴い香りの感じ方も変化する。油脂の融解による結晶性の変化は，香気放散挙動に影響を及ぼすと予想される。本研究では，保存による油脂の結晶性変化と香気放散の変化との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】冷蔵庫で各期間(0-365日）保存したチョコレートを試料として用いた。チョコレートの融解温度以上である 45 ℃で香気成分をSPME法にて捕集し,GC-FIDおよび GC-MS 分析に供した。また, DSC を用いて油脂の融点・結晶化度の測定を行った。また，保存前の試料を用いて匂いかぎを実施した。
【結果】 GC での分析により香気成分としてテトラメチルピラジン , 2- エチル -1- ヘキサノール , 酢酸2-フェニルエチル , フェニルエチルアルコールを同定した。保存による香気成分の融解時の放出は 60 日までは増加し，その後減少に転じた。また，保存期間の長期化に伴い高温域での香気放散量は増加した。 DSC の結果より融点は上昇し，結晶化度は増加が確認できた。香気の主成分であるテトラメチルピラジンは，融点と連動してその挙動は変化した。

【 Objective 】 Chocolate is important aroma and mouthfeel. The mouthfeel and aroma change with the melting of fats. The purpose of this study was to clarify the relationship between the change in crystallinity of fats and behavior of aroma release.
【 Method 】 Chocolate stored in a refrigerator (0-365 days) were used GC-FID and MS,DSC.SPME method was used to extra the aroma components.
【Result】Tetramethyl pyrazine and 2-ethyl-1-hexanol were identified by GC-MS analysis. The release during thawing increased up to 60 days and then decrease. Aroma release amount of high boiling point compounds increased after 2 months. DSC results showed that the melting point increased and the crystallinity increased with storage.

Storage, Fats, Flavor release

発表責任者：達美月（a4521060@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3I03-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

尿細管障害におけるタンパク質架橋酵素の機能解析

Characterization of protein cross-linking enzyme in tubular injury

○丹羽 優、辰川 英樹、人見 清隆 (名大院・創薬科学)
○Suguru NIWA, Hideki TATSUKAWA, Kiyotaka HITOMI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

慢性腎臓病は日本人の成人の多くが罹患する国民病であり、不可逆的に腎機能が低下する疾患である。この病態の進展要因の一つに尿細管障害を起点とした間質の炎症や線維化が強く示唆されている。私たちはタンパク質中のグルタミンとリジン残基間に架橋結合を形成する酵素（トランスグルタミナーゼ：TG1）が障害を受けた腎尿細管上皮細胞で活性化し、腎障害や線維化の病態進展に関わることを報告してきた（Arch Biochem Biophys 2015; Sci Rep 2018）。本研究では、病態形成に伴う尿細管の障害時に TG1 がどのように炎症惹起の制御に関わるかを解明することを目的とした。ヒト尿細管上皮細胞株（HK-2）を H_2O_2 で刺激したところ、処理後 2.5 および 24 時間で炎症性サイトカイン IL-6 や IL-8 の mRNA やタンパク質の発現、培地への分泌量の上昇が見られた。これらの発現上昇は TG1 の発現抑制により有意に阻害されたことから、TG1 は IL-6 や IL-8 の発現誘導の責任因子として働くことが示唆された。次に H_2O_2 による IL-6 や IL-8 の発現上昇の分子機構を理解するため、発現調節因子 NF-κB の上流に位置する JNK、ERK1/2、p38 MAPK に対する各阻害剤を用いて検討した。その結果、H_2O_2 処理した HK-2 ではこれら全てのシグナル伝達を介して NF-κB が活性化され、IL-6 や IL-8 が誘導されることを見出した。以上の結果より、腎障害時の尿細管上皮細胞では TG1 依存的に炎症応答が制御され、病態形成に関わることが示唆された。

Chronic kidney disease (CKD) is a national disease that causes irreversible renal failure. The interstitial inflammation and fibrosis caused by tubular injury have been strongly suggested as one of the factors for the development of CKD. We have reported that TG1, a crosslinking enzyme, is activated in damaged renal tubular epithelial cells (TECs) and is involved in the pathological developments of renal injury and fibrosis. Here, we used human TECs (HK-2) to clarify how TG1 is involved in the regulation of inflammation. The HK-2 stimulated with H_2O_2 showed the increased expression and secretion of both IL-6 and IL-8. These increases were significantly suppressed by knockdown of TG1. Next, we examined the three different inhibitors that block the upstream pathways of NF-κB, which is involved in the transcription of IL-6 and IL-8. The results showed that the expressions of IL-6 and IL-8 was increased via all of each pathway activated in H_2O_2-treated HK-2. These results suggest that TG1-dependent regulation of inflammatory responses in TECs during renal injury is involved in renal pathogenesis.

Transglutaminase, tubular epithelial cells, inflammation

講演番号：3I03-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

筋形成型オリゴ DNA の NF-κB 阻害を介した抗炎症作用機序
Anti-inflammatory mechanism of the myogenetic oligodeoxynucleotide inhibiting NF-κB
○山本 万智[1]、三好 愛[2]、森岡 一乃[2]、二橋 佑磨[3]、三谷 塁一[1,2,3]、高谷 智英[1,2,3,4] ([1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大院総合医理工、[4]信州大バイオメディカル研)
○Machi YAMAMOTO[1], Mana MIYOSHI[2], Kamino MORIOKA[2], Yuma NIHASHI[3], Takakazu MITANI[1,2,3], Tomohide TAKAYA[1,2,3,4] ([1]Fac Agr, Shinshu Univ., [2]Grad Sch Tech, Shinshu Univ., [3]Grand Sch Med Sci Tech, Shinshu Univ., [4]IBS, Shinshu Univ.)

我々は最近、乳酸菌ゲノム由来の 18 塩基の筋形成型オリゴ DNA（iSN04）を同定した。iSN04 は抗ヌクレオリンアプタマーとして、がん分泌物や糖尿病で低下する筋芽細胞の分化能を回復する。興味深いことに、iSN04 は同時に筋芽細胞の炎症反応も抑制するが、そのメカニズムは不明である。そこで本研究では、in vitro の炎症誘導系を用いて、iSN04 の抗炎症作用機序を調べた。

マウス筋芽細胞株 C2C12 に TLR2 リガンド（Pam_3CSK_4, FSL-1）または TNF-α を投与し、炎症誘導系を構築した。リガンド投与 2 時間後、インターロイキン 6 および TNF-α の発現量が上昇したが、これらの発現誘導は iSN04 の前処理(10 μM, 3 時間)で有意に抑制された。免疫染色の結果、炎症性の転写因子 NF-κB は、リガンド投与 30 分以内に核移行するが、iSN04 の前処理はこの核内移行を阻害することがわかった。また、ルシフェラーゼアッセイにより、iSN04 が NF-κB の転写活性を抑制することを確認した。ヒト筋芽細胞でも、iSN04 は TNF-α 依存的な筋分化の悪化を改善するとともに、炎症性サイトカインの発現を抑制することが分かった。さらに、iSN04 は血管平滑筋細胞と脂肪前駆細胞においても抗炎症作用を示した。現在、NF-κB の上流と iSN04 の関連性を検討している。

炎症反応は筋分化を抑制することが広く知られており、iSN04 が筋分化を回復するメカニズムの一部は、その抗炎症作用に依拠していると考えられた。

A single-strand 18-base oligodeoxynucleotide, iSN04, serves as an anti-nucleolin aptamer and promotes myogenic differentiation. iSN04 recovers the myoblast differentiation attenuated by cancer-released factors and diabetes mellitus. In addition, iSN04 restores inflammation of the myoblasts in these situations. In this study, we investigated the molecular mechanism underlying anti-inflammatory effect of iSN04.

Murine myoblast cell line C2C12 was treated with TLR2 ligand (Pam_3CSK_4 or FSL-1) or TNF-α to be induced inflammatory responses. The ligand-induced transcriptions of interleukin-6 and TNF-α were significantly suppressed by pre-treatment of iSN04. The ligand-induced nuclear translocation of NF-κB was also impaired by iSN04. Similar anti-inflammatory effects of iSN04 were confirmed in human myoblasts, vascular smooth muscle cells, and pre-adipocytes. These data suggested that iSN04 is involved in NF-κB signaling pathway.

inflammation, myogenetic oligodeoxynucleotide, NF-κB

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3I03-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

フェロトーシス誘導細胞における酸化特異的エピトープ形成と免疫応答解析

Formation of Oxidation-Specific Epitopes and Analysis of Immune Response in Ferroptosis-induced Cells

○糸井 海星[1]、林 世映[1]、三浦 由香子[1]、板倉 正典[1]、今井 浩孝[2]、内田 浩二[1] ([1]東大農、[2]北里薬)

○Kaisei ITOI[1], Sei-Young LIM[1], Yukako MIURA[1], Masanori ITAKURA[1], Hirotaka IMAI[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kitasato Univ.)

生体膜は、酸化ストレスを受けることで反応性の高い過酸化脂質を生成する。これらの物質は、細胞内のタンパク質と結合して様々な構造と物性をもつ酸化特異的エピトープを形成する。特に、一部のアルデヒド修飾タンパク質に対する抗体が自己免疫疾患と密接に関連していることが報告されている(Miyashita, H. et al., *Sci. Rep.* 2014)。一方で、フェロトーシスは鉄および脂質過酸化によって制御されている非アポトーシス型の細胞死であり、グルタチオンペルオキシダーゼ 4(GPX4)の活性が低下することで細胞内に過酸化脂質が蓄積し、フェロトーシスが誘導されることが報告されている(Stockwell, B. R. et al., *Cell* 2017)。酸化特異的エピトープとフェロトーシスは、共に脂質酸化が鍵となる事象であるが、それらの間の関係には不明な部分が多く残されている。そこで本研究では、酸化特異的エピトープとフェロトーシスとの間の関連性について抗体を用いて明らかにし、酸化ストレスに起因する自己抗体産生機構の解明、関連疾病の予防・改善を最終目的とした。

GPX4$^{+/-}$マウスの脾臓細胞を用い、酸化特異的エピトープを認識する抗体を産生するハイブリドーマを作成し、自己抗原として認識される DNA との交差性を確認した。また、マウス線維芽細胞にフェロトーシスを誘導し、細胞内外の酸化特異的エピトープ形成について、研究室にて樹立されている抗酸化特異的エピトープ抗体を用いたスクリーニング解析をフローサイトメトリーにて行った。さらに、フェロトーシス誘導剤である RSL-3 をマウスリンパ球に添加した際のリンパ球サブセット、IgM 抗体産生能及びサイトカイン産生能に対する影響を解析した。現在、野生型マウス及び GPX4$^{+/-}$マウスから得られた免疫細胞を用いて酸化特異的エピトープを添加した際の応答について解析している。

Lipid peroxides (LPO) modify intracellular proteins to form oxidation-specific epitopes. It has been reported that antibodies against some aldehyde-modified proteins are associated with autoimmune diseases. Ferroptosis is a non-apoptotic type of cell death regulated by iron and lipid peroxidation and caused by reduced activity of glutathione peroxidase 4 (GPX4). Although lipid oxidation is related to both events, the relationship between them remains unclear. In this study, we used antibodies to elucidate the relationship between them and the mechanism of oxidative stress-induced autoantibody production and preventing related diseases.

We generated hybridomas from GPX4$^{+/-}$ mice, which produce antibodies recognizing oxidation-specific epitopes and confirmed their cross-reactivity with DNA. In addition, we induced ferroptosis in mouse embryo fibroblasts and screened for oxidation-specific epitopes by flow cytometry using anti-oxidation-specific epitope antibodies established in our laboratory. Furthermore, we analyzed the effects of RSL-3, a ferroptosis inducer, on lymphocyte subsets and subsequent IgM antibody/cytokine production. We are currently analyzing the response against LPO/modified proteins using lymphocytes isolated from wild-type and GPX4$^{+/-}$ mice.

Oxidation-specific epitopes, Ferroptosis, Protein modification

講演番号：3I03-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

エンメイソウエキスによる表皮常在菌の一種である *Enterococcus* 属に起因した炎症抑制効果の検証
Inflammation of epidermal keratinocytes induced by *Enterococcus* sp. is inhibited by *Isodon japonicus* extract.

○横江 友貴[1]、太田 聖子[1]、渡邉 紘介[2]、伊藤 廉[2]、猪又 顕[1] ([1]株式会社コーセー 研究所、[2]株式会社ミルボン 開発本部)
○ Yuki YOKOE[1], Seiko OTA[1], Kosuke WATANABE[2], Len ITO[2], Ken INOMATA[1] ([1]KOSE Corporation R&D Laboratories, [2]Milbon Co. Ltd., Development Headquarters)

加齢によって生じる顔の老徴の一つであるシワは、紫外線などの影響で生じることが知られている。一方で、肌に生じる微弱かつ慢性的なダメージが表皮組織に与える影響も加齢に対して無視できないことが知られている。我々は 2019 年に、頭皮の加齢と頭皮常在菌の関連に着目し、日本人女性の毛髪と頭皮の大規模調査での頭皮細菌叢の解析結果から、*Enterococcus* 属細菌がうねり毛の増加など、頭皮の加齢現象と関連し、細胞実験から酸化ダメージを引き起こす可能性を報告した。しかしながら、*Enterococcus* 属細菌が頭皮以外にどのように影響を及ぼしているかについては、詳細が不明であった。

本研究では、頭皮の老化と関連を見出した *Enterococcus* 属について、顔の皮膚に及ぼす影響を解析することを目的とした。我々は、表皮常在菌叢解析における *Enterococcus* 属の有無と、顔の肌パラメーターの解析を行った。その結果、*Enterococcus* 属が顔面皮膚に存在する被験者に関しては、目の下のシワスコアと関連性があることを見出した。さらに、表皮ケラチノサイトは *Enterococcus* sp.生菌との共培養によりダメージを受け、そのダメージは炎症性経路の活性化に起因することを明らかとした。これらの影響を抑制することを目的に炎症性反応を抑制する成分の検討を行った結果、エンメイソウエキスの添加により、*Enterococcus* sp.生菌による炎症を抑制する効果を見出した。

Wrinkles are known as one of the facial aging feature caused by external factor such as UV. As well as such external factor, aging cannot excluded the effect to epidermis caused by chronic damage including weak inflammation. In 2019, we focused on the relationship between scalp and its microbiome, and reported that *Enterococcus* genus is related to the scalp aging like increased wavy hair. And from *in vitro* experiments, we also reported that *Enterococcus* sp. could cause oxidative damage to epidermal cells. However, how *Enterococcus* affects the skin besides scalp remains unclear.

The aim of this study is to analyze the effects of *Enterococcus* on the facial skin. We analyzed the presence of *Enterococcus* genus in the skin microbiome and the facial skin parameters. Then, the results suggested the possibility that *Enterococcus* genus was associated with the wrinkle score under the eyes in the subjects who have *Enterococcus* genus on their facial skin. Furthermore, we revealed that keratinocytes were damaged by co-culture with living *Enterococcus* sp., and the damage was caused by activation of the inflammatory pathway. According to our additional investigation to restrain the inflammation, the results indicated that *Isodon japonicus* extract is effective in suppressing inflammation caused by living *Enterococcus* sp.

anti-inflammatory, skin microbiome, epidermal keratinocyte

講演番号：3I03-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

ダイズシストセンチュウの誘引に関与する遺伝子の探索

Analysis of host recognition mechanism of Heterodera glycines

○佐伯 靖将[1]、細井 昂人[1]、内山 博允[2]、佐々木 康幸[1]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東農大バイオ、[2]東農大ゲノムセンター)
○ YASUMASA SAEKI[1], AKITO HOSOI[1], HIRONOBU UCHIYAMA[2], YASUYUKI SASAKI[1], SHUNSUKE YAJIMA[1], SHINSAKU ITO[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [2]NODAI GRC)

ダイズシストセンチュウ（*Heterodera glycines*：Hg）は、マメ科植物を宿主とする植物寄生線虫である。Hg は宿主由来の誘引物質を認識し、宿主根へと誘引行動を行うことが明らかになっているが、そのメカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、ダイズシストセンチュウにおける宿主認識に関与する遺伝子を取得するため、宿主根への誘引時に特異的に応答する遺伝子を取得し、解析を試みた。その結果、宿主根への誘引時に発現上昇する遺伝子として *Caenorhabditis elegans* において化学走性に関与すると推測される遺伝子のホモログが複数抽出された。これらの遺伝子のうち、*HgrGCY-9* 及び *HgGPa-3* について RNAi 法により機能解析を試みた。PF-127 ゲル中で宿主根への誘引試験を行った結果、*HgrGCY-9*、*HgGPa-3* をノックダウンした Hg において 3 時間以降の誘引頭数が減少した。一方、非宿主由来の誘引物質である硝酸イオンへの誘引頭数は減少しなかった。また、口針の突出、運動性、根への感染に対してもノックダウンによる影響は認められなかった。これらの結果から、*HgrGCY-9* 及び *HgGPa-3* は宿主認識に対して特異的に機能する遺伝子であることが明らかになった。

Soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (Hg), is a plant parasitic nematode that uses leguminous plants as its host. It has been known that Hg is attracted to the host roots after recognizing the attractants from the host plants, although the mechanism is still unknown. In the present study, in order to obtain the genes involved in host recognition in *Heterodera glycines*, we screened genes that specifically respond to attraction to host roots. As a result, several homologs of chemotaxis gene in *Caenorhabitis elegans* are upregulated. Of these upregulated genes, we analyzed the function of *HgrGCY-9* and *HgGPa-3* by RNAi method. Attraction assay to host roots in PF-127 gel revealed that the knockdown of *HgrGCY-9* or *HgGPa-3* disrupted attraction to the host roots. In contrast, the knockdown did not affect the attraction to nitrate ion, one of the non-host attractants. A protrusion of stylet (mouth spear), a motility, and an infection to the host roots were also unaffected. These results indicate that *HgrGCY-9* and *HgGPa-3* are host recognition specific genes.

soybean cyst nematode, Heterodera glycines, attract

講演番号：3I03-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

小胞体ストレス時の過酸化を抑制する薬剤の作用機序

Action mechanism of ER redox modulator against ER stress-derived peroxidation

○石田 智也[1]、苅谷 昌洋[2]、奥 勇紀[2]、阪井 康能[2]、寶関 淳[1,2] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]京大農)
○TOMOYA ISHDA[1], MASAHIRO KARIYA[2], YUKI OKU[2], YASUYOSHI SAKAI[2], JUN HOSEKI[1,2]
([1]Kyoto Univ. of Adv. Sci., [2]Kyoto Univ.)

老化などに伴い、小胞体に構造異常なタンパク質が蓄積した小胞体ストレス状態が継続すると細胞死が引き起こされ、神経変性疾患や糖尿病をはじめとする様々な疾患発症の原因になると考えられている。小胞体において成熟されるタンパク質の多くはその構造形成や機能発現にジスルフィド結合の形成を必要とし、小胞体はこれに適した酸化的なレドックス状態に適切に制御されている必要がある。このようなレドックス恒常性の破綻は小胞体ストレスの原因となる。しかしながら、小胞体タンパク質品質管理とレドックスの連関は十分に明らかとなっていない。

糖尿病モデル条件である変異型インスリン変異体の発現は、小胞体ストレスを引き起こし、当研究室にて開発された小胞体レドックスプローブ ERroGFP S4 を用いることで、小胞体が酸化的となることがわかった。さらにこの異常タンパク質の小胞体蓄積に伴う酸化を抑制する化合物を同定した。
本研究では、同定した化合物が小胞体ストレスを緩和する作用機序を明らかにするため、この化合物により誘導される遺伝子を解析し、誘導された遺伝子の中で抗酸化効果をもつメタロチオネイン(MT)に着目した。MT は変異型インスリンを過剰発現した細胞において小胞体酸化を抑制し、変異型インスリンの細胞内蓄積量を減少させた。現在、小胞体ストレス及び酸化に対する MT の作用機序についてさらなる解析を行っている。

Endoplasmic reticulum (ER) stress where misfolded proteins are accumulated in the ER is induced by aging and lifestyle-associated stresses. Continuous ER stress condition eventually leads to apoptosis, which has been associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

ER is an oxidative environment suitable for disulfide bond formation, which is required for the folding and function of secretory and membrane proteins. Therefore, homeostasis of ER redox is properly regulated and its imbalance leads to ER stress. However, the relationship between redox and protein quality control in the ER remains to be elucidated.

Overexpression of an insulin mutant caused peroxidation in ER monitored by an ER redox probe, ERroGFP S4. We identified a compound which suppressed the ER oxidation. To elucidate the action mechanism of this compound, genes induced by the compound were identified. Metallothionein (MT) among them prevented accumulation of the mutant insulin and suppressed the ER peroxidation.

ER stress, ER redox, redox modulator

講演番号：3I03-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

TBC1D7 の新規結合因子の探索とその機能の解析

Identification of novel binding factors of TBC1D7 and functional analysis about cell growth.

○逸見 明央、山本 祐司、鈴木 司、井上 順、田久保 希（東農大院・農・農化）
○Akihiro Henmi, Yuji Yamamoto, Tsukasa Suzuki, Jun Inoue, Nozomi Takubo (Tokyo Univ of Agriculture.)

【背景・目的】結節性硬化症は家族性腫瘍の一つであり、原因遺伝子として TSC1 および TSC2 が同定されている。これらの遺伝子産物である TSC1、TSC2 は複合体を形成し、タンパク質合成を制御する mTORC1 を間接的に抑制する。近年、この TSC1-TSC2 複合体に TBC1D7 がヘテロ 3 量体として存在することが示された。TBC1D7 は TSC1-TSC2 複合体の活性を促進するものの、TBC1D7 自体が、TSC1/TSC2 以外にどのような分子と結合し自身の機能が制御されるかについては不明である。そこで本研究では TBC1D7 の結合因子を探索することで、TBC1D7 が TSC 複合体に及ぼす影響を解明することを目的とした。
【実験】HEK293T 細胞から Tandem Affinity Purification 法にて TBC1D7 複合体を粗精製し、LC-MS/MS を用いた結合タンパク質のスクリーニングを行った。さらに、結合候補因子と TBC1D7 間の結合解析として両者を培養細胞内に強制発現させ、免疫沈降法にて解析を行った。TBC1D7 との結合が確認できた因子を培養細胞に過剰発現させ、TSC 複合体の下流因子である mTORC1 の活性をその基質である S6K のリン酸化を指標とし解析した。
【結果・考察】スクリーニングおよび免疫沈降の結果より、TBC1D7 の結合因子として PGRMC1 を見出した。また PGRMC1 の複合体に TSC2 も確認できたため、PGRMC1 は TBC1D7 を介して TSC 複合体と相互作用することが示された。一方、PGRMC1 を過剰発現したものの S6K のリン酸化の変動は確認できなかった。PGRMC1 はヘムとの結合で活性化し、がん細胞の増殖に関与することから、今後は、PGRMC1 の活性状態を変化させ TBC1D7 との結合に与える影響や TSC 複合体の下流に及ぼす影響を解析していく予定である。

TSC1 and TSC2 form a heterocomplex and suppress the activity of mTORC1. Recently, TBC1D7 was discovered as a TSC complex that enhances the activity of TSC2. In this study, we found that PGRMC1 is a novel binding factor of TBC1D7 and that PGRMC1 also interacts with the TSC complex. However, overexpression of PGRMC1 in cells had no effect on the activation of mTORC1. Since PGRMC1 is activated by binding to heme and is involved in cancer cell proliferation. In the future, we plan to analyze the effects of changing the activity state of PGRMC1 on the binding of TBC1D7 and the downstream effects of the TSC complex.

mTORC1, TSC, TBC1D7

発表責任者：逸見　明央（eric.basami.5357@gmail.com）

講演番号：3I03-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

CNBP による mTORC1 活性化機構の解析

Analysis of mTORC1 upregulation　mechanism by CNBP

○土澤 弘幸[1]、石井 真央[2]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○Hiroyuki DOZAWA[1], Mao ISHII[2], Tsukasa SUZUKI[1,2], Jun INOUE[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2] ([1]Tokyo Univ Agric Grad Sch., [2]Tokyo Univ Agric)

【背景・目的】mTORC1 はセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞の恒常性に重要な役割を持つ。mTORC1 の活性化には、リソソームに局在する GTPase である Rheb 及び Rag が重要である。Rheb はインスリン刺激によって活性化し、mTORC1 を活性化する。また、Rag は細胞内のアミノ酸経路によって活性化され mTORC1 を Rheb が局在するリソソームに局在化させる。これまでに、我々は mTORC1 を活性化する因子を探索し、新たに Cellular nucleic acid-binding protein（CNBP）が mTORC1 のアミノ酸経路に関与することで mTORC1 を活性化させることを報告した(2021 年度 日本農芸化学会 中川ら)。そこで CNBP が mTORC1 のアミノ酸経路に及ぼすメカニズムの解明を本研究の目的とした。
【方法】アミノ酸シグナルを mTORC1 へと伝達する経路は、主に Rag 依存的経路と Arf1 を介した Rag 非依存的経路が存在する。そこで CNBP が Rag 依存的経路に位置するのか検討するため Rag の Dominant negative を過剰発現し mTORC1 の活性の指標として mTORC1 の基質である S6K のリン酸化を Western blot 法にて解析した。次に、Rag と CNBP が相互作用するのか免疫沈降法にて解析した。
【結果・考察】mTORC1 は CNBP の過剰発現によって活性化するものの Rag の Dominant negative の過剰発現においては、CNBP の過剰発現による mTORC1 の活性化の上昇は確認されなかった。一方で、CNBP と Rag はアミノ酸の栄養状態に関係なく相互作用をすることが確認された。これらのことから、CNBP は Rag に作用することで mTORC1 の活性化上昇に関与することが示唆された。今後は、CNBP が Rag の活性化上昇を寄与するかについて解析する予定である。

mTORC1 is a Ser/Thr protein kinase that plays an important role in cell growth and proliferation. Previously, we showed that Cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) enhances the activity of mTORC1, however, the molecular mechanism by which CNBP activates mTORC1 has not been elucidated.
In this study, we showed that overexpression of CNBP did not enhance mTORC1 activity in cells expressing a dominant-negative mutant of Rag. Furthermore, it was confirmed that CNBP and Rag bind to each other regardless of the amino acid status in the cell. These results suggest that CNBP is involved in the activation of mTORC1 via Rag.

mTORC1, CNBP, Rag

発表責任者：山本祐司（yujiya@nodai.ac.jp）

講演番号：3I03-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

5-アミノレブリン酸による哺乳動物細胞の増殖抑制

Inhibition of mammalian cell proliferation by 5-aminolevulinic acid.

○渡邉 晴也[1]、竹本 圭汰[1]、飯田 友貴[2]、高橋 究[2]、石塚 昌宏[2]、中島 元夫[2]、千葉櫻 拓[1]([1]東農大院生命、[2]SBI ファーマ(株))
○Seiya WATANABE[1], Keita TAKEMOTO[1], Tomoki IIDA[2], Kiwamu TAKAHASHI[2], Masahiro ISHIDUKA[2], Motowo NAKAJIMA[2], Taku CHIBAZAKURA[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. Grad. School, [2]SBI Pharmaceuticals Co., Ltd.)

5-アミノレブリン酸(5-ALA)は、天然で合成されるアミノ酸であり動物ではヘム合成の前駆物質である。がん細胞の多くで 5-ALA 代謝産物である光増感物質プロトポルフィリン IX(PpIX)が蓄積することから、がんの蛍光標識や光線力学療法に利用されている。近年では新型コロナウイルスの感染阻害や糖代謝の促進をすることが報告されており、注目されている物質である。我々は 5-ALA 塩酸塩を動物培養細胞に添加した結果、細胞増殖抑制が引き起こされること、正常細胞よりもがん細胞においてより強く増殖が抑えられることを発見した。5-ALA による細胞増殖抑制は報告例がなく、その詳細については明らかになっていない。5-ALA 合成酵素である ALAS2 を外来的に導入・誘導発現させることで、細胞内において持続的に 5-ALA を合成する細胞株を作製し、増殖検定をした結果、ALAS2 発現量依存的に細胞増殖抑制が見られた。また、5-ALA 直後の代謝段階を触媒する ALAD を阻害したところ、細胞増殖の回復が見られたことから、細胞増殖抑制は 5-ALA 代謝産物によって引き起こされることが示唆された。現在、5-ALA 代謝経路下流で PpIX を合成する酵素である PPOX のノックダウンを行っており、その条件下での 5-ALA の細胞増殖への影響も踏まえて討論したい。

5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a naturally synthesized amino acid and a precursor of heme synthesis in animals. Since protoporphyrin IX (PpIX), a photosensitizing metabolite of 5-ALA, accumulates in most cancer cells, it has been used for photodynamic diagnosis and photodynamic therapy of cancer. Recently, 5-ALA has been reported to inhibit SARS-CoV-2 infection and to promote glucose metabolism, which has been attracting much attention. We found that adding 5-ALA hydrochloride to the medium of cultured animal cells causes inhibition of cell proliferation. This is a novel finding and the details of this mechanism have not yet been elucidated. We observed that cell proliferation is inhibited by exogenously introduced 5-ALA synthetase ALAS2 in a dose-dependent manner. In addition, by inhibiting ALAD, which catalyzes the metabolic step immediately downstream of 5-ALA, the cell proliferation was restored, suggesting that the cell proliferation is inhibited by 5-ALA metabolite(s). We are currently attempting to knockdown PPOX, an enzyme that oxidizes protoporphyrinogen IX to form PpIX, and will also discuss the effect of 5-ALA on the cell proliferation under this condition.

5-aminolevulinic acid, cell proliferation, porphyrin metabolism

講演番号：3I03-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

筋分化における古典的・非古典的な甲状腺ホルモン受容体 α 作用の役割

Roles of canonical and non-canonical thyroid hormone receptor α action in myoblast differentiation

○網干 舞音[1]、古川 潤[1]、北風 智也[1]、原田 直樹[1]、山地 亮一[1,2] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪府大・生資センター)
○Manon ABOSHI[1], Jun FURUKAWA[1], Tomoya KITAKAZE[1], Naoki HARADA[1], Ryoichi YAMAJI[1,2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Pref. Univ.)

【目的】骨格筋は分化を伴った複雑な過程を経て形成される。甲状腺ホルモンのトリヨードサイロニン（T3）は thyroid hormone receptor α（THRα）を介して筋分化を促進するが，その分子機構は不明である。THRα は核内で転写因子として甲状腺ホルモン応答配列（TRE）に結合し，標的遺伝子の発現を調節する古典的な作用以外に，核外において非古典的な作用も発揮する。本研究では、筋分化における THRα の作用機構を解析した。
【方法・結果】マウス由来 C2C12 筋芽細胞が筋管細胞へと分化する際に，T3 によって発現が増加する遺伝子を RNA-seq によって網羅的に解析し，転写因子である Kruppel Like Factor 9（Klf9）に着目した。Klf9 をノックダウンした筋芽細胞では筋分化が促進したことから，T3 刺激による THRα の古典的な作用が筋分化抑制に関与する可能性が示された。一方で，TRE に対して結合能を持たない THRα 変異体（DBDmut）を高発現している C2C12 細胞が筋分化誘導された時，2 個以上の核を持つ細胞の割合が，内在性の THRα だけを発現している細胞あるいは野生型の THRα を発現している細胞に比べて増加した。これらの結果から，THRα の古典的なゲノミック作用が筋分化の抑制に関与し，転写活性を持たない THRα の非古典的な作用は筋分化の促進に関与すると推測された。
【 Objective 】 Skeletal muscle regenerates through a complex process that involves the differentiation of myoblasts to myotubes. Thyroid hormone (T3) promotes the myoblast differentiation through thyroid hormone receptor α (THRα). However, its molecular mechanism is unknown. In this study, we evaluated the function of THRα in myoblast differentiation in terms of canonical and non-canonical actions.【Methods and results】Using RNA sequence analysis, we predicted Klf9 as a factor whose expression is increased by T3 during muscle differentiation. siRNA-mediated knockdown of Klf9 promoted myoblast differentiation, suggesting that the canonical action of THRα by T3 is involved in the repression of myoblast differentiation. In contrast, when cells expressing THRα mutant (DBDmut) without canonical action were induced to differentiation, the proportion of cells with two or more nuclei was increased, compared to cells expressing endogenous or wild-type THRα. These results suggest that the canonical genomic action of THRα has the inhibitory effect on myoblast differentiation and that the non-canonical action of THRα has the opposite effect.

Thyroid hormone receptor, skeletal muscle, differentiation

発表責任者：山地亮一（yamaji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3I03-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:00～ ミーティングルーム I

線虫 C. elegans の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-1 の分子機構
Regulatory mechanism of the larval diapause in C. elegans by FLP-1, one of the short neuropeptides

○有年 梨沙子[1]、影山 なつみ[2]、小野 真弘[3]、松永 洋平[4]、岩﨑 崇[1,2,3]、河野 強[1,2,3] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大大学院持続性社会創生科学研究科、[3]鳥取大大学院連合農学研究科、[4]SRL)
○Risako Une[1], Natsumi Kageyama[2], Masahiro Ono[3], Yohei Matsunaga[4], Takashi Iwasaki[1,2,3], Tsuyoshi Kawano[1,2,3] ([1]Tottori Univ., [2]Graduate School of Sustainability Science, Tottori Univ., [3]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori Univ., [4]SRL)

【背景・目的】線虫 *Caenorhabditis elegans* は生育環境の悪化（生育密度の上昇・餌の枯渇）に応答して一時的に生育を停止し休眠する。環境因子は頭部感覚神経で受容され、下流の TGF-β 様シグナル並びにインスリン様シグナルを制御し、通常生育/幼虫休眠を決定する。発表者らは、短鎖神経ペプチド FLPs (FMRFamide-like peptides)が介在して 下流のホルモンシグナルが制御されると推定し、生育/休眠に関与する *flp* 遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、*flp-1* 破壊が著しい幼虫休眠抑制を示すことを明らかにした。本大会では、*flp-1* 破壊の生育/休眠制御機構に関して得られた最近の知見を紹介する。本研究では、線虫 *C. elegans* の休眠制御における最大のペプチドファミリーである FLP s を介した生育/休眠制御機の全容解明を目的とする。
【方法・結果】①*flp-1* 破壊のレスキュー・過剰発現を行い、*flp-1* の生育/休眠制御への関与を実証した。②下流のホルモンシグナルとのエピスタシス解析を行い、*flp-1* はインスリン様シグナルに関与することを明らかにした。③FLP-1 はインスリン様シグナル最強のリガンド DAF-28 の分泌抑制することにより、幼虫休眠を促進することを明らかにした。現在、環境因子による FLP-1 の産生量・分泌量の変動を検証している。
【BACKGROUND & PURPOSE】*Caenorhabditis elegans ceases* larval development and then enters into larval diapause in a response to the growth environment (population density, diet and temperature). The environmental factors are received by head sensory neurons, regulating downstream TGF-β-like signaling and insulin-like signaling, and thereby determine normal growth or larval diapause. Upon our presumption that short neuropeptides FLPs are related to regulation of downstream hormonal signalings, we carried out a screen for the *flp* genes, revealing a significant suppression of larval diapause by disruption of *flp-1*. In this meeting, we will show the molecular mechanism of *flp-1* in regulation of larval diapause. Our final goal is complete understanding of the molecular mechanism in larval development/diapause of *C. elegans*, a model nematode.
【METHODS ＆ RESULTS】We demonstrated as follow: (1) the relevancy of *flp-1* in diapause regulation by experiments of rescue and over-expression of *flp-1*; (2) the relevancy of *flp-1* in the downstream insulin-like signaling, which promotes larval development, by epistasis analyses on the downstream signalings; (3) FLP-1 promotes secretion of DAF-28, the most predominant ligand in the insulin-like signaling. We are going to investigate the response of FLP-1 production and secretion to environmental factors.

C. elegans, diapause, insulin-like peptide

発表責任者：河野強（kawano@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3I05-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

筋障害応答性繊維芽細胞増殖因子 FGF13 の骨格筋における機能解析

A functional analysis of FGF13 on muscle regeneration

○野口 惇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Makoto NOGUCHI, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

超高齢化社会に突入した我が国において、加齢に伴う筋力・筋量の低下(サルコペニア)は QOL の低下を招く深刻な問題である。筋量・筋力の制御機構の解明は健康寿命の延伸に繋がる。骨格筋は可塑性に富んだ組織であり、外的損傷等に応じ速やかに修復する。筋前駆細胞であるサテライト細胞は筋損傷に伴い活性化し増殖・分化を行うことで筋再生の中心的役割を担う。加齢に伴いサテライト細胞の数や増殖能・分化能は低下することが知られており、筋再生機構の新たな制御因子の同定により健康寿命の延伸への寄与が期待される。我々は筋損傷に応答する新規増殖因子として Fibroblast growth factor 13 (FGF13) を見出し、筋再生時における機能解明を目指した。筋障害誘導剤であるカルジオトキシンをマウス前脛骨筋に投与し、経時的な遺伝子発現解析を行った。FGF13 の遺伝子発現は筋損傷誘導後 2-3 日時点で著しく減少し、4 日目に回復傾向を示した。次に、アデノ随伴ウイルスを用いてマウス前脛骨筋に FGF13 を強制発現後、カルジオトキシン投与により筋損傷を誘導した。筋損傷誘導 3 日後における組織染色およびウェスタンブロットの結果から、FGF13 強制発現群ではサテライト細胞のマーカーである Pax7 の陽性細胞およびタンパク質発現が減少することを見出した。また、Pax7 を標的にする複数の microRNA の発現変動が認められた。筋損傷誘導 7 日後におけるヘマトキシリン・エオシン染色の結果から、FGF13 強制発現群では筋繊維直径の減少が確認された。以上の結果から、FGF13 は Pax7 の発現制御を介してサテライト細胞の活性化を抑制する因子であることが示唆された。

Satellite cells (SCs), which are muscle progenitor cells, are the source of myonuclei for regeneration. SCs are activated in response to muscle injury to proliferate and differentiate for replacement of damaged myofibers. However, it remains largely unknown that how SCs are activated after acute injury. In this study, we identified FGF13 as a novel growth factor decreased after acute injury. To examine functions of FGF13 in muscle regeneration, we infected Adeno-associated virus in tibialis anterior muscles to overexpress FGF13. Pax7 upregulation were suppressed and miRNAs which target Pax7 mRNA were increased by FGF13 overexpression after acute injury. Cross-sectional area of myofibers were also decreased by FGF13 overexpression. These results suggest that FGF13 impairs satellite cell activation after acute injury and delays muscle regeneration.

FGF13, Muscle regeneration, Satellite cell

講演番号：3I05-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

骨格筋損傷におけるコレステロール代謝産物の変動と機能解析

Function analysis of cholesterol metabolites during skeletal muscle damage

○高瀬 飛天[1]、清水 誠[1]、小野 敦子[1]、近澤 未歩[1,2]、齋藤 穂高[1]、市 育代[3]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]名城大学・農学部・応用生物化学科・栄養・食品学研究室、[3]お茶大・基幹研究院)

○Hayataka TAKASE[1], Makoto SHIMIZU[1], Atsuko ONO[1], Miho CHIKAZAWA[1,2], Hodaka SAITO[1], Ikuyo ICHI[3], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., Fac. of Agr., Meijo Univ, [3]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ.)

超高齢社会である日本では、健康寿命と平均寿命の差が問題視されている。加齢に伴う骨格筋再生能力の低下により高齢者の運動機能及び QOL は怪我などにより著しく低下し、健康寿命の短縮に繋がる。このことから、健康寿命を延伸させる上で、骨格筋機能低下の抑制が重要である。これまで我々は Cardiotoxin を用いた筋損傷モデルマウスの実験から、核内受容体 LXR の標的遺伝子の発現が増加することを見出した。LXR はコレステロール代謝産物である酸化ステロールと結合することで活性化され、コレステロール代謝の恒常性を維持する。本研究では筋損傷における酸化ステロールの変動及び機能解析を行なった。骨格筋の酸化ステロール画分を用いた質量分析器による解析を通して、複数の酸化ステロールの変動が確認された。次に、マウス培養骨格筋細胞 C2C12 を用いた LPS 誘導性の炎症モデルにおける酸化ステロールの機能解析を行った。筋繊維直径の解析の結果、一部の酸化ステロールによる筋繊維直径の回復効果が示された。

以上の結果より、筋損傷で変動する酸化ステロールは骨格筋繊維の恒常性を維持する機能を有することが示された。

In Japan's super-aging society, the gap between healthy life expectancy and average life expectancy is becoming a big issue. Due to age-related decline in skeletal muscle regeneration capacity, the motor function and QOL of the elderly are significantly impaired by muscle damage, leading to shortened healthy life expectancy. Therefore, it is essential to suppress the decline of skeletal muscle function in order to extend healthy life expectancy. We previously found that the expression of target genes of the nuclear receptor LXR is upregulated in muscle damage. Generally speaking, LXRs are activated by oxysterols. In this research, we analyzed changes in oxysterols in muscle damage and detailed function analysis of the fluctuated oxysterols. Through GC-MS analysis of oxysterol fractions from skeletal muscle, it was shown that some oxysterols were variable. Next, we analyzed the function of oxysterols in a model of LPS-induced inflammation using cultured mouse skeletal muscle cells C2C12. It was suggested that some oxysterols, which vary in muscle damage, contribute to the protection of muscle fibers.

These results indicate that oxysterols, which fluctuate with muscle damage, have a function in maintaining skeletal muscle fiber homeostasis.

Muscle damage, Oxysterol, LXR

発表責任者：高瀬飛天（hayataka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I05-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

転写因子 CREBH が胆汁酸受容体 TGR5 のプロモーター活性に及ぼす影響の解析

Analysis of the effect of transcription factor CREBH on the promoter activity of bile acid receptor TGR5

○佐々木 崇、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Takashi SASAKI, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

胆汁酸受容体 TGR5 は全身に広く発現が認められ、骨格筋機能の向上や肝細胞における糖代謝の改善など様々な代謝プロセスに関与することが報告されている。我々は TGR5 の発現量がそのプロモーター上流に存在するエンハンサー配列 ERSE および UPRE による制御を受けることを既に報告しており、骨格筋においては運動時に活性化する転写因子 ATF6α がこれらのエレメントに結合することで TGR5 発現量を増大することを明らかにしている。一方、肝臓に高発現する転写因子 CREBH もまた UPRE に結合することでターゲット遺伝子の発現を上昇させることが知られているが、TGR5 発現制御への関与は不明である。そこで本研究では、CREBH が TGR5 発現に及ぼす影響の解析を行った。

我々はまず、TGR5 プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を融合したレポータープラスミドを用い、CREBH によるプロモーター活性の変動を評価した。その結果、CREBH は ATF6α と同程度に TGR5 プロモーター活性を上昇させることを明らかにした。またプロモーター上の ERSE および UPRE に変異を導入したレポータープラスミドを用いて同様の実験を行ったところ、CREBH による TGR5 プロモーターの活性化には UPRE がより重要であることが示された。一般に CREBH は、絶食時の肝臓において発現増大および活性化することが知られている。そこで自由摂食マウスならびに 36 時間絶食マウスの肝臓における mRNA 発現量を比較したところ、絶食マウス肝臓では CREBH や TGR5 の有意な発現増大が確認された。以上の結果より、CREBH は肝細胞における新たな TGR5 発現制御因子であることが示唆された。

We have previously reported that the expression level of TGR5 is regulated by enhancer sequences ERSE and UPRE in its promoter. CREBH, a transcription factor highly expressed in the liver, is known to upregulate gene expression by binding to UPRE, but its involvement in the regulation of TGR5 expression is unknown. In this study, we analyzed the effect of CREBH on TGR5 mRNA expression.

Using the luciferase reporter assay system, we found that CREBH increases the TGR5 promoter activity and that the UPRE is more important for the promoter activation. Consistent with these results, TGR5 mRNA expression was increased in the liver of fasted mice in which CREBH is activated. Altogether, our study indicates that CREBH is a novel regulator of TGR5 expression in hepatocytes.

bile acid, Tgr5, Crebh

発表責任者：佐々木　崇（atsasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I05-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

樹状細胞におけるケモカイン CCL17/TARC 発現機構と転写因子 PU.1 siRNA の喘息改善効果

The roles of PU.1/IRF4 in the gene expression of CCL17/TARC in mammal DCs, and the effects of PU.1 siRNA on asthma model mice

○伊藤 直人[1]、坂田 文弥[1]、八須 匡和[1]、長田 和樹[1]、伊藤 朋香[1]、中野 信浩[2]、八代 拓也[1]、西山 千春[1] ([1]東理大先進工、[2]順天堂大医)
○ Naoto ITO[1], Fumiya SAKATA[1], Masakazu HACHISU[1], Kazuki NAGATA[1], Tomoka ITO[1], Nobuhiro NAKANO[2], Takuya YASHIRO[1], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Juntendo Univ. Sch. Med.)

CCL17/TARC は CCR4 を介して Th2 細胞や好酸球の遊走を促すケモカインであり、アトピー性皮膚炎のバイオマーカーに用いられるなどアレルギー疾患に強く関わる。TARC の発現は、胸腺や上皮細胞、樹状細胞（DC）など特定の細胞に認められるが、細胞特異的な発現制御機構は多くが不明なままである。本研究では TARC の主要な産生源である樹状細胞について、CCL17 遺伝子の転写機構を解明すると共に、同定した転写因子を標的とした核酸医薬開発の可能性について喘息モデルを用いて検証した。造血系細胞特異的な転写因子である PU.1/SPI1 に着目し、TARC 発現への寄与を明らかにするため、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)やヒトプライマリーDC に *Spi1* siRNA を導入したところ、CCL17/TARC の顕著な発現抑制が確認された。次に、BMDC に PU.1 のパートナー分子である IRF4 や IRF8 の siRNA を導入した結果、*Irf8* のノックダウンは影響を及ぼさなかった一方、*Irf4* のノックダウンが CCL17/TARC 産生を有意に抑制することが判明した。また、*Spi1* と *Irf4* を過剰発現したマスト細胞では CCL17 産生の促進が観察された。クロマチン免疫沈降法を行った結果、BMDC では PU.1 と IRF4 が EICE 配列を含む *Ccl17* 遺伝子上流 8kb 付近に結合する可能性が示された。ヒトではマウスと共通のプロモーターと EICE 配列に加え、ケラチノサイト特異的に機能するもう 1 つのプロモーターが存在することも判明した。最後にマウス喘息モデルにおいて、*Spi1* siRNA の点鼻投与が肺胞洗浄液中の TARC 分泌量や Th2 細胞数の増加を抑制し、肺炎症を緩和することが示され、樹状細胞を標的とした siRNA が生体の免疫応答を制御し得ることが明らかとなった。（Ito *et al.*, *Allergy*, 2021 in press）

CCL17/TARC gene, is a key chemokine in allergic diseases. Although dendritic cells (DCs) are major sources of TARC, the transcriptional mechanisms of TARC in DCs are largely unknown. We analyzed the involvement of the transcription factor PU.1 in the gene expression of *Ccl17* in DCs by knockdown and overexpression experiments, and we evaluated the effect of *Spi1* siRNA *in vivo*. PU.1 knockdown significantly reduced the expression of CCL17 in bone marrow-derived DCs (BMDCs) and decreased the mRNA levels of *Irf4* and *Irf8*. siRNA transfection of *Irf4* and *Irf8* into BMDCs showed that the knockdown of IRF4 but not of IRF8 significantly reduced the expression of CCL17. Overexpression experiments demonstrated that exogenous coexpression of PU.1 and IRF4 induced apparent expression of CCL17. ChIP assays indicated that EICE sequences in proximal regions of the *Ccl17* gene are bound by PU.1 and IRF4 in BMDCs. Intranasal injection of *Spi1* siRNA reduced the TARC concentration and the migration of $CCR4^+/CD4^+$ T cells in the bronchi of asthma model mice.

allergy, chemokine, dendritic cell

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3I05-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

長鎖ノンコーディング RNA, ANROC と OIP5-AS1 による細胞増殖制御機構

The regulation mechanism of cell proliferation by long noncoding RNAs, ANROC and OIP5-AS1.

○神武 洋二郎、岡田 凌太朗（近大産理工）
○Yojiro Kotake, Ryotaro Okada (Kindai Univ.)

近年の大規模トランスクリプトーム解析により、ヒトにおいて長鎖ノンコーディング RNA（lncRNA）が 2 万種以上存在することが明らかとなった。最近の研究により、多くの lncRNA が細胞増殖、分化、アポトーシスなどの細胞運命決定に関与することが報告された。これまでに我々も、lncRNA ANRIL が細胞老化抑制に関与することを明らかとした。

さらに最近、我々は細胞増殖制御に関与する 2 つの lncRNA、ANROC と OIP5-AS1 を同定した。子宮頸癌細胞 HeLa において ANROC をノックダウンすると、細胞周期の促進因子であるサイクリン B1 の mRNA が増加し、細胞増殖が促進することが明らかとなった。一方、肺癌細胞 H1299、A549 において OIP5-AS1 をノックダウンすると、細胞周期の阻害因子である CDK インヒビターp15 の mRNA が増加し、細胞周期が G1 期に停止することが明らかとなった。これらの結果から、ANROC が細胞増殖を抑制する機能を、OIP5-AS1 は細胞増殖を促進する機能を持つことが考えられた。本発表では、我々が明らかとした ANROC と OIP5-AS1 の機能について、最近の知見を伴わせて紹介したい。

Mass scale transcriptome analysis has revealed the existence of over 20,000 lncRNAs. Recent studies have reported that many lncRNAs are involved in biological processes including cell proliferation, development, and apoptosis. So far, we have also revealed that a lncRNA, ANRIL, is involved in the repression of cellular senescence.

Recently, we identified two lncRNAs, ANROC and OIP5-AS1, which are involved in the regulation of cell proliferation. Silencing ANROC by using siRNAs increased the expression level of cyclin B1 mRNA which enhances cell cycle progression, resulting in the promotion of human cervical cancer cells HeLa. On the other hand, silencing OIP5-AS1 increased the expression level of CDK inhibitor p15 which inhibits cell cycle progression, resulting in cell cycle arrest at G1 phase of human lung cancer cells H1299 and A549. These results suggested that ANROC functions to repress cell proliferation and OIP5-AS1 functions to promote cell proliferation.

long noncoding RNA, cell cycle, cell proliferation

講演番号：3I05-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

膵臓 β 細胞における酸化ストレスによる Redd2 の発現調節機構とその役割の解明
The regulatory mechanisms of Redd2 expression and its roles in pancreatic β-cells under oxidative stress.

○浦川 夏帆[1]、田宮 央登[1]、原田 直樹[1]、松村 成暢[2]、真下 知士[3]、北風 智也[1]、乾 博[1,4]、山地 亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪府大・総リハ・栄養、[3]東大・医科研、[4]大手前大・健康栄養）
○Natsuho URAKAWA[1], Hisato TAMIYA[1], Naoki HARADA[1], Shigenobu MATSUMURA[2], Tomoji MASHIMO[3], Tomoya KITAKAZE[1], Hiroshi INUI[1,4], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Nutr., Osaka Pref. Univ., [3]Tokyo Univ., [4]Otemae Univ.)

【目的】膵臓 β 細胞は、酸化ストレスへの暴露により機能障害や細胞死が誘導される。Regulated in development and DNA damage response 2（Redd2）は、膵臓 β 細胞特異的酸化ストレス誘導剤であるストレプトゾトシン（STZ）を投与したマウスの膵島で発現が増加する。本研究では、膵臓 β 細胞における酸化ストレスによる Redd2 の発現誘導機構と役割の解明を目的とした。
【方法・結果】膵臓 β 細胞株 INS-1 細胞を STZ 存在下で培養した結果 Redd2 mRNA の発現が増加し、Redd2 ノックダウンによって STZ 誘導性細胞障害が抑制された。STZ によって転写因子 Nrf2 およびリン酸化 p53 のタンパク質レベルは共に核内で増加し、活性化が示唆された。Redd2 プロモーター（−2328～−1）活性は Nrf2 または p53 の高発現により上昇した。このプロモーター中の Nrf2 と p53 の応答配列に変異を導入したベクターを用いたレポーターアッセイおよび ChIP アッセイにより、Nrf2 および p53 の結合サイトを明らかにした。次に全身性 Redd2-KO マウスを作製し、標準食および高脂肪食を摂取させた。その結果、高脂肪食摂取時でのみ Redd2-KO 群で耐糖能が改善されることを見出した。摘出した膵臓を解析したところ、高脂肪食摂取時の Redd2-KO 群における膵臓 β 細胞量の増加が見られた。以上の結果から、Redd2 は酸化ストレス存在下において Nrf2 および p53 によって発現が増加し、細胞死を促進することで膵臓 β 細胞の機能低下に寄与することが示唆された。
【Objectives】Exposure of pancreatic β-cells to oxidative stress (e.g. hyperglycemia) induces β-cell dysfunction and death. Regulated in development and DNA damage response 2 (Redd2) is up-regulated by streptozotocin (STZ), induced oxidative stress, in the pancreatic islets. In this study, we aimed to elucidate the regulatory mechanisms of Redd2 and its roles in pancreatic β-cells under oxidative stress.
【Methods and Results】In INS-1 pancreatic β-cells, STZ increased Redd2 expression, and knockdown of Redd2 attenuated STZ-induced cell dysfunction. Nrf2 and phospho-p53 protein levels were increased in the nucleus by STZ, suggesting that STZ activates these transcription factors. Redd2 promoter (-2328–-1) activity was increased by overexpression of Nrf2 or p53. We showed the binding sites of Nrf2 and p53 in Redd2 promoter, by performing reporter assay using mutant Redd2 promoter and ChIP assay. We generated global Redd2-KO mice and fed them chow or high-fat diet. In high-fat-diet-fed mice, improved glucose tolerance and increased β-cell mass was observed in Redd2-KO mice. These results suggest that Redd2 is increased by Nrf2 and p53 under oxidative stress, which contributes to β-cell dysfunction by promoting cell death.

pancreatic ß-cells, diabetes, oxidative stress

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3I05-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

遺伝子改変マウスを用いた骨格筋における Dnmt3a の役割の解析

Analysis of the role of Dnmt3a in skeletal muscle using gene modified mice

○藤田 真理子[1]、畑澤 幸乃[1]、大藪 葵[1]、大平 悠人[1]、水谷 彩子[1]、石原 健吾[2]、吉岡 潔志[3]、小野 悠介[3]、亀井 康富[1] ([1]京府大・生命、[2]龍谷大農、[3]熊本大・発生)
○Mariko FUJITA[1], Yukino HATAZAWA[1], Mamoru OYABU[1], Yuto OHIRA[1], Sako MIZUTANI[1], Kengo ISHIHARA[2], Kiyoshi YOSHIOKA[3], Yusuke ONO[3], Yasutomi KAMEI[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Ryukoku Univ., [3]Kumamoto Univ.)

【背景・目的】骨格筋は人体最大の組織で体重の約 40%を占める。Dnmt3a は骨格筋で多く発現していることが知られている DNA メチル化酵素であるが、骨格筋における詳しい働きはいまだ完全には明らかになっていない。本研究では Dnmt3a のさらなる役割を理解するために骨格筋特異的に Dnmt3a を過剰発現させた Dnmt3a-Tg マウスを作製し、その表現型を解析することを目的とした。
【方法・結果】はじめに Dnmt3a-Tg マウスの骨格筋における遺伝子発現の網羅的解析(マイクロアレイ解析)を行い野生型のマウスと比べて発現が増加した遺伝子の探索を行ったところ、Dnmt3a-Tg マウスでは Myh7 など遅筋の構成遺伝子が増加していたことが観察された。また、筋断面の免疫組織化学染色を行ったところヒラメ筋において遅筋を構成する Type I 線維の割合が顕著に増加していることが観察された。
遅筋はエネルギー、特に脂質を多く使うことから、次に Dnmt3a-Tg マウスにおいてエネルギー消費量の測定を行った。結果として Dnmt3a-Tg マウスは野生型マウスと比べてエネルギー消費量・脂質消費量が有意に増加していた。Dnmt3a は骨格筋において、Myh7 遺伝子の発現や Type- I 線維の数を増加させることによって、骨格筋の遅筋化に少なからず働きをもっていることが示唆された。
[Introduction] Skeletal muscle is the largest organ in the human body. They can be classified into several fiber types according to the expression of myosin heavy chains. DNA methylation is an epigenetic mechanism regulating gene expression. Dnmt3a (DNA methyltransferase 3a) is known to have high expression in the skeletal muscle, however its functions are still largely unknown. In this study, we have created gene modified mice with skeletal muscle specifically overexpressed Dnmt3a mice (Dnmt3a-Tg) to understand the role of Dnmt3a in skeletal muscle.
[Methods and Results] Expression of Dnmt3a in Dnmt3a-Tg mice was measured by qRT-PCR and western blotting. Microarray analysis was performed to understand comprehensive gene expression in the mice, and qRT-PCR was carried out to confirm the result. To assess various functions in Dnmt3a-Tg mice, immunohistochemical staining, indirect calorimetry, mitochondria content, endurance exercise capacity was observed. As a result, we observed a phenotype of increased rate of type- I red muscle fibers in Dnmt3a-Tg mice. Dnmt3a may play a part in switching muscle fiber type by increasing type- I red fibers.

Skeletal muscle, Transgenic mouse, Dnmt3a

講演番号：3I05-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

肝機能の生理学的解明を目指したヒト肝臓オルガノイド培養技術の開発

Development of human liver organoid culture methodology to elucidate physiological liver function

○久保山 文音、高橋 裕、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Ayane KUBOYAMA, Yu TAKAHASHI, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

肝臓は、糖・脂質代謝や血漿タンパク質の合成、薬物代謝、胆汁の合成など生体の恒常性維持に不可欠な機能を担っており、その分子機構の解明は人々の健康維持・増進のための重要課題である。しかし、肝機能に着目した従来の研究ではヒトと種差のある実験動物や肝細胞機能が極めて低いがん由来の株化細胞、または長期間の培養が困難な初代細胞が主に用いられ、ヒトへの外挿性は限定的であった。本研究では、生体臓器に類似した構造・機能と自己組織化を特徴とする 3 次元の細胞集団であるオルガノイドに注目し、新規ヒト肝臓モデルの構築を目指してヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドの樹立とその機能解析に取り組んだ。まず、ヒト iPS 細胞を分化誘導することで肝臓オルガノイドを作出し、増殖培地と成熟培地の切り替えによってオルガノイドの増殖性や肝細胞としての成熟度を自在にコントロールできる培養系の確立に成功した。次に、成熟させた肝臓オルガノイドのインスリン応答性や核内受容体リガンド応答性を評価し、基本的な肝細胞機能が保持されていることを明らかにした。さらに、株化肝細胞では再現が困難な very-low-density lipoprotein（VLDL）の分泌モデルとしても肝臓オルガノイドが有用であることを示した。今後、ヒト iPS 細胞由来肝臓オルガノイドを活用することで、ヒト肝機能や肝疾患の詳細なメカニズムの解明が進むものと期待される。

The liver plays essential roles in glucose and lipid metabolism, the synthesis of plasma proteins, drug metabolism, and the synthesis of bile. Experimental animals, cancer-derived hepatic cell lines, and primary hepatocytes have been used to investigate hepatic functions; however, they accompany species differences, physiological properties unique to cancer cells, and lot-to-lot variations, respectively. Here, we developed a platform to handle liver organoids, a three-dimensional cell complexity with self-organization capacity, and organ-like structure and function. First, we differentiated human iPS cells into liver organoids and established a method to switch media that controls their proliferation and maturation. Next, we found that matured liver organoids exhibited functional hepatocyte characteristics such as responsiveness to insulin and nuclear receptor ligands. Moreover, we showed that liver organoids secreted very-low-density lipoprotein (VLDL), the phenomenon of which is not recapitulated when using hepatic cell lines. Taken together, the use of human iPS cell-derived liver organoids would contribute to the further elucidation of physiological liver function and its related diseases in humans.

hepatocyte, 3D culture, VLDL

発表責任者：佐藤隆一郎（roysato@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I05-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

Development of Chinese hamster lung (CHL) cell line with suppressed sialylation to express effective biologics

○Amihan Leana Anajao[1], Misaki Ryo[1], Noriko Yamano-Adachi[2], Hiroyuki Kajiura[1], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]Osaka University, International Center for Biotechnology, [2]Osaka University, Graduate School of Engineering)

The recombinant antibody's sugar chain moieties known as glycan play an important role in its efficacy to elicit an immune response. Study shows that removal of glycan chain's terminal end (sialic acid) in an antibody result in higher antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) activity. These activities heighten the antibody's capability to fight off microbes and defective cells. For this reason, a recombinant antibody with higher ADCC and CDC activity is quintessential as a biopharmaceutical product.

To obtain a recombinant antibody with more effective immunogenic capability, we disrupted the expression system's glycan-related gene: cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase (*Cmas*) gene. CMAS protein is an important preparatory enzyme for the addition of terminal sialic acid. The CMAS enzyme converts the sialic acid (NeuAc) to an active form (CMP-NeuAc) that can then be used by the cell to produce a terminal sialic acid glycan. Based on this a cell line with knocked out *Cmas* gene would express a recombinant antibody with higher ADCC and CDC activity, giving it a more effective immunogenic property. Next, to allow for a more affordable recombinant antibodies the cell line that we have established was from the Chinese hamster lung (CHL-YN) cell line. It was developed here in Japan (Osaka University) as such it will consequently have a lower cost due to patent. Additionally, CHL-YN was shown to have higher growth rate compared to commonly used CHO-K1.

To knock out the *Cmas* gene, its exon 2 in CHL-YN was disrupted by CRISPR/Cas9n gene editing. Through genomic DNA PCR analysis and sequencing, two mutants were observed to have a disrupted *Cmas* sequence. To check whether these mutants have less terminal sialic acid, their glycoproteins were analyzed using lectin blotting, enzyme-linked lectin assay (ELLA) and quantified by tagging with 1,2- diamino-4,5-methylendioxybenzen (DMB). The results show that both mutants have a significantly higher exposed terminal galactose corresponding to the observed decreased in terminal sialic acid as compared to the wild type CHL-YN.

All these confirmed that we successfully obtained a mutant CHL-YN cell line with reduced terminal sialic acid in its glycoproteins. Thus, it could be a potential expression system for the production of more effective recombinant antibodies. In addition, this expression system will have the advantage of a higher growth rate and reduced cost in comparison to the CHO-K1 cell line.

Chinese hamster lung cell, antibody, sialylation

発表責任者：Fujiyama Kazuhito（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3I05-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 11:00～ ミーティングルーム I

Ralstonia sp. NT-80 由来ラクトン特異性エステラーゼの熱安定性、温度依存性、及び基質特異性
Thermal stability, temperature dependence, and substrate specificity of lactone-specific esterase derived from *Ralstonia* sp. NT-80

○大森 遥斗[1]、星崎 裕美[1]、横尾 直哉[1]、上村 渉 上村 渉[1]、久保田 和貴[1]、岩間 祐介[1]、月村 亘[1]、赤沼 元気[2]、石塚 盛雄[1] ([1]中央大理工応化、[2]学習院大・理・化学)
○Haruto OMORI[1], Yumi HOSHIZAKI[1], Naoya YOKOO[1], Wataru UEMURA[1], Kazuki KUBOTA[1], Yusuke IWAMA[1], Wataru TUKIMURA[1], Genki AKANUMA[2], Morio ISHIZUKA[1] ([1]Department of Applied Chemistry, Chuo University,, [2]Department of Life Science, Gakushuin University)

エステラーゼは、エステル化合物を酸とアルコールに加水分解する酵素である。また、基質特異性が高く立体選択性を有していることから、医療や食品など様々な分野で広く利用されている。当研究室で扱っている *Ralstonia* sp. NT-80 由来のエステラーゼ（Est80）は、ラクトン化合物に対して特異性を示すが、50 ℃ で活性が低下する。進化分子工学的手法により、アミノ酸置換が 5 つ起こった変異エステラーゼ (mut417) を作製した結果、ラクトン特異性を保持しつつ熱安定性が 11～12 ℃ 改善された。これら 5 つのアミノ酸置換をそれぞれ単独導入した単一変異エステラーゼを作製し、アミノ酸残基の熱安定性への寄与を調べた結果、R29C, R96H, N212D が熱安定性に関与していることが分かり、3 つのアミノ酸置換を行った変異エステラーゼ (mut3)は熱安定性をさらに約 1 ℃ 向上させた。本研究では、wild type (wt) 及び多重変異エステラーゼである mut3, mut417 を精製し、それぞれのラクトン化合物に対する熱安定性、及びメチル基やエチル基などが置換されたラクトン化合物に対する基質特異性を調べることを目的とした。また、単一アミノ酸置換体である R29C, Q82L, R96H, N212D, R286H の酵素によるラクトン化合物の加水分解反応の温度依存性を調べた結果も紹介する。

Esterase is an enzyme that hydrolyzes ester compounds into acids and alcohols. In addition, since it has high substrate specificity and stereoselectivity, it is widely used in various fields such as medical treatment and foods. The esterase derived from *Ralstonia* sp. NT-80 (Est80) handled in our laboratory shows specificity for lactone compounds, but its activity decreases at 50°C. Evolutionary molecular engineering techniques produced a mutant esterase (mut417) with five amino acid substitutions, which improved thermal stability by 11-12°C while preserving lactone specificity. As a result of preparing a single mutant esterase in which each of these five amino acid substitutions was introduced independently and investigating the contribution of amino acid residues to thermostability, it was found that R29C, R96H, and N212D are involved in thermostability. A mutant esterase (mut3) with three amino acid substitutions further improved thermostability by about 1°C. In this study, we purify wild type (wt) and multi-mutation esterases mut3 and mut417, and investigate the thermal stability of each lactone compound and the substrate specificity of lactone compounds substituted with methyl or ethyl groups. The purpose was. In addition, we will also introduce the results of investigating the temperature dependence of the hydrolysis reaction of lactone compounds by the enzymes of R29C, Q82L, R96H, N212D, and R286H, which are single amino acid substitutions.

Gram-negative aerobic true bacterium *Ralstonia* sp. NT-80, Esterase specific activity, Esterase residual activity

発表責任者：大森遥斗（a18.6r3c@g.chuo-u.ac.jp）

講演番号：3I06-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

非昆虫ベースの食餌は、肉食性動物の酸性キチナーゼの構造と機能を変化させる

Non-insect-based diet alters the structure and function of carnivorous acidic chitinases

○田畑 絵理[1,2]、鯉沼 拓海[1]、田山 拓史[1]、樫村 明徳[1]、坂口 政吉[1]、小山 文隆[1] ([1]工学院大先進工、[2]日本学術振興会・特別研究員（PD））
○Eri TABATA[1,2], Takumi KOINUMA[1], Hiroshi TAYAMA[1], Akinori KASHIMURA[1], Masayoshi SAKAGUCHI[1], Fumitaka OYAMA[1] ([1]Kogakuin Univ., [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (PD))

胎盤ほ乳動物の祖先は，昆虫を食べる小さな生物であったが，恐竜の大量絶滅をきっかけに，肉食性動物，草食性動物，雑食性動物といった多様なほ乳類の出現につながったと考えられている。酸性キチナーゼ (Acidic Chitinase, Chia) は，ニワトリ，ブタ，コモンマーモセット (雑食・食虫性) の胃で高発現し，消化器系条件下で昆虫のキチン質を分解するが，イヌ (肉食性動物) とウシ (草食性動物) では, Chia の mRNA およびタンパク質の発現レベルが低く, キチン分解活性が著しく低下していた。今回我々は，活性の高いマウスと低いイヌの Chia 間でキメラ体，変異体タンパク質を作製し，イヌ Chia を活性化させることで，その活性低下の原因アミノ酸の同定を行った。その結果，イヌ Chia のキチン分解活性が，2 アミノ酸置換 (F214 および A216) によって大幅に低下したことを見出した。そして，イヌが属する食肉目 46 種の Chia の配列を解析したところ，イヌ科，スカンク科，マングース科，ハイエナ科を除く 31 種で Chia は偽遺伝子であった。しかし，昆虫を食べる動物の Chia は完全長のキチナーゼをコードし，高いキチン分解活性を示した。これらの結果から，現代でも昆虫を食べる種の Chia は活性が高く，他方，昆虫を食べない種では Chia が機能レベルで不活性化分子へと進化したことを明らかにした。

The ancestor to all placental mammals was a tiny insect-eating creature that evolved after the mass extinction of the dinosaurs. This event opened a niche for diets that led to the emergence of a wide variety of mammals, such as carnivores, herbivores and omnivores. Acidic chitinase (Chia) is highly expressed in the stomachs of insectivorous and omnivorous animals including mouse, chicken and pig and degrade chitin and chitin-containing materials such as shrimp shells and mealworm larvae shells under gastrointestinal conditions. On the other hand, dog (carnivore) and bovine (herbivore) express low levels of Chia mRNA and proteins accompanied by a marked decrease in chitinolytic activity. Here we report that the structure and activity of carnivorous Chia have changed in species with a non-insect-based diet. Our results indicate that two amino acid substitutions (F214 and A216) reduced the activity of Chia in Canidae. Simultaneously, except for Canidae, Chia has evolved into a pseudogene due to the loss of the protein-coding region. In contrast, species that feed on insects retain highly active Chia in Carnivora. These results show that Chia of a species that feed on insects is still active today, whereas Chia in species without insect-based diet has evolved into an inactive molecule.

Acidic Chitinase, Canivora, Chitinase activity

発表責任者：田畑絵理（bq21002@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3I06-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

ネコ酸性キチナーゼ偽遺伝子の活性化

Activation of the cat acidic chitinase pseudogene

○小山 文隆[1]、鯉沼 拓海[1]、田山 拓史[1]、樫村 明徳[1]、坂口 政吉[1]、田畑 絵理[1,2]([1]工学院大・先進工、[2]日本学術振興会・特別研究員（PD））
○Fumitaka OYAMA[1], Takumi Koinuma[1], Hiroshi Tayama[1], Akinori Kashimura[1], Masayoshi Sakaguchi[1], Eri Tabata[1,2] ([1]Department of Chemistry and Life Science, Kogakuin University, [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (PD))

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、カニなどの甲殻類、昆虫、真菌類などの多様な生物の主要な構成成分である。酸性キチナーゼ (acidic chitinase、Chia) は、マウス、ブタ、ニワトリ（雑食性動物）の胃で多量に発現し、胃や腸の条件下で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し、キチン含有生物のキチンを分解する。これに対し、肉食性動物のイヌの Chia は、雑食性動物と比べ、キチンの分解能力がとても低い。さらに、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマでは Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた。本研究ではネコ Chia の偽遺伝子から活性化酵素を作製し、この分子が、酵素活性を失うように進化した道筋とその意義を解明することを目的とした。まず、ネコ Chia 偽遺伝子からタンパク質の読み枠を回復させ、ネコ Chia (Cre-Cat Chia) タンパク質を作製した。しかし、Cre-Cat Chia には活性が認められなかった。次に、Chia 分子の Cys 残基の保存性に注目し、Cys を修正した変異体 (Cys-Cat Chia) を作製したが、不活性のままだった。そこで、キチナーゼ活性が強いミーアキャット Chia との間でキメラ体を作製し、Cys-Cat Chia のキチン分解活性の喪失の原因となる領域を特定した。ミーアキャットの exon 5 と 7 領域がネコ Chia を活性化させ、さらに 5 つのアミノ酸置を導入した Cys-Cat-5 Mu は活性化した。以上の結果は、ネコ Chia 偽遺伝子は、ORF 破壊後に、タンパク質の構造と機能に関与するアミノ酸に変異が導入され、偽遺伝子化した可能性を強く示唆した。

Chitin, a linear polymer of β-1, 4-linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) is a major structural component in crustaceans, insects, nematodes and fungi. In previous reports, we have reported that acidic chitinases (Chia) act as digestive enzymes in mouse, pig and chicken (omnivorous) but not in dog (carnivorous) and bovine (herbivorous). Also, in some carnivorous species such as cat, tiger and puma, Chia is a pseudogene and lost the protein-coding region. Here, we clarified how cat Chia was pseudogenized by activating the enzymatic function. The cat Chia pseudogene was still inactive when restored the open reading frame and matched the number and position of cysteines. Then we created chimeric meerkat-cat enzymes and analyzed the chitinolytic activity of each chimera to identify the regions responsible for the loss of the chitinolytic activity. Five amino acid substitutions at the exon 5 and 7 showed the highest activity at pH 2.0 and achieved 50% activity of the enzyme. Thus, Chia was pseudogenized by the accumulation of mutations in sites related to the conformation and activity of the enzyme.

Acidic Chitinase, Pseudogene, Chitinase activity

発表責任者：小山文隆（f-oyama@cc.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3I06-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

分泌タンパク質生産効率における分子シャペロン共発現とレドックス調節の効果

The effect of chaperone co-expression and ER redox regulation on the secretory protein production

○天方 迪也[1]、由里本 博也[1]、寶関 淳[1,2]、阪井 康能[1] ([1]京大院農、[2]京都先端大・バイオ環境)
○Michiya AMAKATA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Jun HOSEKI[1,2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Advanced Science)

分泌タンパク質の多くは、その構造形成にジスルフィド結合の形成を必要とし、小胞体内で protein disulfide isomerase (PDI) などの分子シャペロンにより正しいジスルフィド結合形成の促進を受けてフォールディングされ、細胞外に分泌される。このような小胞体シャペロンの過剰発現は、小胞体内におけるフォールディング能を向上させ、分泌生産量を増加させることが知られているが、分泌生産効率と小胞体内レドックス状態との相関については十分な知見が得られていない。

本研究では、ヒト培養細胞 HEK293 を宿主として、PDI 及びグルタチオン酸化還元酵素を過剰発現させた際の小胞体レドックス状態と分泌タンパク質の生産量及び活性について解析した。なお、小胞体レドックス状態については、当研究室で開発した小胞体局在型の蛍光レドックスプローブ ERroGFP S4 (Hoseki *et al.*, 2016) を用いて解析した。野生型 PDI の過剰発現は小胞体を酸化的にし、分泌量も低下させた。また、分泌タンパク質の比活性も向上させなかった。一方、PDI のある変異体は、小胞体レドックス状態を変化させずに、分泌量の低下を抑制し、分泌タンパク質の比活性を増加させた。また、グルタチオン酸化酵素の過剰発現は小胞体を少し酸化的とし、分泌量を低下させた一方で、分泌タンパク質の比活性を最も向上させた。さらに、この効果の宿主間における違いについて検討するため、現在、メタノール資化性酵母を生産宿主として同様な解析を行っている。

Most of secretory proteins are folded with disulfide bond formation. Protein disulfide isomerase (PDI) promotes folding of proteins and their proper formation of disulfide bonds in the endoplasmic reticulum (ER). Overexpression of such a chaperone enhances the protein folding ability in the ER and increases the amount of secretory protein production, whereas the relationship between protein folding efficiency and the ER redox state is still unclear. In this study, we analyzed the effect of overexpression of PDI and glutathione oxidoreductases on the ER redox state and the amount of protein production in HEK293 cells. Furthermore, we have investigated differences of these effects in HEK293 and methylotrophic yeast cells as the expression host.

chaperone, secretory protein production, ER redox

講演番号：3I06-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

セルピン病治療薬開発の標的分子模倣体 H338RS-S の構造解析

Structural analysis of the H338RS-S mutant of neuroserpin: a mimic of a target molecule for the development of drugs to treat serpinopathies.

品田 紗智子、○恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
Sachiko SHINADA, ○Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】セルピン蛋白質の変異体がポリマー化して発症する疾患をセルピン病と呼び、認知症(ニューロセルピンの H338R 変異体：以下 H338R)や肺気腫(α_1-アンチトリプシン, COVID-19 重症化にも関与)がよく知られている。セルピンのポリマーは、folding 中間体 M*が分子間でドメインスワップすることにより伸長することから、M*が治療薬開発における標的分子の 1 つとなっている。本研究では、H338R を利用した創薬に有用な M*模倣体の創出と、その分子構造、および薬剤候補について報告する。

【方法と結果】大腸菌封入対から調製した尿素変性 H338R を緩衝液で希釈して refolding させると、Native 型にまで戻れず中間体で folding が停止した。 得られた分子種は凝集しやすく解析に不向きであったため、安定化のための S-S 結合を導入した変異体 H338R/T296C/E343C（以下 $H338R_{S\text{-}S}$）から folding 中間体を調製し、その諸性質を円偏光二色性や蛍光分析、電気泳動法で調べた。その結果、得られた分子種の構造は MD で予測されている M*のそれとよく一致しており、且つ単量体で長時間安定に存在できる、目的に適う模倣体であることが分かった。次に、HDX-MS でより詳細に構造を調べたところ、β-ストランドで構成されるシャッターと呼ばれる領域が開き、反応中心ループが部分的に挿入されていることが示唆された。そこで、開いたシャッターに結合するよう *in silico* スクリーニングで見いだされた薬剤(ZX)との結合を調べたところ、本薬剤はポリマー化を抑止することが明らかとなった。

Serpinopathies result from polymerization of pathogenic mutants of serpins such as the H338R variant of neuroserpin (dementia) and the S/Z variants of α_1-antitrypsin (emphysema and aggravation of COVID-19). Serpin polymers are formed from a late folding intermediate M* *via* domain swapping, and thus M* is a target molecule for the development of drugs to treat the diseases. We successfully prepared a stable folding intermediate mimic of M* useful for drug design from the H338R/T296C/E343C mutant of neuroserpin ($H338R_{S\text{-}S}$). The mimic had a fold that is consistent with M* predicted by MD, in addition stayed in a monomer for several days. HDX-MS analysis suggested that the mimic has an open shutter region and a partially inserted reactive center loop, which are the swapping regions of serpin polymers. An organic compound ZX that potentially binds to the open shutter was found by *in silico* screening, and it inhibited polymerization of neuroserpin.

drug design, dementia, protein aggregation

講演番号：3I06-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

α1-アンチトリプシンを標的とした薬剤開発に有用な熱安定型変異体の創出

Creation of a thermostable active mutant of alpha-1 antitypsin useful for drug design.

○勘澤 良介、綿谷 凌、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
○Ryosuke KANZAWA, Ryo WATATANI, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景】α_1-アンチトリプシン欠乏症は、血漿蛋白質のα_1-アンチトリプシン(AAT)の点変異により発症するミスフォールディング病で、肺気腫や肝硬変を引き起こす。AAT の変異は東アジアでは極めて稀であるが、南欧では 28%(S 変異体:E264V)、北米では 10%(Z 変異体:E342K)の割合で存在し、肺組織の破壊が起こることから、COVID-19 重症化リスクの 1 つとなっている。本疾患の薬物治療は、これまで組換え型 AAT 補充療法が適用されてきたが、COVID-19 パンデミックにより、低分子薬剤のニーズが一気に高まった。【戦略】AAT が属するセルピン族は、Native 構造が準安定で、最安定型である不活性型(Latent 型やポリマー)へ容易に自発転移することから、SBDD には不向きである。セルピン族で唯一、低分子薬剤の開発に成功している PAI-1 では、熱安定型変異体 $PAI\text{-}1_{am}$ を薬剤開発に利用する手法が標準となっている。そこで、AAT についても、同様の熱安定型改変体を調製した。【方法】当研究グループは、ニューロセルピンの熱安定型改変体 NS_{GKI} を創出し、その X 線結晶構造解析にも成功している。ここで得られた構造データと、野生型 AAT の結晶構造を基に、AAT に F189Y/T339E の変異を導入した変異体 AAT_{YE} を調製した。【結果】AAT_{YE} の構造およびトリプシンに対する阻害活性は野生型のそれとよく一致しており、且つ、T_m 値は狙い通り 5.8℃上昇した。現在、AAT_{YE} と薬剤候補との共結晶化を実施中である。この熱安定型改変体創出手法は、PAI_{am} を獲得したランダムスクリーニングとは異なり、他のセルピンにも応用できる画期的なものである。

α_1-antitrypsin (AAT) is a plasma serpin, and some of its variants (e.g., E264V and E342K) cause AAT deficiency, whose patients are estimated more than 3.4 million worldwide. The pathogenic variants result in lung disorder and thus higher risk for severe illness from COVID-19. Since 2020, needs for therapeutic drugs of AAT deficiency are dramatically growing, while supply of existing therapeutic recombinant AAT is limited. To meet the needs, the development of small-molecule drugs is essential. Serpins including AAT have the meta-stable native conformation and spontaneously transform into inactive and more thermostable conformers (the latent form and polymers), thereby difficulty in SBDD. The only successful examples of drugs binding serpin, PAI-1 inhibitors, are developed by use of a thermostable active mutant of PAI-1. Here we report creation of a novel thermostable mutant of AAT (AAT_{YE}) useful for SBDD. This mutant had the same physiological activity but a 5.8ºC higher T_m as compared with the wildtype. Our strategy is based on tertial structures of serpins and applicable across the board serpins, which have high structural-homology among the family.

SBDD, COVID-19, antitrypsin

発表責任者：勘澤良介（kanzawa21@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3I06-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

小胞体ストレスセンサーの会合状態分布を介した応答制御機構の研究

Regulation mechanism of stress signaling via oligomeric state of endoplasmic reticulum stress sensor

○松崎 元紀[1,2,3]、横山 武司[4]、次田 篤史[4]、金村 進吾[5]、田尻 道子[6]、明石 知子[6]、齋尾 智英[3]、稲葉 謙次[2]、奥村 正樹[1] ([1]東北大学際研、[2]東北大多元研、[3]徳島大先端酵素研、[4]東北大生命、[5]関学大理、[6]横浜市大生命医)

○Motonori MATSUSAKI[1,2,3], Takeshi Yokoyama[4], Atsushi Tsugita[4], Shingo Kanemura[5], Michiko Tajiri[6], Satoko Akashi[6], Tomohide Saio[3], Kenji Inaba[2], Masaki Okumura[1] ([1]FRIS, Tohoku Univ., [2]IMRAM, Tohoku Univ., [3]Tokushima Univ., [4]Tohoku Univ., [5]Kwansei Gakuin Univ., [6]Yokohama-city Univ)

哺乳動物の小胞体は、インスリンや IgG のような分泌タンパク質を生産するオルガネラであるが、外的な環境変化や許容量を超えた分泌タンパク質の生産などによって、ミスフォールドタンパク質を蓄積してしまうことがある。ミスフォールドタンパク質の蓄積 (小胞体ストレス) は、神経変性疾患などの原因となるため、細胞は分子シャペロンの量や分解系の活性を制御する小胞体ストレス応答機構 (UPR) を備えている。UPR の活性は小胞体ストレスの度合いに応じて調節されているが、ストレスの度合いを感知して核に伝えるしくみは不明だった。

IRE1 は小胞体ストレスを感知する主要なセンサーの一つとして発見されたが、ストレス下で会合し UPR のシグナルを発信する。このときの会合状態には諸説があり、未だ議論に結論が出ていない。本研究では、ストレスの度合いと IRE1 の会合の度合いの関連を電気泳動、質量分析、透過型電子顕微鏡などによって調査した。その結果、IRE1 はミスフォールドタンパク質や分子間ジスルフィド結合の量に応じて、その会合状態を変化させることがわかった。この会合状態の変化は、IRE1 がストレスの度合いを感知するしくみの一端だと考えられる。

The endoplasmic reticulum (ER) of mammals is an organelle that produces secretory proteins such as insulin and IgG, but external environmental changes or the production of secretory proteins in excess of the acceptable amount can lead to the formation of misfolded proteins. Since the accumulation of misfolded proteins (ER stress) is a cause of neurodegenerative diseases, cells have an unfolded stress response (UPR) mechanism that regulates the amount of molecular chaperones and the activity of the degradation system. Although the activity of UPR is regulated according to the degree of ER stress, the mechanism by which UPR senses the degree of stress and transmits it to the nucleus was unknown.

IRE1, which was discovered as one of the major ER stress sensors, is activated through oligomerization under stress and transmits UPR signals. There are some hypotheses on the oligomeric state at this activation, and the actual oligomeric state is still unknown. In this study, we investigated the relationship between the degree of stress and the degree of IRE1 oligomerization by electrophoresis, mass spectrometry, and transmission electron microscope. The results showed that IRE1 changes its oligomeric state depending on the amount of misfolded proteins and intermolecular disulfide bonds. This change in the oligomeric state may be a part of the mechanism by which IRE1 senses the degree of stress.

endoplasmic reticulum, unfolded protein response, disulfide bond

発表責任者：松崎元紀（matsusaki@tohoku.ac.jp）

講演番号：3I06-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

ALS 原因遺伝子産物 TDP-43 の定量的解析を目的としたモデル培養細胞の開発

Cell culture models for quantitative analysis of TDP-43, a product of a causative gene for ALS

○舟橋 里帆、高原 照直、牧 正敏、柴田 秀樹 (名大院・生命農)
○Riho FUNAHASHI, Terunao TAKAHARA, Masatoshi MAKI, Hideki SHIBATA (Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

筋萎縮性側索硬化症（ALS, amyotrophic lateral sclerosis）は、運動神経の機能が進行的かつ不可逆的に損なわれ、死に至る難病である。TDP-43（TAR DNA-binding protein 43）は、主に核に局在する RNA 結合タンパク質であり、その遺伝子 *TARDBP* の複数の変異が ALS の発症に関わる。*TARDBP* やその他の ALS 関連遺伝子の変異をもつ ALS 患者の神経細胞では、TDP-43 が細胞質に蓄積し、異常な凝集体が形成される。TDP-43 の異常が ALS の症状を引き起こし、細胞間での異常な TDP-43 の伝播によって病態が進行すると考えられている。

本研究では、TDP-43 が関与する神経変性の進行過程を解明することを目的とし、細胞内外の TDP-43 を定量可能なモデル細胞を構築した。具体的には、深海エビ由来発光酵素の短いペプチド（HiBiT）を付加した TDP-43（HiBiT-TDP-43）を培養細胞に恒常的に発現させた。神経変性の進行過程における特徴的な TDP-43 の異常な細胞内局在や機能を模すために、核局在化シグナル配列および RNA 結合領域に変異を持つ TDP-43 も同様に発現させた。これらの細胞内発現量とエクソソーム画分を含む細胞外への分泌量を定量した結果、野生型 TDP-43 と変異体 TDP-43 では、分泌割合と細胞内での分解速度が異なることが示された。現在、変異体 TDP-43 の分解の分子機構に関する解析を進めている。

ALS (amyotrophic lateral sclerosis) is a fatal and progressive disease that causes selective death of motor neurons. TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) is an RNA-binding protein mainly localized in the nucleus. In neurons of ALS patients with mutations in the *TARDBP* gene, which codes for TDP-43, and in other ALS-associated genes, TDP-43 typically shows mislocalization and aggregation in the cytoplasm. Misfolded TDP-43 has been reported to be secreted and propagated among transmitted cells in exosome-dependent and -independent manners, leading to the progression of neurodegenerative pathology.

In this study, we established cultured cell lines that constitutively express TDP-43 or its mutants tagged with a small fragment of nanoluciferase (HiBiT) to measure the protein levels of HiBiT-TDP-43 in the cell extracts and the conditioned medium including the exosomal fraction.

As a result, the rate of extracellular secretion and intracellular degradation differed between wild-type and mutants of TDP-43. The molecular mechanisms of degradation of mutated TDP-43 are under investigation.

amyotrophic lateral sclerosis, TDP-43, exosome

発表責任者：舟橋里帆（manykillifish@gmail.com）

講演番号：3I06-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

「基質取り込みゲート」に着目した薬剤輸送体(ABCB1)と脂質輸送体(ABCB4)の機能分化メカニズムの解明

Elucidation of functional differentiation between drug transporter(ABCB1) and lipid transporter(ABCB4) focusing on "substrate entry gate"

○上原 翔[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[2]、木村 泰久[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Kakeru UEHARA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS., Kyoto Univ.)

ABCB1(ATP binding cassette subfamily B1)は様々な構造の脂溶性化合物を輸送し、がんの多剤耐性獲得や投与薬物の体内動態に関わる膜タンパク質である。一方で、ABCB4 はホスファチジルコリン(PC)を胆汁中に輸送し、界面活性作用の強い胆汁酸から胆管細胞を保護する。ABCB1 と B4 のアミノ酸配列の類似性は 86 %と非常に高いにもかかわらず、その機能は大きく異なる。本研究は機能分化に関わるアミノ酸残基を同定することを目的した。

本研究では、ABCB1 のホモログ CmABCB1 の構造を参照し、基質をタンパク質内部へ取り込むための領域「基質取り込みゲート」に着目した。ABCB4 の「基質取り込みゲート」関連領域を ABCB1 の対応する領域に入れ替えたキメラタンパク質を作製し、薬剤排出能を獲得したか調べた。フローサイトメーターを用いた薬剤排出活性測定により、キメラタンパク質が ABCB1 の蛍光基質 rhodamine 6G をわずかに輸送できることが分かったため、「基質取り込みゲート」関連領域の中に機能分化に関わる残基が存在することが分かった。また、rhodamine 6G の輸送が ABCB1 の他の基質 paclitaxel や actinomycin D で阻害されたことから、このキメラは ABCB1 のように多剤輸送能を保持することが分かった。以上より「基質取り込みゲート」が機能分化に重要であることが示された。

ABCB1 transports structurally unrelated hydrophobic compounds and related to the acquisition of multidrug resistance to cancer cells and pharmacokinetics. ABCB4 transports phosphatidylcholine and protects cholangiocytes from bile acid. Despite those two transporters show high (86%) similarity in amino acid sequence, the function of these two transporters are varied. The aim of this study is to identify key region for functional differentiation.

In this research, we focused on “substrate entry gate”. We constructed ABCB4 mutants whose regions related to “substrate entry gate” was exchanged for those of ABCB1 and examined whether these chimera mutants can transport drugs. Chimera mutants showed weak transport activity to rhodamine 6G. Moreover, the transport of rhodamine 6G was inhibited by other transport substrates (paclitaxel and actinomycin D) of ABCB1. These results suggest that substrate entry gate is important for functional differentiation.

ABC transporter, drug, lipid

発表責任者：上原翔（kakeru.quality19950908@gmail.com）

講演番号：3I06-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

ナノディスク再構成系を用いたヒト MDR1 機能解析手法の開発

Development of a method for functional analysis of human MDR1 using nanodisc

○辻 雪奈[1]、植田 和光[2]、木岡 紀幸[1]、木村 泰久[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS）
○ Yukina Tsuji[1], Kazumitsu Ueda[2], noriyuki kioka[1], yasuhisa kimura[1] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS., Kyoto Univ.)

【背景・目的】MDR1(ABCB1、P-glycoprotein)は、ABC タンパク質ファミリーに属する能動輸送体で、ATP の結合と加水分解に伴う構造変化により様々な疎水性化合物を細胞から排出する。MDR1 は、脳や小腸、腎臓などに多く発現し、これらの臓器や生体を環境中の有害な化合物から保護する。先行研究では、脂質二重膜中のコレステロールが、MDR1 の輸送基質に対する K_M を減少、または V_{MAX} を増加させることで、MDR1 の基質輸送効率を上昇させることが示唆されたが、その機構の詳細は未だ不明である。本研究では、円盤状人工脂質二重膜であるナノディスクへの再構成系を用いて、MDR1 活性誘導におけるコレステロールの役割を解明することを目的とした。
【方法・結果】MDR1 の輸送活性は、ATP 結合、加水分解と連動するため、ATP 加水分解活性は輸送を評価する有用な指標となる。本研究では、ナノディスクに MDR1 を再構成し、ATP 加水分解活性測定を行って MDR1 の活性を評価した。まず、輸送基質による ATP 加水分解活性の誘導が見られるかを解析したところ、ナノディスク中でも輸送基質による誘導が観察され、機能的な状態で再構成できていることが確認された。次に、MDR1 活性に対するコレステロールの効果(輸送基質の K_M の減少及び V_{MAX} の増加)がナノディスク中において再現できる条件を探索し、ナノディスクの脂質組成によってコレステロールの影響が異なる、すなわち脂質組成がコレステロールによる活性制御に重要であることを明らかにした。現在、ナノディスクを用いた MDR1 の熱力学的解析に取り組んでいる。

MDR1(ABCB1, P-glycoprotein) transports various hydrophobic compounds from cells by structural change with ATP binding and hydrolyzation and protects our bodies. Previous studies have shown that cholesterol increases the substrate-dependent ATPase activity of MDR1 by changing K_M and V_{MAX} for transport substrates. However, the regulation mechanism by cholesterol is still unclear. The aim of this study is to clarify the mechanism by using nanodisc reconstitution system.

We reconstituted MDR1 into artificial lipid bilayer nanodisc and analyzed ATPase activity. MDR1 reconstituted in nanodisc showed stimulation of ATPase activity with transport substrates. This suggests that nanodisc can be used for functional characterization of MDR1. During optimization of lipid composition of nanodisc, we found that the effect of cholesterol on ATPase activity depends on lipid used for reconstitution. Currently, we are working on thermodynamic analysis of MDR1 using nanodisc.

ABC protein, nanodisc, cholesterol

講演番号：3I06-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:00～ ミーティングルーム I

昆虫味覚受容体のリガンド結合およびチャネル開閉を説明する構造モデルの構築
Structural model for ligand binding and channel opening of an insect gustatory receptor
○森永 敏史[1]、永田 宏次[1]、伊原 さよ子[1]、新村 芳人[1,2]、佐藤 幸治[1]、東原 和成[1] ([1]東大農、[2]宮崎大農)
○Satoshi Morinaga[1], Koji Nagata[1], Sayoko Ihara[1], Yoshihito Niimura[1,2], Koji Sato[1], Kazushige Touhara[1] ([1]UTokyo, [2]Miyazaki Univ.)

昆虫は味覚受容体である gustatory receptor（GR）を介して環境中の味物質を受容し、摂食するかどうかの選択を行っている。カイコの GR 遺伝子の 1 つである BmGr9 は D-fructose をリガンドとして開閉する陽イオンチャネルとして機能する。今回、我々は BmGr9 の立体構造モデルを構築し、チャネルポアや D-fructose 結合領域を推定した。生化学的手法や 1 分子イメージングを用いた解析の結果、BmGr9 の膜トポロジーや多量体構造が嗅覚受容体（OR）と類似していたため、OR のクライオ電顕構造を基にし、ホモロジーモデリングの手法を用いて BmGr9 のモデルを構築した。構築したモデルの妥当性を検証するため、BmGr9 の機能に重要な寄与をもつことが予想されるアミノ酸残基に対して部位特異的変異導入を行い、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた強制発現系により機能解析を行った。その結果、7 番目の膜貫通領域（TM7）がチャネルポアを構成し、チャネル開閉の制御に関わっていることが示唆された。また、TM2~4 と TM6 によって構成される細胞外側に開いたポケットが D-fructose 結合領域を構成していることが示唆された。さらに、BmGr9 のモデルと D-fructose の構造を用いてドッキングシミュレーションを行い、BmGr9 のリガンド結合様式を推定した。以上の結果を統合し、BmGr9 に D-fructose が結合してチャネルポアが開口するまでの構造変化の流れを提唱した。今回の我々の研究は、昆虫 GR の構造と機能を結びつける最初の報告である。

Insect gustatory receptors (GR) play a role in sensing tastants. One of silkworm GRs, BmGr9, functions as a D-fructose-gated cation channel receptor. Currently we present a structural model for a channel pore and a D-fructose binding site in BmGr9. Since biochemical and a single-molecular imaging data suggest that the membrane topology and the oligomeric state of BmGr9 appear to be similar to those of insect odorant receptors (OR), a homology model of BmGr9 was constructed based on the cyro-EM structure of an OR. Site-directed mutagenesis data suggests that the transmembrane (TM) region 7 forms channel pore and controls channel gating. The model also suggests that a pocket formed by TM 2–4 and 6 constitutes a D-fructose binding site. Mutagenesis experiments in combination with docking simulations suggest the binding mode of D-fructose. Integrating our results, we propose a conformational change that leads to channel opening upon D-fructose binding. Our current findings are the first report that associates functions with structures of insect GRs.

insect, gustatory receptor, structure

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I08-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

新規 *N*-アシルドーパミン合成酵素の発見

Identification of a novel *N*-acyl-dopamine synthase

○前田 萌羽[1]、前本 佑樹[1]、青木 元秀[1]、梅村 知也[1]、吉田 稔[2,3]、伊藤 昭博[1,2]([1]東薬大・生命科学、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]東大院・農生科・応生工)
○ Moeha MAEDA[1], Yuki MAEMOTO[1], Motohide AOKI[1], Tomonari UMEMURA[1], Minoru YOSHIDA[2,3], Akihiro ITO[1,2] ([1]Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [2]Chem. Genomics, RIKEN CSRS, [3]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

痛み受容体のリガンドとして知られているドーパミンと脂肪酸のアミドである *N*-アシルドーパミン (以下、AcylDA) は、当研究グループによるスクリーニングにより HIF-1α を安定化する内在性代謝物として新たに同定された。AcylDA の生物活性は既報のがん代謝物である 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) と類似しており、AcylDA もがん代謝物として働く可能性があるが、その詳細は不明である。 AcylDA の生理機能を解明するためにはその生合成経路を明らかにする必要があるが、ヒトのドーパミンアシル化酵素は見つかっていない。そこで本研究は、ドーパミンアシル化酵素の同定を目的にした。まず、ドーパミンアシル化酵素が発現しているモデル細胞を探すため、AcylDA の元になるドーパミン添加により HIF-1α が安定化する細胞を探したところ、中枢神経腫瘍細胞である U251 細胞を見出した。U251 細胞にアシル基転移活性をもつ候補酵素を発現させ、産生される AcylDA 量を LC-MS/MS により測定した。その結果、PLAAT (ホスホリパーゼ A/アシル基転移酵素)ファミリーメンバーの 1 つが細胞内の AcylDA 量を劇的に増加させることを見出した。加えて、大腸菌から精製したリコビナント PLAAT タンパク質に、*in vitro* でドーパミンに対するアシル基転移酵素活性があることを確認した。以上の結果より、リン脂質に対するアシル基転移酵素として知られていた PLAAT が、ヒトのドーパミンアシル化酵素として機能することを明らかにした。

We previously identified *N*-acyl-dopamines (AcylDAs), which had been known as ligands for TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1), as endogenous metabolites that stabilize HIF-1α. Since their biological activities resemble those of a known oncometabolite, 2-hydroxyglutarate (2-HG), AcylDAs may also act as oncometabolites. Although it is necessary to elucidate the biosynthetic pathways of AcylDAs for understanding their physiological functions, dopamine acyltransferases have not been reported in human. In this study, therefore, we aimed to identify human dopamine acyltransferases. We identified human glioblastoma U251 cells that increased the amount of AcylDAs and subsequent stabilization of HIF-1α by dopamine supplementation, suggesting that U251 cells express dopamine acyltransferases. Using U251 cells as a model cell line, we found that one of PLAAT (phospholipase A/acyltransferase) family members dramatically increased the amount of AcylDAs in cells. *In vitro* acyltransferase assay revealed that recombinant PLAAT protein purified from *E. coli* possesses acyltransferase activities against dopamine. These results suggest that one of the human PLAAT members, known as an acyltransferase for phospholipids, functions as a dopamine acyltransferase.

metabolite, acyltransferase, dopamine

講演番号：3I08-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

ナトリウム利尿ペプチドが塩味の行動応答に及ぼす影響

Effects of Natriuretic peptide on behavioral responses to salt taste solutions in mice

○菅原 友佳[1,2]、高井 信吾[1]、川端 由子[1,3]、岩田 周介[1,4]、渡邊 雄[1,5]、尾池 麻未[1,6]、平山 彩夏[1,7]、實松 敬介[1,4,8]、田畑 正志[2]、重村 憲徳[1,4] ([1]九大・院歯・口腔機能解析学、[2]九大・院農・家畜生体機構学、[3]九大・院歯・口腔機能分子科学、[4]九大・五感応用デバイス研究開発センター、[5]九大・院歯・義歯補綴科、[6]九大・院歯・口腔総合診療科、[7]九大・院歯・矯正歯科、[8]九大・OBT 研究センター)
○ YUKA SUGAWARA[1,2], SHINGO TAKAI[1], YUKO KAWABATA[1,3], SHUSUKE IWATA[1,4], Yu Watanaba[1,5], ASAMI OIKE[1,6], AYAKA HIRAYAMA[1,7], KEISUKE SANEMATSU[1,4,8], SHOJI TABATA[2], NORIATSU SHIGEMURA[1,4] ([1]Dept Oral Neurosci., Grad Sch Dent Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [2]Lab Functional Anatomy., Grad Sch Biosource and Bioenvironmental Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [3]Dept Aging Science and Pharmacology., Grad Sch of Dent Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [4]R&D Cent for Five-Sense Devices, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [5]Dept Implant and Rehabilitative Dentistry., Grad Sch of Dent Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [6]Dept Interdisciplinary Dentistry., Grad Sch of dent Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [7]Orthodontics and Dentofacial Orthopedics., Grad Sch of dent Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan, [8]OBT Center, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan)

味覚感受性は体内の栄養状態に応じて最適化され、必要な栄養素の効率的な摂取を可能にしている。このダイナミックな味覚の調節系には様々なホルモンの関与が示唆されている。本研究では、体内 Na^+濃度や血圧の恒常性維持に重要な役割を担うナトリウム利尿ペプチド（NP）が塩味感受性調節に関与すると予想し、その末梢味覚器における発現と機能を探索した。RT-PCR の結果、マウス味細胞において全ての NP サブタイプ（ANP、BNP、CNP）の mRNA は検出されなかった。一方、NP 受容体（NPRA、NPRB、NPRC）の mRNA は全て発現していることがわかった。中でも CNP 受容体である NPRB の発現は味蕾特異的であり、ENaC-α（塩味受容体）と共発現していることが免疫染色により明らかとなった。さらに、NP シグナリングの味感受性に対する影響を検討するために、NPRB のリガンドである vosoritide を皮下投与したマウスを用い、short-term lick test（10 秒）と二瓶選択嗜好試験（2 分）を行った。その結果、vosoritide 投与群ではコントロール群と比べて、塩味に対する行動応答が特異的に抑制された。以上の結果から、体内に Na^+が過剰に存在する時には、心臓や脳から循環血液中に分泌された NP が、味細胞に発現する NP 受容体を活性化し、塩味感受性を調節している可能性が示唆された。

Taste sensitivity is modulated in response to the animal's nutritional status, allowing the demand-driven nutrient intake. In recent years, various hormones are suggested to be involved in these dynamic taste modulation. In this study, we explored the possibility that natriuretic peptide (NP), which is secreted from the heart or brain and plays a substantial role in the maintenance of the whole body Na^+ homeostasis and blood pressure, may also work as an important modulator for the peripheral salt taste sensitivity. In the RT-PCR experiments, the expression of all NP subtypes (ANP, BNP, and CNP) mRNA were not observed in the taste cells of wild-type mice. On the other hand, NP receptors (NPRA, NPRB, and NPRC) were expressed in the taste cells. Noteworthy, NPRB (CNP receptor) expression was taste cell-specific and co-localized with ENaC-α (salt taste receptor) in the immunohistochemical experiments. Further, the mice with subcutaneous injection of vosoritide (NPRB ligand) exhibited the significantly suppressed behavioral responses specifically to salt taste solutions but not to others (sweet, umami, bitter and sour) in the short-term lick test (10 seconds) and the two-bottle preference test (2 minutes). These results suggest that NP in blood circulation may activate NP receptors on taste cells and modulate salt taste sensitivity.

taste, physiology, natriuretic peptide

発表責任者：菅原友佳（sugawara.yuka.606@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3I08-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

食物新奇性恐怖による摂食行動制御機構の組織学的解析

Analysis of brain regions regulating feeding behavior by Neophobia.

○山本 航史、喜田 聡（東大院）
○Koji YAMAMOTO, Satoshi KIDA (Tokyo Univ.)

食嗜好性（食物価値）は経験依存的に変化する。マウスでは高嗜好性の食物であっても初体験の場合には警戒され、食経験後に摂取量が増加する（新奇性恐怖）。しかし、新規食物の記憶が新奇性恐怖を解消する機構は未だ不明である。本研究ではマウス食物新奇性恐怖課題を用いて、高嗜好性食物の初回提示と再提示後に活性化する脳領域を比較することで、新規食物の摂食後に食行動変化を誘導する脳領域の同定を試みた。1 日 1 回の摂食制限に習慣づけ後、通常飼料、新規食物としてチーズまたはクッキーを 30 分間給餌し（Test1）、この 24 時間後に Test1 と同じ食物を 30 分間再給餌した（Test2）。Test1 と Test2 の 60 分後の各脳領域の c-fos 陽性細胞を免疫組織染色により解析した。新規食物の摂食量は Test2 では Test 1 よりも有意に多くなり、また、通常飼料に比べて Test1 では少なく、Test2 では多くなったことから、Test1 では新奇性恐怖が観察され、Test2 ではこの解消が認められることが示唆された。扁桃体 CeA 領域ではチーズ群とクッキー群共に Test1 と Test2 後に通常飼料群よりも c-fos 陽性細胞が有意に多く観察され、新規食物の初回と再提示に活性化されることが示唆された。従って、CeA 領域が新規食物の記憶形成と想起に関与することが示唆された。クッキー群の眼窩前頭前野では Test1 においてのみ c-fos 陽性細胞数の増加が観察されたことから、この領域は新規食物の認識に関与することが示唆された。

Food preference (food value) changes feeding experience-dependently. In mice, even high palatability foods are vigilant in the case of first experience, and intake increases after food experience (Neophobia). As first a step to understand unknown mechanisms for extinction neophobia due to memory of novel food, we are trying to identify the brain region that induces feeding behavior changes after feeding novel foods using the neophobia task. After habituating, normal food, cheese or cookies as novel food were fed for 30 minutes (Test1), and after 24 hours the same food as Test1 was re-fed for 30 minutes (Test2). The amount of novel food intake was significantly higher in Test2 than in Test1. In the central amygdale (CeA) region, c-fos positive cells were observed significantly more novel food groups than in the normal food group, suggesting that it was activated for the first time and re-presentation of novel foods. In the orbital prefrontal cortex region of the cookie group, c-fos positive cells were observed significantly more only in Test1.

Neophobia, Feeding behavior, C-fos

講演番号：3I08-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

新規食物摂食時の食記憶と摂食行動を制御する神経ネットワーク
Brain networks for regulation of memory formation and feeding behaviors by novel food
○福山 雄大、喜田 聡（東大農）
○Yudai FUKUYAMA, SATOSHI KIDA (The university of Tokyo.)

食習慣は食経験（食記憶）と経験依存的な食嗜好（食物価値）変容により形成されるが、その生物学的メカニズムは不明である。食物新奇性課題では未知食物に対する新奇性恐怖が観察され、経験依存的な摂食行動変化の観察が可能となる。一方、長期記憶形成に必要となる遺伝子発現を指標にして記憶形成を制御する脳領野を同定することが可能である。我々は、食物新奇性課題を用いて、食記憶に基づく摂食行動変化機構を解析することを目的として、食記憶エングラム（記憶貯蔵細胞）を構成する神経ネットワークの網羅的な同定を試みている。絶食後のマウスにチーズを 30 分間給餌し(トレーニング)、この 24 時間後にチーズを再び 30 分間給餌すると(テスト)とその摂食量が有意に増加したことから、新規食物の摂食経験により摂食量が増大すること、すなわち、新奇性恐怖が認められた。そこで、食記憶エングラムのネットワークを同定することを目的として、免疫組織染色法を用いて神経活動依存的に発現誘導される c-Fos 発現を指標にして新規餌摂食時に活性化される脳領域を同定した。通常飼料群に比べて、チーズ摂食群では前頭前野 PL 領域、嗅周皮質 PRh、島皮質 IC、海馬 CA1 領域、分界条床核 BNST、扁桃体中心核、Parasubthalamic nucleus などで有意な c-fos 陽性細胞の増加が観察された。さらに、in silico 解析を用いて c-Fos 発現陽性細胞数の相関性に基づいて領野間の機能的結合を評価した結果、チーズ群では前頭前野 PL 領域を中心としたネットワークが形成されていることが明らかとなった。従って、新規食物（チーズ）摂取時に前頭前野を中心とした食記憶エングラムが構築されることが初めて示唆された。

We purposed to understand mechanisms of neophobia from the view of memory engrams of feeding novel food. We tried to identify brain regions activated in response to feeding cheese as a novel food by measuring the expression of c-Fos, a marker of activity dependent gene expression. Novel food group showed significant increases of c-Fos-positive cells in medial prefrontal cortex PL region, perirhinal cortex , insular cortex, central nucleus of the amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, Hippocampus CA1 and parasubthalamic nucleus compared to the normal food group. The results of in silico analysis for functional connectivity based on the c-Fos expression showed that PL centered neural networks were formed in the novel food group. Thus, it was suggested that a food memory engram centered in the prefrontal cortex is constructed during the ingestion of a novel food (cheese).

feeding, memory, prefrontal cortex

発表責任者：福山雄大（fukuyama@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I08-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

乳児に特徴的な体臭成分による母親のオキシトシン分泌促進効果

Odorous substances emitted by infants facilitate secretion of maternal oxytocin

○平澤 佑啓[1]、白須 未香[1]、岡本 雅子[1]、東原 和成[1,2]（[1]東大農、[2]東大ニューロインテリジェンス国際研究機構）
○Yukei HIRASAWA[1], Mika SHIRASU[1], Masako OKAMOTO[1], Kazushige TOUHARA[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tokyo WPI-IRCN)

ヒトにおいて乳児の頭部の匂いが親に愛着を持って嗅がれることや、乳児が着用した衣服の匂いが、経産女性の脳の報酬系に関わる領域を賦活させることが知られている。これらの知見から、乳児の体臭は成人の体臭とは異なること、乳児特徴的な体臭成分が経産女性に対して何らかの生理効果を持つことが予想される。そこで、我々は、乳児と母親の頭部から発せられる成分をガスクロマトグラフ質量分析計を用いて比較した。その結果、母親よりも乳児から有意に多く発せられる物質を複数同定することができた。次に、これらの乳児特徴的な物質が経産女性の生理状態を変化させるのか調べた。養育行動に関わるホルモンとして知られている、オキシトシンに注目した。乳児特徴的な物質を経産女性に呈示し、尿中オキシトシンの量の変化を調べた。対照として、乳児と母親の頭部から発せられる量に差がない物質を混合したものと、成人の汗の匂い成分を用いた。その結果、乳児特徴的な物質が尿中オキシトシンの量を有意に増加させたのに対し、対照物質ではオキシトシンの増加が認められなかった。以上より、乳児の頭部から特徴的に発せられる物質が経産女性のオキシトシン分泌を増加させることが示され、乳児体臭が母親の育児行動を促進することが示唆された。

It has been shown that sniffing infants' odors activates the reward-related areas of a mother's brain. In our previous study, we found that mothers sniff their infants' heads for affective reasons in their daily child-rearing. These findings suggest that infants emit substances different from mothers, and exert some effects on mothers through their odors. To test this hypothesis, we analyzed infant odors, and identified substances that were emitted significantly more in infants' heads than those of mothers. We then examined the effects of odors on secretion of oxytocin, a neurotransmitter and a hormone known to be crucial in maternal behaviors. Substances characteristic to infants were mixed at the same ratio as that detected in infants, and used as an infant odor sample. As controls, we used a mixture of substances which were emitted by both infants and mothers at a similar amount, and a model mixture of adult axillary odors. We found that smelling infant odor significantly increased the amount of urinary oxytocin in mothers, while controls did not. These results showed that infants emit characteristic substances, which trigger secretion of oxytocin in mothers, and may facilitate maternal behaviors.

Olfactory, Infant, Oxytocin

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I08-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

ネコ尿特異的に分泌される分岐脂肪酸組成の家系解析

Comparison of feline urinary branch fatty acids ratio among their siblings and parents

○市沢 翔太、上野山 怜子、宮崎 雅雄 (岩手大農)
○Shouta ICHIZAWA, Reiko Uenoyama, Masao Miyazaki (Iwate Univ.)

ネコはとても人気のある伴侶動物であるが、その尿はイヌやウサギなど他の伴侶動物に比べて特異な不快臭を有するため、しばしば問題になる。我々の先行研究により、この不快臭の原因物質として、他の哺乳動物では報告のない中鎖の脂肪酸に、メチル基やエチル基といった分岐を有するものを同定し、ネコの尿には複数の分岐脂肪酸が豊富に含まれていることを明らかにした。また、この尿中分岐脂肪酸は個体ごとに組成比が異なることも見出したが、ネコ尿中分岐脂肪酸の組成に家系間や親子間の関係があるのか分かっていなかった。本研究では三つの家系に由来するネコの尿中の分岐脂肪酸の組成比に家系ごとの特徴があるか、また親子、兄弟間で分岐脂肪酸の組成比に類似性がみられるか検証した。まず全てのネコから新鮮な尿を集め、尿から Bligh & Dyer 法で脂質を抽出し、メチルエステルに誘導体化した。そして二次元ガスクロマトグラフ質量分析計（GC×GC/MS）で脂肪酸の分子種を分析した。得られた結果を用いて多変量解析を行い、その組成にどのような傾向があるか解析し家系間と兄弟間の関係を明らかにした。

Domestic cats are popular companion animals whose urine has unpleasant and distinct smell compared to other companion animals such as dogs and rabbits. Our previous study demonstrated that the feline urine contain the medium chain fatty acids with methyl and ethyl chains (BFA) that are not detectable in mammals other than cats. We also showed that there are individual differences in urinary BFA compositions among cats. However, little is known whether BFA compositions are related to kinship. The aim of this study is to clarify if BFA compositions in feline urine are similar among their siblings and/or parents. Lipids were extracted from fresh cat urine by the Bligh & Dyer method, and then derivatized to form the methyl esters. GC×GC/MS analyzed contents of the derivatized fatty acids in each cat. The multivariate statistics of individual BFA compositions were carried out to clarify that relationship among siblings and parent or other households.

cat, urine, fatty acids

発表責任者：市沢翔太（a0218002@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3I08-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

ネコがマタタビやキャットニップの葉を舐め噛む行動は蚊への化学防御効果の促進に寄与する
Licking and chewing of silver vine and catnip contributes to enhance chemical defense against mosquitoes in cats

○上野山 怜子[1]、宮崎 珠子[1]、Hurst Jane. L.[2]、安立 昌篤[3,4]、西川 俊夫[3]、宮崎 雅雄[3]([1]岩手大総合科学、[2]リバプール大、[3]名古屋大生命農、[4]東北大薬)
○Reiko UENOYAMA[1], Tamako MIYAZAKI[1], Jane. L. HURST[2], Masaatsu ADACHI[3,4], Toshio NISHIKAWA[3], Masao MIYAZAKI[3] ([1]Iwate Univ., [2]Univ. of Liverpool, [3]Nagoya Univ., [4]Tohoku Univ.)

ネコはマタタビやキャットニップの葉に対し特異に反応し、舐める、噛む、顔や体を擦り付ける行動を示す。我々は、擦り付けにより蚊の忌避活性を持つイリドイド化合物群がネコの被毛に付着し、蚊に刺されにくくなることを見出した。しかし、葉を舐め噛む行動も蚊の忌避に寄与しているのか未解明であった。本研究では、これらの植物に対する舐め噛み行動が蚊への化学防御効果を強めるうえでの役割について検証した。GC/MS 分析により、葉を舐め噛む物理的ストレスは、マタタビとキャットニップの葉からのイリドイド放出を増加させることが分かった。また、ストレスを与えたマタタビでは葉中のイリドイド組成がより複雑な組成へと変化したが、キャットニップではストレス前後でともにネペタラクトンが 99%以上を占めていた。傷ついたマタタビ中の複雑なイリドイド組成は、その約 40 倍も含まれてる傷ついたキャットニップ葉中のネペタラクトンと同程度に長い反応をネコに誘起した。以上の結果、ネコの嗅覚感度は、物理的ストレスを受けた際に植物固有に生産されるイリドイドの量と組成に対し、それぞれ最大の反応を示すように適応しており、葉を舐め噛み傷つけることはネコがより多くの蚊の忌避剤を体に付着させることに寄与していると考えられる。本知見は、防虫効果を持つ植物を舐め噛む行動が化学的害虫防御を促進する機能を持つことを初めて示した。

Cats exhibit a characteristic response to silver vine and catnip, comprising licking and chewing the leaves, face and head rubbing, and rolling over. Our previous study demonstrated that this rubbing behavior transfers iridoids with mosquito repellency from the leaves onto feline fur. However, there is no evidence that licking and chewing of silver vine contributes to chemical pest defense in cats. Here we investigate if feline licking and chewing strengthens chemical pest defense against mosquitoes. GC/MS analysis revealed that mechanical stress by licking and chewing increases the iridoid emission from both silver vine and catnip leaves. The stress diversifies the iridoid composition of silver vine, while catnip iridoids are almost solely composed of nepetalactone (over 99%) before and after the leaf stress. The complex iridoids in stressed silver vine induce a comparable duration of the feline response to the approximately 40-fold higher amount of nepetalactone in stressed catnip. Our data suggest that cat’s sensitivity to iridoids is fine-tuned to plant-specific production of iridoids when the plant is stressed, which enables cats to gain more iridoids. Thus, it is possible to say that licking and chewing of silver vine leaves plays an adaptive function to promote the transfer of iridoids as mosquito repellents.

cat, mosquito, iridoid

発表責任者：上野山怜子（ruenoyama@outlook.com）

講演番号：3I08-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

遺伝子発現依存的な社会的敗北ストレス誘導性社会忌避記憶の形成

Gene expression required for the formation of social avoidance memory

○松村 京香[1,2]、石川 理絵[1]、喜田 聡[1] ([1]東大院農、[2]東農大院農)
○Kyoka MATSUMURA[1,2], Rie ISHIKAWA[1], Satoshi KIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

心的外傷後ストレス障害（PTSD）は、トラウマ体験の記憶（トラウマ記憶）を原因とする精神疾患である。一方、マウスの社会的敗北（SD）ストレス課題では、大型のマウスに攻撃を受けることでこのマウスに対する社会忌避記憶が形成され、さらに、繰り返し攻撃を受けることで慢性的な不安行動亢進が誘導される。そこで、SD 課題は社会忌避記憶（トラウマ記憶）が不安行動異常を誘導する PTSD モデルであると考えられるが、社会忌避記憶の形成機構は不明である。一方、長期記憶形成には遺伝子発現が必要とされる。本研究では、社会忌避記憶形成機構を解明するため、社会忌避記憶形成に対するタンパク質合成の必要性を検証した。攻撃を受ける SD 雄マウス（C57BL/6）を攻撃性の高い雄 ICR マウス（攻撃マウス）のケージに 5 分間入れて攻撃を受けさせた。この直後に SD マウスにタンパク質合成阻害剤アニソマイシン（ANI）を全身投与し、96 時間後に社会忌避記憶を評価した。筒に入れた攻撃マウスを配置したオープンフィールド内を SD マウスに１０分間自由探索させ、筒に鼻を接触させた時間と筒に対して遠方領域に滞在した時間をそれぞれ測定した。溶媒投与群では攻撃を受けなかった対照群に比べて筒に接触した時間が短く、遠方領域滞在時間も長くなり、社会忌避記憶が確認された。一方、ANI 投与群では溶媒群に比べて筒に接触した時間が長く、遠方領域滞在時間が短かったことから、社会忌避記憶形成に障害が観察された。従って、SD 誘導性の社会忌避記憶形成に遺伝子発現が必要であることが強く示唆された。

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a mental disorder associated with traumatic memory. In the social defeat (SD) stress task, repeated exposures to SD stress by aggressor mice for 10 days induce social avoidance behavior to the aggressor and anxiety-like behavior in mice. Therefore, we assumed that social avoidance and chronic anxiety-like behavior reflect PTSD-like states consisting of impaired emotional behavior associated with traumatic social memory. To characterize social avoidance memory, we examined whether protein synthesis is required for social avoidance memory formation. Mice received SD stress for 5 min and then were systemically injected protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI). As a result, ANI-treated SD mice showed disrupted social avoidance memory, suggesting that protein synthesis is required for social avoidance memory formation.

PTSD, social defeat, social avoidance memory

講演番号：3I08-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

苦味物質に対する嗜好性が向上する条件付け味覚嗜好学習課題の確立

Establishment of nicotine-conditioned taste preference learning task

○劉 牧言、喜田 聡（東大院）
○MUYAN LIU, Satoshi Kida (Tokyo Univ.)

食物に対する嗜好性は経験依存的に変化する。新規食物摂取後に内臓不快感を経験すると、以降この食物を忌避する、すなわち食嗜好性が低下する。この動物モデルが高嗜好性食物の嗜好性を低下させる条件づけ味覚嫌悪学習課題であり、世界的に活用されている。しかし、食経験により食嗜好性が増加する機構は未だ不明である。本研究では、マウスにおいて低嗜好性食物の嗜好性が増加する条件づけ味覚嗜好学習課題を新たに開発し、食嗜好性増加機構を解明することを目的とした。条件づけ場所嗜好性テストでは快情動を誘導する薬物と特定の場所との条件づけにより場所嗜好性を誘導する。そこで、このパブロフ型条件づけの原理に基づき，苦味物質（キニーネ水溶液）摂取後にニコチンを投与することで、苦味物質に対する嗜好性が向上するかを解析した。1 日 1 回の給水制限に習慣づけ後（4 日間)、キニーネ溶液（0.05mg/ml）摂取直後あるいは 40 分後にニコチン（0.3mg/kg）または生理食塩水を腹腔内投与するトレーニングを 1 日 1 回 1 ～ 3 日間行った。その翌日にキニーネ溶液と水を 40 分間提示し、両者の摂取割合を解析した。その結果、トレーニングを 3 日間行った場合、対照群に比較してニコチン投与群は有意に高いキニーネ水溶液の摂取割合を示し、キニーネ溶液に対する嗜好性学習効果が観察された。以上のように、本研究では、苦味物質に対する嗜好性が向上する条件づけ味覚嗜好学習課題の確立に成功した。

If an animal experiences an abnormal physical condition such as visceral discomfort after eating behaviors toward a new taste, it will be repelled when the taste presented next time. This model is a conditioned taste aversion learning task that reduces the palatability of highly palatable foods, and is being utilized worldwide. However, the mechanism by which eating experience increases eating preference is still unknown. The purpose of this study was to develop a new conditioned taste preference learning task that increases the value of low-preference foods in mice, and to elucidate the mechanism of increase in food preference. Specifically, we trained the mice by giving the mice a bitter quinine solution (0.05mg/ml) for 3days. Nicotine (0.3mg/kg) or saline was intraperitoneally administered right afterwards. As a result, the nicotine-administered group showed a significantly higher intake rate of the quinine solution than the control group, and the palatability learning effect was observed. As described above, we succeeded in establishing a conditioned taste preference learning task that improves the preference for bitterness substances.

preference, learning, taste

講演番号：3I08-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

ヒスチジンによる長期記憶形成と記憶想起の向上
enhancement of memory formation and retreival by Histidine

○川嶋 珠生[1]、樺山 音々[2]、小田切 友紀[2]、谷水 俊之[1]、石川 理絵[1]、喜田 聡[1] ([1]東大農、[2]東農大)
○ Tamau KAWASHIMA[1], Nene KABAYAMA[2], Yuki ODAGIRI[2], Toshiyuki TANIMIZU[1], Rie ISHIKAWA[1], Satoshi KIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

ヒスチジン（His）はタンパク質を構成するのみならず、脳内では覚醒や摂食、認知機能等を制御する神経伝達物質ヒスタミンに変換される。ヒスタミンには、脳内に 3 種類の受容体(H1,H2,H3)が存在し、それぞれ異なる情報伝達経路を活性化する。本研究では、His 投与により記憶制御プロセス群が向上する可能性を検討し、さらに、その作動機序の解明を目指した。社会的認知記憶課題では、記憶評価対象の成熟マウスに幼若マウスを 24 時間毎に 2 回提示し（トレーニングとテスト）、社会行動時間の低下を指標に社会記憶を評価できる。トレーニングの 30 分、12、24 時間前の His 腹腔内投与（500mg/kg）には影響は認められなかったが、2， 6 時間前の投与により長期社会記憶形成の向上が観察された。さらに、低濃度の His 投与（50mg/kg）、また、飲水によるヒスチジン経口投与でも同様の結果が観察された。一方、テストの 30 分、1、2 時間前の His 投与により社会記憶想起の向上が観察された。また、ヒスタミン受容体アンタゴニスト群を His と同時投与した影響を解析した結果、H2 受容体と H1 受容体アンタゴニストは His による記憶形成と記憶想起の亢進をそれぞれ阻害したことから、His が記憶形成と想起を向上させる分子機構は異なることが示唆された。以上の本研究の結果から、His 投与は記憶形成と想起をそれぞれ向上させることが明らかにされ、His 投与により簡便に記憶能力を改善できる可能性が示された。

Histidine (His) is converted into histamine, a neurotransmitter that controls arousal, feeding, and cognitive function in the brain. Histamine has three types of receptors (H1, H2, H3) in the brain, which activate different signaling pathways. The purpose of this study is to verify that histidine administration promotes brain function and to elucidate the mechanism. In social recognition test, juvenile mice are presented to mature mice to evaluate social memory twice (training and test session). Intraperitoneal administration of His(500mg/kg) 30 minutes, 12 and 24 hours before training didn't have an effect, but improvement of memory formation was observed by administration 2 and 6 hours before training. Furthermore, similar results were observed with low-concentration His administration(50mg/kg), and oral administration of His. On the other hand, improvement of memory retrieval was observed by administration of His 30 minutes, 1 and 2 hours before test. In addition, administration both his and histamine receptor antagonists showed that H2 and H1 receptor antagonists inhibited the enhancement of memory formation and memory retrieval by His, respectively. That is, it was suggested that the molecular mechanisms for improvement on memory formation and retrieval are different. From the above results, it was clarified that His administration improved both memory formation and retrieval, and His administration may improve the memory ability easily.

amino acid, histidine, memory

講演番号：3I08-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

FGF21 分泌を誘導する希少糖は、マウスの飲酒を抑制する

FGF21-inducing rare sugars suppress alcohol drinking in mice

○松居 翔、岩間 大貴、高橋 侑真、森岡 修平、小栗 靖生、都築 巧、佐々木 努（京大農）
○Sho MATSUI, Hiroki IWAMA, Yuma TAKAHASHI, Shuhei MORIOKA, Yasuo OGURI, Satoshi TSUZUKI, Tsutomu SASAKI (Kyoto Univ.)

【背景】過剰飲酒は大きな社会問題である。FGF21 と Oxytocin（OXT）は、飲酒欲求を抑制すると、個別に報告されている。また我々は、FGF21-OXT 系を発見し、報告した。【目的】FGF21-OXT 系が飲酒欲求を制御するのかを検証した。加えて、FGF21 誘導物質を探索し、その物質の飲酒欲求抑制効果を検証した。【方法】OXT 神経特異的 FGF21 受容体欠損（KO）マウスを作製し、2 瓶選択試験により、飲酒欲求の指標となるアルコール嗜好性を評価した。次に野生型マウスの初代培養肝細胞に 46 種類の希少糖を添加して、培地中の FGF21 の分泌量を測定した。FGF21 分泌を有意に促進する希少糖を野生型マウスに経口投与し、血中 FGF21 濃度とアルコール嗜好性を評価した。【結果】KO マウスはコントロールマウスと比較して、有意に高い飲酒欲求を呈した。D-ソルビトール、D-キシリトール、D-タガトース、D-プシコースは初代培養肝細胞からの FGF21 分泌を有意に促進した。これらの希少糖の野生型マウスへの経口投与は血中 FGF21 濃度を有意に上昇させた。加えて、D-タガトース、D-プシコースの経口投与はアルコール嗜好性を低下させた。【結論】FGF21-OXT 系は飲酒欲求を調節する。同系を刺激する希少糖 D-タガトース及び D-プシコースは、飲酒欲求を抑制する効果を示す。

Excessive alcohol consumption can cause serious health complications. FGF21 and oxytocin (OXT) have been reported individually to reduce alcohol drinking. We previously reported FGF21-OXT system. Therefore, we tested if the FGF21-OXT system regulates alcohol drinking. In addition, we identified the FGF21-inducing substances and tested their effect on alcohol drinking. We assessed the preference for ethanol in OXT neuron-specific FGF21 receptor-deficient (KO) mice by two-bottle selection test (water vs. ethanol), and found that the preference for ethanol was increased in KO mice. We next screened for FGF21-inducing rare sugars by adding 46 rare sugars to primary hepatocytes of wild-type (WT) mice, and measuring the concentration of FGF21 in the supernatants. FGF21 secretion from primary hepatocytes was significantly induced by D-sorbitol, D-xylitol, D-tagatose and D-psicose. Moreover, oral administration of these rare sugars to WT mice significantly increased blood FGF21 levels, and oral administration of D-tagatose and D-psicose also decreased preference for ethanol. Taken together, these data suggest that D-tagatose and D-psicose, which may stimulate FGF21-OXT system, could suppress alcohol drinking.

FGF21, Oxytocin, Alcohol

発表責任者：松居　翔（matsui.sho.4s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3I08-12
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:00～ ミーティングルーム I

IgA を介した腸管粘膜免疫における転写抑制因子 Bach1 の役割について

Involvement of transcriptional repressor Bach1 in IgA-mediated intestinal immune system

濱田 理久[1]、水島 かつら[2]、髙木 智久[2]、武藤 哲彦[3]、五十嵐 和彦[3]、内藤 裕二[2]、○東村 泰希[1]
([1]石川県大院・生資環、[2]京府医院・医、[3]東北大院・医)
Riku Hamada[1], Katsura Mizushima[2], Tomohisa Takagi[2], Akihiko Muto[3], Kazuhiko Igarashi[3], Yuji Naito[2], ○Yasuki Higashimura[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Univ. of Med., [3]Tohoku Univ.)

腸管管腔内へ分泌された IgA はウイルスや細菌などの病原体と結合することでこれら病原体の生体内への侵入防御、食細胞の貪食能強化に寄与する。BTB domain and CNC homology 1（Bach1）はヘム結合性の転写抑制因子であり、グロビン遺伝子や酸化ストレス応答系に関わる遺伝子の発現制御を担っている。Bach1 の発現は広範であるが、腸管生理機能に及ぼす影響については未だ明らかでない。本研究では野生型マウス C57BL/6J（WT）および Bach1 欠損マウス（Bach1KO）を用いて、Bach1 が IgA を介した腸管粘膜免疫に及ぼす影響について解析をおこなった。その結果、Bach1 遺伝子の欠損に伴い、パイエル板の増加・肥大および腸管粘膜での IgA 産生が亢進することを見出した。また、フローサイトメーターを用いた免疫学的解析の結果、腸管膜リンパ節およびパイエル板における IgA 産生 B 細胞（$B220^{+}$ IgA^{+}）の割合は、Bach1 欠損に伴い有意な減少あるいは減少傾向を示した。つまり、Bach1 欠損に伴い、腸管組織中の IgA 含量は増加するものの、IgA 産生を担う細胞群の増加は観察されなかった。即ち、Bach1KO では、腸管組織内へと浸潤した IgA が腸管腔内へと適切に分泌されていない可能性が示唆された。続いて、腸管腔内への IgA 分泌において中心的な役割を果たす多量体免疫グロブリン受容体（pIgR）に着目し、その発現レベルに及ぼす Bach1 欠損の影響を解析した。WT および Bach1KO より摘出した大腸組織を用いて、pIgR の発現レベルを解析した。その結果、mRNA およびタンパク質レベルの両方において、Bach1KO では pIgR mRNA の発現レベルが有意に低値を示した。詳細な分子機序に関しては現在解析中である。

Immunoglobulin A (IgA) produced in small intestine plays a crucial role in maintaining intestinal homeostasis. IgA protect host immunity against pathogen infection by binding virus or bacteria in intestine. BTB domain and CNC homolog1 (Bach1) is a transcription repressor, which are mainly involved in the regulation of antioxidative pathway. Although Bach1 is ubiquitously expressed genes, its effect on intestinal physiology is still unclear. In this study, we investigated the function of Bach1 in IgA-mediated intestinal mucosal immunity using Bach1-deficient mice. In Bach1-deficient mice, the number of IgA-producing cells did not increase, despite the increase in IgA content in the intestinal mucosa. Furthermore, the expression of Polymeric Immunoglobulin Receptor, which is responsible for IgA secretion into the intestinal lumen, was decreased in Bach1-deficient mice.

Bach1, IgA, pIgR

発表責任者：東村泰希（yasuki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3J02-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

ダイズイソフラボン合成関連遺伝子の時期特異的発現について
Isoflavones synthesis genes expression profile in soybean root
○濱崎 英史[1]、栗原 志夫[1]、栗山 朋子[1]、見城 貴志[2]、小島 克洋[2]、穴井 豊昭[3]、竹山 春子[4]、松井 南[1] ([1]理研 CSRS、[2](株) 朝日アグリア、[3]九州大学、[4]早稲田大学)
○ Hidefumi HAMASAKI[1], Yukio KURIHARA[1], Tomoko KURIYAMA[1], Takashi KENJYO[2], Katsuhiro KOJIMA[2], Toyoaki ANAI[3], Haruko TAKEYAMA[4], Minami MATSUI[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]ASAHI AGRIA CO., LTD., [3]Kyusyu Univ., [4]Waseda Univ.)

ダイズのイソフラボンは根から分泌され、共生窒素固定を行う根粒菌を誘引するシグナル分子として機能すると考えられている。そのため、イソフラボンはダイズ植物体の生長－根圏微生物叢との相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆される。しかし、ダイズ植物体の生長過程における根におけるイソフラボン合成の時期や土壌環境によるイソフラボン合成の影響は不明な部分が多い。

そこで本研究では、圃場と制御栽培環境下で生育したダイズの根におけるイソフラボン合成関連遺伝子発現ついての時系列解析を試みた。水田、畑、還元土壌を用いて生育したダイズ・フクユタカ(5葉期・開花期・種子最大肥大期)よりサンプリングした根から全 RNA を調製して解析を行った。その結果５葉期においてイソフラボン関連遺伝子の時期特異的な発現を観察した。またイソフラボン合成に関わる遺伝子ファミリーで発現時期が異なることが示唆された。土壌条件における差異について検討をおこなった。

本研究は、内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（管理法人：生研支援センター）によって実施された。

Isoflavones synthesized in soybean (*Glycine max*) roots play a key role in rhizosphere bacterial communities. Amount of isoflavones would be affected among plant growth process and different in soil, which have not been clear. In this study, Fukuyutaka cultivar were grown with soils from various conditions and performed RNA-seq analysis at 5th leaf stage, flowering stage, and full seed stage, respectively. In the roots at 5th leaf stage, several isoflavones synthesis genes are highly expressed, comparison with other stages.

soybean, isoflavones synthesis genes, soils

講演番号：3J02-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナのフラビン代謝調節に関与する新規転写因子の生理機能解析

Functional characterization of a novel transcription factor involved in flavin metabolism in Arabidopsis

○原田 美帆[1]、難波 純也[1]、丸田 隆典[1]、石川 孝博[1]、吉村 和也[2]、重岡 成[3]、小川 貴央[1]([1]島根大院・自然科学、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・附属農場)
○ Miho HARADA[1], Junya NAMBA[1], Takanori MARUTA[1], Takahiro ISHIKAWA[1], Kazuya YOSHIMURA[2], Shigeru SHIGEOKA[3], Takahisa OGAWA[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Exp. Farm, Kindai Univ.)

ビタミン B_2（RF:リボフラビン）を前駆体とするフラビンモノヌクレオチド（FMN）およびフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）は、植物において光合成/呼吸電子伝達系や多くの二次代謝産物の生合成系に関与するため、植物細胞内のフラビン化合物レベルは厳密に制御する必要がある。しかしながら、植物におけるフラビン代謝系の調節機構についてはほとんど不明である。これまでに我々は、シロイヌナズナ葉を用いたトランスクリプトームおよび遺伝子破壊株の解析から、フラビン代謝調節に関与する新規転写因子として FAD-responsive transcription factor 19（FRTF19）を同定した。FRTF19 は、植物において乾燥や低温などの環境ストレス応答に関与する転写因子ファミリーに属することから、FRTF19 によるフラビン代謝調節と種々の環境ストレスとの関連性が示唆される。そこで本研究では、種々のストレス条件下における FRTF19 とフラビン代謝系について解析を行なった。野生株における *FRTF19* と RF 合成系遺伝子群の発現は、アブシジン酸および低温ストレス処理により上昇し、それに伴って細胞内 RF レベルも増加したが、*FRTF19* 遺伝子破壊株では RF 合成系遺伝子群の発現と RF の増加が抑制されていた。この結果から、FRTF19 は種々の環境ストレス条件下において、細胞内フラビン化合物レベルの調節に関与していることが強く示唆された。現在、*FRTF19* 過剰発現株を作出し、詳細な解析を行っている。

Riboflavin (RF), also known as vitamin B_2, is the precursor of FMN and FAD, which are essential cofactors involved in various redox reactions and many metabolic processes in plants. Thus, the intracellular flavin homeostasis must be tightly regulated. However, at present information on the regulatory mechanisms involved in flavin homeostasis is still limited. Recently, we identified 47 FAD-responsive transcription factors (FRTFs) by a microarray analysis using Arabidopsis leaves after exogenous FAD treatment. Among *frtf* knockout mutants, the *frtf19* plants showed lower intracellular flavin levels compared to the wild-type plants. In the wild-type plants, the expression of *FRTF19* as well as RF biosynthetic genes and intracellular RF levels were increased by low temperature and abscisic acid treatment. These findings suggest that FRTF19 is involved in the regulation of flavin metabolism in plants under stress conditions. Now, we have generated *FRTF19*-overexpressing plants and are analyzing in detail.

transcription factor, riboflavin, stress

講演番号：3J02-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

ゼニゴケの精子誘引物質候補 apigenin 生合成酵素 chalcone isomerase（CHI）遺伝子機能欠損株の作出および活性評価

Evaluation of apigenin as a sperm chemoattractant in the liverwort *Marchantia polymorpha* by targeted disruption of the chalcone isomerase gene

○武部 夏実、諏訪 宏紀、松川 哲也、大和 勝幸、梶山 慎一郎（近大生物理工）
○Natsumi Takebe, Hiroki Suwa, Tetsuya Matsukawa, Katsuyuki Yamato, Shin'ichiro Kajiyama (Kindai Univ.BOST)

ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* は精子と卵を用いた受精を行うことから有性生殖の受精モデル植物として注目されている。受精において、精子は卵や卵付近から放出される物質の濃度勾配を感知し、卵に向かって遊泳する。この現象を精子走化性と呼び、精子を引き付ける物質のことを精子誘引物質という。精子誘引物質の同定は精子誘引物質の受容体や下流のシグナル伝達経路といった、精子走化性のメカニズムや受精の仕組みを解明するために不可欠である。我々は、植物に最もよく含まれる代表的なフラボノイドのひとつである apigenin をゼニゴケの精子化学誘引物質の候補として単離・同定した。本研究では apigenin がゼニゴケの精子誘引物質として特異的に機能するか検証するために、apigenin の生合成経路の chalcone isomerase（*CHI*）遺伝子の機能欠損株を作出した。*chi* 欠損株の apigenin 含量は検出限界以下であったが、雌株の精子誘引活性は有意に残っていた。従って、ゼニゴケの精子誘引物質は apigenin ではなく、他の物質であることが示唆された。

The liverwort *Marchantia polymorpha* produces motile sperms to fertilize eggs and is one of the model organisms for understanding fertilization mechanism as other basal land plants. During fertilization, sperm senses the concentration gradient of a substance released from the egg or from its vicinity and approaches to the egg. This phenomenon is called sperm chemotaxis, and the substance that attracts sperm is termed a sperm chemoattractant. Identification of sperm chemoattractant is essential for elucidating the mechanisms of sperm chemotaxis, including its receptor, and downstream signal transduction pathways. We identified apigenin, which is one of the most common flavonoids in plants, as a candidate for the sperm chemoattractant in *M. polymorpha*. To verify that apigenin is the sperm chemoattractant in *M. polymorpha*, loss-of-function mutants of the *CHI* (chalcone isomerase) gene, which is a part of the apigenin biosynthetic pathway, were generated and investigated. Although the amount of apigenin in *chi* mutants was below the detection threshold, archegonia and extracts of archegoniophores from the female mutants still showed sperm attracting activity. These results suggested that a compound other than apigenin should be responsible for the sperm chemotaxis in *M. polymorpha*.

Marchantia polymorpha, apigenin, sperm chemoattractant

講演番号：3J02-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

酒造好適米への休眠遺伝子 *Sdr4-k* 導入とその機能の解析

Introgression of dormant gene *Sdr4-k* into sake rice and analysis of its function

○金澤 伸矢[1]、氏原 巧貴[1]、岩野 舞衣子[1]、花俣 繁[2]、Aycan Murat[2]、Baslam Marouane[2]、菅原 雅通[3]、鍋倉 義仁[3]、金桶 光起[3]、花城 勲[4]、杉本 和彦[5]、三ツ井 敏明[1,2]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟県醸造試験場、[4]鹿児島大農、[5]農研機構)
○Shinya KANAZAWA[1], Koki UJIHARA[1], Maiko IWANO[1], Shigeru HANAMATA[2], Murat AYCAN[2], Marouane BASLAM[2], Masamichi SUGAWARA[3], Yoshihito NABEKURA[3], Mitsuoki KANEOKE[3], Isao HANASHIRO[4], Kazuhiko SUGIMOTO[5], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sc. & Tech., Niigata Univ., [2]Fac. of Agr., Niigata Univ., [3]Niigata Pref. Sake Research Institute, [4]Fac. of Agr., Kagoshima Univ., [5]NARO)

酒米の特徴の 1 つとして、米粒の中心部に「心白」と呼ばれる白濁部がある。酒造りにおいて心白は重要な形質だが、その形成メカニズムは未だ十分に解明されていない。本研究では、インド型品種カサラス由来の休眠遺伝子「*Sdr4-k*」に注目した。うるち米において *Sdr4-k* は種子休眠増強に加え、高温登熟下での米の白濁化の抑制が報告されている。そこで、本研究では *Sdr4-k* を酒米に導入することで、酒米における *Sdr4-k* の機能および米の白濁への影響を調査した。使用した酒米品種は、新潟県で広く栽培されている「越淡麗」、「五百万石」の 2 品種である。*Sdr4-k* の導入には戻し交配育種法と迅速世代促進法を駆使し、約 1 年半で *Sdr4-k* 導入系統である「越淡麗 *Sdr4-k*」、「五百万石 *Sdr4-k*」を作出した。圃場、バイオトロンを用いた高温条件下での生育を行い、*Sdr4-k* の機能を調査した。

Sdr4-k を導入することで酒米でも種子休眠の増強により穂発芽耐性が向上した。また、高温条件下で生育した越淡麗 *Sdr4-k* は越淡麗と比較して整粒率の上昇が見られた。高温条件で生育した登熟種子での遺伝子発現解析では、デンプン生合成関連遺伝子の発現量が *Sdr4-k* を導入することでデンプン生合成・分解バランスを正に調節する方向へ変動した。そのため、この遺伝子発現量の変動が高温登熟耐性の付与に関与していると示唆された。*Sdr4-k* 導入による酒造特性への影響についても調査を進めている。

Sake rice is characterized by the possession of a white cloudy tissue at the center of the grain kernel termed as the ‘white core’. This white core is a critical trait for sake production. Yet the formation mechanism(s) of the white core remains not fully understood. We focused here on Seed dormancy 4 (*Sdr4-k*) gene as a potential regulator of seed dormancy as well as high temperature (HT)-induced grain chalkiness reduction at the ripening stage in normal rice. We assumed that *Sdr4-k* is a key factor involved in grain chalkiness and we precisely introgressed the *Sdr4-k* gene into the sake rice varieties "Koshitanrei" and "Gohyakumangoku".

Field assessment data indicated that sake rice plants carrying the *Sdr4-k* gene improved seed dormancy. Under high temperature conditions, the ‘Koshitanrei *Sdr4-k*’ displayed better grain quality. Besides, our results revealed that the expression of starch-related genes was altered in the ripe seeds of ‘Koshitanrei *Sdr4-k*’ than WT. We are also investigating the effect of *Sdr4-k* introgression on brewing characteristics.

sake rice, *Sdr4*, starch

講演番号：3J02-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

ゲノム編集酵素の直接導入による多収性オオムギ品種の開発

Development of high yield commercial barley by protein-based genome editing

○手塚 大介[1]、チョ フイキョン[1]、小野寺 瞳[1]、リンフ キャンヤン[1]、千々松 武司[2]、今井 亮三[1]
([1]農研機構・生物研、[2]佐々木食品工業（株））
○Daisuke Tezuka[1], Huikyong Cho[1], Hitomi Onodera[1], Qianyan Linghu[1], Takeshi Chijimatsu[2], Ryozo Imai[1] ([1]Institute of Agrobiological Sciences, NARO, [2]SASAKI FOOD Co.,Ltd)

【背景・目的】
植物のゲノム編集では，CRISPR/Cas9 などの人工ヌクレアーゼ遺伝子を染色体に挿入し，ゲノム編集された再生個体から交配等により挿入遺伝子を欠落させる方法が一般的である。この手法では形質転換系が必須であるが，実際に実用作物品種の多くは培養や再分化が困難なため，ゲノム編集が難しい。我々は培養せずに，植物体の未分化細胞（茎頂分裂細胞）を直接ゲノム編集する *in planta* Particle Bombardment（iPB）法をコムギ で開発した。本研究では，iPB 法のオオムギへの適用を検討するとともに，出穂遅延による茎葉収量および子実収量の増加を目的として，花成制御遺伝子 (*Ppd-H1*)の変異体作出を試みた。
【方法・結果】
オオムギ品種「ニシノホシ」を用いた。吸水種子の胚をナノニードルで切開し，茎頂分裂組織（SAM）を露出させた。SAM を含む胚組織を胚乳から切り離し，MS 培地上に円周状に置床した。*Ppd-H1* を標的とする CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質を 0.6 μm 径の金粒子に結合させ，パーティクルボンバードメントにより SAM に導入した。無選抜に生育させた植物体の第 5 葉を用いて遺伝子型解析を行い，変異を検出したところ，導入当代 605 個体中 16 個体においてゲノム編集が検出された。このうち 6 個体は，次世代で脱キメラ化させた個体の中に変異の遺伝が確認された。長日条件下の *ppd-H1* 変異株では，原品種に対して出穂が約 40 日遅延した。原品種では，幼穂形成が観察される発芽 25 日後にかけて *HvFT1* の発現が上昇したが，変異株では低レベルで推移していた。変異株では *HvFT1* の経日的な発現上昇も遅延している可能性が考えられた。また変異株では，栄養成長期間が延長されたことにより原品種比で茎葉収量が約 17 倍，子実収量が約 4 倍に増加した。

Application of genome editing to commercial crop varieties is challenged by the lack of efficient transformation methodology. Here, we developed the *in planta* particle bombardment (iPB) method in barley. This method introduces CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein into shoot apical meristem (SAM) and allows genome editing without transgenesis. A key regulator of photoperiod sensitivity, *Photoperiod-H1* (*Ppd-H1*), was selected as a target of editing. The *ppd-H1* mutants delayed heading under long-day conditions and showed increase of leaf biomass and grain yield due to extended vegetative growth.

Barley, Genome editing, Flowering

講演番号：3J02-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナ種内雑種実生でみられるバイオマス増大に寄与する非相加的発現遺伝子の探索

Identification of non-additively expressed genes implicated in control of plant growth in seedlings of *Arabidopsis* intraspecific F_1 hybrids

○山口 真明[1]、杉 直也[1,2]、鈴木 穣[3]、草野 都[1,4]、柴 博史[1]([1]筑波大院生命地球科学、[2]横浜市大生命ナノシステム、[3]東大院新領域、[4]理研 CSRS)
○ MASAAKI YAMAGUCHI[1], NAOYA SUGI[1,2], YUTAKA SUZUKI[3], MIYAKO KUSANO[1,4], HIROSHI SHIBA[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Yokohama City Univ., [3]Univ. Tokyo, [4]RIKEN)

雑種強勢とは、異なる種間や種内交配で得られた F_1 雑種において、両親系統と比較してバイオマス増大等がみられる重要農業形質である。これまでにも雑種強勢のメカニズム解明を目指して、シロイヌナズナやトウモロコシ等を用いた比較トランスクリプトーム解析が行われ、光合成関連遺伝子やホルモン生合成遺伝子等の発現の変動が報告されているが、F_1 雑種の表現型との因果関係には不明な点が多い。演者らは、シロイヌナズナ F_1 雑種実生で見られる顕著なバイオマス増大に着目しその制御メカニズムを明らかにする目的で、トランスクリプトーム比較解析を行い、バイオマス増加を制御する新規因子の特定を目指した。

F_1 雑種と両親系統では、発芽時期や成長速度に違いがあることが報告されている。そのため各遺伝子型間の生長のずれを考慮して、播種後 13,15,17 日経過した各実生から RNA-seq データを取得、比較解析し、サンプル間における生育ステージのずれに起因した遺伝子発現差異を排除し、F_1 雑種において非相加的な発現を示す遺伝子を抽出した。現在、バイオマス増大に重要である窒素代謝経路に関わる非相加的発現遺伝子とバイオマス増加との関連を調べており、本報では得られた結果をもとにシロイヌナズナ種内雑種の雑種強勢で見られるバイオマス増大の制御モデルについて考察したい。

Heterosis is an important agronomic trait in which F_1 hybrids show increased biomass compared to their parents. In this study, we investigated the mechanism of the biomass increase in *Arabidopsis* F_1 hybrids by comparative transcriptome analysis to elucidate a potential novel regulator of biomass increase.

It has been reported that there is a difference in the developmental rate between F_1 hybrids and their parents. In this study, we obtained RNA-seq data from seedlings 13, 15, and 17 days after sowing, grown in a cultivation system that minimized the growth gap as much as possible. Further analysis was performed to eliminate differences in gene expression caused by differences in growth stages among the samples, and to extract genes that showed non-additive expression in F_1 hybrids. We are currently investigating the relationship between non-additively expressed genes involved in nitrogen metabolism pathways, which are important for biomass increase, and biomass increase. In this symposium, we will discuss the regulatory model of biomass increase observed in *Arabidopsis* intraspecific hybrids with the results obtained.

Heterosis, Transcriptome, Non-additively expressed genes

発表責任者：山口真明（s2021065@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3J02-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナの雑種強勢を制御する DNA メチル化の解析

Molecular mechanism of heterosis by epigenetic approach in *Arabidopsis*

○宮川 紗衣乃[1]、杉 直也[1,2]、鈴木 穣[3]、草野 都[1,4]、柴 博史[1]([1]筑波大院生命地球科学、[2]横浜市大生命ナノシステム、[3]東大院新領域、[4]理研 CSRS)
○SAENO MIYAKAWA[1], NAOYA SUGI[1,2], YUTAKA SUZUKI[3], MIYAKO KUSANO[1,4], HIROSHI SHIBA[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Yokohama City Univ., [3]Univ. Tokyo, [4]RIKEN)

【背景・目的】雑種強勢とは、異なる種内や種間の交配で得られた雑種第一代（F_1）がその両親と比べてバイオマス増大やストレス耐性が向上するという現象である。雑種強勢を利用した育種法が様々な作物や野菜で行われているが、雑種強勢の分子機構は未だ明らかになっていない。また近年、雑種強勢への DNA メチル化の影響が示唆されているが、その分子機構についても解明されていない。本研究では、シロイヌナズナを用いて維持型 DNA メチル化酵素 MET1 の機能欠失変異体の F_1 雑種を作成し、バイオマスへの影響を調べることで、DNA メチル化を介した雑種強勢メカニズムの実態解明を進めることとした。
【方法・結果】シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の Col-0 系統と C24 系統の *met1* 変異株を用いて交配を行い、得られた *met1* ホモ欠損の F_1 雑種の表現型解析を行った。野生型の F_1 雑種はその両親系統と比較して有意なバイオマス増加を示した一方、*met1* を欠損した F_1 雑種は、*met1* ホモ欠損の両親系統と比較してバイオマスに有意な差は示さなかった。
現在、*met1* ホモ欠損の F_1 雑種において DNA メチル化によって影響を受ける遺伝子の解析を進めている。本報では、これらの結果を元に DNA メチル化を介したバイオマス増大の分子制御メカニズムについて考察したい。

Heterosis or hybrid vigor is the phenomenon in which the first generation (F_1) of hybrids obtained from intra- and interspecific crosses show enhanced biomass and stress tolerance compared to their parents. Although plant breeding based on heterosis have been exploited in various crops and vegetables, the molecular mechanism of heterosis remains unknown. Recently, the effect of DNA methylation on heterosis has been suggested, but the molecular mechanism has not been elucidated. In this study, we generated F_1 hybrids of mutants lacking the function of methyltransferase I (MET1), which maintains cytosine methylation in CG contexts in *Arabidopsis thaliana*, and examined their effects on biomass to elucidate the mechanism of DNA methylation-mediated heterosis.

In *Arabidopsis*, we performed phenotypic analyses of *met1* homozygous F_1 hybrids obtained by crossing Col-0 and C24 both of which were MET1/*met1* lines. The wild-type F_1 hybrids showed significant increase in biomass compared to their parental lines, whereas the F_1 hybrids of *met1* loss-of-function mutants did not show significant difference in biomass compared to their *met1* homozygous parental lines. We are now analyzing the genes affected by DNA methylation in *met1* homozygous F_1 hybrids. Based on these results, we would like to discuss the molecular mechanism of DNA methylation-mediated biomass increase.

Heterosis, DNA methylation, *Arabidopsis*

発表責任者：柴博史（shiba.hiroshi.gm@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3J02-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

Modified SDS-LiCl 法を用いたバラ(（*Rosa* x *hybrida*)の花由来 RNA 調整法の検討

Modified SDS-LiCl:An effective method for RNA extraction from floral tissues of rose （*Rosa* x *hybrida*)

○内徳 聖[1]、高倉 梨央[1]、稲葉 丈人[1]、稲葉 靖子[1,2] ([1]宮崎大農、[2]東北大院・生命科学)
○Hijiri Uchitoku[1], Rio Takakura[1], Takehito Inaba[1], Yasuko Inaba[1,2] ([1]Miyazaki Univ., [2]Tohoku Univ.)

バラ（*Rosa* x *hybrida*）は、観賞用に供される代表的な植物の一つであり、世界的にも需要が高い。近年、バラを用いた花の色、香り、老化等の研究は、花色の改変や二次代謝経路の同定など、ハイレベルな先端研究が展開されている。しかし一方で、品種によっては花の RNA を調整するのにも困難を伴うことが多く、本研究では、汎用的かつ効果的なバラの花由来 RNA 調整法の構築を目指した。

まず、バラ‘オール 4 ラブ’の花の各組織（花弁、雌しべ、雄しべ、がく、花托）から、文献記載の各種方法により RNA 調整を行った結果、Modified SDS-LiCl（MSL）法（Sci Rep, 10:16887, 2020）では、雌しべ以外の全ての組織において、質量ともに十分な RNA を調整することができた。MSL 法の最初に用いる Extraction Buffer を加温して使用した所（Hot MSL 法)、雌しべの rRNA は、他の組織の rRNA に比べて分解が進んでいたが、内部標準遺伝子の発現は、他組織と同程度であった。また、MSL 法の後にエタノール沈殿を行うことで、RNA の純度がかなり改善されることもわかった。MSL 法と市販のキットを比較した結果、Hot-MSL 法は、市販のキットと同程度の RNA 調整が可能であることがわかった。現在、MSL 法が他のバラ品種の RNA 調整にも有効かどうかを検討中である。

The rose (*Rosa x hybrida*) is one of the most commercially grown plants for ornamental use. In recent years, the research on rose flower color, fragrance, and senescence has extensively progressed in molecular levels, however, it is often difficult for some cultivars to prepare even the floral RNA. Therefore, in this study, we aimed to develop a versatile and effective method for preparing RNA from rose flowers.

At first, RNA was prepared from each tissue (petal, stamen, pistil, sepal, and receptacle) of a rose cultivar‘*All 4 Love*’ using several methods described in previous reports. As a result, a sufficient amount of RNA could be prepared from almost all tissues, but not from pistils, by the modified SDS-LiCl (MSL) method（Sci Rep, 10:16887, 2020）. When pre-heatedextraction buffer was used at the beginning of the MSL method (Hot MSL), isolation efficiency of the pistil RNA was significantly improved. When the Hot-MSL method was used, rRNA of pistil was more degraded compared with that of other tissues, but mRNA levels of internal control genes almost the same among all tissues. It was also found that ethanol precipitation following the MSL method has significantly improved the purity of RNA. When compared with commercially available kits, RNA recovery and purity from rose flowers using Hot-MSL method was comparable to those commercial kits. We are currently investigating whether the MSL method is also effective for RNA preparation from other rose varieties.

Rosa x hybrida, Modified SDS-LiCl (MSL) method, RNA preparation

発表責任者：稲葉靖子（ykoina@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3J02-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 09:30～ ミーティングルーム J

多倍体ゲノムに対応したアセンブリパイプラインの開発

Development of an assembly pipeline for polyploid genome

○石橋 智仁、伊藤 武彦（東工大生命理工）
○Tomohito ISHIBASHI, Takehiko ITOH (Tokyo Tech.)

多倍体生物は植物に多く見られ、植物の多様な形質を研究する上で、多倍体ゲノム配列の構築はとても重要となっている。その一方で、多倍体ゲノムは相同な配列を多く持つ複雑さや、ゲノムサイズの大きさからゲノムアセンブリが難しいことが知られている。近年のシーケンス技術の進歩により、シーケンシングエラーの少ないロングリードである HiFi リードが普及しており、多くの生物種において得られるアセンブリ結果の連続性が向上した。しかし、二倍体生物であってもハプロタイプを考慮した染色体レベルの結果を得るためには、Hi-C データや両親の配列データなどの追加の情報が必要となる事が多い。また、多倍体ゲノムを構築できるアセンブラは未だ数が少なく、高品質なゲノムを構築できるものはほとんどない。そこで本研究では多倍体ゲノムの全体像を把握するための解析として、連続性の高い結果を得ることを目的としたアセンブリパイプラインを構築した。開発した手法では HiFi リードおよび Illumina リードを入力として使用し、既存のアセンブラである hifiasm の結果を基にしてハプロタイプ間のスイッチエラーを許容することで、全てのハプロタイプを反映したアセンブリを行う。さらに、近縁種のリファレンスゲノムを用いることで、アセンブリ結果をより長く繋ぎ合わせることも可能である。現在は、多倍体生物の公開データを使用して本手法を適用したゲノムアセンブリの評価を行なっており、当日はその結果を合わせて発表する予定である。

Many crop species experienced polyploidization events in plant evolution and genome assembly of polyploid plants is important to improve their agronomic traits. On the other hand, the assembly of polyploids is hindered by genomic complexity and large genome size. In recent years, the contiguity of the assembly is improved in many species by using PacBio HiFi reads. But even in diploid cases, it is generally impossible to construct allele-aware chromosome-level genome without Hi-C data or trio binning approach. Here we developed an assembly pipeline for better contiguity to understand the genome landscape of complex polyploids. In our pipeline, we use HiFi reads and Illumina reads as input and construct long contiguous assembly by allowing some haplotype switch errors based on the result of hifiasm. Additionally, we can perform scaffolding using closely related species as reference. We are currently evaluating our pipeline using publicly available data, and the latest results will be introduced in this presentation.

genome assembly, polyploid genome, bioinformatics

講演番号：3J04-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

植物プロモーターの特異性を維持して目的遺伝子を高発現させる Boost Gateway システムの開発

Development of Boost Gateway system that maintains the specificity of the plant promoter and highly expresses the target gene

○山田 裕也[1]、蜂谷 卓士[1]、石黒 澄衛[2]、塚越 啓央[3]、中川 強[1] ([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]名大・生命農、[3]名城大・農)

○Yuya YAMADA[1], Takushi HACHIYA[1], Sumie ISHIGURO[2], Hironaka TSUKAKOSHI[3], Tsuyoshi NAKAGAWA[1] ([1]Int. Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Bioagr. Nagoya Univ., [3]Fac. Agr. Meijyo Univ.)

プロモーターの特異性（組織特異的発現など）を維持して発現量を増強させるシステムは大変有用であり、転写因子などの制御因子を特定の組織・細胞で過剰発現させ機能解析を行う実験、特定の組織・細胞をレポーターによって標識する実験が可能となる。そこで我々は、特定の植物プロモーター、強力な転写因子、目的遺伝子の 3 者を簡易にクローニングして植物プロモーターの発現をブーストすることが可能な Boost Gateway システムを構築した。

今回はモデル実験として行ったノパリンシンターゼ遺伝子プロモーターと、植物葉の背軸側で特異的に発現するシロイヌナズナ *FILAMENTOUS FLOWER* プロモーターを用いた Boost Gateway システム機能評価の結果を報告する。

A system that maintains the specificity of the promoter (tissue-specific expression, etc.) and enhances the expression level is very useful and enable experiments and identifications of regulatory factors such as over expression of transcription factors in specific tissues/cells for their functional. It is also possible to carry out clear labeling of the tissues and cells with a reporter using specific promoters. Therefore, we constructed a Boost Gateway system that can easily clone a specific plant promoter, a strong transcription factor, and a gene of interest to boost the expression of the plant promoter.

In this study, we will present the performance of Boost Gateway System using the nopaline synthase gene promoter and the *Arabidopsis thaliana FILAMENTOUS FLOWER* promoter, which is specifically expressed on the dorsal side of plant leaves as a model experiment.

Agro bacterium, promoter, Transient expression analysis

発表責任者：山田　裕也（n20m813@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3J04-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

植物への複数遺伝子導入システムの開発と形質転換植物における導入遺伝子発現解析

Development of multiple gene transfer system into plants and expression analysis of transgene in plants

○大屋 卓博[1]、蜂谷 卓士[1]、佐藤 豊[2]、中川 強[1] ([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]遺伝研・植物)
○Takahiro OYA[1], Takushi HACHIYA[1], Yutaka SATO[2], Tsuyoshi NAKAGAWA[1] ([1]Int. Cent. Sci. Res., Shimane Unv., [2]Plant Genet., Natl. Inst. Genet.)

複数遺伝子クローニング技術は、タンパク質複合体の解析、また代謝経路の構築など様々な目的に利用することができ大変有用である。さらに植物へ複数遺伝子を簡便に導入し、安定に発現する技術は食糧問題や環境問題の解決策となりうる。本研究では、当研究室で開発した複数遺伝子クローニング技術、Gateway Recycling Cloning System を用いて複数遺伝子コンストラクトを作製し、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）、イネ（*Oryza sativa*）へ導入、発現解析を行った。シロイヌナズナの発現解析では、シロイヌナズナ由来のユビキチン 10(UBQ10)プロモーターを共通プロモーターとして用いて導入した 5 つのレポーター遺伝子全ての発現が確認できた。また、mRNA のコピー数を比較した結果、複数遺伝子が良好に発現していることが確認できた。イネの発現解析では、トウモロコシ由来のユビキチン 1（Ubiquitin 1）プロモーターを共通プロモーターとして用いて導入した 3 つのレポーター遺伝子全ての発現が確認できた。Gateway Recycling Cloning System を用いた植物改変についても議論したい。

Multi-gene cloning technology is very useful because it can be used for various purposes such as analysis of protein complexes and construction of metabolic pathways. Furthermore, technology enabling easily introduction and stable expression of multiple genes in plants can be a solution to food and environmental problems. In this study, we created multiple gene constructs using the Gateway Recycling Cloning System, a multi-gene cloning technology developed in our laboratory, introduced them into *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*, and analyzed their expression. In the *A. thaliana,* the expression of five reporter genes individually driven by the *A. thaliana* ubiquitin 10 promoter was confirmed. In addition, we compared copy number of mRNA and confirmed efficient expression of all genes. In the *O. sativa*, the expression of three reporter genes individually driven by the *Zea maize* ubiquitin 1 promoter was confirmed. We would also like to discuss plant modification using the Gateway Recycling Cloning System.

multiple genes, plant transformation, promoter

発表責任者：大屋卓博（n20m803@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3J04-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナにおける葉緑体外 OPDA 生産系の構築

Production of 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) outside chloroplasts in Arabidopsis

○金谷 貴広、井原 雄太、若松 孝幸、蛯谷 裕輝、太田 啓之、下嶋 美恵（東工大・生命理工）
○ Takahiro Kanatani, Yuta Ihara, Takayuki Wakamatsu, Yuki Ebiya, Hiroyuki Ohta, Mie Shimojima (Tokyo Inst. Tech.)

植物の二次代謝産物であるオキシリピンは、防御応答や成長調節に関わる生理活性物質であることが知られている。その一種である 12-oxo-phytodienoic acid（OPDA）は、傷害・虫害ストレスに対する抵抗性誘導をはじめとする、ジャスモン酸（JA）とは異なる生理機能を持ち、農薬や医薬としての利用も期待されている。しかしながら通常、葉緑体で作られる OPDA は、ペルオキシソームにてβ酸化を受けることで速やかに JA へと変換される。また、オキシリピンの過剰蓄積体は、成長が著しく阻害されることが知られている。これらの理由から、植物を用いたオキシリピンの安定的かつ高効率な生産方法は確立されていない。

本研究では、OPDA 生合成の基質であるα-リノレン酸を豊富に含む油滴や小胞体に着目し、３つの OPDA 合成酵素に対して油滴局在化配列を付加し、シロイヌナズナに導入を行った。これにより、葉緑体外に存在するグリセロ脂質中の脂肪酸を OPDA に変換する形質転換体が得られた。このことは、安定的なオキシリピン生産法の確立に向けた大きな一歩といえる。

Oxylipins, secondary metabolites in plants, are known to be bioactive substances involved in defense responses and growth regulation. One of the oxylipins, 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), has different physiological functions from jasmonic acid (JA), such as inducing resistance to injury and insect stress, and is expected to be used as an agrochemical and medicine. However, in plants, OPDA produced in chloroplasts is rapidly converted to JA by ß-oxidation in peroxisomes. In addition, it is known that hyperaccumulation of oxylipins severely inhibits the plant growth. For these reasons, a stable and highly efficient method to produce oxylipins using plants has not been established.

In this study, we focused on oil droplets and the endoplasmic reticulum rich in α-linolenic acid, a substrate for OPDA biosynthesis. Then, we produced Arabidopsis transgenic plants by introducing the three enzymes involved in OPDA synthesis with oil droplet localization sequence. This resulted in transformants that convert fatty acids in glycerolipids present outside chloroplasts into OPDA. This may be a great leap to establish the method for stable production of oxylipins.

OPDA, oxylipin, Arabidopsis

講演番号：3J04-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

新規のシグナルペプチドを利用した植物におけるタンパク質の分泌生産

Fusion of a novel signal peptide enhances protein secretion into the apoplast in plants

○山本 佳奈[1]、梶浦 裕之[2]、三﨑 亮[2]、藤山 和仁[2] ([1]阪大院工、[2]阪大生国セ)
○Kana YAMAMOTO[1], Hiroyuki KAJIURA[2], Ryo MISAKI[2], Kazuhito FUJIYAMA[2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech)

近年、組換えタンパク質生産の宿主として植物培養細胞が注目されている。培養細胞では目的タンパク質を培地中に分泌できるため、精製の簡便化が期待できる。この培地への分泌効率を上げることで、より理想的なタンパク質生産システムとなり得る。分泌促進のためにシグナルペプチドが必要となるが、植物における分泌生産により特化したシグナルペプチドの利用が望まれる。

本研究では植物培養細胞でのタンパク質のさらなる高分泌生産を目指し、分泌タンパク質が局在するアポプラストに特に多く存在するタンパク質を同定することで、2 種類の新規の植物由来分泌シグナルペプチドを見出した。この分泌シグナルペプチドを付加したモデルタンパク質を、まずは *Nicotiana benthamiana* 植物体で一過的に発現し、使用したシグナル配列のタンパク質生産および分泌への寄与を評価した。その結果、このシグナル配列はタンパク質の分泌生産性を向上させ、植物培養細胞を用いた組換えタンパク質の分泌生産への応用が期待できる結果となった。

Recently, the use of plant cell suspension culture for recombinant protein production has received a great deal of attention. During the protein production in plant cell suspension culture, the purification process could be simplified by secreting the target protein into the media. To improve secretion efficiency in plants, more suitable signal peptides are needed.

In this study, focusing on proteins that are mainly expressed in the apoplast where secretory proteins mainly accumulate, we identified two novel secretory signal peptides through proteome analysis. Subsequently, the effects of signal sequences on protein production and secretion were examined in transient expression of reporter protein fused with the signal peptide in *Nicotiana benthamiana* plants. The signal sequence significantly enhanced the secretion of reporter protein, suggesting that, it could be applied to a secretory protein production in suspension cultured cells.

plant, signal peptide, secretion

講演番号：3J04-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

遺伝子組換え植物による活性型ビタミン D3 の合成

Metabolic engineering of active vitamin D3 by transgenic plants

○山岸 萌子[1]、中川 真太郎[1]、畑田 珠希[1]、秋山 遼太[1]、三浦 謙治[2]、刑部 敬史[3]、刑部 祐里子[4]、鈴木 宗典[5]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]([1]神戸大農、[2]筑波大生命環境、[3]徳島大生物資源産業、[4]東京工業大生命理工、[5]神戸天然物化学)
○ Moeko YAMAGISHI[1], Shintaro NAKAGAWA[1], Miki HATADA[1], Ryota AKIYAMA[1], Kenji MIURA[2], Keishi OSAKABE[3], Yuriko OSAKABE[4], Munenori SUZUKI[5], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Tokushima Univ., [4]Tokyo tech, [5]KNC laboratories)

人間は皮膚に日光を浴びることで 7-デヒドロコレステロール（7-DHC）からビタミン D3（VD3）を生合成しており、VD3 は肝臓で CYP2R1 による 25 位水酸化、腎臓で CYP27B1 により 1α位水酸化を受けて活性型 VD3 となる。活性型 VD3 はカルシウムやリンの調節機能を持ち、骨粗鬆症などの治療薬となるが、化学合成された活性型 VD3 は高価である。本研究では、代謝改変した遺伝子組換えトマトを用いることで活性型 VD3 を安価に生産することを目的としている。一般的な植物と違い、トマトなどのナス科植物は 7-DHC を生合成中間体とするコレステロール(CHR)生合成能が非常に高いことがわかっている。7-DHC から CHR への代謝経路に関与するステロール 7 位還元酵素をコードする 2 つの遺伝子 *DWF5* と *DWF5H* をゲノム編集により破壊したトマト植物体において、7-DHC の蓄積が確認された。また *Nicotiana benthamiana* を用いた一過的発現系によりヒト由来 CYP2R1 と CYP27B1 が植物体内で機能することが明らかとなった。しかし *DWF5*/*DWF5H* 二重破壊植物体は強い矮性を示し種子を取ることが困難であるため、二重破壊植物体を用いて CYP2R1 と CYP27B1 を過剰発現する組換え毛状根を作成した。得られた *DWF5/5H* 二重破壊 CYP2R1/CYP27B1 過剰発現毛状根に UV を照射することで組換えトマト毛状根での活性型 VD3 の高生産を目指している。
Humans biosynthesize vitamin D3 (VD3) from 7-DHC by exposing the skin to sunlight. VD3 is hydroxylated at C25 by CYP2R1 in the liver and C1α by CYP27B1 in the kidney. Active VD3 regulates calcium and phosphorus and is a therapeutic drug for osteoporosis, but chemically synthesized active VD3 is expensive. The purpose of this study is to produce active VD3 at low cost by using transgenic tomatoes. Solanaceae plants are known to have a high ability of CHR biosynthesis with 7-DHC as a biosynthetic intermediate. Accumulation of 7-DHC was confirmed in tomato plants in which two genes *DWF5* and *DWF5H* encoding sterol Δ7-reductase were disrupted by genome editing. In addition, it was confirmed by a transient expression in *Nicotiana benthamiana* that CYP2R1 and CYP27B1 are functionally active in plants. However, the *DWF5*/*DWF5H* double knockout tomato plants showed a severe dwarf phenotype, and therefore, the transgenic hairy roots constitutively expressing CYP2R1 and CYP27B1 were generated by using the double knockout plants as a host. By irradiating the hairy roots with UV, we aim to produce a high amount of active VD3 in the hairy roots.

active vitamin D3, metabolic engineering, tomato

講演番号：3J04-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

熱帯熱マラリアワクチン抗原高発現イネの作出と解析

Malaria vaccine antigen high level expression in rice seed

○加藤 洋香[1]、藤本 菜緒[1]、野澤 彰[3]、高島 英造[3]、曾我 郁弥[3]、黒田 昌治[4]、森田 重人[1,2]、澤崎 達也[3]、増村 威宏[1,2]([1]京都府立大学・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ、[3]愛媛大学・プロテオサイエンス、[4]農研機構)
○ Hiroka KATO[1], Nao FUJIMOTO[1], Akira NOZAWA[3], Eizo TAKASHIMA[3], Ikuya SOGA[3], Masaharu KURODA[4], Shigeto MORITA[1,2], Tatsuya SAWASAKI[3], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ. Life Env. Sci., [2]Kyoto Prefect. Agri. Forest. Fish. Technol. Cent., [3]Ehime Univ. Proteo Sci. Cent., [4]National Agriculture and Food Research Organization)

近年，形質転換植物を用いたヒト用ワクチンの開発が注目されている．先行研究では，イネ種子中にコレラ菌に対するワクチン抗原を産生することに成功した.その抗原は免疫原性を保ったまま，粘膜免疫の誘導に関与する腸管上皮組織まで到達した.

本研究では，世界で多くの死者を出しているにも関わらず，いまだに有効なワクチンが開発されていない，熱帯熱マラリア感染症に着目した．ワクチン抗原としてはマラリア原虫が赤血球に感染する際に用いる GPI-anchored micronemal antigen(GAMA5)を対象とした．GAMA5 をコードする遺伝子を用いて発現プラスミドを構築し，アグロバクテリウム法を介してイネを形質転換した．その結果，7 系統のイネが得られた．形質転換したすべてのイネ個体のゲノム DNA 中に導入遺伝子の配列が確認された．形質転換イネ種子を粉末化しタンパク質を解析したところ，ワクチン抗原が含まれていることが確認された．現在，ワクチンタンパク質の性質について解析を行っている．

Recently, the development of vaccines for human using transformed plants has been attracting attention. In our previous study, we succeeded in making a vaccine antigen against cholera expressed in rice seeds. The antigen keeping its immunogenicity, were successfully delivered to the intestinal epithelial tissue which is involved in the induction of mucosal immunity.

In this study, we focused on malaria, which have caused many deaths worldwide but for which no effective vaccine has yet been developed. The vaccine antigen was GPI-anchored micronemal antigen (GAMA5), which is used when Plasmodium falciparum infects erythrocytes. An expression plasmid was constructed using the gene encoding GAMA5, and rice was transformed via the Agrobacterium method. As a result, 7 strains of rice were obtained. The sequence of the transgene was confirmed in the genomic DNA of all transformed rice individuals. When the transformed rice seeds were powdered and the protein was analyzed, it was confirmed that the vaccine antigen was contained. Currently, we are analyzing the properties of vaccine proteins.

rice seed, malaria vaccine, transgenic plants

発表責任者：増村威宏（masumura@kpu.ac.jp）

講演番号：3J04-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

The identification of CYP716A12 mutants which have a high potential for oleanolic acid production through heterologous expression in *Nicotiana benthamiana*

○JUTAPAT ROMSUK[1], Yasumoto Shuhei[1,2], Seki Hikaru[1,2], Fukushima Ery Odette[1,3], Miura Kenji[4], Muranaka Toshiya[1,2] ([1]Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan, [2]Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, Suita, Osaka, Japan, [3]Universidad Regional Amazónica IKIAM, Vía Muyuna Km 7, Tena, Ecuador, [4]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan)

Oleanolic acid is in high demand as a bioactive triterpene precursor. Chemical synthesis is difficult due to their complex structure. It is synthesized from 2,3-oxidosqualene *via* cyclization and three-step oxidation reactions catalyzed by a β-amyrin synthase and the cytochrome P450 CYP716A, respectively. The CYP716 family has been isolated from various plant species. Their experimental crystal structure and detail catalytic mechanisms are unknown. CYP716A12 was selected as a model of this study. Previous study, we succeeded in identifications of amino acid mutations with high potential for oleanolic acid production using bioinformatics and *in vivo* functional analysis in engineering yeast. In this study, the selected mutated-CYP716A12s were introduced into *Nicotiana benthamiana* using agroinfiltration-based transient protein expression system. Notably, transient protein expression in *N. benthamiana* revealed that substituting amino acids on substrate recognition sites significantly increased the production of oleanolic acid. The findings will contribute to the development of new methods for synthesizing and accessing previously inaccessible natural products and analogs, as well as the potential for drug discovery pipelines to be revitalized.

Plant-specialized metabolites, Oleanolic acid, Transient protein expression

発表責任者：Toshiya Muranaka（muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

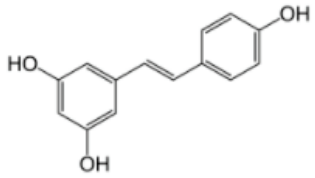
講演番号：3J04-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

ラッカセイスプラウトによるレスベラトロールの生産

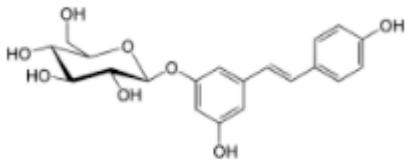
Production of resveratrol by peanut sprouts

○田中 紘才、滝口 泰之（千葉工大先進工）
○Kosai TANAKA, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Tech.)

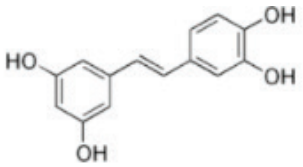
Resveratrol はブドウやラッカセイなどの植物に含まれる抗酸化物質で，抗腫瘍性，抗炎症性，認知症の予防効果などが動物実験で報告されている。



resveratrol



piceid



piceatannol

我々は無菌状態の落花生種子を暗所で発芽させたスプラウト中の resveratrol とその配糖体である piceid の濃度変化を高速液体クロマトグラフィーによって測定した。その結果，20℃，5 日間，栽培したスプラウト 1 g（乾燥重量）中に resveratrol が 39 μg 検出された。また，発芽前の種子 1 g（乾燥重量）中に piceid が 161 μg 検出されたが，その濃度は発芽とともに減少した。このことから，スプラウトに含まれる resveratrol は piceid の加水分解によって生成されることが示唆された。さらに，スプラウト中には resveratrol より水酸基を一つ多く含む piceatannol も検出された。

本講演では，スプラウトの栽培条件よるこれらの抗酸化成分の影響についても紹介する。

Resveratrol is an antioxidant contained in plants such as grapes and peanuts, and its antitumor and anti-inflammatory, and dementia-preventing effects have been reported in animal experiments.

We measured changes in the concentrations of resveratrol and its glycoside, piceid, in a sprout of sterile peanut seeds germinated in the dark condition by high performance liquid chromatography (HPLC). As a result, 39 μg of resveratrol was detected in 1 g of dry sprout cultivated at 20℃ for 5days. In addition, 161 μg of piceid was detected in 1 g of seed before germination, but the content of piceid decreased with germination. This suggestes that resveratrol contained in sprout is produced by hydrolysis of piceid. In addition, piceatannol containing one more hydroxyl group than resveratrol was also detected in the sprout.

Effects of cultivation conditions of peanut sprout on these antioxidant components will also presented in this symposium.

resveratrol, peanut sprout, antioxidants

発表責任者：滝口泰之（takiguti.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

講演番号：3J04-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

High level transient production of thermostable basic fibroblast growth factor in Nicotiana benthamiana leaves

○EDJOHN AARON MACAUYAG, Kazuhito Fujiyama, Hiroyuki Kajiura, Ryo Misaki (Osaka University)

Human basic fibroblast growth factor (hbFGF) is a key factor in cellular processes like cell proliferation and development. Because of this, its applications have been utilized in biomedical engineering, cosmetics and research. In this study, a high level production system of bFGF has been developed. The production process is optimized starting from the upstream to the downstream processes, maximizing the yield of the product obtained. A protein engineered thermostable variant of hbFGF (TSbFGF) was found to be the most productive variant among the bFGF variants tested with a crude extract productivity of around 185 μg / g leaves (FW). Using this construct, an optimized extraction method was used and tag-less purification was achieved via a tandem SP-Sepharose and Heparin affinity chromatography with a recovery of around 35%. An improved bioactivity in HepG2 cells of the purified TSbFGF was observed as compared to commercial *E.coli* produced bFGF. A comparable bioactivity with the commercial bFGF was obtained when used in CHO-K1 cells. These results show how the *N. benthamiana* transient production of the thermostable variant of bFGF could be a very feasible method for the industrial production of this protein.

bFGF, Transient Expression, Nicotiana benthamiana

講演番号：3J04-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 10:30～ ミーティングルーム J

アグロバクテリウムによる植物一過的形質転換のための Dual-Luciferase Assay Vector の構築

Construction of Dual-Luciferase Assay Vectors for *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transient transformation of plants

○武藤 佑季、蜂谷 卓士、中川 強（島根大・総科セ・遺伝子）
○Yuki Muto, Takushi Hachiya, Tsuyoshi Nakagawa (Int. Cent. Sci. Res., Shimane Unv.)

アグロバクテリウム（*Agrobacterium tumefaciens*）を用いた植物の一過的形質転換は短時間で容易に行うことができ、ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を用いて植物での発現実験やプロモーターアッセイを行うことができる。しかし、感染に用いたアグロバクテリウムが存在する状態での発現解析では、植物での発現とアグロバクテリムでの発現を区別することが困難あるいは煩雑である。本研究では、我々が開発した複数遺伝子クローニング技術 Gateway Recycling Cloning System を活用して、ホタル由来とウミシイタケ由来の 2 種類のルシフェラーゼのそれぞれの活性部位にイントロンが挿入され、植物由来のルシフェラーゼ発光は検出されるが、アグロバクテリウム由来の発光は検出されない “Intron Dual-Luciferase Vector System” の構築を試みた。

本講演では、上記の “Intron Dual-Luciferase Vector System” について報告するとともに、シスエレメント解析におけるこのベクターシステムの有用性についても議論したい。

Transient transformation of plants using Agrobacterium (*Agrobacterium tumefaciens*) is easy and rapid, and reporter genes such as luciferase can be used for gene expression experiments and promoter assays in plants. However, expression analysis in the presence of the Agrobacterium used for infection makes it difficult or cumbersome to distinguish expression in the plant from that in the Agrobacterium. In this study, we utilized the Gateway Recycling Cloning System, a multi-gene cloning technology developed in our laboratory, to construct the "Intron Dual-Luciferase Vector System", in which introns are inserted into the active sites of two types of luciferase, one from firefly and the other from sea pansy (*Renilla*), so that luciferase luminescence from plants can be detected but not from Agrobacterium.

In this study, the construction of "Intron Dual-Luciferase Vector System" will be reported and the usefulness of this vector system in cis-element analysis will be discussed.

Dual-luciferase, transient transformation, plant

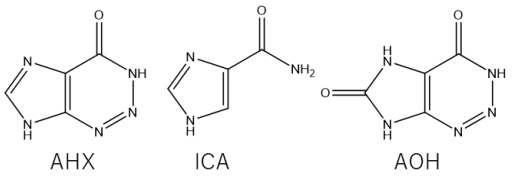
講演番号：3J07-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

シバとコムラサキシメジの共存培養によるフェアリーリング形成の分子機構解明の試み

Attempt to elucidate the molecular mechanism of "fairy-rings" formation by co-cultivation of turfgrass and *Lepista sordida*

○鈴木 海斗[1]、住田 真晟[1]、崔 宰熏[1,2,3]、道羅 英夫[3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]([1]静大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研)
○Kaito SUZUKI[1], Masaaki SUMIDA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hideo DOHRA[3], Hirohumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Inte. Sci. Tech., Shizuoka University, [2]Grad. Sch. Sci. Tech. Shizuoka University, [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka University)

芝生が輪状に周囲より色濃く繁茂し、時には逆に輪状に成長が抑制され、後にその輪の上にキノコが発生する「フェアリーリング」という自然現象が知られている。フェアリーリング形成菌であるコムラサキシメジ(*Lepista sordida*)から AHX、ICA が単離され、それらはフェアリーリング原因物質として同定された[1)2)]。その後、AHX を根から吸収したイネから AOH が単離された。AOH は AHX と同様にシバの成長を促進した[3)]。我々は、シバとフェアリーリング形成菌であるコムラサキシメジを共培養することによって、フェアリーリング形成の分子機構を解明する糸口が得られるのではないかと考えた。その目的に従い、本研究では、ノシバ(*Zoysia japonica*)及びベントグラスとの共培養から代謝産物と遺伝子変化の解析を行った。寒天培地でコムラサキシメジとノシバの共培養を行った。また、コントロールとして、ノシバのみ、コムラサキシメジのみで培養を行った。同様に、ベントグラスとコムラサキシメジの共培養を試みた。根部、地上部、菌の重量と長さの測定した結果、共培養によってノシバ及び菌の成長促進が見られた。一方、ベントグラスとコムラサキシメジの共培養では互いに成長阻害が見られた。現在 HPLC、TLC、MS 分析により代謝産物、RNAseq により遺伝子差解析を行っている。



The natural phenomenon "fairy rings" resulting from a fungus–plant interaction appears worldwide. 2-Azahypoxanthine (AHX) and imidazole-4-carboxamide (ICA) were isolated from the culture broth of one of the fairy ring-forming fungi, *Lepista sordida*. Afterward, a common metabolite of AHX in plants, 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), was found in AHX-treated rice. We thought that co-cultivation of turfgrass with the fairy ring-forming fungus *Lepista sordida* would provide clues to elucidate the molecular mechanism of "fairy rings" formation.

Co-cultivation of *L. sordida* and turfgrass (*Zoysia japonica* or bentgrass) was carried out on agar. The results showed that the growth of the fungus and *Z. japonica* was promoted by co-cultivation of the grass and the fungus. On the other hand, the co-culture of bentgrass and the fungus resulted in mutual growth inhibition.

1) Choi, JH., Kawagishi, H. et al. *ChemBioChem*. 11, 1373 (2010). 2) Choi, JH., Kawagishi, H. et al. *J. Agric. Food Chem*. 58, 9956 (2010). 3) Choi, JH., Kawagishi, H. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 1552 (2014).

fairy rings, *Lepista sordida*, co-cultivation

講演番号：3J07-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）における 2-azahypoxanthine の生合成研究

Biosynthetic studies on 2-azahypoxanthine in *Lepista sordida*

○鈴木 兵梧[1]、伊藤 彰将[2]、崔 宰熏[1,2,3]、鈴木 智大[4]、平井 浩文[1,2,3]、道羅 英夫[3]、河岸 洋和[1,2,3]
([1]静大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研、[4]宇都宮大・バイオ)
○Hyogo SUZUKI[1], Akinobu ITO[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Tomohiro SUZUKI[4], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hideo DOHRA[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Ctr. Biosci. Res. Educ., Utsunomiya Univ.)

コムラサキシメジ菌糸体培養濾液から単離された 2-azahypoxanthine（AHX）は、フェアリーリングの惹起物質として発見され、植物及びキノコにおいて普遍的に存在している[1,2]。AHX はキノコの子実体形成を促進するなどの非常に興味深い生物活性を有する。前回大会に引き続き、本研究では、AHX を大量に産生するキノコであるコムラサキシメジを供試菌として、AHX の生合成研究に着手した。

前回大会では、コムラサキシメジに 8 個存在する NO synthase（NOS）の中で最も発現量が多い組換え LsNOS2（rLsNOS2）が産生する NO が 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) に非酵素的に取り込まれ、AHX が生成することを報告した[3]。本研究では、2 番目に発現量が多い組換え LsNOS8（rLsNOS8）を用いた *in vitro* 酵素活性試験を行い、rLsNOS8 が産生する NO が rLsNOS2 と同様に AHX の窒素源となることを明らかにした。したがって、コムラサキシメジ生体内では、LsNOS によって L-Arg から産生される NO がプリン代謝経路上で生合成される AHX 前駆体の AICA に取り込まれ、AHX が生合成されると考えられる。この仮説を検証するために、プリン骨格の前駆体である ^{15}N-L-Asp、^{15}N-L-Gln、$^{13}C_2$,^{15}N-Gly、^{13}C-formic acid 及び AHX 生合成に関与する[guanidino-$^{15}N_2$] L-Arg を培地に添加してコムラサキシメジ菌糸体を培養し、培養濾液を LC-MS/MS に供したところ、ラベル体 AHX が検出され、上述した 5 つの化合物の取り込みが確認された。この結果は、コムラサキシメジにおいて AHX がプリン代謝経路上で生合成され、L-Arg に由来する NO が AHX の窒素源となることを示唆した。

2-azahypoxanthine (AHX) was isolated from the culture broth of a fairy ring-forming fungus, *Lepista sordida*[1),2)]. While AHX has interesting biological activities, its biosynthetic enzymes are not completely identified. In this study, *in vitro* enzyme assay using rLsNOS8 proved that NO produced by rLsNOS8 is a nitrogen source for AHX skeleton. Therefore, we hypothesized that in *Lepista sordida*, NO produced from L-Arg by LsNOS is incorporated into 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA), a precursor of AHX biosynthesized in the purine metabolism, resulting in the biosynthesis of AHX. In feeding experiments with ^{15}N-L-Asp, ^{15}N-L-Gln, $^{13}C_2$,^{15}N-Gly, ^{13}C-formic acid and [guanidino-$^{15}N_2$] L-Arg, labeled AHX was detected by LC-MS/MS, suggesting that AHX is biosynthesized in the purine metabolism and NO derived from L-Arg is the nitrogen source of AHX skeleton.

1) Kawagishi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 752–758 (2018). 2) Kawagishi, H. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* **95**, 29–38 (2019). 3) 鈴木 兵梧, 河岸 洋和ら. 日本農芸化学会大会講演要旨集, p811 (2021).

fairy rings, nitric oxide synthase, *Lepista sordida*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3J07-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナにおけるフェアリー化合物の影響と機能解析

Effects and Functional Analysis of Fairy Compounds in Arabidopsis thaliana

○中原 諒大[1]、崔 宰熏[1,2]、ネルソン デビッド C.[3]、道羅 英夫[2]、谷口 有希[1]、深沢 知加子[1]、本橋 令子[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大・農、[2]静大・グリーン研、[3]Bot. Plant Sci., UCR)
○ Ryota NAKAHARA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], David C. NELSON[3], Hideo DOHRA[2], Yuki TANIGUCHI[1], Chikako FUKAZAWA[1], Reiko MOTOHASHI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISH[1,2] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ, [3]Dept. Bot. Plant Sci., Univ. Calif. Riverside)

芝がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象をフェアリーリングという。当研究室ではこの原因物質として 2-azahypoxanthine (AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA)及び、2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) を発見し、フェアリー化合物 (Fairy Chemicals: FCs) と称している。現在までの研究によって、フェアリー化合物の植物に対する成長調節活性、ストレス耐性の向上、普遍的内生をしていることが明らかになっており、新たな植物ホルモン候補として研究を行っているが FCs の生合成酵素・代謝酵素については未だ明らかになっていない。[1] 当研究室ではイネにおける FCs の機能解析を行っており、AHX、AOH は伸長促進活性を、ICA は伸長抑制活性を示している。しかし、シロイヌナズナに FCs と FCs の前駆体である 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)を処理した所、イネとは異なり伸長抑制活性を示した。 そこでシロイヌナズナにおける FCs の影響に着目し、FCs のシロイヌナズナにおける機能解析を行った。本研究では FCs と AICA をシロイヌナズナに 1、6、24 時間処理したサンプルを用いて RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現差解析を行った。また、LC-MS/MS に供することで FCs 含量の変化を確認し、シロイヌナズナにおける FCs の代謝と代謝産物を分析している。

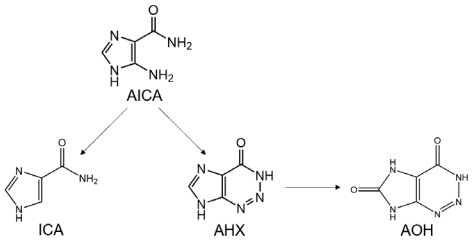


Fig. 1 FCs biosynthetic pathway

In our laboratory, 2-azahypoxanthine (AHX), imidazole-4-carboxamide (ICA), and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) were found to be the causative agents of "fairy rings" and were referred to as Fairy Chemicals (FCs). FCs and a FCs precursor, 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA), have been studied as new plant hormone candidates because they have been shown to have growth regulating activity, enhanced stress tolerance, and are universal endogenous in plants. AHX and AOH showed growth-promoting activity in rice, but growth-inhibiting activity in *Arabidopsis thaliana*. Although functions of the compounds have already been analyzing in rice, those in Arabidopsis are unknown at all. In this study, Arabidopsis plants treated with FCs were subjected to RNA-seq and LC-MS/MS to analyze the functions and metabolism of FCs.

1. Kawagishi, H. Are fairy chemicals a new family of plant hormones? *Proc. Japan Acad. Ser.* B 95, 2 9–38 (2019).

Arabidopsis thaliana, Fairy Chemicals, RNA-seq

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3J07-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

フェアリー化合物 2-アザヒポキサンチン非感受性シロイヌナズナ変異株の単離と解析

Isolation and phenotypic analysis of fairy compound-insensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*

○田中 裕基[1]、鈴木 智大[1]、伊藤 綾乃[1]、崔 宰熏[2,3]、謝 肖男[1]、野村 崇人[1]、岡本 昌憲[1]、河岸 洋和[2,3] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡大・農)
○Yuki TANAKA[1], Tomohiro SUZUKI[1], Ayano ITO[1], Jae-hoon CHOI[2,3], Xiaonan XIE[1], Takahito NOMURA[1], Masanori OKAMOTO[1], Hirokazu KAWAGISHI[2,3] ([1]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ.)

フェアリーリングとは芝生がリング状に繁茂もしくは枯死する現象のことである。この現象はコムラサキシメジをはじめとする菌類により引き起こされることが知られており、これまでの研究で、フェアリーリングを惹起する物質として、植物の成長を促進する 2-アザヒポキサンチン（AHX）、2-アザ-8-オキソヒポキサンチン（AOH）、植物の成長を抑制するイミダゾール-4-カルボキシアミド（ICA）が明らかにされている[1-3]。これら化合物は総称してフェアリー化合物（FCs）と呼ばれ、植物の成長調整剤として農業分野への応用展開が期待されている。さらに FCs は様々な植物からもその内生が確認されており[4]、本研究では、これら FCs が新規の植物ホルモンなのではないかと予想している。そこで、FCs の受容体および作用機序の解明に向けて、シロイヌナズナに対しエチルメタンスルホン酸による変異原処理を行い、AHX 非感受性変異株の作出とその解析を行った。

現在、AHX に対して非感受性を示す 30 種類以上の変異株を取得した。変異株はその特徴から、①乾燥に弱く、萎れやすく、葉の形態が丸まった変異株群と、②植物体の大きさが若干小さくなったものの、形態的に E185 野生株と同等の変異株群に大きく分かれた。今後は次世代シーケンサーによる変異株の全ゲノム解析を行い、AHX 非感受性の原因遺伝子の探索を行う予定である。

“Fairy rings” is a disease symptom in lawn; rapidly growing, lush green circular bands of grass and/or circles of mushrooms are observed. *Lepista sordida* is a mushroom belonging to the family *Tricholomataceae* and forms fairy ring, which is a phenomenon caused by the interaction between basidiomycete fungi and plants. In the previous study, 2-azahypoxanthine (AHX), 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), and imidazole-4-carboxamide (ICA) were discovered as the compounds that induce fairy rings[1-3]. These three compounds, named fairy compounds (FCs), have potential for use in the agricultural sector. We hypothesized that FCs were new plant hormones. To identify the receptors and the action mechanisms of FCs, FCs-insensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* were generated and analyzed.We obtained the more than 30 AHX-insensitive mutants, and these mutants had various characteristics. Thus, we plan to sequence whole-genomes of these mutants using next-generation sequencing in order to clarify the genes involved in AHX sensitivity in the future.

1) Choi, J.-H. et al. ChemBioChem 11, 1373-1377 (2010). 2) Choi, J.-H. et al. J. Agric. Food Chem. 58, 9956-9959 (2010). 3) Choi, J.-H. et al. Angew. Chemie. Int. Ed. 53, 1552-1555 (2014). 4) Kawagishi, H. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95, 29-38 (2019).

Fairy ring, Mushroom, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3J07-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

ゼニゴケにおけるストリゴラクトン生合成酵素の機能解析

Functional analysis of strigolactone biosynthetic enzymes in the liverwort *Marchantia polymorpha*

○福田 遥、来馬 道生、瀬戸 義哉（明大院農）
○Haruka Fukuda, Michio Kuruma, Yoshiya Seto (meiji Univ.)

ストリゴラクトン（SL）は、植物の枝分かれ抑制作用を持つ植物ホルモンである。一方で根寄生植物の発芽誘導や AM 菌の菌糸分岐誘導といった根圏シグナル物質としての作用も知られている。活性型 SL は、カロテノイドの一つである all-*trans*-β-carotene から生成される。異性化酵素である D27 は all-*trans*-β-carotene から 9-*cis*-β-carotene への変換を触媒し、続いてカロテノイド酸化開裂型酵素である CCD7 により 9-*cis*-β-apo-10'-carotenal が生成される。さらに、同じくカロテノイド酸化開裂酵素である CCD8 により SL と類似した骨格を有するカーラクトン（CL）が生成される。CL は、シトクロム P450 である CYP711A などの酵素による代謝を受け活性型 SL が生成される。ゼニゴケにおいては、これらの SL 生合成酵素遺伝子のうち、*CCD8* 以降の生合成酵素遺伝子は持たないため、SL を生合成出来ないと考えられている。一方で、*D27* ホモログが 4 つ存在することに加え、*CCD7* ホモログが 1 つ保存されている。*CCD8* 以降の SL 生合成遺伝子をもたないゼニゴケにおいて、これらの酵素遺伝子がどのような生理的役割を担っているのかには興味がもたれる。そこで、*D27* ホモログと *CCD7* ホモログが、高等植物におけるホモログと同様の酵素機能を有するか否かを明らかにするために、カロテノイド生産ベクターを導入した大腸菌を用いることで、生化学機能解析を行うこととした。

Strigolactones (SLs) are plant hormones that regulate shoot branching and diverse aspect of plant growth. They are also known as the root-derived chemical signals that regulate parasitic and symbiotic interactions with root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. The bioactive SLs are biosynthesized from all-*trans*-β-carotene. DWARF27 (D27), an iron-chelating enzyme, catalyzes the conversion from all-*trans*-β-carotene to 9-*cis*-β-carotene, and carotenoid cleavage dioxygenase 7 (CCD7) converts 9-*cis*-β-carotene to 9-*cis*-β-apo-10'-carotenal. Sequential reaction of CCD8 on this substrate yields carlactone (CL), which has a similar skeleton with SLs. CL is further metabolized by enzymes such as CYP711A to bioactive SLs. In the liverwort *Marchantia polymorpha* genome, some *D27* homologs and one *CCD7* homolog are conserved, while the SL biosynthetic genes downstream of *CCD7*, such as *CCD8*, are not conserved. In order to understand the physiological role of *D27* and *CCD7* homologs in *M. polymorpha*, we performed biochemical analysis using *Escherichia coli* transformed with a carotenoid production vector.

plant hormone, strigolactone biosynthesis, *Marchantia polymorpha*

講演番号：3J07-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

ワタ（*Gossypium hirsutum*）における strigol 合成酵素の探索

Screening of cytochrome P450s responsible for the conversion to strigol in *Gossypium hirsutum*

○若林 孝俊[1,2]、中山 芽与[1]、本間 大翔[1]、三浦 謙治[3]、滝川 浩郷[4]、水谷 正治[1]、杉本 幸裕[1,2]（[1]神戸大院農、[2]JST/JICA SATREPS、[3]筑波大生命環境、[4]東大院農）
○ Takatoshi WAKABAYASHI[1,2], Megumi NAKAYAMA[1], Masato HONMA[1], Kenji MIURA[3], Hirosato TAKIKAWA[4], Masaharu MIZUTANI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Kobe Univ., [2]JST/JICA SATREPS, [3]Univ. of Tsukuba, [4]Univ. of Tokyo)

植物ホルモンの一種であるストリゴラクトン (SL) に関する研究は、ストライガの発芽刺激物質として 1960 年代にワタ (*Gossypium hirsutum*) の根浸出液から strigol が単離されたことに始まる。Strigol は 5-deoxystrigol (5DS) からシトクロム P450 (CYP) によって変換されることが示唆されているが、生合成酵素の同定には至っていない。本研究では、ワタ (*G. hirsutum*) における strigol 合成酵素遺伝子の同定を目指し、CYP 遺伝子のスクリーニングを行った。

SL の生合成経路では、β-carotene から生合成中間体である carlactone が生成され、その後、CYP711A によって carlactonoic acid (CLA) に変換される。我々は以前に、別種のワタ (*G. arboreum*) の GaCYP722C が、CLA から 5DS への変換を触媒することを明らかにした。そこで、ベンサミアナタバコを用いた一過的タンパク質発現システムである「つくばシステム」を利用し、5DS に至る生合成遺伝子を共発現させることで、タバコ葉内で 5DS を合成した。ここに、strigol 合成酵素の候補遺伝子を共発現させることで、5DS から strigol への変換を指標としたスクリーニング系を構築した。候補遺伝子として、SL 生産が誘導されるリン欠乏条件下で発現上昇する CYP 遺伝子を選抜した。スクリーニングの結果、共発現させた候補遺伝子の一つにおいて、顕著な strigol 生産を確認した。現在、この酵素遺伝子についてさらなる生化学的解析を進めている。

The first structural determined strigolactone (SL), strigol, was isolated from root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum*) as a germination stimulant for *Striga* in the 1960s. It has been suggested that strigol is converted from 5-deoxystrigol (5DS) catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase (CYP); however, the enzyme responsible for this conversion has not been identified.

We have previously shown that GaCYP722C of another species of cotton (*G. arboreum*) catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5DS. Using a transient protein expression system in *Nicotiana benthamiana*, we reconstructed 5DS biosynthesis in *N. benthamiana* leaves by co-expressing GaCYP722C with the upstream SL biosynthesis genes. Candidate genes for strigol synthase were co-expressed in combination with the reconstructed 5DS pathway, and strigol production was evaluated. For the candidates, we selected CYP genes whose expression increases under phosphate deficient conditions that induce SL production. As a result of screening, one co-expressed CYP gene showed significant consumption of 5DS and production of strigol.

Cytochrome P450, Plant hormone, Strigolactone

講演番号：3J07-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

根寄生植物 *Striga asiatica* における SL 受容体の機能解析

Functional analysis of SL receptors in the root parasitic plant *Striga asiatica*

○内山 雄太[1]、遠矢 莉子[2]、瀬戸 義哉[1] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Yuta UCHIYAMA[1], RIKO TOOYA[2], YOSHIYA SETO[1] ([1]Meiji Univ. graduate school, [2]Meiji Univ.)

ストリゴラクトン（以下 SL）は、枝分かれ制御等の作用を有する植物ホルモンとしての機能を有している。一方、根寄生植物は、宿主となる植物の根から放出される SL を感知して発芽する。非寄生植物においては SL が植物ホルモンとして機能する際の受容体としてα/β-hydrolase ファミリーに属する D14 が同定されている。さらに、D14 のパラログである HTL は煙由来の発芽誘導分子であるカリキンに加え、未知のリガンド分子を受容することが報告されている。根寄生植物である *Striga hermonthica* においては、*HTL* ファミリー遺伝子が多数存在しており、その多くは非寄生植物に見られる HTL から独自に進化を遂げたクレードを形成しており、これらが発芽時における SL 受容体として機能することが明らかとなった。*S. hermonthica* においては現在 11 個の *HTL* ホモログが存在し、そのうちの 9 種類が SL 受容体として機能することが報告されている。近年ゲノムが解読された *S. hermonthica* の近縁種である *S. asiatica* においても多数の HTL が存在することが明らかとなっているが、それらの詳細な機能解析はなされていない。本研究では、*S. asiatica* の *HTL* の幾つかについて、シロイヌナズナの *htl* 欠損変異体にて発現させた組み換え体を作製し、それらの SL 応答性を調べることにより、*S. asiatica* における SL 受容体の同定を行った。

Strigolactones (SLs) function as phytohormones with multiple roles such as shoot branching inhibition. On the other hand, root parasitic plants germinate by sensing SLs released from the host plants root. In non-parasitic plants, D14, a member of the α/β-hydrolase family, has been identified as a receptor for SLs as plant hormones. Furthermore, HTL, a paralog of D14, has been reported to recognize the unknown ligand molecule in addition to the smoke derived germination inducers, karrikins. In a root parasitic plant, *Striga hermonthica*, a large number of *HTL* family genes are conserved, many of which form a clade that has evolved independently from the HTLs found in non-parasitic plants. Some of them have been shown to function as the SL receptors for germination. In the *S. hermonthica*,11 *HTL* homologs have been reported. Nine of these have been reported to function as SL receptors. Recently, the genome of *S. asiatica*, a closely related species of *S. hermonthica*, has been sequenced, and it has been shown that this species also has many HTLs. In this study, we generated transgenic Arabidopsis individually expressing *S. asiatica HTL* genes in the Arabidopsis thaliana *htl* mutant, and analyzed their potential as the SL receptor.

parasitic plant, Strigolactone, HTL

講演番号：3J07-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

独創的化合物を用いた根寄生雑草 ShKAI2c 受容体の機能へのアプローチ

Functional characterization of *Striga* ShKAI2c by using its triazole urea type specific inhibitors

○須藤 瑠璃子、関 真太郎、今村 優作、喜久里 貢、高橋 郁夫、宮川 拓也、中村 英光、浅見 忠男 (東大農)
○Ruriko SUTO, Shintaro SEKI, Yusaku IMAMURA, Ko KIKUZATO, Ikuo TAKAHASHI, Takuya MIYAKAWA, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Tokyo Univ.)

根寄生雑草ストライガは、世界中で農作物の収穫量低下を引き起こしている。ストライガの種子発芽は宿主植物が生産するストリゴラクトン（SL）により誘導され、その受容には ShKAI2d が関与する。ストライガの KAI2/HTL は 11 種類存在し、ShKAI2c、ShKAI2i および ShKAI2d の 3 つのクレードに分類され、セリン加水分解酵素ファミリーに属する。このうち ShKAI2c の機能やリガンドは未だ不明である。我々は ShKAI2c が栄養成長期以降のストライガの地上部で発現していることを確認しており、ShKAI2c が地上部で役割を持つことを想定している。

本研究では、ストライガの栄養成長期以降の生育制御による新規防除法の確立を期待し、ShKAI2c の機能解析を目指した。しかし、ストライガにおいて遺伝学的なアプローチは困難である。そこで我々は、ケミカルバイオロジーの手法を用いることにした。当研究室では、セリン加水分解酵素阻害剤としてトリアゾールウレアを基本骨格に持つ独創的な化合物を多数合成しており、そのうちいくつかは ShKAI2d や、イネの SL 受容体 D14、シロイヌナズナのカリキン受容体 KAI2 の機能を阻害することを既に見出している。酵母スリーハイブリッド法、示差走査型蛍光定量法および質量分析により、化合物ライブラリーからのスクリーニングを行い、ShKAI2c 特異的共有結合型阻害剤 KK143 を得た。さらに KK143 をストライガに接種したところ、ShKAI2c の機能について予想していない新たな知見が得られた。本発表ではその結果についても報告し、ShKAI2c の機能について議論したい。

Strigolactones (SLs) and karrikins (KARs) share a common chemical structure and received by D14 and KAI2/HTL, respectively, both of which are classified into the serine hydrolase enzyme family. *Striga* is a nasty root parasitic weed that germinates after sensing SL, and KAI2/HTL homologs are involved in the SL perception mechanism. In *Striga*, there are 11 KAI2/HTL homologs, which have been categorized into three phylogenetic clades: ShKAI2c, ShKAI2i and ShKAI2d; however, the function and the ligand of ShKAI2c are still unknown. To dissect the function of ShKAI2c, we planned to develop ShKAI2c-specific inhibitors. In this study, the screening of the compound library was conducted and ShKAI2c inhibitors were identified. Furthermore, the target specificity of the compounds was analyzed by Y2H system and found a ShKAI2c-specific inhibitor KK143. Now, we are investigating the effects of the ShKAI2c-specific inhibitor on the growth of *Striga*.

Root parasitic plants

発表責任者：浅見忠男（asami@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J07-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

ストリゴラクトンシグナル伝達による病害誘導性機構の解析

Analysis of disease inducibility mechanism by strigolactone signaling

○髙木 光佑[1]、伊藤 瑛子[1]、前田 哲[2]、草島 美幸[1]、藤田 萌香[3]、仲下 英雄[3]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1]、中村 英光[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]農研機構・生物機能利用研究部門、[3]福井県立大・生物資源)

○Kosuke TAKAGI[1], Akiko ITO[1], Satoru MAEDA[2], Miyuki KUSAJIMA[1], Moeka FUJITA[3], Hideo NAKASHITA[3], Masaki MORI[2], Tadao ASAMI[1], Hidemitsu NAKAMURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]National Agriculture and Food Research Organization, [3]Fukui Prefectual Univ.)

ストリゴラクトン（SL）は枝分かれ抑制ホルモンとして広く知られる植物ホルモンだが、近年は、その環境ストレス耐性など、植物の強靭化にも関与していることが知られてきている。私達は、SL の受容体 D14 が過剰発現したイネ（D14ox）において、疑似病斑が生じること、さらにイネいもち病への病害抵抗性が上昇していることを確認した。そこで本研究では、新たな作物の病害防除法の確立を目指して、SL による病害抵抗性誘導のメカニズムの解析を目指した。

SL の合成アナログ GR24 をスプレー処理したイネにおいて、イネいもち病の病斑数が減少していることを見出した。さらに D14ox と野生型イネの遺伝子発現パターンの比較を RNA-seq によって解析し、サリチル酸やジャスモン酸といった、病害抵抗性に関与する植物ホルモンの代謝に関わる遺伝子発現が変動していることを見出した。そこで本発表では、RNA-seq の結果を解析して、一群の病害抵抗性関連遺伝子の発現が変動していたことを報告する。現在、これらの遺伝子変動がいもち病菌感染前後で変動するか、その変動に SL シグナルの有無が影響するかを解析中である。

また、我々は以前に D14 が枝分かれの制御因子である D53 以外にも、ジベレリンシグナルの制御因子である SLR1 と相互作用することを見出している。加えて、病害抵抗性関連因子との相互作用も見出している。そこで我々は、D14 とこれらのタンパク質の相互作用の様式が異なるかを調べることにした。D14 に様々な点変異を導入し Y2H アッセイをおこなったところ、D14–標的タンパク質相互作用に影響を与える D14 の変異が、標的タンパク質ごとに異なることを見出した。今後、これらの知見をもとに SL シグナルが病害抵抗性に与える影響についての分子基盤を確立していきたいと考えている。

Strigolactone(SL) is a plant hormone that is widely known as a branch inhibitory hormone, and its involvement in stress tolerance has recently been suggested. We have found that rice plants overexpressing the strigolactone receptor D14 (D14ox) showed increased resistance to rice blast. To establish a new disease control method for the crop, we aimed to elucidate the disease–inducing mechanism of SL. We compared the gene expression pattern between D14ox and WT by RNA–seq analysis, and found that the transcript levels of a series of disease resistance factors were increased. We also performed Y2H assay and pull–down assay using various D14 mutated protein and target proteins. The data suggested the different binding mode between D14 and each target protein.

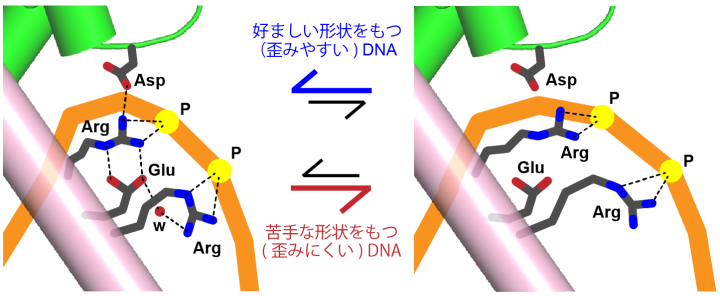
strigolactone

講演番号：3J07-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

ブラシノステロイド応答性の遺伝子抑制にはマスター転写因子の DNA 形状認識が必須である
Brassinosteroid-induced transcriptional repression requires DNA shape recognition by a master transcription factor

○野崎 翔平[1,2,3]、光田 展隆[4]、坂本 真吾[4]、山上 あゆみ[5]、徐 玉群[3]、Bui Thi Bao Chau[3]、寺田 透[3]、三浦 謙治[1,2]、中野 雄司[5]、田之倉 優[3]、宮川 拓也[3]([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・T-PIRC、[3]東京大・院・農生科、[4]産総研・生物プロセス研究部門、[5]京都大・院・生命科学)
○Shoheoi Nosaki[1,2,3], Nobutaka Mitsuda[4], Shingo Sakamoto[4], Ayumi Yamagami[5], Yuqun Xu[3], Thi Bao Chau Bui[3], Tohru Terada[3], Kenji Miura[1,2], Takeshi Nakano[5], Masaru Tanokura[3], Takuya Miyakawa[3] ([1]Fac. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, [2]T-PIRC, Univ. Tsukuba, [3]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [4]Bioprod. Res. Inst., AIST, [5]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

ブラシノステロイド（BR）は植物の成長・発達および環境ストレスや病害虫への応答を広く制御する植物ホルモンである。BR 情報伝達を司るマスター転写因子は BIL1/BZR1 であり、BR 応答遺伝子を正または負に制御することが知られているが、BL1/BZR1 依存的な BR 応答遺伝子制御の分子実態についての理解は不十分であった。そこで我々は、独自のマイクロアレイによる BR 依存的な遺伝子発現変化の解析、および DAP-seq 解析データベースから抽出したゲノム上の BIL1/BZR1 結合サイトの結果を組み合わせて比較解析を行ったところ、プロモーターに BIL1/BZR1 結合サイトを持つ遺伝子は抑制される傾向にあり、抑制される遺伝子のプロモーターには BIL1/BZR1 が単独で強く結合可能なサイトが存在する傾向が見出された。また、DAP-seq 解析結果およびゲルシフトアッセイより BIL1/BZR1 はコア塩基配列の隣接 2 塩基を選択的に認識することが明らかとなった。さらに、変異体解析および構造解析より BIL1/BZR1 の隣接 2 塩基に対する結合選択性は DNA の形状認識が基盤となっていることが強く示唆された。以上の結果は、BR 応答遺伝子制御の全容解明に向けて、重要な進展をもたらしたと考えられる。



BIL1/BZR1 is a plant-specific transcription factor that converts the signaling of the phytohormones brassinosteroids (BRs) to transcriptional responses, thus controlling various physiological processes in plants. Although BIL1/BZR1 upregulates some BR-responsive genes and downregulates others, the molecular mechanism underlying the dual roles of BIL1/BZR1 is still poorly understood. In this study, we analysed the DAP-seq data of BIL1/BZR1 and our genome-wide microarray data of BR-responsive genes. These analyses indicated that BR-responsive transcriptional repression required BIL1/BZR1 alone to bind tightly to the gene promoters, while transcriptional activation did not require it. Furthermore, we revealed that two nucleobases flanking the core-binding site are critical for the tight binding of BIL1/BZR through DNA shape recognition and for the resultant transcriptional repression. Our results from the integrated approach linking plant physiological analyses to biochemical and structural analyses shed light on the molecular and structural mechanism underlying BR-responsive transcriptional regulation.

Plant hormone, Brassinosteroid, Transcription factor

講演番号：3J07-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

好熱菌発酵産物由来の耐熱性機能性細菌 *Paenibacillus* sp.の植物生育促進性候補遺伝子群の同定と構造方程式モデリングにおけるオミクス統計評価

Identification of plant-growth-promoting gene candidates in thermostable functional *Paenibacillus* sp. from thermophile-fermented compost, and their omics data-based statistical estimation by structural equation modeling.

○宮本 浩邦[1,2,3,4]、須田 亙[4]、中熊 映乃[1,2,3]、富永 直樹[5]、宮本 久[6]、井藤 俊行[7]、佐藤 心郎[8]、守屋 繁春[8]、松浦 真紀子[1,2]、進藤 智恵[4]、児玉 浩明[1]、平井 優美[8]、茂田 勝美[5] ([1]千葉大院・園芸、[2](株)サーマス、[3]日環科学(株)、[4]理研・IMS、[5]タキイ種苗(株)、[6](株)三六九、[7]京葉ガスエナジーソリューション(株)、[8]理研・CSRS)

○Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3,4], Wataru Suda[4], Teruno Nakaguma[1,2,3], Naoki Tominaga[5], Hisashi Miyamoto[6], Toshyuki Ito[7], Meneo Sato[8], Shigeharu Moriya[8], Makiko Matsuura[1,2], Chie Shindo[4], Hiroaki Kodama[1], Masami Yokota Hirai[8], Katsumi Shigeta[5] ([1]Chiba Univ., [2]Sermas Co., Ltd., [3]Japan Eco-science Co., Ltd., [4]RIKEN IMS, [5]Takii Seed Co.,Ltd., [6]Miroku Co., Ltd., [7]Keiyo gas energy solution Co.,Ltd., [8]RIKEN CSRS)

好熱菌 *Bacillaceae* を主体とした高温発酵産物は土壌の微生物構造を改変し、作物の成長や生体防御を向上させる可能性があることが示唆されている(*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013、日本農芸化学会報告等)。本研究では、当該作用機序を明らかにする目的で、実験室モデル植物、圃場モデルとして様々な葉菜類、果菜類、根菜類に与える発酵産物の影響を土壌・作物体を対象としたオミクス解析に基づいて網羅的に評価した。アソシエーション解析、安定同位体試験などの結果から、一つの傾向として窒素固定、並びに温暖化係数が高い N_20 の発生量を抑制する傾向を確認することができた。窒素固定菌に焦点を絞った結果、熱安定性窒素固定菌候補 *Paenibacillus* 属が単離同定に成功し、単離菌株のゲノム解析によって、nif 関連遺伝子群、並びに成長調節(インドール酢酸の産生能、シデロフォア反応、リン酸可溶化能)関連遺伝子群を確認することができた。さらに、モデル作物の葉茎部、根部、並びに土壌のオミクスデータを観測変数とした上で、土壌中の *Paenibacillus* 属に関わる共分散構造分析をすることによって、作物種を超えた発酵産物の施肥効果の因果関係を統計的に評価することができた。以上の結果から、発酵産物は、根圏微生物の制御の上で、土壌-植物体の窒素代謝系のみならず様々な代謝に影響を与えていることが示唆された。

A compost fermented by thermophiles including Bacillaceae could modify the microbial structure of soil and improve crop growth and biodefense (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, *etc.*). Here the effects on various leaf vegetables, fruit vegetables, and root vegetables in a laboratory and field model are comprehensively analyzed based on omics analysis for soil and crops. Association analyses and stable isotope tests confirmed nitrogen fixation and N_2O reduction. As a result of focusing on nitrogen fixation, the genus *Paenibacillus* spp., candidates for thermostable nitrogen-fixing bacteria, were isolated. Genome analyses revealed that the isolated strains had nif-related genes and crop growth-related genes (indole acetic acid production, siderophore, phosphate solubilization). Furthermore, structural equation modeling using the omics data statistically estimated the causal relationship of the compost effects. Thus, these observations highlight that effective bacterial candidates in the compost modulate rhizosphere microorganisms and influence the quality of the crop via various metabolic alterations as well as the nitrogen metabolism system of soil-plants .

Thermophile, Omics, plant

発表責任者：宮本浩邦（h-miyamoto@faculty.chiba-u.jp）

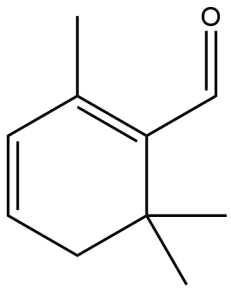
講演番号：3J07-12
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 13:30～ ミーティングルーム J

サフラナールのレタス主根伸長促進作用における内在性 ABA の関与の検討と構造活性相関

Possible involvement of endogenous ABA in safranal-enhanced primary root elongation of lettuce and structure-activity relationships of safranal and its analogs

○岡 智将[1]、藤丸 佑紀[1]、山口 拓也[1,2]、松山 茂[1]、春原 由香里[1] ([1]筑波大生命環境科学研究科、[2]富山県立大工学部)
○Tomomasa OKA[1], Yuki FUJIMARU[1], Takuya YAMAGUCHI[1,2], Shigeru MATSUYAMA[1], Yukari SUNOHARA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Toyama Prefectural Univ.)

植物由来揮発性有機化合物には植物に対する生長制御および環境ストレス緩和作用が報告されている。我々は, アポカロテノイドに属する揮発性化合物の一つであるサフラナールが, レタス (*Lactuca.sativa* L.cv. Legacy) の主根伸長を 60% 増加させることを見出した。また, 塩ストレス条件下でもこの作用は維持され, 塩ストレスによる主根伸長抑制を著しく緩和した。トランスクリプトーム解析により, サフラナールが ABA 生合成遺伝子である *NCED3* の発現量を上方制御すること, 液体クロマトグラフィー質量分析法により内在性 ABA 量が 1.5 倍程度増加していることが確認された。また, ABA 生合成阻害剤処理条件下において, サフラナールの主根伸長促進作用が減少した。これらの結果から, サフラナールは 内在性 ABA を増加させることで主根伸長を促進している可能性が示唆された。



Safranal

本講演では, 上記の内容とともに現在取り組んでいるレタス主根伸長活性を有する化合物の構造活性相関研究についても紹介したい。

Plant-derived volatile organic compounds (VOCs) have the potentials to promote plant development and alleviate environmental stress. We found that safranal, one of apocarotenoids, increased 60% of primary root elongation in lettuce (*Lactuca.sativa* L.cv. Legacy). In addition, this activity was maintained under salinity stress, which safranal markedly mitigated salinity-induced inhibition of primary root elongation. Transcriptome analysis showed that the expression of *NCED3*, one of ABA biosynthesis genes, was upregulated under safranal treatment, and endogenous ABA content was increased to about 1.5-fold when liquid chromatography-mass spectrometry was performed. Safranal-enhanced primary root elongation was also decreased under ABA biosynthesis inhibitor treatment. Taken together, our results suggested that safranal possibly promotes primary root elongation via the increase of ABA biosynthesis in lettuce.

Structure-activity relationship in which compounds promote primary root elongation in lettuce will also be introduced in this presentation.

Apocarotenoids, ABA, Safranal

講演番号：3J09-01
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

イネにおける AICA と AICA riboside の機能解析

Functional analysis of AICA and AICA-riboside in rice

○三好 大成[1]、崔 宰熏[1,2]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2]（[1]静大・農、[2]静大・グリーン研）

○ Taisei MIYOSHI[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hideo DOHRA[2], Hirohumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGIHSHI[1,2] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Shizuoka Univ, [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

フェアリーリングとは、芝草が輪状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象である。当研究室ではこの原因物質として 2-azahypoxanthine(AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA)、及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) をキノコ及び植物から発見し、フェアリー化合物(fairy chemicals: FCs) と称している。また、FCs は植物成長調節活性を示し、普遍的内生が確認されたことから、新たな植物ホルモン候補として研究を行っている。

当研究室は過去に、イネを使用した安定同位体ラベル化 5-aminoimidazole-4-carboxamide（AICA）の取り込み試験を行い、イネにおいて AICA から FCs が生合成されることを明らかにした。[1] また、AICA から AHX への反応では窒素を取り込むことから NO 合成経路の関連も示唆されている。しかし、FCs 前駆体である AICA の植物における機能やそれに関連する遺伝子などは未解明である。

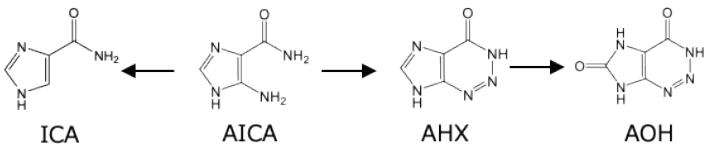


Fig. 1 FCs biosynthetic pathway in rice

本研究では、AICA, AICA-riboside を投与したイネを用いて LC-MS/MS 分析により経時的代謝を調べた結果、FCs と FCs-riboside に代謝されることが明らかになった。さらに、FCs 生合成・代謝に関わる遺伝子の同定と AICA, AICA-riboside の機能解析するために RNA-seq 解析を行った。

2-Azahypoxanthine (AHX), imidazole-4-carboxamide (ICA), and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) were identified as the fairy-ring inducing compounds and named as fairy chemicals (FCs). We have conducted uptake studies of stable isotope labeled AICA using rice and found that FCs are biosynthesized from AICA in rice.[1] The uptake of nitrogen into AHX skeleton in the reaction from AICA to AHX has also been suggested to be related to the NO synthesis pathway. In this study, we investigated the metabolism of rice treated with AICA and AICA-riboside using LC-MS/MS, and found that AICA was converted into FCs and their ribosides. In addition, RNA-seq analysis was performed on rice seedlings treated with AICA and AICA-riboside to identify genes involved in biosynthesis and metabolism of FCs, and to know function of AICA and AICA-riboside.

1. Kawagishi, H. Are fairy chemicals a new family of plant hormones? *Proc. Japan Acad. Ser. B* 95, 29–38 (2019).

AICA, AICA-riboside, Fairy Chemicals

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

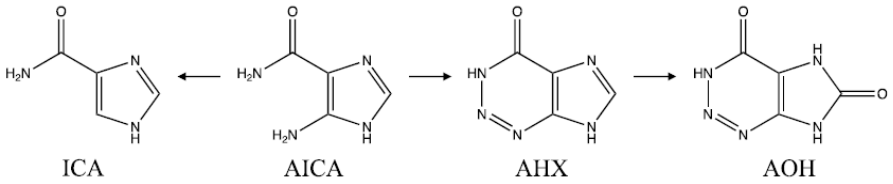
講演番号：3J09-02
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

イネにおけるフェアリー化合物 ICA の生合成研究

Biochemical study on biosynthesis of one of fairy chemicals, imidazole-4-carboxamide, in rice

○阿部 孝宏[1]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大・グリーン研、[2]静大院・創造)
○Takahiro ABE[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

私達は既にコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）より imidazole-4-carboxamide（ICA）の単離に成功しており、ICA には植物成長抑制活性があることも発見している [1)]。さらに 5-aminoimidazole-4-carboxamide（AICA）で処理したイネから ICA を検出しており、イネにおいて AICA から ICA への変換が行われていることを確認している [2)]。また ICA が AICA や 2-azahypoxanthine （AHX)、2-aza-8-oxohypoxanthine （AOH）等、他のフェアリー化合物と同様に多くの植物でも内生されていることも確認されており、本化合物が植物にとって大切な働きを持つことが示唆されている [3)]。本研究では、ICA の生合成経路の解明を目的とし、イネ培養細胞破砕液からの ICA 生合成物質の探索を行った。破砕液を限外ろ過で分画し、補因子として様々な化合物を添加して反応を確認した。その結果、$CuCl_2$ 添加時に 3,000 Da 以下画分で AICA から ICA への変換が確認された。この画分のさらなる精製を進めている。



植物におけるフェアリー化合物の生合成

We have already isolated imidazole-4-carboxamide (ICA) from the fungus *Lepista sordida,* and found that ICA has plant growth regulating activity[1)]. Furthermore, ICA has been detected from rice treated with 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA), confirming that AICA is converted to ICA[2)]. It has also been confirmed that ICA is endogenous in many plants as well as other fairy compounds, suggesting that this compound has important function(s) in plants[3)]. In this study, we attempted to identify the substances involved in the biosynthesis of ICA in order to elucidate its biosynthetic pathway. Rice cells were crushed by ultrafiltration, and conversion of AICA to ICA was observed in a fraction below 3,000 Da of the obtained liquid when $CuCl_2$ was added.

1) Choi, J.-H., Kawagishi, H., et al, *J. Agric. Food Chem*., 58. 9956-9959 (2010)、2) Takemura, H., Choi, J.-H., Kawagishi, H. et al, *Sci. Rep.,* 9, 9899 (2019)、3) Kawagishi, H. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 95, 29-38 (2019)

fairy rings, imidazole-4-carboxamide, 5-aminoimidazole-4-carboxamide

講演番号：3J09-03
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

イネにおけるフェアリー化合物 ICA の代謝産物に対する特異的なメチルトランスフェラーゼの探索
Search for specific methyltransferases for metabolites of one of fairy chemicals ICA in rice

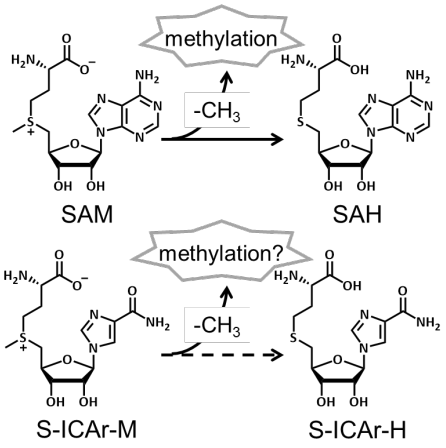
○古田島 美颯[1]、崔 宰熏[1,2,3]、道羅 英夫[2]、謝 肖男[4]、大内 仁志[5]、鈴木 智大[4]、大西 利幸[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、浅川 倫宏[6]、稲井 誠[5]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,3]([1]静大院・創造、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・総合農、[4]宇大・バイオ、[5]静県大・薬、[6]東海大・海洋)

○Mihaya KOTAJIMA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hideo DOHRA[2], Xiaonan Xie[4], Hitoshi OUCHI[5], Tomohiro SUZUKI[4], Toshiyuki OHNISHI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Tomohiro ASAKAWA[6], Makoto INAI[5], Toshiyuki KAN[5], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Center for Biosci. Res. and Educ., Utsunomiya Univ., [5]Sch. of Phar. Sci., Univ. of Shizuoka, [6]Mar. Sci. and Tech., Tokai Univ.)

イネにフェアリー化合物の 1 つである imidazole-4-carboxamide（ICA）を取り込ませると、代謝産物として *S*-ICA ribonucleoside-L-homocysteine（S-ICAr-H）が単離され、*S*-ICA ribonucleoside-L-methionine（S-ICAr-M）への変換も LC-MS/MS によって確認されている[1]。

生体内のメチル化反応は、メチルトランスフェラーゼによって *S*-adenosyl-L-methionine（SAM）のメチル基が様々な生体分子に供与されることで進行する。この時、SAM は強力なメチル化阻害剤である *S*-adenosyl-L-homocysteine（SAH）に代謝される。

SAM と SAH の関係から、ICA 代謝産物にも同様の関係が存在すると考えた。そこで、ICA 代謝産物に特異的なメチルトランスフェラーゼを探索するため、ICA 処理時と ICA 未処理時のイネを用いて RNAseq 解析を行った。GO 解析の結果、ICA 未処理時と比較して、ICA 処理時にメチルトランスフェラーゼ活性を示す多くの遺伝子が発現増加していた。現在、大腸菌を用いた異種発現によって得られた組換えメチルトランスフェラーゼの ICA 代謝産物に対する活性を検討している。



S-ICAr-M and S-ICAr-H were detected as metabolites of ICA in rice treated with ICA, one of fairy chemicals.

Methylation proceeds by donating the methyl group from SAM to various biomolecules by methyltransferases and SAM is converted into the potent methylation inhibitor SAH.

We thought that a similar relationship between SAM and SAH exists in the ICA metabolites. Therefore, in order to search for specific methyltransferases for the ICA metabolites, RNAseq analysis was performed using rice with and without ICA treatment. As a result, GO analysis indicated that the expression of genes showing methyltransferase activity was increased during ICA treatment. Examination of recombinant methyltransferase activity against the ICA metabolites is now in progress.

1) Ouchi, H., Kawagishi, H., Kan, T., *et al. J. Nat. Prod.* **84**, 453–458 (2021).

S-adenosylmethionine, methyltransferase, *Oryza sativa*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3J09-04
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

ジベレリンによるイネ葉鞘伸長の解析

Analysis of gibberellin-induced elongation in rice

○杉原 諒彦[1]、大井 崇生[2]、竹原 清日[1]、服部 将子[1]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]名大院・生命農)

○ Akihiko SUGIHARA[1], Takao OI[2], Sayaka TAKEHARA[1], Masako HATTORI[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI (TANAKA)[1] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr., Nagoya Univ.)

ジベレリン(GA)は伸長や発芽、果実の肥大など多くの生理作用に関与している植物ホルモンであり、農業分野では植物成長調節物質として利用されている。また、イネやコムギなどにおいて、GA 関連遺伝子の半矮性変異体品種は、草丈の高い品種に比べて耐倒伏性を向上させるため収量増加に利用されており、いわゆる「緑の革命」と呼ばれている。

近年、分子生物学的手法を用いた研究によって、GA 受容体 GID1 によって GA が受容されると、GA-GID1 複合体は GA シグナル伝達の抑制因子である DELLA と結合できるようになり、DELLA の分解と GA 応答を引き起こすというシグナル伝達システムが明らかになりつつあるが、GA による伸長作用機構は未だ明らかになっていない。

そこで、我々は GA による伸長作用機構の解明を目的とし、イネの第二葉鞘を用いた X 線マイクロ CT (computed tomography) スキャンを行ったところ、GA 処理による細胞伸長の詳細な形態や場所を捉える事ができた。さらに、GA 処理の有無に関わらず、基部から 1mm 間隔で採取したサンプルに対してトランスクリプトーム解析を行ったので合わせて報告する。

Gibberellins (GAs) are plant hormones, involved in many physiological processes such as stem elongation, seed germination, and fruit development, and therefore are agronomically used as plant growth regulators. In addition, GA-related semi-dwarf mutants of various cereal crops have been used to improve in lodging resistance, resulting in high yield, so called “green revolution”.

Recently, genetical and molecular biological studies have revealed the GA signaling mechanism. GA receptor GID1 binds with GAs, then the GA-GID1 complex interacts with DELLA proteins, which are repressor of GA signaling, resulting in DELLA protein degradation and GA responses. However, the mechanism of GA-induced stem elongation remains to be elucidated.

Therefore, we conduct the detailed morphological observations using X-ray microtomography. We also perform the transcriptome analysis of rice leaf segments (1 mm each) separately obtained from the base to top region of the 2nd leaf sheath in rice with or without GA.

gibberellin, plant hormone, morphological observation

講演番号：3J09-05
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

イネジベレリン生合成・代謝酵素に対する選択的阻害剤創製への試み

Attempt to develop selective inhibitors for gibberellin biosynthetic and metabolic enzymes

○竹原 清日[1]、尾原 寛之[1]、服部 将子[1]、三上 文三[2]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大・生存圏)
○ Sayaka TAKEHARA[1], Hiroyuki OBARA[1], Masako HATTORI[1], Bunzo MIKAMI[2], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI-TANAKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

ジベレリン (GA) は草丈伸長促進や発芽促進など様々な生理作用を持つ植物ホルモンである。GA の生合成酵素 GA3-oxidase (GA3ox) 及び代謝酵素 GA2-oxidase (GA2ox) は 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素 (2ODD)のグループに属する。それらの阻害剤として植物調整剤であるプロヘキサジオンカルシウム塩(PHX)が知られており、イネにおいては PHX 処理により節間伸長抑制が確認されることから、GA 生合成の阻害、つまり GA3ox がより強い阻害作用を受けていると考えられている。そこで本研究では、PHX との共結晶構造解析により PHX に対する親和性を決定する要因を解明することを目的とした。

イネ OsGA3ox2 及び OsGA2ox3 の阻害定数を測定したところ、予想通り GA3ox の方が低い値を示し、PHX に対する親和性が高いことが明らかとなった。さらに、PHX との共結晶構造決定した結果、PHX は本来 2OG と結合するアミノ酸残基と結合しており、PHX と 2OG が競合的に働いていることが分かった。また、阻害様式の違いを決めているアミノ酸の同定、ならびに PHX に対してイネとは逆の反応を示すストック植物を用いた解析についても報告する。

本研究は、基盤研究(C)の助成を受けた。

Gibberellins (GAs) are plant hormones that play a key role in plant growth and development, including seed germination, stem and root growth, flower induction and fruit set. GA biosynthetic enzyme GA3-oxidase (GA3ox) and metabolic enzyme GA2-oxidase (GA2ox) belongs to the 2-oxoglutarate–dependent dioxygenase family group. The prohexadione-calcium (PHX), a plant growth regulator, is known as an inhibitor of these enzymes. In rice, GA3ox is more strongly inhibited by PHX treatment. Therefore, the purpose of this study was to elucidate the factors that determine the affinity for PHX by analyzing the co-crystal structure with PHX.

The inhibition constants of rice OsGA3ox2 and OsGA2ox3 were measured, and as expected, GA3ox showed a lower value, indicating a higher affinity for PHX. In addition, the co-crystal structure of GA3ox and PHX shows that the amino acid that originally binds to 2OG binds to PHX, indicating that PHX and 2OG are competitive inhibitors. Furthermore, we will also report the identification of amino acids involved in the different pattern of inhibition and the analysis using stock plants (*Malcolmia maritima*) that show the opposite response to PHX as rice.

gibberellin, plant hormone, plant growth regulator

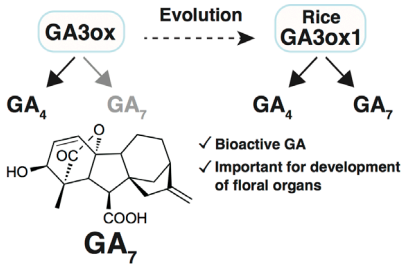
講演番号：3J09-06
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

イネ属のジベレリン 3 酸化酵素 1 の遺伝子発現と酵素活性の進化的解析

Evolutionary analyses of gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in Oryza

○河合 恭甫[1]、竹原 清日[1]、樫尾 徹[1]、森井 南美[1]、杉原 諒彦[1]、吉村 久子[1]、伊藤 亜矢[1]、服部 将子[1]、戸田 陽介[2,3]、小嶋 美紀子[4]、竹林 裕美子[4]、古海 弘康[5]、野々村 賢一[6]、三上 文三[7]、赤木 剛士[8]、榊原 均[4,9]、北野 英己[1]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1]([1]名大院・生物機能セ、[2]JST・さきがけ、[3]名大・ITbM、[4]理研・CSRS、[5]遺伝研・技術課、[6]遺伝研・植物細胞遺伝、[7]京大院・生命農、[8]岡山大院・環境生命、[9]名大院・生命農)

○ Kyosuke KAWAI[1], Sayaka TAKEHARA[1], Toru KASHIO[1], Minami MORII[1], Akihiko SUGIHARA[1], Hisako YOSHIMURA[1], Aya ITO[1], Masako HATTORI[1], Yosuke TODA[2,3], Mikiko KOJIMA[4], Yumiko TAKEBAYASHI[4], Hiroyasu FURUUMI[5], Ken-ichi NONOMURA[6], Bunzo MIKAMI[7], Takashi AKAGI[8], Hitoshi SAKAKIBARA[4,9], Hidemi KITANO[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI-TANAKA1[1] ([1]Biosci. and Biotechnol. Cent., Nagoya Univ., [2]JST, [3]ITbM, Nagoya Univ., [4]RIKEN CSRS, [5]Technical Section, Natl. Inst. Genet., [6]Plant Cytogenetics, Natl. Inst. Genet., [7]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [8]Grad. Sch. Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [9]Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)



植物ホルモンのジベレリン（GA）は、草丈の伸長や花器官の発達など様々な成長過程を制御する。植物体内で GA は複数の酵素が関わる段階的な合成経路を経て活性型 GA に至り、前駆体から活性型 GA への変換は Gibberellin 3-oxidase (GA3ox)が担う。イネではゲノム上に 2 つの GA3ox オルソログが存在し、OsGA3ox1 は花器官のみに特異的に、OsGA3ox2 は全身で発現する。このうち OsGA3ox1 は、進化の過程で補基質との結合部位において他の GA 合成酵素が持たないアミノ酸残基（Phe235）を獲得し、これにより生物活性の高い GA_7 を合成可能である。我々はイネの OsGA3ox1 の遺伝子発現と酵素活性の進化の詳細を明らかにすることを目的に、イネ属植物から単離した GA3ox1 オルソログを用いた解析を行った。その結果、イネ（*O. sativa*）から *O .brachyantha* の共通祖先で上記のアミノ酸残基置換を獲得し、イネに近い種の GA3ox1 ほど GA_7 合成能が高いことを見出した。さらに、遺伝子発現についてもイネに近い種のものほど葯に特異的な発現様式を示すことがわかった。そのほか、上記の酵素活性と遺伝子発現の進化と花器官の発達における表現型との関連についても報告する。

The plant hormone gibberellin (GA) regulates a variety of developmental processes, including plant height and flower organ development. In plants, GAs are synthesized in a stepwise manner by multiple oxidases, and the conversion from direct precursors to bioactive GAs is mediated by Gibberellin 3-oxidases (GA3oxs). In rice, there are two *GA3ox* orthologs in the genome. *OsGA3ox1* is expressed specifically in floral organs, and *OsGA3ox2* is expressed in various organs. In the course of evolution, OsGA3ox1 has acquired the amino acid residue in interacting site to the co-substrate (Phe235) that other GA biosynthetic enzymes do not have, and is capable of synthesizing GA_7 which has high biological activity. We performed functional and expression analyses using *GA3ox1* orthologs isolated from wild rice plants to elucidate the evolutionary details of *GA3ox1*s. We found that the common ancestor of rice (*O. sativa*) and *O. brachyantha* acquired substitutions of amino acid residues described above, and that the GA3ox1 of the species closer to rice had higher GA_7 synthesis activity. In addition, gene expression also showed more anther-specific pattern in species closer to rice. We will also report on the association of the enzymatic activities and gene expressions of *GA3ox1*s with the reproductive phenotypes.

plant hormone, gibberellin, evolution

講演番号：3J09-07
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナ AtGH3.10 はジャスモン酸-アミノ酸結合酵素として機能する

AtGH3.10 functions as a jasmonic acid-amido synthetase in Arabidopsis thaliana

○清水 崇史[1]、デルフィン ジェイ カミソラ[1]、菅野 裕理[2]、瀬尾 光範[2]、北岡 直樹[3]、松浦 英幸[3]、峠 隆之[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]理研 CSRS、[3]北大院・農)
○ Takafumi SHIMIZU[1], Jay Camisora DELFIN[1], Yuri KANNO[2], Mitsunori SEO[2], Naoki KITAOKA[3], Hideyuki MATSUURA[3], Takayuki TOHGE[1] ([1]NAIST, [2]RIKEN, CSRS, [3]Hokkaido Univ.)

ジャスモノイルイソロイシン(JA-Ile)は植物の花成や傷害応答などに関わる植物ホルモンである。シロイヌナズナでは AtJAR1 がジャスモン酸（JA）にイソロイシン（Ile）を結合させる JA-Ile 生合成酵素として知られているが, *atjar1* 欠損変異体が示す表現型は他の JA 欠損変異体に比べて軽微であることから, 他の JA-Ile 合成酵素遺伝子の存在も示唆されていた。本研究ではシロイヌナズナの *AtGH3.10* が新たな JA-Ile 合成酵素遺伝子として機能する可能性について調べた。*AtGH3.10* は *AtJAR1* と最も配列相同性が高い遺伝子として見出された。組換え酵素の活性試験から, AtGH3.10 は JA に Ile や他のアミノ酸を結合させる活性を有することが示された。ゲノム編集により *atgh3.10* 欠損変異体と *atgh3.10/atjar1* の二重欠損変異体を作製し, 表現型観察を行った結果, *atgh3.10* は *atjar1* 欠損変異体と同様に明瞭な表現型を示さなかったが, *atgh3.10/atjar1* 二重欠損変異体は花の形態異常や稔実率の低下など, JA 欠損変異体に典型的な表現型を示した。花器官における JA 類定量や JA 応答性遺伝子の発現解析から, 二重変異体における JA-Ile 内生量の低下がその原因であることが示唆された。葉の傷害応答についても調査したところ, *atgh3.10/atjar1* 二重欠損変異体では野生型や各単独欠損変異体に比べ JA-Ile や他の JA アミノ酸結合体の蓄積量, JA 応答性遺伝子の発現量が顕著に低下していた。以上の結果から *AtGH3.10* は JA-アミノ酸結合酵素遺伝子であることが示唆された。

Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) is a plant hormone that regulates flowering and wound response. JA-Ile is biosynthesized via conjugation of jasmonic acid (JA) and isoleucine (Ile). In Arabidopsis, AtJAR1 has been identified as a JA-Ile biosynthetic enzyme. However, Arabidopsis mutants defective in *AtJAR1* do not show male sterility that can be observed in other JA-biosynthetic mutants, suggesting that other genes may have functional redundancy with *AtJAR1*. In this study, we performed functional characterization of *AtGH3.10* as a candidate of JA-Ile biosynthetic gene. Recombinant AtGH3.10 exhibited an activity to conjugate JA and Ile. Reduced number of viable siliques was observed in *atgh3.10/atjar1* double mutant but not in *atgh3.10* or *atjar1* single mutants. Substantial reduction of JA-Ile accumulation was observed in the flower buds of the double mutant compared to that of single mutants. Wound-induced accumulation of JA-Ile and expression levels of JA-responsive genes were significantly lower in the double mutant than those in single mutants. These findings suggest that *AtGH3.10* is a JA-amido synthetase gene.

jasmonate, plant hormone, Arabidopsis

発表責任者：清水 崇史（takshim@bs.naist.jp）

講演番号：3J09-08
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

シソ科植物における *cis*-jasmone 生合成経路の解明

Elucidation of the biosynthetic pathway of *cis*-jasmone in Lamiaceae plants

○井上 史朗[1]、北岡 直樹[1]、松田 一彦[2]、松浦 英幸[1] ([1]北大農、[2]近大農)
○ Shiro INOUE[1], NAOKI KITAOKA[1], KAZUHIKO MATSUDA[2], HIDEYUKI MATSUURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kinki Univ.)

【背景・目的】*cis*-Jamone(CJ)は、ジャスモン酸類縁体の化合物であり、香気成分として香水や化粧品などで広く利用されている。この CJ の生合成は、ジャスモン酸(JA)を経由する経路 A と *iso*-OPDA を経由する経路 B の二つの経路が提唱されている。本研究では、植物界において、主にどちらの経路で CJ が生合成されているかを解明するべく、CJ を生合成する植物の探索及び、その植物における重水素標識化された生合成中間体を用いた生合成経路解析を行った。
【方法・結果】CJ を生合成する植物の探索を行った。GC-MS を用いて、北海道大学構内に自生する植物を中心に CJ 生合成の有無を分析したところ、ナガバハッカ(*Mentha longifolia*)において CJ 生合成が確認された。さらに、ナガバハッカが属するシソ科の植物を分析したところ、スペアミント(*Mentha spicata*)、アップルミント(*Mentha suaveolens*)、ローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)においても CJ 生合成が確認された。次に、CJ 生合成中間体の重水素標識体の合成を行った。メチルジャスモン酸(MeJA)を原料に、witting 反応等を行うことで、3 種の重水素標識体(MeJA-d6、4,5-didehydro MeJA-d6、3,7-didehydro MeJA-d6)を合成した。最後に、これらの重水素標識体を用いて、アップルミントにおける CJ 生合成経路解析を行った。アップルミントと重水素標識体を密閉容器に共存させ、空気伝播によって植物体に重水素標識体を施した。次に CJ-d6 の生合成の有無を分析すると、3,7-didehydro MeJA-d6 処理時は CJ-d6 が検出されたが、MeJA-d6 及び 4,5-didehydro MeJA-d6 処理時は CJ-d6 が検出されなかった。この傾向は上記の植物においても一致しており、シソ科植物における CJ 生合成は、*iso*-OPDA を経由する経路 B を用いて行われていることが示唆された。

cis-Jasmone (CJ) is an analog compound of jasmonic acid, which is widely used as an aromatic ingredient in perfumes and cosmetics. Two pathways for the biosynthesis of CJ have been proposed: pathway A via jasmonic acid (JA) and pathway B via *iso*-OPDA. Therefore, in this study, we tried to elucidate which pathway is mainly used for the biosynthesis of CJ in various plants. We found that some plants in Lamiaceae produce CJ. Secondly, We synthesized three deuterated compounds that are probably CJ biosynthetic intermediates. Finally, we treated the plants with airborne deuterium-labeled compounds and analyzed CJ-d6 using GC-MS. In case of appling 3,7-didehydro MeJA-d6, CJ-d6 was detected. However, CJ-d6 was not detected in that of MeJA-d6 or 4,5-didehydro MeJA-d6. It was suggested that Lamiaceae plants biosynthesize CJ via *iso*-OPDA (Pathway B).

cis Jasmone, Jasmonic acid, *iso*-OPDA

発表責任者：井上史朗（shiro529@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3J09-09
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

空気伝搬のメチルジャスモネートの植物における代謝 （その２）

Elucidation of metabolic pathway for air borne methyl jasmonate in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (part 2)

○榎 亜加音[1]、大木 克成[1]、北岡 直樹[1]、清水 崇史[2]、峠 隆之[2]、松浦 英幸[1] ([1]北大農、[2]奈良先端大・バイオ)
○Akane ENOKI[1], Katsunari OKI[1], Naoki KITAOKA[1], Takafumi SHIMIZU[2], Takayuki TOHGE[2], Hideyuki MATSUURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]NAIST)

【背景・目的】ジャスモン酸（JA)は、植物の形態形成や病傷害への防御応答などを制御する生理活性物質である。その類縁体であるジャスモン酸メチル（MeJA)は、空気を介して近隣の植物に伝搬・代謝されることで傷害を受けていない植物においても防御応答を引き起こすことが知られている。しかし、空気伝搬した MeJA の植物体における代謝や受容機構に関しては、不明な点も多い。本研究では、気中より MeJA を吸収した植物における MeJA の代謝機構を明らかにすることを目的とし､研究を行った。
【結果】半密閉容器内でシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*)に MeJA の重水素標識体（MeJA-d_5)を空気伝搬し、処理後の植物体における JA 類の内生量を調べた。その結果、JA の活性型とされるジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile)の蓄積量は極微量であった一方で、12-ヒドロキシ JA（12OHJA)および 12-ヒドロキシ JA-Ile（12OHJA-Ile)の重水素標識体の顕著な蓄積が観察された。続いて、JA-Ile と 12OHJA のどちらを経由して 12OHJA-Ile が生成するかを明らかにするため、JA-Ile の 12 位水酸化酵素をコードする *CYP94B3* の欠損株に MeJA-d_5 を吸わせ、処理後の植物体内における JA 類の定量分析を行った。その結果、*cyp94b3* 欠損株では 12OHJA-Ile の重水素標識体が野生株と同程度蓄積されることが明らかとなった。さらに、MeJA-d_5 処理後の遺伝子転写量を定量 RT-PCR を用いて調べ、MeJA 処理により、JA の 12 位水酸化酵素である *JASMONATE-INDUCED OXYGENASES*（*JOX*)遺伝子の転写量が顕著に誘導されることが明らかとなった。以上の結果より、気中より伝搬した MeJA は主に 12OHJA を経由して 12OHJA-Ile へと変換されることが示唆された。

Jasmonic acid (JA) is a plant hormone, which is involved in a variety of biological functions, including defense responses. Its analog, methyl jasmonate (MeJA), is also known to induce defense responses in airborne form and be metabolized in neighboring plants. However, the metabolic pathway of airborne MeJA remains to be elucidated. In this study, airborne deuterium-labeled MeJA (MeJA-d_5) was submitted to *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *cyp94b3* mutant, and the endogenous amounts of jasmonates in the treated plants were examined. The results showed that deuterium-labeled 12-hydroxyJA (12OHJA) and 12-hydroxyJA-Ile (12OHJA-Ile) accumulated significantly more than that of the labeled isoleucine jasmonic acid (JA-Ile), and the amount of accumulation was comparable between Col-0 and *cyp94b3* mutants. Furthermore, MeJA treatment markedly induced the transcription level of *JOX* gene, a hydroxylase at position 12 of JA. These results suggest that 12OHJA, but not JA-Ile, is the major intermediate in the conversion of 12OHJA to 12OHJA-Ile.

methyl jasmonate (MeJA), metabolic pathway, 12-hydroxyJA-Ile (12OHJA-Ile)

講演番号：3J09-10
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

オーキシンの不活性化経路の再構築に関する研究

Reconstruction of auxin inactivation pathway

○田中 佑佳[1]、新井 一司[1]、福井 康祐[1]、Guo Ruipan[4]、Hu Yun[4]、Ge Chennan[4]、青井 勇輝[2]、比良 隼[2]、Zhao Yunde[4]、笠原 博幸[2,3]、林 謙一郎[1] ([1]岡山理科大・理、[2]東京農工大院、[3]理研・CSRS、[4]カルフォルニア大サンディエゴ校)

○Yuka TANAKA[1], Kazushi ARAI[1], Kosuke FUKUI[1], Ruipan GUO[4], Yun HU[4], Chennan GE[4], Yuki AOI[2], Hayao HIRA[2], Yunde ZHAO[4], Hiroyuki KASAHARA[2,3], Ken-ichiro HAYASHI[1] ([1]Okayama Univ. of Science, [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [3]RIKEN CSRS, [4]Univ. of California San Diego)

植物のホルモン・オーキシン（IAA： indole-3-acetic acid）の細胞内濃度の調節は、IAA の生合成、極性輸送および不活性化によって調節される。IAA の生合成や極性輸送の分子機構が明らかにされた一方、その不活性化経路については、DAO 酵素による酸化、GH3 酵素によるアミノ酸付加、配糖体化、メチルエステル化など複数の経路が提唱されているが、その全体像は明らかになっていない。

我々は、IAA が主な不活性化経路としてアミノ酸付加後、酸化的に代謝される GH3-DAO-ILR1 経路を決定した。オーキシン不活性化酵素の欠失変異体や過剰発現体を作製し、それらの IAA 代謝物分析と標識体の取り込み実験を行った結果、GH3 酵素の下流で、DAO 酵素は IAA-アミノ酸複合体を oxIAA（2ーオキシインドリン 3ー酢酸）-アミノ酸複合体へと酸化する酵素であると推定した。また、植物体内で ILR1 加水分解酵素によって、oxIAA-アミノ酸複合体は oxIAA へと分解された。oxIAA はさらに dioxIAA (3-hydroxy-oxIAA)へと代謝されることがわかった。これまで DAO 酵素が IAA を直接酸化して、IAA の主要な不活性化物である oxIAA へに変換すると考えられてきたが、 DAO 組換え酵素の活性を再検討したところ、DAO 酵素は IAA-アミノ酸複合体の酸化酵素であることが示された。

すなわち、この代謝経路では、IAA は GH3 酵素により一時的な貯蔵体である IAA-アミノ酸複合体に変換され、続いて DAO 酵素が IAA-アミノ酸複合体を不可逆的に酸化して、oxIAA-アミノ酸複合体へと代謝し、さらに ILR1 酵素が oxIAA へと加水分解することが示された。本研究によりオーキシンの主要な不活性化は、GH3-DAO-ILR1 の 3 つの酵素が直線状に位置する代謝経路であると決定された。

Natural auxin、 indole-3-acetic acid (IAA) plays a crucial role in every aspect of plant development. Cellular IAA level is coordinately modulated by biosynthesis、 polar transport、 inactivation of IAA. The several inactivation pathways of IAA have been proposed so far、 such as oxidation、 amino acid conjugation、 glycosylation、 and methyl esterification. We herein present that auxin is mainly inactivated by linear GH3-DAO-ILR1 pathway. In this pathway、 IAA is initially converted to IAA-amino acid conjugates. DAO enzyme oxidizes IAA-amino acid conjugates to form oxIAA-amino acid conjugates. ILR1 enzyme hydrolyzes oxIAA-amino acid conjugates to afford oxIAA. This inactivation pathway is determined by in vitro enzyme assays and the analyses of IAA metabolites in the loss of functional mutants and overexpressing mutants of auxin-inactivation enzymes.

Plant hormone, auxin, inactivation

発表責任者：林　謙一郎（hayashi@dbc.ous.ac.jp）

講演番号：3J09-11
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

コリンおよび N-アリルグリシンによる植物生長促進とその分子機構

Plant growth promotion by choline and N-allylglycine and its molecular mechanism

○池田 直樹[1]、松浦 佑馬[2]、神村 麻友[2]、蔡 晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大院バイオ、[2]長浜バイオ大バイオ、[3]長浜バイオ大ゲノム編集研究所）
○Naoki IKEDA[1], YUUMA MATSUURA[2], MAYU KAMIMURA[2], Che Fang-Sik[1,2,3] ([1]Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]GERI, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

コリンを様々な植物に処理すると生育が促進され、乾燥重量が増加することが知られている。コリンによる植物の生育促進の分子機構を明らかにするために、分子レベルでの解析が可能なシロイヌナズナに対するコリンの効果を調べた。コリンを 0.3～300 μM の範囲内で含む 1/2MS 培地にシロイヌナズを播種し 10 日間生育させたところ、0.6～60 μM の間で生育促進が確認された。6 μM のコリンを含む 1/2MS 培地にシロイヌナズナを播種し 10 日間生育させたときの生育を部位ごとに確認したところ、主根が約 1.2 倍に伸長し、葉面積が約 1.2 倍に増加し、乾燥重量も約 1.1 倍に増加した。コリンによる生育促進の機構を調べるため、シロイヌナズナにコリンを噴霧処理し、2 日後の光合成活性を測定したところ、コントロールに比べ約 1.1 倍に上昇していた。我々は以前、N-アリルグリシンも小麦プロトプラストの光合成活性を促進することを報告している。そこで次に、シロイヌナズナの生育に及ぼす N-アリルグリシンの効果についても検討した。6 μM の N-アリルグリシンを含む 1/2MS 培地でシロイヌナズナを生育させたところ播種後 10 日で乾燥重量が約 1.4 倍に増加した。この様なコリンと N-アリルグリシンの生育促進がその他の植物種でも観察されるのかを明らかにするために、アブラナ科植物である尾上菜にコリンと N-アリルグリシンを処理したところ乾燥重量の増加が認められた。そこで、コリンと N-アリルグリシンによる生育促進および光合成促進の分子機構を調べるため、コリンと N-アリルグリシンをシロイヌナズナおよび尾上菜に処理し発現変動する遺伝子を RNAseq 解析で比較したところ、光合成や生育制御に関わる遺伝子が共通で発現変動していることが示された。

To clarify the molecular mechanism of plant growth promotion by choline, effects of choline on *A. thaliana* was investigated. When *A. thaliana* is grown on 1/2MS medium containing 0.3～300 μM choline, an increase in dry weight, an increase in leaf area, and root elongation were observed within 0.6～60 μM choline. Moreover, photosynthesis was promoted in *A. thaliana* treated with choline. We previously reported that N-allylglycine promotes wheat photosynthesis. Therefore, when *A. thaliana* was treated with 6 μM N-allylglycine, growth promotion of 1.4 times was observed. Transcriptome analysis using RNAseq revealed that choline and N-allylglycine commonly express genes involved in photosynthesis and growth.

Choline, N-allylglycine, growth promotion

講演番号：3J09-12
質疑応答日時、会場：3 月 17 日 14:30～ ミーティングルーム J

銅イオンキレーターより見出された新規エチレン制御剤

Novel Ethylene Regulators from Copper Ion Chelators

○小山 倫之、浅見 忠男（東大農）
○Tomoyuki KOYAMA, Tadao ASAMI (Univ. Tokyo)

エチレンは気体の植物ホルモンであり、開花や花弁の老化、果実の成熟の促進といった、農業あるいは園芸上重要な活性を持っている。また、エチレンはアフリカを中心に作物に甚大な被害を及ぼしている根寄生植物であるストライガの発芽を誘導することでも知られている。これらの性質を用いて、エチレンは果実の栽培やストライガの自殺発芽による防除などに用いられている。一方でエチレン作用阻害剤は花弁や青果の鮮度保持剤として用いられている。このように、エチレンの作用の制御は農業の生産性向上やロスの低減に貢献している。しかし、これまでに実用化されたエチレン作用制御剤には、コストや圃場での利用の面で解決すべき課題が残されている。そこで、本研究では、エチレンの作用機構という新たな着眼点に基づきエチレン作用制御剤の探索を行った。

エチレン受容体とエチレンの結合には Cu^{+}が必要であると考えられている。そこで、銅イオンキレーターよりエチレン作用を制御する化合物の探索を試みた。10 種類以上の銅イオンキレーターとして報告されている物質を用いてシロイヌナズナ黄化実生のエチレン応答を用いたスクリーニングを行ったところ、エチレン様活性を示す化合物としてルベアン酸(ジチオオキサミド)が見出された。見出された化合物の構造展開・活性評価の結果や、作用点解析の結果についても報告する予定である。

Ethylene is a gaseous plant hormone which has agriculturally or horticulturally important activities such as promotion of flowering, senescence of petals, and ripening of fruits. It is also known that ethylene induces germination of *Striga hermonthica,* a kind of root parasitic plants which causes serious damages on crops mainly in Africa. These characters of ethylene enable ethylene action regulators to improve agricultural productivity and reduce loss of agricultural products. However, ethylene action regulators applied in practical use so far have drawbacks to be improved in their use in fields and costs. In this context, we aimed for the discovery of novel ethylene action regulators in this research.

Ethylene receptors requires Cu^{+} for their proper function, and ethylene is considered to bind to Cu^{+}. Therefore, we searched for ethylene action regulators from more than 10 cupper ion chelators, and found that rubeanic acid (dithiooxamide) has ethylene-like activities. We are going to report the results of structural development and analysis on mechanism of action.

Ethylene, Plant Hormone, Plant Growth Regulator

講演番号：4A01-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

大腸菌が生成するセレンナノ粒子は細胞膜で包まれている

Selenium nanoparticles generated by *Escherichia coli* is encapsulated in cell membrane

○芝本 佳永[1]、越智 杏奈[1]、豊竹 洋佑[1]、青野 陸[1]、井上 真男[1,3]、今井 友也[2]、三原 久明[1]（[1]立命大生命、[2]京大生存研、[3]立命大 R-GIRO）
○Kano Shibamoto[1], Anna Ochi[1], Yosuke Toyotake[1], Riku Aono[1], Masao Inoue[1,3], Tomoya Imai[2], Hisaaki Mihara[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ., [3]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

セレンは多くの生物で必須微量元素であるが、必要な濃度を超えると毒性を示す。一部のバクテリアは、異化作用や無毒化作用のため、環境中の亜セレン酸 (SeO_3^{2-}) を細胞内に取り込んで還元し、セレンナノ粒子 (SeNPs) を細胞外に生成する。我々はこれまでに大腸菌が生成する細胞外 SeNPs に外膜タンパク質などが吸着していることを見いだした。しかし、SeNPs が細胞内のどの場所で形成され、どのようにして細胞外に排出されるのか、その過程には謎が多い。そこで本研究では、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて大腸菌の SeNPs 生成と排出メカニズムの解明を試みた。

まず、SeO_3^{2-}-添加・非添加培地で培養した細胞をネガティブ染色し、TEM で観察したところ、細胞質および細胞外に平均粒径 75 ± 15 nm 程度の SeNPs が観察された。細胞外 SeNPs から抽出した成分をメチルエステル化して GC/MS 分析を行った結果、細胞膜に由来する脂肪酸のピークが検出された。次に、細胞膜透過性のジチオトレイトールを用いて SeNPs を還元・溶解させ、その残骸を TEM で観察したところ、SeNPs と同程度の大きさのリポソーム様の構造物が見られた。一方で、細胞膜を透過できないチオレドキシンシステムを用いたところ、SeNPs の還元・溶解は見られなかった。以上より、大腸菌によって細胞外に排出された SeNPs が膜に包まれていることが示され、SeNPs は細胞質内で形成され、膜小胞を介して排出されることが示唆された。

In the presence of excessive selenite, some bacteria are known to produce extracellular selenium nanoparticles (SeNPs) for detoxification, but the mechanism is unknowns. Here, we aimed to elucidate the mechanism of SeNPs formation in *Escherichia coli* using negative stain transmission electron microscopy. SeNPs (75 ± 15 nm) was observed in cytosol and outside the cell grown with selenite. GC/MS analysis of components extracted from extracellular SeNPs showed peaks derived from cellular fatty acids. When the extracellular SeNPs were incubated with a membrane-permeable reducing agent, dithiothreitol, SeNPs disappeared, but liposome-like structures whose size was comparable to SeNPs remained. Meanwhile, incubation with membrane-impermeable thioredoxin system did not make any difference to extracellular SeNPs. Based on these results, SeNPs were suggested to be excreted by enclosed in membrane vesicle in *E.coli*. This propose a novel mechanism that selenite is reduced in the cytoplasm, followed by excretion of SeNPs entrapped with membrane vesicles.

selenium nanoparticle, selenite, membrane vesicles

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4A01-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

Bacillus subtilis におけるプロファージ PBSX を介した round-body 形成の亜セレン酸耐性への関与
Involvement of prophage PBSX-mediated round-body formation in selenite resistance in *Bacillus subtilis*

○越智 杏奈、井上 真男、青野 陸、三原 久明（立命大生命）
○Anna Ochi, Masao Inoue, Riku Aono, Hisaaki Mihara (Ritsumeikan Univ.)

Bacillus subtilis は毒性の高い亜セレン酸を還元・無毒化し、細胞外にセレン粒子を形成する。本菌は亜セレン酸還元時に、一部の細胞が細胞壁を失ったスフェロプラスト様「round-body」を形成する。しかしながら、round-body の形成メカニズムや亜セレン酸耐性との関係は不明である。一方、本菌は DNA 損傷時に RecA により誘導されるプロファージ PBSX を利用して一部の細胞の細胞壁を溶解し、膜小胞を形成する。そこで、亜セレン酸による DNA 損傷により PBSX が誘導され round-body を形成する可能性を考え、PBSX の round-body 形成と亜セレン酸還元への関与を調べた。

PBSX の転写を制御する RecA の遺伝子欠損株は亜セレン酸存在下で生育しなかった。一方で、他の DNA 修復遺伝子 *recO*、*uvrA* および *mutM* の各欠損株は、野生株に比べて遅れはするが亜セレン酸を還元し生育した。このことから、亜セレン酸による Δ*recA* 生育阻害は DNA 損傷が主な原因ではないことが判明し、さらに、同じ DNA 修復系の欠損株 Δ*recO* との比較から、RecA 制御下の遺伝子が亜セレン酸耐性に必須であることが示唆された。さらに、PBSX 遺伝子群の 1 つ *xkdA* の欠損株では、亜セレン酸存在下で round-body を形成せず、生育遅延が見られた。以上の結果から、RecA によって誘導される PBSX を介した round-body 形成が、本菌の亜セレン酸耐性に関与することが示唆された。

Bacillus subtilis reduces toxic selenite to nontoxic selenium particles. Selenite reduction by *B. subtilis* is known to be accompanied by cell-wall lysis of certain cell populations to form spheroplast-like “round-body”. However, the relationship between round-body formation and selenite tolerance has not been clear. On the other hand, it was reported that the cell wall of *B. subtilis* is lysed to form membrane vesicles by prophage PBSX induced by RecA in response to DNA damage. In this study, we investigated whether PBSX is involved in round-body formation and selenite resistance.

A *recA*-disrupted strain of *B. subtilis* did not grow in the presence of selenite, although other DNA repair gene-deficient strains (Δ*recO*, Δ*uvrA*, and Δ*mutM*) grew in the same medium. This suggests that the selenite-induced growth inhibition in Δ*recA* is not due to DNA damage but is related to a gene(s) regulated by RecA. A Δ*xkdA* strain lacking a component of PBSX did not form round-body even in the presence of selenite and showed growth retardation with a high concentration of selenite. These results suggest that selenite resistance in *B. subtilis* depends on round-body formation mediated by PBSX, which is regulated by RecA.

Bacillus subtilis, selenite, membrane vesicles

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4A01-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

枯草菌における膜小胞生産機構

Mechanisms of membrane vesicle formation in *Bacillus subtilis*

○安部 公博[1]、豊福 雅典[1,2]、野村 暢彦[1,2]、尾花 望[2,3]（[1]筑波大生命、[2]筑波大 MiCS、[3]筑波大 TMRC）
○Kimihiro ABE[1], Masanori Toyofuku[1,2], Nobuhiko Nomura[1,2], Nozomu Obana[2,3] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba, [3]TMRC, Univ. Tsukuba)

近年、グラム陰性・陽性を問わず、多くの細菌が、直径 20~400 nm の膜小胞を外環境中に放出することが分かってきた。しかし、グラム陰性細菌では細胞外膜の剥離によって膜小胞が形成されることが良く知られているが、グラム陽性細菌における膜小胞生産機構については、いまだ不明な点が多い。そこで本研究では、グラム陽性細菌である枯草菌における膜小胞形成機構の解析を行った。その結果、新たに 2 つの膜小胞生産経路が明らかとなった。

1) 界面活性剤添加による細胞膜ストレス、急激な温度変化、栄養飢餓、そして低酸素状態の 4 種のストレス条件下において、枯草菌が自身の細胞壁溶解酵素の作用により溶菌し、膜小胞が形成される様子が観察された。

2) これまでに、枯草菌を Brain-Heart Infusion（BHI）培地中で長時間培養すると、膜小胞を産生することが既に明らかとなっている。我々は、転写因子 Spo0A が抗菌ペプチドのサブランシン合成遺伝子群の転写を活性し、培養液中に分泌されたサブランシンが枯草菌自身を攻撃して、ダメージを受けた一部の細胞で溶菌を伴った膜小胞産生がされることを見出した。

以上の結果から、枯草菌は、外部ストレスによる受動的な膜小胞形成と、枯草菌自身が Spo0A を介して膜小胞形成をコントールしていることが明らかとなった。

Many bacteria release small membrane vesicles (MVs), regardless of Gram-negative or Gram-positive bacteria. Yet, the molecular mechanism of MV formation remains largely unclear, particularly in Gram-positive bacteria. In this study, we investigated on the mechanism of MV formation, using a Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis* strain 168. Consequently, we newly found two pathways for the MV formation. 1) *B. subtilis* releases MVs, associated with cell lysis under some stress conditions including a sucrose-fatty-acid-ester treatment (cytoplasmic membrane stress), rapid temperature shift, starvation, and low oxygen circumstance. 2) *B. subtilis* produces abundantly MVs in Brain-Heart Infusion (BHI) medium as the consequence of sibling killing by a secreted antimicrobic peptide, sublancin 168, whose biosynthetic gene operon is controlled by Spo0A.

Membrane vesicle, *Bacillus subtilis*, cell lysis

発表責任者：尾花望（obana.nozomu.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

バイオサーファクタントが細菌のメンブレンベシクルに与える影響

Effect of biosurfactants on bacterial membrane vesicles

○淡下 勇司[1]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3,4] ([1]筑波大学大学院・生命地球科学研究群、[2]筑波大学・生命環境系、[3] 筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター、[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））
○YUJI TANGE[1], NOBUHIKO NOMURA[2,3], MASANORI TOYOFUKU[2,3,4] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS), University of Tsukuba, [4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））

細菌は細胞膜に由来する直径 20～400nm の膜小胞（MV）を放出する。MV はタンパク質、核酸、シグナル物質など様々な成分を運ぶ「運び屋」として機能し、細菌間相互作用だけでなく免疫調節などの細菌と宿主の相互作用にも関与する。しかし、環境中での MV の動態は十分に理解されていない。MV は環境中で非常に安定していると考えられているが、枯草菌においてはバイオサーファクタント（BS）であるサーファクチンによって MV が溶解することが示されている。BS は多くの細菌が産生する界面活性剤だが、MV への影響を調べた報告は少ない。そこで本研究では、土壌中の MV および BS 産生菌をスクリーニングすることで、MV に対する BS の影響を調べた。その結果、MV と BS の産生には相関性がなく、菌株によって大きく異なった。その中で、MV を多量に生産し、水の表面張力を大きく低下させる菌株に着目した。この菌株の MV に異なる種類の界面活性剤を添加すると、種類に応じて小胞への影響が変化した。本菌と比較して、枯草菌の MV に対する各界面活性剤の影響が異なった。以上のことから、BS は組み合わせによって MV に多面的な影響を与えると考えられる。

Bacteria release membrane vesicles (MVs) with a diameter of 20-400 nm, which are derived from their cellular membranes. MVs are involved not only in bacterial interactions but in bacterial-host interactions such as immunomodulation. However, the dynamics of MVs in the environment have not been fully understood. While MVs are reported to be very stable in the environment, studies with *Bacillus subtilis* have shown that MVs can be dissolved by a biosurfactant (BS), surfactin. BS is a surface-activating substance produced by many bacteria, but few reports study their effect on MVs. To gain a broader view, we explored the effect of BSs on MV by screening for MV and/or BS producers from soil. The results show that there is not much coloration between MV and BS production, and largely differ depending on the strain. Among these strains, we focused on a strain that produce high amount of MVs and that largely reduce the surface tension of water. When different types of surfactants were added to the MV of this strain, the number of vesicles decreased depending on the type of surfactant added. Compared with this strain, each surfactant had different effects on MVs derived from *B. subtilis*. In conclusion, we consider that BS has multifaceted effect on MVs depending on the combinations.

Membrane Vesicle, Biosurfactant, Bacterial interaction

講演番号：4A01-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

緑膿菌におけるメンブレンベシクル伝達の解析
Analysis of membrane vesicle trafficking in *Pseudomonas aeruginosa*
○臼倉 雄紀[1]、諏佐 勇磨[1]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3,4] ([1]筑波大院・生命地球科学研究群、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター、[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences)
○Yuki USUKURA[1], Yuma SUSA[1], Nobuhiko NOMURA[2,3], Masanori TOYOFUKU[2,3,4] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability, University of Tsukuba, [4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences (SunRiSE)))

多くの細菌は自身の細胞膜により構成される細胞外膜小胞を産生する。この細胞外膜小胞はメンブレンベシクル(MV)と呼ばれ、核酸やタンパク質、シグナル物質など様々な生体物質を含む。MV は物質の運び屋としての機能を有すると考えられており、遺伝子水平伝播や細胞間コミュニケーションといった細菌間相互作用に関与していることが報告されている。MV は、「細菌による産生、外部環境での拡散、他細胞による受け取り」という段階を経て機能を発揮すると考えられている。これまでの研究から、MV 形成機構はいくつかモデルが提唱されている一方で、その受け取り機構については未だ知見が乏しく、詳しいメカニズムも未解明である。そこで本研究ではグラム陰性細菌のモデル細菌である緑膿菌から MV を回収し、細菌による MV 受け取り機構解明を目的とした。

本研究ではグラム陰性細菌の最外層構造であるリポポリサッカライド(LPS)に着目した。緑膿菌では O 抗原が異なる 2 種類の LPS(A-band, B-band)が存在する。そこで LPS が MV の付着性に与える影響を調べるため LPS 欠損株から MV を回収し、MV と菌体の付着性を評価したところ、B-band 欠損 MV において細菌への付着性が増加する結果が得られた。また MV と細菌との相互作用を可視化するため、超解像顕微鏡を用いた MV1 粒子および菌体のライブセルイメージング観察系を構築した。従来まで MV は微小粒子のため 1 粒子解析が困難とされてきたが、本観察系により膜染色した MV 由来の蛍光が付着した菌体表層に移行していく様子が可視化された。これは MV が菌体に付着した後に、その膜成分を菌体側に輸送していることを示唆する結果となった。本研究は MV1 粒子と菌体との相互作用理解に繋がり、微生物分野に基礎的知見を与えるだけでなく臨床面での MV 応用への一助にもなると考える。

In this study, we investigated the influence of LPS band (A-band, B-band) on the attachment of membrane vesicles (MVs) to cells. Moreover, to understand the MV-cell interaction, we developed a live-cell imaging system that would allow us to observe single cell and single MV particle. The MVs lacking the B-band attached better to *P. aeruginosa* cells compared with the WT MVs. Super resolution live-cell imaging enabled us to track single MV particle and we were able to observe the attachment of single MV on the cell surface. Interestingly, transfer of the fluorescence dye from MVs to cells was observed after MV-attachment.

membrane vesicle, cell-cell interaction, single nanoparticle analysis

発表責任者：豊福　雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

緑膿菌細胞集団中の一部で出現する球状細胞の解析

Characterization of stress induced cell wall deficient Pseudomonas aeruginosa cells

○原田 潤[1]、兼松 周作[1]、野村 暢彦[1,2]、豊福 雅典[1,2,3] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大微生物サステナビリティ研究センター、[3]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences (SunRiSE))
○Jun Harada[1], Shusaku Kanematsu[1], Nobuhiko Nomura[1,2], Masanori Toyofuku[1,2,3] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba Univ. MiCS, [3]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences (SunRiSE))

当研究室の先行研究から、グラム陰性桿菌である緑膿菌の細胞集団の一部において、球状の形態をとる細胞(以下 round cell; R-cell)が出現することがわかってきた。R-cell は DNA ストレスを受けると、SOS 応答によって誘導される内在性ファージに由来する酵素のホリンとエンドリシンによって起こる。ホリンが内膜に穴をあけ、エンドリシンがペプチドグリカン（以下 PG）層を分解することで形成される。R-cell は破裂して MV を生産するものから破裂しないものまで多様に存在していることが観察されている。R-cell は細胞壁が分解されているために、多くの細菌において報告されている細胞壁が欠落した状態で分裂、増殖し続けることが可能な L-form やスフェロプラストに類する特異な細胞形態であると考えられる。したがって、R-cell は L-from において見られる細胞壁をターゲットとする抗生物質存在下での増殖などの能力を有する可能性が考えられる。また、スフェロプラストにおいて見られる細胞融合などの能力があることが予想される。さらに、このホリンーエンドリシンはプロファージ遺伝子としても知られており、ほとんどの細菌のゲノムに広く保存されている。つまり、このホリンーエンドリシンを介した R-cell 形成機構は細菌共通のメカニズムであることが予想される。しかし、R-cell はこれまでにほとんど研究されていない。本研究では R-cell の性質や機能を明らかにすることで、その生物学的役割の解明を目指す。

Some cell populations of *Pseudomonas aeruginosa* change their shape into round cells (R-cells), which are formed by the activity of holin and endolysin. Holin and endolysin are derived from endogenous prophages that are induced by DNA stress. Holin creates a hole in the inner membrane and endolysin degrade the peptidoglycan (PG) layer. R-cells are suggested to be heterogenous as some explode and produce MVs while others remain without exploding. The lack of intact peptidoglycan layer, suggest that R-cells are unique cell forms similar to L-forms or spheroplasts. As the gene encoding holin and endolysin are well conserved among bacteria, R-cell formation could be a common feature in bacteria. However, R-cells have been studied little so far. In this study, we aim to elucidate the biological roles of R-cells by examining their properties.

phage, membrane vesicle (MV), cell wall

発表責任者：原田潤（s1810707@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

緑膿菌の Quorum sensing 遺伝子に挿入される可動性因子の解析
Sequence Insertion in a Quorum Sensing Gene of *Pseudomonas aeruginosa*
○上原 礼佳[1]、須澤 由希[1]、遠矢 正城[1]、吉澤 晋[2]、木暮 一啓[2]、野村 暢彦[3,4]、豊福 雅典[3,4,5] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東京大・AORI、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・MiCS、[5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in Life Sciences)
○ Ayaka UEHARA[1], Yuki SUZAWA[1], Masashiro TOYA[1], Susumu YOSHIZAWA[2], Kazuhiro KOGURE[2], Nobuhiko NOMURA[3,4], Masanori TOYOFUKU[3,4,5] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]AORI., Univ. Tokyo, [3]Fac. Life Environ Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS., Univ. Tsukuba, [5]SunRiSE)

Quorum sensing（QS）は細菌間コミュケーション機構の１つである。微生物制御の重要な標的となっている一方で、本機構が実環境中でどのように機能しているかについての知見はほとんどない。そこで我々は、水環境から単離された緑膿菌の解析を行った。その結果、外洋域からは QS の機能が一部欠損した株が多く単離された。興味深いことに、QS 欠損株の中には QS 関連遺伝子（*lasR*）に挿入配列（IS）を持つ株が存在し、その株では集団から二種類のコロニー形態が出現した。*lasR* に挿入される IS の報告例は少なく、IS と QS の関係は不明である。そこで本研究は、IS に着目し、環境に応じた QS 機構の変遷を理解することを目的とした。コロニー形態が異なる二種類の株を単離し、シーケンス解析を行った結果、コロニー形態の違いは *lasR* への IS 挿入の有無に依存していた。また、両者ともにゲノム中の *lasR* 以外の locus に共通の IS を有していた。完全な *lasR* を持つ細胞を単離し継代培養を行ったところ、*lasR* に IS が挿入された株が出現し、IS の挿入に伴って QS 制御下にある物質生産の低下が観察された。更に、*lasR* に挿入される IS は複数種存在することが確認された。以上より、この株の IS は可動性を保持しており、IS の挿入が QS 活性を変化させることが示唆された。本研究で IS による QS の制御機構の一端を明らかにすることで、QS 制御の新たな糸口が得られる可能性がある。
Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-to-cell communication system that regulates various gene expressions. Still, it is unclear how this system is maintained in environments. To answer this question, we analyzed *Pseudomonas aeruginosa* strains that were isolated from aquatic environments. We found that several strains isolated from the open ocean were found to be often defective in the QS systems. Interestingly, several isolates from the ocean carried insertion sequence (IS) in the QS gene, *lasR*. To gain more insight, we analyzed one of the strains, Ocean-1187. We realized that two types of colonies appear from a single isolate of Ocean-1187. Sequence analysis revealed that the different colony morphology was dependent on the insertion of the IS into *lasR*. When Ocean-1187 that possesses an intact *lasR* was subcultured, cells with IS inserted in *lasR* appeared. Furthermore, we found that there are multiple types of IS that can be inserted into *lasR*. These results suggest that the IS in Ocean-1187 is mobile and therefore can alter QS activity by jumping in *lasR*. we assume that the conversion of QS is beneficial for *P. aeruginosa* to adapt to different environments.

quorum sensing, cell to cell communication, insertion sequence

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

自家蛍光に基づいた QS シグナル応答株の網羅的解析

Comprehensive analysis of QS signal-responsive strains based on autofluorescence

○佐野 千佳歩[1]、高部 響介[2]、八幡 穣[2,3]、豊福 雅典[2,3,4]、野村 暢彦[2,3]([1]筑波大・院・生命地球科学研究群、[2]筑波大・生命環境系、[3]微生物サステナビリティー研究センター、[4]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences)
○ Chikaho SANO[1], Kyosuke Takabe[2], Yutaka Yawata[2,3], Masanori Toyofuku[2,3,4], Nobuhiko Nomura[2,3] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]SunRiSE)

環境中の細菌間相互作用の一種であるクオラムセンシング（QS）では、周囲の同種細胞が生産したシグナル分子に応答して遺伝子発現が変化する。近年、実環境で想像以上に多様な細菌がシグナルを利用する可能性が示されたが、どれほど広く利用されているのか調べた例は少ない。既存の解析手法はシグナル応答株の網羅的な探索に不向きなため、細胞内分子が生得的に発する自家蛍光に着目した。今回、QS モデル細菌複数種にわたって野生株と QS 欠損株では自家蛍光が変化することが確認され、画像解析等を用いて 85%以上の確率で QS 活性を推測できた。この結果は自家蛍光解析でシグナルに応じた何らかの細胞状態変化を検出できることを示す。また環境単離株に本手法を応用し、シグナル添加に応じた 20%弱の株の自家蛍光変化を検出した。これらシグナル応答候補株については現在詳細な解析を進めている。今後はシグナル応答株をスクリーニングするだけでなく、様々な未知の相互作用探索に応用していきたい。

Quorum sensing (QS), is a type of bacterial chemical communication, in which gene expression is altered in response to a threshold signal concentration. Metagenomic studies suggested that the natural soil environment harbor diverse bacterial species with the genetic potential to perform QS. To date, however, it remains unclear if, and how, such diverse bacterial species are using the QS train *in situ*. Here, we developed a novel technique to detect QS response of intact soil isolates and examined how pervasive the QS response is among soil bacterial communities. To this end, we focused on autofluorescence (AF), that fluorescence innately emitted by intracellular molecules. In this study, we found that AF shifted between wild-type and QS-deficient strains of several QS model bacteria. By using image analysis and other methods, we were able to estimate QS activity in single cells with a probability of over 85%. These results indicate that AF analysis can detect signal responses. Using environmental isolates, we detected AF shifts due to the addition of signals in approximately 20% of strains. We are currently conducting a detailed analysis of these strains. In the future, we would like to apply this method not only for the screening of signal-responsive strains but also for the analysis of various forms of microbial unknown interactions.

Quorum Sensing, Autofluorescence, Cell to cell communication

講演番号：4A01-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

緑膿菌バイオフィルム内における自然突然変異株の解析
Analysis of spontaneous mutant in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

○矢野 真弓[1]、伊澤 徹[1]、尾花 望[2,3]、豊福 雅典[3,4,5]、野村 暢彦[3,4]（[1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・医療系トランスボーダー医学研究センター、[3]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター、[4]筑波大・生命環境系、[5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））
○Mayumi Yano[1], Toru Isawa[1], Nozomu Obana[2,3], Masanori Toyofuku[3,4,5], Nobuhiko Nomura[3,4]
([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Transborder Medical Research Center, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS), University of Tsukuba, [4]Faculty of Life Environmental Sciences, University of Tsukuba, [5]Suntory Rising Stars Encouragement Program in life Sciences（SunRiSE））

多くの細菌はバイオフィルム（BF）を形成する。BF は微生物集団と細胞外高分子物質（EPS）から構成された三次元構造体である。産業における BF は活性汚泥を用いた水質浄化などに広く利用されている。その一方で、有害面において疾病をもたらし、我々の生活に悪影響を及ぼす。以上のことから、BF を制御するためには BF の特性を明らかにする必要がある。また、BF 細胞では浮遊細胞に比べて多種多様な自然突然変異株が高頻度に出現することが報告されている。BF における変異株出現は酸化ストレスに起因するという報告があるものの、BF 形成における変異株出現の空間的分布の詳細は未だ報告されていない。そのため BF における変異株の出現を時空間的に解析し、両者の関係性を明らかにすることを目標とした。

本研究では BF のモデル細菌である緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）PAO1 株を使用した。緑膿菌 BF における自然突然変異株の出現には *recA* が関与していることが知られている。フローセルシステムで BF を形成させ、共焦点レーザー顕微鏡によって BF 構造体および内部細菌の *recA* 発現を一細胞レベルで観察した。その結果、BF の底面部に *recA* 高発現細胞が局在している様子が観察された。次に活性酸素種（ROS）が BF 内で蓄積することで変異株が出現しているのでないかと考え、BF を ROS 染色剤で染色して可視化を行った。その結果、*recA* 高発現菌に ROS が蓄積していることが観察されたことから、ROS が変異の温床になっている可能性がある。今後はさらに突然変異株が出現するメカニズムを明らかにしていく予定である。

In this study, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain, which is a model bacterium of biofilm (BF), was used. It is known that *recA* is involved in the emergence of spontaneous mutants in *Pseudomonas aeruginosa* BF. BF was formed using a flow cell system, and *recA* expression in BFs were observed at the single cell level by a confocal laser scanning microscopy. As a result, it was observed that *recA* high-expressing cells were localized in the bottom of BFs. Next, we considered that mutant strains appeared due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in BFs, and useda ROS stain to visualize it. As a result, it was observed that ROS was accumulated in *recA*-expressing bacteria, and it is possible that ROS trigger mutation. In the future, we plan to clarify the mechanism by which mutant strains appear.

biofilm, spontaneous mutant, oxidative stress

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

酸素の存在がプラスミドの接合伝達頻度を変化させるメカニズムの解明

The mechanism how oxygen causes higher transconjugant frequency of plasmids

○久野 航裕[1]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研)
○Kosuke KUNO[1], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,2] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ, [2]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，異なる細胞間を水平伝播することで様々な遺伝子群を運び，微生物の進化や環境への適応に寄与する．このようなプラスミドを介した遺伝子の伝播は，微生物が豊富に存在する地中や，動物の腸内などの嫌気的な環境下でも普遍的に生じていると予測される．従って，嫌気条件におけるプラスミドの動態を理解することは，地球上の微生物の進化・適応機構の解明に重要である．先行研究では，モデルプラスミドとして pBP136 を用い，通性嫌気性の *Pseudomonas stutzeri* JCM 5965 派生株間における，好気（O_2 21%）と嫌気（O_2 <150 ppm）条件下での接合伝達頻度を比較した．その結果，接合伝達頻度は好気条件下で有意に高く，接合時の酸素の存在が大きく影響することが示された．[1)]しかし，酸素が接合伝達に関与する機構は不明のままであった．そこで本研究では，接合時の酸素が接合伝達頻度を上昇させるメカニズムを解明することを最終目的とし，大気中酸素への曝露時間または酸素濃度を変えた接合実験を行った．その結果，接合伝達頻度は，大気中酸素への曝露時間（Fig. 1）および 21.1 %まで変化させた酸素濃度（Fig. 2）に対して，線形関係にあることが示された．従って，接合伝達頻度は，細胞が取り入れうる酸素の分子数に依存することが示唆された．現在は，21.1%よりも低い酸素濃度条件で，曝露時間を変えると，接合伝達頻度はどのように変化するのか検証している．また，21.1%以上の酸素濃度では，接合伝達頻度は低下したことから（Fig. 2），酸素濃度の上昇に伴うストレス応答の変化にも着目し，細胞内に存在する ROS の定量を試みている．

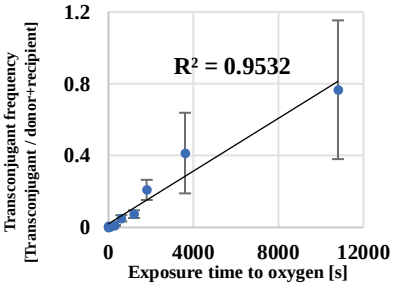


Figure 1 Transconjugant frequency under the different exposure time to oxygen.

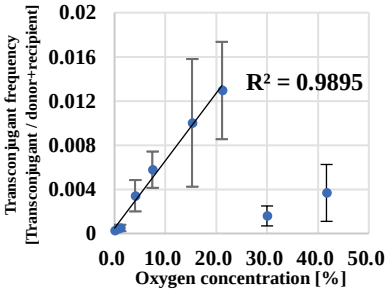


Figure 2 Transconjugant frequency under the different oxygen concentration.

Plasmids can be transferred among bacteria by conjugation and promote bacterial evolution and adaptation in natural environments. Since many microbe niches are present in microaerobic or anaerobic conditions, such as underground and in the digestive system of animals, it is important to understand how the plasmids are transferred under anaerobic conditions. Previously, the transconjugant frequency under anaerobic conditions were shown to be lower than that under aerobic conditions.[1)] In the present study, transconjugant frequency were compared when the cells were exposure to oxygen with different duration or different concentration. Transconjugant frequency was increased linearly as increasing the exposure duration or oxygen concentration. This result suggests that transconjugant frequency could be affected by the numbers of oxygen molecules which bacterial cells could take in.

1) Ochi et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2021;85(4):1005-1015.

plasmid, bacterial conjugation, oxygen

発表責任者：新谷　政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4A01-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム A

Pseudomonas chlororaphis の Quorum Sensing によるフェナジン-1-カルボキサミド生産制御機構の解析

Quorum sensing regulates the production of phenazine-1-carboxamide in *Pseudomonas chlororaphis*

○諸星 知広[1]、矢部 奈緒香[1]、謝 肖男[2]、染谷 信孝[3]([1]宇大院地域創生、[2]宇大バイオ、[3]農研機構)
○Tomohiro Morohoshi[1], Naoka Yabe[1], Xiaonan Xie[2], Nobutaka Someya[3] ([1]Grad. Sch. Reg. Devel. Creativity, Utsunomiya Univ., [2]Bio. Sci. Cent., Utsunomiya Univ., [3]NARO)

Pseudomonas chlororaphis subsp. *chlororaphis*（*Pcl*）及び *piscium*（*Ppi*）は、抗菌物質であるフェナジン-1-カルボキサミド(PCN)を生産する。多くのグラム陰性細菌は、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)をシグナル物質とした Quorum Sensing 機構を有している。本研究では、*Pcl* と *Ppi* の基準株（DSM 50083^T 及び DSM 21509^T）において、AHL を介した Quorum Sensing による PCN 生産制御機構を明らかにすることを目的とした。両菌株のゲノム配列には、AHL 合成遺伝子と AHL レセプター遺伝子の組み合わせとして、*phzI*/*phzR* と *csaI*/*csaR* の二組が存在する。まず、両菌株において *phzI* 及び *csaI* の破壊株を作成したところ、*phzI* 破壊株のみ PCN 生産が消失した。PhzI、CsaI が生産する AHL の構造を LC-MS/MS で解析したところ、PhzI は主に 3-hydroxy-C6-HSL を生産するが、CsaI は検出可能な AHL を生産しなかった。次に、*phzR* 及び *csaR* の破壊株を作成したところ、*phzR* 破壊株のみ PCN 生産が消失したことから、PhzR が PCN 生産の唯一の制御因子であることが明らかとなった。以上より、*Pcl* と *Ppi* では、PhzI が生産する 3-hydroxy-C6-HSL に PhzR が応答し、PCN 生合成遺伝子の発現を制御するが、CsaI/CsaR は PCN 生産制御には直接関わらないことが明らかとなった。

Pseudomonas chlororaphis subsp. *chlororaphis* (*Pcl*) and *piscium* (*PPi*) produce an antimicrobial compound, phenazine-1-carboxamide (PCN). Many Gram-negative bacteria produce acylhomoserine lactone (AHL) as a quorum-sensing signal molecule. In this study, we investigated the regulatory mechanism of PCN production by AHL-mediated quorum sensing in type strains of *Pcl* and *PPi* (DSM 50083^T and DSM 21509^T, respectively). In the genome sequences of both strains, there are two sets of AHL-synthesis and AHL-receptor genes, *phzI*/*phzR* and *csaI*/*csaR*. When AHL production of *phzI*- or *csaI*-disrupted mutant was checked, PhzI produced 3-hydroxy-C6-HSL as a major AHL, but CsaI produced no detectable AHLs. When AHL production of *phzR*- or *csaR*-disrupted mutant was checked, PCN production was observed in *csaR* mutant, but completely disappeared in *phzR* mutant. These results demonstrated that in *Pcl* and *Ppi*, PhzR responds to AHL produced by PhzI and regulates the expression of PCN biosynthetic genes, while CsaI/CsaR is not directly involved in the regulation of PCN production.

quorum sensing, *Pseudomonas chlororaphis*, phenazine

発表責任者：諸星知広（morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4A03-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

Shewanella vesiculosa HM13 由来細胞外膜小胞の主要積荷タンパク質の生理的役割

Physiological roles of a major cargo protein of extracellular membrane vesicles from *Shewanella vesiculosa* HM13

○釜阪 紘平、林 杏亮、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京大化研）
○ Kouhei KAMASAKA, Kyosuke HAYASHI, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Kyoto Univ., Inst. Chem. Res.)

【背景・目的】 *Shewanella vesiculosa* HM13 の細胞外膜小胞 (EMV) は単一の主要な積荷タンパク質として機能未知タンパク質 P49 を含む。これまでの研究から、細胞外に輸送された P49 は細胞および EMV 表層に存在する多糖との相互作用を介して細胞表面と EMV 表面に結合すること、さらに、構造予測プログラムをもちいた解析の結果、P49 は S 層タンパク質様構造を形成することが予想された。S 層タンパク質は細菌の主な細胞表層成分であり、細胞の接着制御など多様な機能を持つことが知られている。本研究では、P49 が本菌の細胞および EMV の表面特性に及ぼす影響の解明を目的に、細胞接着および EMV 分散性について評価した。【結果・考察】 ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) の結果、野生株は直径約 70 nm の均一なサイズ分布の EMV を分泌していることが示された。一方、P49 の欠損株ではサイズ分布の不均一性が増加し、EMV の自己会合が促進されたものと考えられたが、精製 P49 を添加した場合は、約 70 nm の均一性の高い EMV が観察された。糖タンパク質（フィブロネクチン、ムチン）に対する細胞の接着能を調べたところ、P49 はこれらの接着因子に対する細胞接着を阻害した。これらの結果から、P49 は細胞および EMV の表層多糖に結合することで、EMV の分散性の向上や非特異的な細胞接着の抑制を担うことが示唆された。

【Introduction】 *Shewanella vesiculosa* HM13 secretes a protein of unknown function, named P49, as a single major cargo protein of the extracellular membrane vesicles (EMVs). We found that P49 is transported to EMVs via the interaction with the polysaccharide on EMVs. In silico structure prediction demonstrated that P49 forms an S-layer protein-like structure. S-layer protein is a major cell surface component of bacteria and has various functions, such as regulation of cell adhesion. In this study, to analyze the effects of P49 on the surface characteristics of the cells and EMVs, we examined the cell adhesion and dispersion of EMVs. 【Results and Discussion】 Nanoparticle tracking analysis (NTA) showed uniform size distribution of EMVs of the parent strain with a mode diameter of about 70 nm. Defect of P49 increased heterogeneity in size suggesting aggregation of EMVs, whereas EMVs of uniform size were observed when purified P49 was added. The P49-deficient strain showed higher cell adhesion to fibronectin and mucin than the parent strain. These results suggest that P49 associated with the surface of the cells and EMVs contributes to enhancing the dispersion of EMVs and suppressing non-specific cell adhesion.

extracellular membrane vesicle, S-layer protein, cell adhesion

発表責任者：釜阪紘平（kmsk.k121@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A03-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

Shewanella vesiculosa HM13 の細胞外膜小胞の積荷タンパク質の機能発現に関与する表層糖鎖生合成系遺伝子群の機能解析

Analysis of surface polysaccharide biosynthetic genes involved in functionalization of a cargo protein of extracellular membrane vesicles of *Shewanella vesiculosa* HM13

○都築 大空[1]、釜阪 紘平[1]、劉 愈穎[1]、今井 友也[2]、川本 純[1]、小川 拓哉[1]、栗原 達夫[1]([1]京大化研、[2]京大生存研)

○Taiku TSUDZUKI[1], Kouhei KAMASAKA[1], Yuying LIU[1], Tomoya IMAI[2], Jun KAWAMOTO[1], Takuya OGAWA[1], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Kyoto Univ., Inst. Chem. Res., [2]Kyoto Univ., Res. Inst. Sust. Human)

グラム陰性の低温菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 が高生産する細胞外膜小胞（EMV）は、機能未知タンパク質 P49 を主要な積荷として含んでいる。P49 遺伝子の近傍には、グラム陰性細菌の表層糖鎖合成の初発反応を触媒する酵素 WecA の N 末端および C 末端領域をコードする遺伝子 *wecA3N* と *wecA3C* が存在した。WecA3NC に加えて、本菌は２つの WecA ホモログ（WecA1、WecA2）を有していた。WecA3N を欠損した株（ΔWecA3N）では EMV の主要な表層多糖が消失するとともに、EMV は P49 との相互作用能を失っていた。このことから、P49 は WecA3N 依存的に合成される表層糖鎖と相互作用することで、EMV に輸送されることが示唆された。一方で、ΔWecA3C および *wecA3N* と *wecA3C* の二重欠損株 ΔWecA3NC の表層多糖を SDS-PAGE で解析した結果、表層多糖が合成されていることがわかった。また、これらの変異株の EMV は、野生株と同様に P49 を主要な積荷として含んでいた。変異株の EMV についてナノ粒子トラッキング解析法で粒径分布を解析した結果、ΔWecA3N、ΔWecA3C、ΔWecA3NC の EMV は野生株と比較して不均一であり、EMV が自己会合しているものと考えられた。EMV の積荷タンパク質 P49 は、EMV の分散性に寄与することが示されている。ΔWecA3C や ΔWecA3NC の EMV は野生株同様、P49 を積荷とする一方で、分散性が低下していたことから、WecA1 もしくは WecA2 によって合成される表層糖鎖は P49 との結合能は有するものの、EMV 表層における P49 の機能発現には十分でない可能性が考えられた。

Shewanella vesiculosa HM13 abundantly secretes extracellular membrane vesicles (EMVs) carrying a single major cargo protein, P49. In the vicinity of the P49 gene, we found *wecA3N* and *wecA3C* coding for the N- and C-terminal regions, respectively, of a homolog of WecA, which catalyzes the first step of the synthesis of surface polysaccharides. Moreover, *S. vesiculosa* HM13 has two additional WecA homologs, WecA1 and WecA2. Deletion of *wecA3N* resulted in the loss of the EMV-surface polysaccharides and abolished the binding of P49 to EMVs both *in vivo* and *in vitro*. On the other hand, EMVs of the mutant that lacks *wecA3C* (ΔWecA3C) and the mutant that lacks both *wecA3N* and *wecA3C* (ΔWecA3NC) harbored surface polysaccharides and P49 as did EMVs of the parent strain. The results suggest that WecA3C inhibits the synthesis of the polysaccharides in the absence of WecA3N and that WecA1 and/or WecA2 synthesize polysaccharides that can bind to P49 in the absence of WecA3NC. However, characterization of EMVs carrying P49 suggested that the polysaccharides synthesized by WecA1/WecA2 are not sufficient for functionalization of P49 at the EMV surface.

extracellular membrane vesicle, protein secretion, surface polysaccharide

発表責任者：都築大空（tsudzuki.taiku.27x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A03-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

Identification and characterization of genes related to extracellular membrane vesicle production of *Shewallena vesiculosa* HM13

○Mengshan Zhu, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Kyoto Univ., Inst. Chem. Res.)

Extracellular membrane vesicles (EMVs) secreted by Gram-negative bacteria are spherical nanosized particles. EMVs attract the attention of many researchers because of their potential applications in drug delivery, vaccine production, and recombinant protein production. Despite its great potential, the current understanding of the mechanisms of EMV biogenesis is limited. *Shewanella vesiculosa* HM13, a cold-adapted Gram-negative bacterium isolated from the intestinal contents of horse mackerel, produces a large amount of EMVs carrying a putative S-layer protein P49 as a single major cargo protein, indicating the advantage of using this strain for the construction of a platform to produce heterologous proteins as cargoes of EMVs. For this purpose, vesiculation mechanisms should be elucidated. Here, we performed a transposon-mediated random mutagenesis of *S. vesiculosa* HM13 and then screened the library to obtain the mutants with pronounced changes in EMV production for identification of the genes related to the production of EMVs. For high-throughput analysis of EMV amount, multi-dot blotting with an antibody raised against the surface lipooligosaccharides of this strain was performed, and the EMV productivity was further evaluated by nanoparticle tracking analysis. As a result, two hypo-vesiculation mutants showing EMV productivity of less than 10% of the parent strain, named Tn14 and Tn24, were obtained. The transposon insertion site of Tn14 was found in the open reading frame of a gene located in the prophage-related gene cluster, suggesting the possible occurrence of prophage-induced vesiculation in this strain. For Tn24, the inserted transposon was identified from the 3′-untranslated region (3′-UTR) of the genes coding for homologs of 5′-methylthioadenosine phosphorylase and D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase. We found that disruption of these genes did not have a significant effect on EMV production. Thus, this 3′-UTR itself possibly plays an important role in EMV biogenesis of *S. vesiculosa* HM13. In all, our study identified two genetic elements of which disruption affects EMV production and provided new clues to understanding the mechanism of EMV production.

extracellular membrane vesicle, prophage related gene, transposon mutagenesis

発表責任者：Zhu Mengshan（mengshanzhu@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A03-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

曲率認識ペプチドを用いたハイスループットスクリーニングによる細菌細胞外膜小胞形成関連遺伝子の探索

Search for genes related to bacterial extracellular membrane vesicle production by high-throughput screening using curvature-sensing peptide

○井上 宙夢[1]、河野 健一[2]、川本 純[1]、小川 拓哉[1]、栗原 達夫[1] ([1]京大化研、[2]京大薬)
○ Hiromu INOUE[1], Kenichi KAWANO[2], Jun KAWAMOTO[1], Takuya OGAWA[1], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.)

本研究では、細胞外膜小胞 (extracellular membrane vesicle, EMV) を高生産する *Shewanella vesiculosa* HM13 の EMV 生産機構の解明を目的に、トランスポゾンランダム変異導入による EMV 生産関連遺伝子の網羅的探索を試みた。*S. vesiculosa* HM13 のトランスポゾン変異株（計 1564 株）を、EMV を培養液から分離することなく EMV 生産性を評価することができる曲率認識ペプチド nFAAV5-NBD をもちいたスクリーニングに供した。その結果、これまでに EMV 生産性が向上した株が 5 株、低下した株が 2 株得られた。EMV 高生産株では、Dipeptidyl carboxypeptidase (Dcp)、Glutamate synthase [NADPH] small chain、Phage integrase、McrBC restriction endonuclease、および機能未知タンパク質をコードする遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた。EMV 生産能が低下した株では Trimethylamine-*N*-oxide reductase、Phosphoenolpyruvate synthase をコードする遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた。膜タンパク質の品質管理に関与すると予想される Dcp、およびペプチドグリカンを構成する D-グルタミン酸の生合成を担うと予想される Glutamate synthase [NADPH] small chain の遺伝子破壊株を作製した結果、それぞれ親株と比較して 2.3 倍、2.8 倍まで EMV 生産性が向上することがわかった。以上の結果から、これらのタンパク質ホモログ遺伝子の欠損によるタンパク質のミスフォールディングやペプチドグリカン成分の欠損による膜ストレスが、EMV 生産を促進したと考えられた。

To elucidate the vesiculation mechanism of *Shewanella vesiculosa* HM13, we performed a genome-wide search of genes involved in the biogenesis of the extracellular membrane vesicles (EMVs) using a curvature-sensing peptide, nFAAV5-NBD, which can detect EMVs in the culture medium. As a result of screening of random transposon mutants of *S. vesiculosa* HM13, five hyper-vesiculation strains and two hypo-vesiculation strains were obtained. The transposon was inserted into the genes encoding dipeptidyl carboxypeptidase (Dcp), glutamate synthase [NADPH] small chain, phase integrase, McrBC restriction endonuclease, and unknown protein in the hyper-vesiculation strains, whereas the transposon was inserted into the genes coding for trimethylamine-*N*-oxide reductase and phosphoenolpyruvate synthase in the hypo-vesiculation strains. Disruption of the genes coding for Dcp, presumably involved in the quality control of membrane proteins, and glutamate synthase [NADPH] small chain, responsible for the synthesis of D-glutamic acid, a component of peptidoglycan, caused 2.3- and 2.8-fold increase in EMV production, respectively, suggesting that membrane stress due to protein misfolding and loss of peptidoglycan components caused hyper-vesiculation in these mutants.

extracellular membrane vesicle, curvature-sensing peptide, high-throughput screening

発表責任者：井上宙夢（inoue.hiromu.28r@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A03-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

有機塩素系殺虫剤分解細菌が産生する membrane vesicle に含まれる DNA

DNA in membrane vesicle produced by organochlorine insecticide-degrading bacteria

○石原 知行、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命）
○Tomoyuki Ishihara, Hiromi Kato, Yoshiyuki Otsubo, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (HCH)の分解能を有する細菌株のゲノム比較解析によって、これら分解菌はプラスミドや挿入配列 IS*6100* などの可動性遺伝因子を介して環境中から特殊な分解遺伝子（*lin* 遺伝子）を獲得したと考えられている。我々は、*lin* 遺伝子の起源や環境中での存在形態を考察する上で細菌が環境中に放出する membrane vesicle (MV)の重要性に着目した。MV は、環境中で遺伝情報のリザーバーとして機能する可能性が指摘されている。これまでの研究で、(i) HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株が MV を産生すること、(ii) γ-HCH 資化に必須な ABC トランスポーターLinKLMN 遺伝子破壊株（UT26Δ*linKLMN*）が野生株に比べて多量の MV を産生すること、(iii) MV-related DNA は DNase による分解を受けにくい状態で存在すること等を明らかにした。MV-related DNA の量的・質的な情報を追求することは、MV の遺伝情報のリザーバーとしての機能を理解する上で、重要な知見となる。そこで本研究では、UT26 株の MV に対する様々な処理が、MV-related DNA にどのような影響を及ぼすか検討した。

UT26Δ*linKLMN* 株を培養し、フィルター濾過した培養上清を超遠心する事で、MV を含むペレットを得た。このペレットに対して密度勾配遠心を行い、密度の異なる複数のバンドに分かれた MV を 8 つの画分に分けて回収した。脂質二重膜に特異的な蛍光色素による MV の定量、および DNase 処理後に picogreen による DNA の定量を行なった結果、MV が最も多く検出された画分と、DNA が最も多く検出された画分は一致しなかった。すなわち、DNA の存在量が異なる MV の存在を示唆する。また、最も高い DNA 濃度が検出された画分でも DNA 量は 179 pg/μL と微量であったが、これら画分を鋳型とし、IS*6100* 領域を標的とした PCR で PCR 産物が検出できた。一方、DNase 処理後に酵素の不活化の為に熱処理(80℃)を行うが、その際に EDTA を加えるとより多くの DNA が回収された。すなわち、熱によって MV が壊れて DNA が漏れ出し、不活化される前の DNase によって分解されている可能性が考えられる。以上の結果は、MV-related DNA の解析にあたっては、極めて慎重な処理の選定が必要であることを示している。

Recently, there are some reports on horizontal gene transfer via bacterial membrane vesicle (MV). We hypothesize that MV may be involved in evolution of γ-hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacteria. In our previous study, we demonstrated that HCH-degrading *Sphingobium japonicum* strain UT26 produces MV. In this study, we report effects of various treatments on MV-related DNA of UT26.

membrane vesicle, DNA, Sphingomonads

講演番号：4A03-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

疎水性シグナルを包括した脂質二重膜小胞によるクォーラムセンシング誘導

Induction of quorum sensing by lipid bilayer vesicles containing hydrophobic signals

○中嶋 勇人[1]、豊福 雅典[2,3]、野村 暢彦[2,3]、ウタダ アンドリュー シンイチ[2,3]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター、[3]筑波大・生命環境系）
○Yuto Nakajima[1], Masanori Toyofuku[2,3], Nobuhiko Nomura[2,3], Andrew Shinich Utada[2,3] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci. Univ. Tsukuba, Tsukuba)

ほぼすべての細菌はメンブレンベシクル（MV）と呼ばれる自身の細胞膜で構成された直径 20～400 nm の球状の構造物にタンパク質や核酸などを封入し、細胞外へ放出する。近年、疎水性の高いクオーラムセンシング（QS）シグナル分子が高濃度に含まれた MV が同種の細菌に伝達されることが明らかになった。このことは、拡散性のある分子が環境中に直接放出されるという標準的な QS モデルとは逆に、分子が凝縮された MV が QS を誘発することを示している。MV に含まれる物質は、ベシクルの構造によって分解から守られているため安定している。MV を用いれば、シグナル分子が無限に希釈された環境下でも単一の細胞の QS を誘導することが可能であると考えられる。しかし、このシグナル伝達のダイナミクスについては不明な部分が多い。ここでは、モデル MV として大型単層小胞（LUV）（粒径：～150 μm）を作製し、ベシクルによるシグナル伝達を明らかにするとともに、QS の誘導を検証した。

Membrane vesicles (MV) have 20-400 nm particle size and are thought to be released by nearly all bacteria. Contrary to the standard model of quorum sensing (QS) where diffusible molecules are released directly into the environment, recently, it was shown that MV containing high concentrations of hydrophobic signal molecules can induce QS. The substances contained within the MV are stable because they are protected from degradation by the vesicle structure. With MV it is possible to induce QS in a single cell even in environments where signaling molecules are infinitely diluted, however the dynamics of this signal transduction have not been well studied. Here, we generate large unilamellar vesicles (LUV) (~150um) as model MVs to clarify signal transfer and verify the induction of QS.

Membrane Vesicles, Quorum sensing, Large unilamellar vesicles

講演番号：4A03-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

海洋細菌が形成する金属表面上のバイオフィルムにおけるマルチコピーなべん毛構成遺伝子の役割

Role of multi-copy flagellin genes in biofilm formation of marine bacterium FT01 on metal surfaces

○宮川 大[1]、尾花 望[2,3]、伊藤 菜々子[1]、相沢 慎一[4]、宮野 泰征[5]、野村 暢彦[3,6]([1]筑波大院 ・ 生命環境、[2]筑波大・医学医療系・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]県立広島大院・生命環境、[5]秋田大院・理工、[6]筑波大・生命環境系)

○Dai Miyagawa[1], Nozomu Obana[2,3], Nanako Ito[1], Shinichi Aizawa[4], Yasuyuki Miyano[5], Nobuhiko Nomoura[3,6] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, , University of Tsukuba, [2]Transborder Medical Research Center, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS), University of Tsukuba, [4]Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima, [5]Graduate School of Engineering Science, Akita University, [6]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

微生物金属腐食は微生物の生理活性が起因する現象であり、常温・中性条件でも迅速に腐食が進行する。しかし、その原因細菌や腐食機構は不明な点が多い。我々はステンレス表面にバイオフィルムを形成する海洋細菌 *Marisediminitalea* 属の FT01 株を単離した。FT01 は鉄枯渇条件ではステンレス表面上に局所的に厚いバイオフィルムを形成して金属腐食を引き起こす。本研究では FT01 による金属腐食機構を理解するために、本菌のバイフォルム形成機構を明らかにすることを目的とした。

表面付着はバイオフィルム形成の初期のステップであり、多くの細菌においてべん毛による遊泳運動が関与することが示されている。全ゲノム解析の結果、FT01 ゲノムにはべん毛構成タンパク質（フラジェリン）遺伝子である *hag* を 5 種類有する特徴的なべん毛遺伝子群が存在していることが明らかとなった。各 *hag* のバイオフィルムへの関与を調べるために様々な *hag* 破壊株を作製し、各々のバイオフィルム形成を観察した。その結果 *hag1,4* は遊泳運動に必要であり、*hag3,5* はバイオフィルム形成における初期付着に関与することが示唆された。Hag1-5 はアミノ酸の相同率が 40%以上であるにも関わらず、Hag1,4 と Hag3,5 は異なる機能を有していることが示された。以上より、べん毛による運動性と *hag* 遺伝子の冗長性は海洋中における FT01 の金属付着に重要であると考えられる。

Microbiologically influenced corrosion (MIC) is caused by the metabolic activity of bacteria. In the previous study, we isolated *Marisediminitalea* sp. FT01 as a potential causative agent of MIC. Iron starvation induces the 3D structural biofilm formation of FT01 on stainless-steel surfaces and metal corrosion. The whole-genome sequencing shows that FT01 has five *hag* homologs that encode flagellin, the main component of flagellar apparatus. Swimming motility driven by flagella has been shown to be related to surface adhesion steps in biofilm formation in various bacteria. Therefore, we investigated the involvement of multicopy *hag* genes in biofilm formation.

Based on the microscopic observation of the mutant strains of each *hag* gene, we found that *hag1* and *hag4* are required for swimming; in contrast, *hag3* and *hag5* are dispensable for swimming but involved in the initial attachment to metal surfaces. These data showed that Hag1/4 and Hag3/5 have different roles on biofilm formation, even though Hag1-5 proteins share more than 40% amino acid residues. These results suggest that the redundancy of *hag* genes is important for the metal adhesion of FT01 in the ocean.

Initial adhesion, Flagellin, Motility

発表責任者：宮川大（5tb6ai@gmail.com）

講演番号：4A03-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

酸素耐性嫌気性菌 *Amphibacillus xylanus* と通性好気性菌 *E.coli* における“嫌気ストレス”に関する研究

Study of “anaerobic stress” in aerotolerant anaerobe *Amphibacillus xylanus* and facultative aerobe *Escherichia coli*

鈴木 智典[1]、○加藤 紗弥[1]、木俣 真弥[1]、酒井 陽一[2]、高山 努[2]、中本 忠宏[3]、中島 聖也[1]、福島 多一[1]、武田 晃治[1]、吉村 悦郎[4]、野村 佳歩[1]、阿部 晃[1]、新村 洋一[1]、内野 昌孝[1]([1]東京農大、[2]大同大、[3]東レリサーチセ、[4]放送大)

Tomonori SUZUKI[1], ○Saya KATO[1], Shinya KIMATA[1], Yoichi SAKAI[2], Tsutomu TAKAMAYA[2], Tadahiro NAKAMOTO[3], Seiya NAKASHIMA[1], Taichi FUKUSHIMA[1], Koji TAKEDA[1], Etsuro YOSHIMURA[4], Kaho NOMURA[1], Akira ABE[1], Youichi NIIMURA[1], Masataka UCHINO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agri., [2]Daido Univ., [3]Toray Research Center, [4]The Open Univ. of Japan)

近年、酸素供給停止による嫌気化で発生するストレス“嫌気ストレス”が微生物をはじめ動・植物界で報告されている。このストレスは、急激な嫌気化により過剰に生成する還元力（電子）に起因すると推定されるが、障害機構は不明である。供試菌 *Amphibacillus xylanus* EP01 株は、好気・嫌気の両条件下で過剰電子を生成しない 2 代謝系を有し、両条件下で良好生育する酸素耐性嫌気性菌である。本菌の嫌気から好気条件への切り替え培養では良好生育を維持するが、好気から嫌気条件への切り替え培養では、著しい生育低下“嫌気ストレス”が観察された。蛍光顕微鏡による観察では、嫌気条件切り替え培養後に著しい遊離 Fe^{2+}の増加、生育回復時に遊離 Fe^{2+}の減少が認められた。さらに、嫌気条切り替え培養菌体のメスバウアー分光分析では、遊離 Fe^{2+}(34%)の増加が確認された(1)。
A. xylanus は、呼吸鎖を欠如する酸素耐性嫌気性菌であるが、好気的生育に Fe を要求し、呼吸鎖に匹敵する酸素吸収力を有す。好気的生育に Fe を要求し、呼吸鎖を有す通性好気性菌 *E. coli* BW25113 株を供試菌として、同様の切り替え培養では、“嫌気ストレス”は観察されなかった。嫌気条切り替え菌体のメスバウアー分光では、Fe^{2+}(16%)増加は観察されたが、遊離 Fe^{2+}は観察されなかった。
両供試菌細胞内に嫌気条件下での生成電子を Fe^{3+}に伝達可能な遊離フラビン（2）と各々の還元酵素系(3,4)を見いだしており、“遊離フラビン系による嫌気ストレス”の仮説について検討した。

In oxidative stress, cell damage is caused by reactive oxygen. On the other hand, “anaerobic stress” has been reported in bacteria, animal and plant which is caused by stopped of oxygen supply. Although it is presumed that this is due to excess electrons generated by change to rapid anaerobic condition, its reaction mechanism is not clear yet. The *Amphibacillus xylanus* EP01 strain (*A. xylanus*) used in this study is an aerotolerant anaerobe that it has two metabolic system that does not generate excess electrons, can grow under both aerobic and anaerobic conditions. However, a remarkable decrease in growth of the strain was observed in the change from aerobic to anaerobic condition. Increase of Fe^{2+} was found at the time by fluorescence microscopy and Mössbauer spectroscopy. Facultative aerobe (*E. coli* BW25113) was also used in same culture conditions. (1) Ohno Y., *et al.*, *The 2020 Annual Meeting of JSBA*, 2020. (2) Suzuki T. *et al.*, *J. Bacteriol. Parasist.*, 2020. (3) Kimata S. *et al.*, *FEBS open bio*, 2018. (4) Satoh J. *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2019.

Amphibacillus xylanus, Anaerobic stress, Ferrous

講演番号：4A03-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

シアノバクテリアの分子シャペロンパラログの新規機能獲得

Paralogs of Cyanobacterial Molecular Chaperones, A New Paradigm in Chaperone Studies

○仲本 準 (埼玉大院理工)
○Hitoshi NAKAMOTO (Saitama Univ.)

分子シャペロンは、新生タンパク質の折りたたみを助け、変性タンパク質どうしの凝集を阻止し、それらの（再）折りたたみを促進する。さらに、タンパク質の分解やオルガネラへのタンパク質輸送にも関与する、生命活動に必須のはたらきをするタンパク質である。代表的な分子シャペロンである GroEL（シャペロニン）、DnaK、HtpG や ClpB などの構造や機能に関する詳細な解析が行われてきたが、その多くは従属栄養生物である大腸菌を材料としたものであり、独立栄養生物の分子シャペロンも同様の構造や機能を有すると考えられている。大腸菌と異なり、シアノバクテリアには複数種の *groEL* や *clpB* 遺伝子が存在する。私たちは、これらのホモログ（パラログ）遺伝子翻訳産物の比較生化学的解析を行ってきた。その結果、複数種の GroEL や ClpB のホモログの一方が、他方や大腸菌のものと比較して、発現調節や構造・機能に関して著しく異なる特徴をもつことが明らかになってきた。これらの結果に基づき、次のような仮説を立てた。即ち、遺伝子重複により複数の *groEL* や *clpB* 遺伝子が生じ、その一つの遺伝子が祖先遺伝子の機能を維持したのに対して、 他方が新規で生存上有利な機能を獲得したのではないかというものである。本発表では、この新規機能獲得とシアノバクテリアの独立栄養的生き方との関係に焦点を当てて議論する。

Molecular chaperones are involved in maintaining cellular protein homeostasis under normal and stress conditions. Chaperones such as GroEL (Hsp60 or chaperonin), DnaK (Hsp70), and ClpB (Hsp100) are evolutionarily conserved molecular chaperones. Molecular chaperones in *Escherichia coli* have been models for subsequent research on those of other bacteria and eukaryotic cells. *E. coli* chaperone has served as a paradigm for the molecular chaperone family. In contrast to *E.coli*, cyanobacteria contain multiple genes/paralogs encoding *groEL* or *clpB*. We have been particularly interested in paralogs of the cyanobacterial chaperones. Our study indicated that one of the members in each gene family codes for a chaperone whose structure and function are similar to the corresponding one in *E.coli*. On the other hand, the other member codes for a protein that is totally different from the other one. Based on these studies, I postulate that these paralogs have acquired novel, beneficial functions and become preserved by natural selection.

Molecular Chaperone, Cyanobacteria, Gene duplication

発表責任者：仲本準（nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4A03-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

過酷な環境からの新規微細藻類の探索とストレス応答機構に関する研究

Isolation of microalgae from harsh environments and their stress response mechanisms

○川口 遼太[1]、豊島 拓樹[1]、高市 真一[2]、川崎 信治[2] ([1]東農大 バイオ、[2]東農大　微生物)
○Ryota Kawaguchi[1], Hiroki Toyoshima[1], Shinichi Takaichi[2], Shinji Kawasaki[2] ([1]TUA Bio., [2]TUA Microbiol.)

【目的】一般の光合成生物は、強光を伴う高塩濃度や乾燥、低温などの環境ストレス下において、光酸化ストレスが発生し生育が困難になる。当研究室では、過酷な生育環境に生息する光合成生物に、新規な生命応答の存在を推定し、優れたストレス耐性能を有する微細藻類の単離を行ってきた。農大前の真夏のアスファルト表面から単離された真核微細藻類 Ki-4 株は、他生物では報告例のないアスタキサンチンを水溶化するタンパク質（AstaP と命名）を生産し、イカダモ科の新種：*Coelastrella astaxanthina* と同定・命名された[1)2)]。本スクリーニング系で新規な生物が発見されたことから、さらなるユニークな生命反応の発見が期待される。そこで本研究では強光が付随する過酷な環境から新たな微細藻類の探索、同定を行った。その結果、複数の新種候補株を含む優れたストレス耐性を示す微細藻類が単離されたので、その研究結果を報告する。
【方法・結果】強光が付随する過酷な生育環境からサンプリングを行い、独立栄養条件にて生育する微細藻類を単離した。その結果、計 90 株の微細藻類を単離し、H15A 株を含む、既知種とは顕著に異なる複数の種を同定した。また単離株のメタボローム解析を進めたところ、強光・乾燥ストレス付与後に糖やアミノ酸、脂質、カロテノイド種の多様な代謝変動が観察され、その新規性と有用性について解析を行った。

1)2) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013). Kawasaki et al. Phycological Research (2019)

When photosynthetic organisms are exposed to drought and/or salt stress under high light conditions, photooxidative stress occurs and growth is severely inhibited. Our research group has investigated such environments to find microalgae. One of the results is the finding of a water-soluble astaxanthin binding protein, named AstaP, which is the first orange carotenoid protein found in eukaryotic microalgae. Based on the above findings, we anticipated that the isolates possessed unique protection systems; therefore, we undertook further investigations. In this study, we searched for new microalgae from a harsh environment with strong light. A total of 90 microalgae strains were isolated and identified. Metabolomics analysis of the isolates revealed diverse metabolic changes in sugars, amino acids, lipids, and carotenoids after exposure to high light and drought stress, and we are analyzing their novelty and usefulness in industrial use.

microalgae, photooxidative stress, metabolome

発表責任者：川崎信治（kawashin@nodai.ac.jp）

講演番号：4A03-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム A

細胞性粘菌を用いた表現型可塑性研究に向けた新規実験モデル系の構築

Establishment of a novel experimental model system for the study on phenotypic plasticity using cellular slime molds

○小川 遥香、成田 隆明（千葉工大・先進工・生命）
○Haruka OGAWA, Takaaki NARITA (Dept. of Life Sci., Chiba Inst. Technol.)

表現型可塑性とは、生物個体が環境条件に応じてその表現型を変化させる能力であり、一つの遺伝子型で異なる表現型を示すことができる。表現型可塑性は生物多様性が生まれた要因の一つと考えられているが、その詳細な分子メカニズムは未だ解明されていない。本研究では、土壌微生物である細胞性粘菌を用いた表現型可塑性の分子メカニズム解明に向けた第一歩として、枝分かれ構造をもつ子実体を形成することで知られる *Polysphondylium violaceum* が、「環境条件によって枝分かれ構造を形成しなくなること」を表現型可塑性と定義し、*P. violaceum* を用いた表現型可塑性研究の新規実験モデル系の確立に向け、研究を進めている。*P. violaceum* が表現型可塑性を示す環境要因を決定するため、まずは *P. violaceum* の餌となるバクテリア量の違いに焦点を当てた。その結果、餌として *Klebsiella aerogenes* を使用し、*K. aerogenes* にとって貧栄養の培地で二員培養した *P. violaceum* では、*K. aerogenes* にとって富栄養の培地の場合と比べ、子実体の枝分かれ構造形成率が低くなる傾向が確認された。このことから、餌となるバクテリア量の違いは、*P. violaceum* の表現型可塑性を引き起こす一因であると示唆される。現在は、餌の種類の違いに焦点を当て、グラム陰性菌 *K. aerogenes* あるいはグラム陽性菌 *Bacillus subtilis* と二員培養した *P. violaceum* において、その子実体の枝分かれ構造形成率の変化について解析しており、本発表では、現時点で得られている実験結果について報告する。

Phenotypic plasticity is the ability for organisms to produce distinct phenotypes from a given genotype in response to environmental variation. Although phenotypic plasticity has been believed to be one of the causes that biological diversity has been occurred. However, the molecular mechanism in detail is not clearly understood. In this study, we aim to elucidate the molecular mechanism of phenotypic plasticity by utilising a soil microorganism, cellular slime molds, as the novel model organism. We defined it as ‘‘phenotypic plasticity’’ that *Polysphondylium violaceum* was not to be formed side branch in the fruiting body and observed the phenotype in different culture conditions. When *P. violaceum* amoebae were cultured with *Klebsiella aerogenes* as their bacterial food source on low-nutrient agars, they tended to show lower efficiency of side branch formation in fruiting bodies compared to that in case of culturing on high-nutrient agars. This result is suggesting that the different amount of food sources is one of the factors caused side branch formation in *P. violaceum*. Further, we have now been investigated the effects of the difference of bacterial food sources themselves on side branch formation in *P. violaceum*. Regarding this experiment, the results that we can currently obtain will be reported.

Phenotypic plasticity, Cellular slime molds, Morphogenesis

発表責任者：成田隆明（takaaki.narita@p.chibakoudai.jp）

講演番号：4A05-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

低温醸造過程におけるワイン酵母のプロテオスタシス

Proteostasis of wine yeast during brewing process at low temperature

○吉田 雅偲[1]、古谷 昇[1]、今井 芙月[1]、三木 健夫[2]、井澤 真吾[1] ([1]京都工繊大・工芸科学、[2]山梨大・生命環境)
○Masashi YOSHIDA[1], Noboru FURUTANI[1], Futsuki IMAI[1], Takeo MIKI[2], Singo IZAWA[1] ([1]Kyoto Inst. Technol., [2]Yamanashi Univ.)

10% (v/v)エタノールは酵母にとってシビアなストレスであり、不溶性タンパク質の蓄積や deposition sites の形成を引き起こす (Kato *et al.*, 2019)。一方で我々は、10%エタノールによる不溶性タンパク質の蓄積と deposition sites の形成が、6% (v/v)エタノールや 37°C での前処理によって抑制される事を報告した (Yoshida *et al.*, 2021)。比較的マイルドなストレスにより bi-chaperone system (主に Hsp70 と Hsp104 によって構成され、変性タンパク質の脱凝集を行う)が活性化し、タンパク質品質管理(PQC)能が向上したことで、シビアなストレス下での変性タンパク質の蓄積が抑制されたと考えられる。これを踏まえて、徐々にエタノール濃度が上昇する醸造過程においてもタンパク質変性が抑制されるのではないかと考え、今回解析を行った。実際に合成果汁(SGM)を使って白ワイン醸造を模した発酵試験を 15°C で行ったところ、醸造終盤においても不溶性タンパク質は蓄積しなかった。また、実験室条件で培養した酵母を醸造過程から回収した SGM に移したところ、不溶性タンパク質が蓄積した事から、醸造過程の環境がシビアなストレスである事を確認している。さらに、醸造過程を経験した酵母は実験室条件で 10%エタノールによる不溶性タンパク質の蓄積を抑制する事を見出した。以上の結果から、15°C で徐々にエタノール濃度が上昇することで、酵母の PQC 能が上昇したと考えられた。一方で、エタノール濃度が急激に上昇する 28°C の発酵試験では、不溶性タンパク質の蓄積が認められた。本発表では発酵温度やエタノール濃度の上昇速度が酵母の PQC に与える影響について考察する。

We recently reported that pretreatment with mild ethanol stress activates PQC ability and suppresses the accumulation of insoluble proteins under severe ethanol stress (Yoshida *et al.*, 2021). We furthermore speculated that gradual increase in ethanol concentration during the brewing process may also induce activation of PQC ability and suppress the accumulation of insoluble proteins. We herein confirmed that the insoluble protein level was very low in wine yeast cells in the late stage of the brewing process using the synthetic grape medium (SGM). We also found that the fermented SGM induced insoluble protein accumulation in yeast cells cultured in SD medium. Furthermore, wine yeast cells that underwent the brewing process were able to suppress the accumulation of insoluble proteins under laboratory conditions of 10% (v/v) ethanol in SD medium. From these results, we concluded that PQC ability can be activated by gradually increasing the ethanol concentration during the brewing process. In this presentation, we will also discuss the contribution of temperature and ethanol accumulation rate of the brewing process to PQC ability in wine yeast cells.

proteostasis, wine brewing, bi-chaperone system

発表責任者：吉田雅偲（masashi.agun@gmail.com）

講演番号：4A05-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

ビール醸造過程の酵母のプロテオスタシス

Proteostasis in beer yeast cells during brewing process

○古谷 昇[1]、吉田 雅偲[1]、今井 竣也[1]、藤原 久志[2]、若井 芳則[2]、井澤 真吾[1]（[1]京都工繊大・工芸科学、[2]黄桜株式会社）
○Noboru FURUTANI[1], Masashi YOSHIDA[1], Shunya IMAI[1], Hisashi FUJIWARA[2], Yoshinori WAKAI[2], Shingo IZAWA[1]（[1]Kyoto Inst. Technol., [2]Kizakura Co., Ltd.）

酵母細胞内のタンパク質の一部は熱ショックや高濃度エタノールによって変性・不溶化することが知られている(Kato *et al., FEMS Yeast Res.,* 2019)。また、これらの変性タンパク質は細胞内に拡散するのではなく deposition sites に蓄積・隔離されることで、毒性が抑えられるとともに効率的に再生・分解されると考えられている。醸造過程のビール酵母は様々なストレスにさらされると考えられるが、プロテオスタシスについての情報は非常に少ないため、今回検討を行なった。

ビール酵母として上面発酵酵母の *Saccharomyces cerevisiae* Nottingham 株を用い、ケルシュタイプの小仕込み試験を 17˚C で行なった。ゲノム組込み型プラスミドを使って Hsp104-GFP (deposition site marker)と Hsp42-GFP (aggregase)を導入し、醸造過程や実験室条件での発現や局在を観察した。その結果、実験室条件では 10% (v/v) エタノールによって deposition sites の形成が誘導され、不溶性タンパク質が蓄積した。一方、小仕込み試験ではエタノール濃度が 6% (v/v)程度まで上昇したが、浮遊した酵母細胞内では deposition sites の形成や不溶性タンパク質の蓄積はほとんど認められなかった。他方、大型タンクで醸造した際のタンク下部に沈澱した酵母細胞では不溶性タンパク質の蓄積が認められた。

It is known that heat shock and severe ethanol stress denature and insolubilize yeast proteins (Kato *et al*., *FEMS Yeast Res.,* 2019). During the process of brewing alcoholic beverages, budding yeast cells perform alcoholic fermentation under multiple stresses such as ethanol stress, high osmotic pressure, and low temperatures. Since the physiology of yeast cells during the beer brewing process remains unclear, we analyzed protein denaturation and the formation of deposition sites in beer yeast cells.

A Nottingham strain of *Saccharomyces cerevisiae* was used as beer yeast, and Kölsch-type brewing tests were conducted at 17˚C. We examined expression patterns of Hsp104-GFP (deposition site marker) and Hsp42-GFP (aggregase) in beer yeast cells during the brewing process and under laboratory conditions. Severe ethanol stress (10% v/v) induced the formation of deposition sites and the accumulation of insoluble proteins in yeast cells under laboratory conditions. In the small brewing test, the ethanol concentration was increased to around 6% (v/v), but the formation of deposition sites and the accumulation of insoluble proteins was hardly observed in the floating yeast cells. In contrast, when brewed in a large capacity tank, accumulation of insoluble proteins was observed in yeast cells precipitated at the bottom of the tank.

proteostasis, beer brewing, heat shock protein

発表責任者：古谷昇（0507nobo.f@gmail.com）

講演番号：4A05-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

エタノールストレスによる酵母 *HSP78* の発現誘導とミトコンドリアタンパク質の変性

Preferential synthesis of Hsp78 and denaturation of mitochondrial proteins in yeast cells under severe ethanol stress

石川 優、西野 靖矢、福田 志津、○井澤 真吾（京都工繊大・工芸科学）
Yu ISHIKAWA, Seiya NISHINO, Shizu FUKUDA, ○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

高濃度エタノールストレスによる翻訳抑制下では、酵母の大部分のタンパク質の新規合成が停止する一方で、ストレス下での生き残りや適応に必要とされる一部の因子が選択的・優先的に合成される。そのため、エタノールによる翻訳抑制下でも優先的に合成されるタンパク質を同定・解析することで、高濃度エタノールストレス下での酵母の生存戦略に関する理解が深まると考えられる。本研究では、ミトコンドリアのタンパク質品質管理（PQC）に着目し、高濃度エタノールストレス下で優先的に発現するミトコンドリア PQC 関連因子を探索した。酵母のミトコンドリアには Ssc1（ミトコンドリア Hsp70 型シャペロン）、Hsp60（4 量体ミトコンドリアシャペロニン）、Hsp78（ミトコンドリア ClpB 型シャペロン）を主要構成因子とする専用の PQC システムが備わっている。酵母細胞を高濃度エタノールストレスで処理した際のこれらの因子の発現量を検討したところ、Hsp78 は翻訳抑制下でも合成され、その発現量が増加することを見出した。また、*HSP78* を欠損させた細胞では、高濃度エタノール処理によりミトコンドリアタンパク質 Ilv2 が不溶化・蓄積し、DUMP（Deposits of Unfolded Mitochondrial Proteins）の形成が促進された。また、呼吸欠損株の発生頻度も有意に増加することが確認された。以上の結果から、高濃度エタノールストレスによるミトコンドリアへのダメージに対し、酵母は *HSP78* の発現を誘導することで対処していることが示唆された。

Under the translation repression caused by severe ethanol stress, new synthesis of most proteins in yeast is repressed, while some proteins required for stress tolerance are selectively and preferentially synthesized. Therefore, the identification and analysis of proteins that are preferentially synthesized even under translation repression can deepen our understanding of the survival strategy of yeast under severe ethanol stress. In this study, we focused on the mitochondrial protein quality control (PQC) system. Yeast mitochondria have a dedicated PQC system with Ssc1 (mitochondrial Hsp70-type chaperone), Hsp60 (tetrameric mitochondrial chaperonin), and Hsp78 (mitochondrial ClpB-type chaperone) as major components. We found that expression of Hsp78 was induced by severe ethanol stress. In *hsp78*Δ cells, severe ethanol stress enhanced the accumulation of insolubilized Ilv2 and the formation of DUMPs (Deposits of Unfolded Mitochondrial Proteins). In addition, the frequency of respiratory defective strains was also significantly increased in *hsp78*Δ cells. These results suggest that yeast cells cope with the damages in mitochondrial proteins caused by severe ethanol stress through the preferential synthesis of Hsp78.

DUMP, mitochondrial PQC system, ethanol stress

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：4A05-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

高濃度エタノールストレス下での酵母の翻訳抑制に関する適応誘導

Acquired resistance to severe ethanol stress in translation repression of budding yeast

○安東 稜子、石川 優、井澤 真吾（京都工繊大・工芸科学）
○Ryoko ANDO, Yu ISHIKAWA, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

酵母自身がアルコール発酵の過程で産生するエタノールも高濃度になるとストレスとなり、強く持続的な翻訳抑制を誘導する (Yamauchi and Izawa, 2016)。また、翻訳されなくなった mRNA や翻訳関連因子は stress granules (SGs)や processing bodies (PBs)に隔離される。一方、酵母を低濃度エタノール (6% v/v)で前処理した場合、高濃度エタノール (10% v/v)に対する耐性が向上する。この現象は適応応答と呼ばれ、生存率の上昇 (Lewis *et al*., 2010)やタンパク質品質管理 (PQC)能力の向上によるタンパク質変性の抑制 (Yoshida *et al*., 2021)などが誘導される。本研究では、高濃度エタノールストレス下の翻訳抑制に関しても、低濃度エタノールによる前処理で適応応答が誘導されるか検討した。

翻訳活性を解析するためにポリソーム解析を行なった。解析の結果、直接高濃度エタノールストレスを与えた場合にはポリソーム画分の割合は減少したままであったが、低濃度エタノールで前処理を行なった場合には時間とともにポリソーム画分の割合が増加した。また翻訳抑制時に形成が誘導される SGs も前処理を行なうと時間とともに減少・消失することを確認し、前処理によって翻訳活性が徐々に回復することを見出した。続いてリボソームの動態について解析を行なったところ、エタノールストレス下でリボソームタンパク質は安定だったが、rRNA 量は減少傾向が認められた。また興味深いことに、この減少は前処理によって抑制されることも明らかとなった。さらに、翻訳開始に関わるスキャニング因子 Ded1 が高濃度エタノールストレス下で細胞質に凝集体を形成しており、この凝集体は前処理を行なうことで徐々に減少・消失することを確認した。以上の結果から、前処理による翻訳活性の変動にリボソームや翻訳開始因子が関与していることが示唆された。現在、翻訳活性変動に影響する他の要因を探るため、PQC に関わる因子である Fes1 と Hsp104 の欠損株における翻訳活性についても解析を行なっている。

Acute severe ethanol stress (10% v/v) causes the pronounced translation repression in yeast cells. It is well known that pretreatment with mild ethanol (6% v/v) improves the tolerance to severe ethanol stress, and this phenomenon is called “adaptive response”. However, there is no information on the adaptive response to severe ethanol stress in yeast translation repression. In this study, we found that yeast cells pretreated with mild ethanol stress were able to recover their translation activity even under severe ethanol stress. The results provide new insights into the acquired resistance of yeast cells to severe ethanol stress.

translation repression, stress adaptation, Ded1

発表責任者：安東 稜子（ryokoicha.1119@gmail.com）

講演番号：4A05-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

グルコース枯渇下における出芽酵母タンパク質 Tma10 と Stf2 の機能解析

Functional analysis of budding yeast proteins Tma10 and Stf2 under glucose depletion

○西野 靖矢、井澤 真吾（京都工繊大・工芸科学)
○Seiya NISHINO, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

グルコース枯渇は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に強い翻訳抑制を引き起こすため、Hsp26 や Hsp30 などの一部のタンパク質を除いて大部分のタンパク質の新規合成が抑制される。今回、機能未知のタンパク質 Tma10 の発現がグルコース枯渇下で誘導されることを新たに見出した。Tma10 のタンパク質レベルは非ストレス下ではほとんど検出されなかったが、グルコース枯渇 30 分後には顕著に上昇しグルコース枯渇条件下で高いレベルを維持していた。一方、培地中にグルコースを再供給すると Tma10 は 30 分以内に速やかに分解され、基底レベルにまで減少した。また、Tma10 の発現レベルは 42˚C の熱ショックや窒素源枯渇条件下でも有意に上昇した。これらの結果から、Tma10 はストレス条件下で発現するターンオーバーが早いタンパク質だと考えられる。

出芽酵母のゲノム塩基配列内には Tma10 のパラログとして Stf2 がコードされている。野生株の Stf2 タンパク質レベルもグルコース枯渇下で上昇したが、その発現レベルは Tma10 に比べて低かった。しかし興味深いことに、グルコース枯渇下の Tma10 欠損株(*tma10*Δ)における Stf2 の発現レベルが、グルコース枯渇下の野生株における Tma10 と同等のレベルにまで顕著に増加することが確認された。そのため、グルコース枯渇下では一定レベルの Tma10 と Stf2 が必要とされ、何か重要な役割を担っていると推測された。そこで、Stf2 と Tma10 の二重欠損株(*stf2*Δ*tma10*Δ)を構築し、グルコース枯渇下での表現型を解析したところ、ミトコンドリア内に形成される変性タンパク質の凝集体 (Deposits of Unfolded Mitochondrial Proteins、DUMP) やミトコンドリア形態などで野生株との違いが認められた。現在、グルコース枯渇下における両タンパク質の機能について詳細な解析を行っている。

Glucose depletion induces strong translation repression in *Saccharomyces cerevisiae*, resulting in the prevention of new synthesis of most proteins. We found that the expression of Tma10, whose function is unknown, is induced even under translation repression caused by glucose depletion. The protein level of Tma10 was almost undetectable under non-stressed conditions, but increased markedly within 30 min after glucose depletion and maintained a high level under glucose depleted conditions. On the other hand, when glucose was resupplied into the medium, Tma10 was rapidly degraded and decreased to basal level. *S. cerevisiae* has Stf2 as a paralog of Tma10. Interestingly, the expression level of Stf2 in *tma10*Δ cells under glucose depletion was significantly increased to the level comparable to that of Tma10 in wild-type cells under glucose depletion. Therefore, it is likely that a certain level of Tma10 and Stf2 is required to play some important role under glucose depletion.

translation repression, glucose depletion, stress response

講演番号：4A05-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母におけるミトコンドリアレトログレードシグナル伝達経路を介したジヒドロスフィンゴシンの細胞死誘導

Induction of cell death by dihydrosphingosine via the mitochondrial retrograde signaling pathway in budding yeast

○高山 千廣、古賀 綾乃、有田 頌彬、坂本 理沙、谷 元洋（九大理）
○ Chihiro TAKAYAMA, Ayano KOGA, Nobuaki ARITA, Risa SAKAMOTO, Motohiro TANI (Kyushu Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてスフィンゴ脂質は生体膜脂質二重層の主要成分の一つであり、生育に必須となる脂質である。ジヒドロスフィンゴシン（DHS)、フィトスフィンゴシン（PHS)は、酵母のスフィンゴ脂質の基本骨格となる長鎖塩基構造である。 通常、PHS, DHS は細胞に微量しか存在しないが、ストレス応答、エンドサイトーシス制御等において重要な役割を果たしていることが報告されている。これまでに我々は、細胞内で DHS が過剰に蓄積すると、ミトコンドリア由来の活性酸素種の増大を介した細胞死が誘導され、その細胞毒性は PHS よりも強いことを見出した（*FEBS J*(2020) 287, 3427)。本研究では、DHS の細胞毒性発揮のメカニズム解明を目指し、細胞外から添加した DHS に対して抵抗性を付与する変異遺伝子（サプレッサー変異)の探索を行い、3 個の遺伝子を同定した。この中には、細胞のミトコンドリア機能を活性化させる ミトコンドリアレトログレードシグナル伝達経路（RTG 経路)の活性化に関与する *RTG2* が含まれていた。 RTG 経路と DHS の細胞毒性との関連性を調べるために、RTG 経路の抑制に寄与する *MKS1* を欠損した酵母を作製した。RTG 経路が活性化される *mks1Δ*株では、野生株に比べて細胞外から添加した DHS の細胞内取り込み量が変化しないにも関わらず、DHS 過剰蓄積による ROS の増加、細胞死誘導効果が増強された。さらに、*MKS1* 欠損による効果は、RTG 経路の転写因子をコードする *RTG3* の欠損で打ち消されることも確認された。*mks1Δ* 株と同様の効果は、RTG 経路転写因子の *RTG1,RTG3* を過剰発現させても観察された。また、DHS 処理によって RTG 経路の活性が上昇することが確認された。以上のことより、DHS 過剰蓄積による細胞毒性にはミトコンドリア機能調節に関与する RTG 経路の活性化が部分的に関与することが示唆された。

Sphingolipids, which have sphingoid long-chain bases as the core structure, are essential for growth of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *S.cerevisiae* has two types of long-chain bases, phytosphingosine (PHS) and dihydrosphingosine (DHS). Previously, we found that intracellularly accumulated DHS causes mitochondrial reactive oxygen species-mediated cells death, and the cytotoxicity is much more potent than PHS. In this study, we screened suppressor mutations that confer resistance to DHS, and identified *RTG2* encoding component of the mitochondrial retrograde (RTG) signaling pathway. Deletion of *MKS1* encoding a negative regulator of the RTG pathway or overexpression of *RTG1/RTG3* encoding transcriptional factors of the RTG pathway confers hypersensitivity to accumulation of DHS. Furthermore, the activity of RTG pathway was increased when cells were treated by DHS. These results suggested that the activation of the RTG pathway is at least partly involved in the cytotoxic activity of DHS.

sphingolipid, dihydrosphingosine, yeast

発表責任者：谷　元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：4A05-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における一酸化窒素依存的な翻訳後修飾を介した代謝制御

Metabolic regulation mediated by the nitric oxide-dependent posttranslational modification in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○示野 誠也、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Seiya SHINO, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

一酸化窒素（NO）は様々な生物種においてシグナル分子として機能する一方、過剰な NO はストレスを引き起こす。NO の作用機序の一つとして、システイン（Cys）残基の翻訳後修飾（PTM）である *S*-ニトロソ（SNO）化が知られている。また、モデル低分子化合物を用いた解析から、SNO 化修飾がグルタチオンと反応し、*S*-グルタチオン（SGT）化修飾へと変換されることが示唆されている。PTM はタンパク質の安定性や局在、酵素の活性に関与することで生理機能を制御している。高等生物のモデルであり、発酵産業上重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、NO の生理的役割や作用機序には不明な点が多い。本研究では、NO 処理条件下において細胞内で PTM を受けるタンパク質を探索・同定し、酵母の NO ストレスに対する応答・耐性機構を明らかにすることを目的とした。

NO 処理した酵母から得たタンパク質抽出液を解析した結果、SNO 化タンパク質の増加は観察されなかったが、興味深いことに SGT 化タンパク質が増加していた。さらに、プロテオーム解析と抗グルタチオン抗体を用いたウェスタンブロットから、NO 処理依存的に解糖系酵素の fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fba1 の 112 番目の Cys 残基（Cys112）が SGT 化されることを見出した。また、組換え精製酵素を用いた解析から、Cys112 の SGT 化が Fba1 の酵素活性を抑制すること、グルタレドキシン Grx1 が Fba1 を脱 SGT 化し、酵素活性を回復させることが示された。一方、Cys112 の SGT 化に依存して、ペントースリン酸回路（PPP）の代謝中間体、および主に PPP で合成される NADPH の細胞内含量が増加した。以上の結果から、NO 依存的に Fba1 の Cys112 が SGT 化され、解糖系・PPP の制御を介して増加した NADPH が NO ストレス応答に寄与することが示唆された。

Nitric oxide (NO) acts as a signaling molecule and also a stress source at its excess concentration. NO exerts its action *via* post-translational modifications (PTM), including *S*-nitrosylation and indirect *S*-glutathionylation (SGT). In this study, we analyzed the NO-dependent PTM in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Our proteomic and immunoblotting analysis exhibited that fructose-1,6-bisphosphate aldolase Fba1 underwent SGT at 112th cysteine residue (Cys112) when treated with NO. Our further analysis indicated that the activity of Fba1 was inhibited by SGT of Cys112 reversibly. Additionally, an intermediate in pentose phosphate pathway (PPP) and NADPH, which is mainly synthesized in PPP, were increased dependently on SGT of Fba1 at Cys112 under NO treatment condition. These results suggest that the NO-dependent inhibition of Fba1 activity *via* its SGT regulates the metabolism in PPP, leading to the increase of NADPH, which is important for response to NO stress.

Saccharomyces cerevisiae, Nitric oxide, Post-translational modification

講演番号：4A05-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

リボフラビン合成酵素 GTP cyclohydrolase II が *Candida glabrata* の病原性に及ぼす影響
Effect of a riboflavin synthesis enzyme GTP cyclohydrolase II on the pathogenicity of *Candida glabrata*

○鈴木 崇真[1]、那須野 亮[1]、老木 紗予子[2]、萩原 大祐[2]、高木 博史[1]([1]奈良先端大・バイオ、[2]筑波大生命環境)
○Soma Suzuki[1], Ryo Nasuno[1], Sayoko Oiki[2], Daisuke Hagiwara[2], Hiroshi Takagi[1] ([1]NAIST, [2]Tsukuba Univ.)

病原菌は感染時に、宿主の一酸化窒素合成酵素(NOS)に由来する一酸化窒素(NO)により攻撃されるため、病原菌のNO耐性は感染や病原性に極めて重要である。当研究室では、酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、*RIB1*遺伝子にコードされるリボフラビン(RF)合成の初発酵素GTP cyclohydrolase II(GCH2)の反応生成物がNOを消去し、NO耐性に寄与することを見出した。本研究では、日和見感染真菌*Candida glabrata*におけるGCH2を同定し、NO耐性機構と病原性への寄与を解析した。塩基配列から推定した*C. glabrata*の*RIB1*(*CgRIB1*)に着目し、解析したところ、*CgRIB1*破壊株がRF要求性を、*CgRIB1*の遺伝子産物がGCH2活性をそれぞれ示したことから、*CgRIB1*がGCH2をコードすることを明らかにした。また、*CgRIB1*の過剰発現株および破壊株は、野生型株に比べてそれぞれNO耐性および感受性を示した。続いて、*C. glabrata*をマウス由来のマクロファージ様細胞に取り込ませ、マクロファージ様細胞内の生菌数を測定した。その結果、野生型株は経時的に増加した一方、*CgRIB1*破壊株では有意に減少した。しかし、NOS阻害剤を処理した条件では、*CgRIB1*破壊株の生菌数は顕著に回復し、経時的に増加した。さらに、カイコをモデル宿主として用いた感染実験により*C. glabrata*の病原性を解析した。その結果、*CgRIB1*破壊株を感染させたカイコの生存期間は、野生型株を感染させたカイコよりも有意に延長した。以上のことから、GCH2依存的なNO耐性機構が*C. glabrata*の病原性に極めて重要であり、GCH2が抗菌剤の標的として非常に有望であることが示された。

Pathogens are exposed to nitric oxide (NO) stress derived from a host immune system during infection process. Therefore, NO stress tolerance mechanisms in pathogens are important for their pathogenicity. We have previously shown that GTP cyclohydrolase II (GCH2), an enzyme in the riboflavin (RF) biosynthetic pathway, encoded by *RIB1* gene is important for NO stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Here, we identified and characterized GCH2 in an opportunistic pathogen *Candida glabrata*. Our phenotypic and biochemical analyses indicated that a putative *RIB1* in *C. glabrata* (*CgRIB1*) was required for RF biosynthesis and also encoded GCH2. Furthermore, the overexpression or deletion of *CgRIB1* increased or decreased the NO stress tolerance of *C. glabrata*, respectively. Moreover, the infection experiments using macrophage-like cells or a silkworm as a model host showed that GCH2 was essential for the virulence of *C. glabrata*. These results suggest that the GCH2-dependent NO stress resistance mechanism is a promising target for novel antifugals.

Pathogen, Nitric Oxide, Riboflavin

講演番号：4A05-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

酵母 Saccharomyces cerevisiae における新規な一酸化窒素耐性機構の解析

Elucidation of a novel nitric oxide tolerance mechanism found in the yeast Saccharomyces cerevisiae

○吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yuki YOSHIKAWA, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【背景と目的】 高等生物のモデルとして、また種々の発酵・醸造食品の製造に重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵生産過程で様々なストレスに曝されている。そのため、有用物質の生産性向上を目指す上で、各種のストレス耐性機構の解明は重要な課題である。砂糖の生産時に副産物として生じる廃糖蜜はバイオエタノール生産の原材料などに利用され、その中でも甜菜廃糖蜜には多量の亜硝酸が含まれ、発酵阻害の要因である（Glacet *et al., Biotechnology Letters,* 1985）。亜硝酸は酸性条件下において分解が促進され、一酸化窒素（NO）を含む活性窒素種（RNS）が発生する。NO は、哺乳類の生体内において血管拡張、神経伝達や感染防御など様々な生命現象に関与する重要なシグナル伝達物質である。一方、当研究室では、酵母において適切な濃度の NO は細胞のストレス耐性に寄与するが、過剰量の NO は細胞毒性を示すことを報告している。そのため、甜菜廃糖蜜を利用したアルコール発酵においては、RNS が発酵を阻害する一つの要因であると考えられ、酵母における NO 耐性機構の理解は甜菜糖蜜を利用したアルコール発酵能の改善に極めて重要である。
【方法と結果】 本研究では、高濃度の亜硝酸を含有する液体培地にて培養を繰り返すことで、著しく高い RNS 耐性を有する複数株の取得に成功した。現在、取得した株の全ゲノムシーケンス解析を進めており、変異遺伝子の同定と解析を行うことで、新規な NO 耐性機構を明らかにする予定である。

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is important as a model of higher eukaryotes and also for the fermentation industry, is exposed to various stresses during the fermentation process. Therefore, the elucidation of stress tolerance mechanisms and its application are important issues to improve the fermentation productivity. Molasses, a by-product of sugar production, is used as a cost-effective carbon source for bioethanol production. It has been reported that beet molasses contained a large amount of nitrite and that nitrite inhibited alcoholic fermentation. Nitrite is rapidly decomposed under acidic conditions, producing reactive nitrogen species (RNS) including nitric oxide (NO). We have previously reported that an appropriate concentration of NO contributed to stress tolerance, however it was cytotoxic at its excess level. Taken together, it is important for the improved fermentation efficiency using beet molasses to understand the responses to RNS.

In this study, we isolated yeast strains harboring significantly higher RNS tolerance by repeated passages of yeast cells in a medium containing high concentration of nitrite with acidic pH. Now, we are verifying the underlying mechanisms of their NO tolerance by whole genome sequencing analysis of isolated yeast strains.

Saccharomyces cerevisiae, Nitric oxide, Nitrite

講演番号：4A05-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出したリボフラビン合成経路依存的なアセトアルデヒド耐性機構の解析

Molecular mechanism of acetaldehyde tolerance mediated by the riboflavin biosynthesis pathway found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○那須野 亮、鈴木 崇真、高木 博史 (奈良先端大・バイオ)
○Ryo NASUNO, Soma SUZUKI, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【背景】ビタミン B2 としても知られるリボフラビン（RF）は、FAD や FMN など酸化還元酵素の補酵素の前駆体であり、多様な生命現象に関わる全ての生物に必須の物質である。動物は RF を合成できないが、細菌や真菌、植物は、GTP とリブロース-5-リン酸を出発物質とする RF 生合成経路を有している。最近我々は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた解析から、RF 合成経路の律速酵素である GTP cyclohydrolase II（GCH2）が、過剰な一酸化窒素（NO）によるストレスから細胞を保護することを見出した。本研究では、NO 耐性以外にも RF 合成経路には新規な生理的機能があると仮説を立て、酵母を用いてこれを検証した。**【結果と考察】**GCH2 をコードする *RIB1* 遺伝子を破壊した酵母を種々のストレス条件下で生育させたところ、*RIB1* 破壊株はアセトアルデヒド（AA）や高濃度のグルコースに感受性を示した。一方、高濃度グルコースと同程度の浸透圧を示すと考えられる 1M NaCl の存在下では、*RIB1* 破壊の効果は見られなかった。これは、高濃度グルコース条件下において細胞内で合成される AA が、*RIB1* 破壊株の生育阻害を引き起こすことを示唆する。以上の結果から、外因性および内因性の AA に対する耐性に GCH2 が寄与する可能性が示された。現在、RF 合成経路依存的な AA 耐性の分子機構を明らかにするため、RF 合成経路に関与する遺伝子の発現量や代謝物を解析している。

【Introduction】Riboflavin (RF) is an essential compound as a precursor of FAD and FMN, which function as cofactors of various redox enzymes. Various organisms except for animals, including bacteria, fungi, and plants synthesize RF from GTP and ribulose-5-phosphate as starter materials. Recently, we demonstrated that GTP cyclohydrolase II (GCH2), which is the rate-limiting enzyme of RF synthesis pathway, contributes to the stress resistance against the excess amount of nitric oxide (NO). Here, we investigated novel functions of RF biosynthesis pathway in addition to NO resistance. **【Results and Discussion】**Our growth assay using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* demonstrated that the cells lacking GCH2 were sensitive to acetaldehyde (AA) and high concentration of glucose, but not to osmotic stress. These results imply that AA endogenously synthesized from high level of glucose inhibits the growth of the GCH2 deficient cells. Our findings suggest that GCH2 is involved in the AA tolerance. Possible mechanisms underlying the GCH2-dependent AA tolerance will be discussed based on the results from on-going analyses of gene expression and metabolites.

Riboflavin, Acetaldehyde, Yeast

発表責任者：那須野　亮（r-nasuno@bs.naist.jp）

講演番号：4A05-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母における Rad24 優性不能変異の解析

Analysis of Rad24 dominantly incapacitated mutations in fission yeast

○大島 智仁、川向 誠（島大生資）
○Tomohito OSHIMA, MAKOTO KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

分裂酵母は通常は一倍体で安定で、栄養豊富な条件下では体細胞分裂により増殖する。しかし、細胞外ストレスや栄養源（特に窒素原）の枯渇、接合フェロモンなどの細胞外因子に応答すると、細胞周期を G1 期で停止させ、接合・減数分裂・胞子形成からなる有性生殖過程へ移行する。我々は通常は胞子形成しない窒素源存在下であっても高い頻度で胞子形成を行う変異株、*sam*（skip the requirement of starvation for mating）変異株の解析を進めている。優性変異である *sam3* および *sam9* の変異は *rad24*(E185K)のミスセンス変異によるものである。*rad24* 遺伝子によってコードされる 14-3-3 タンパク質は標的タンパク質と相互作用を引き起こすことで相手側の機能を制御する。E185K の変異部位はタンパク質との結合に重要な疎水性部位になるため相互作用ができなくなったと考えられている。Rad24(E185K)のミスセンス変異による相互作用への影響を免疫沈降法により解析した。Rad24(E185K)は、Chk1 との相互作用に影響は生じないが、Ste11、Mei2 において相互作用へ影響が生じることが分かった。このことは Rad24(E185K)が紫外線感受性に影響せず、有性生殖に影響する表現型と一致する。

Fissio yeast is usually stable in haploid, and grow by mitosis under nutrient-rich conditions. However, in response to extracellular stress, depletion of nutrient sources (especially nitrogen sources), and extracellular factors such as mating pheromones, the cell cycle is arrested at the G1 phase, leading to a sexual reproduction process consisting of mating, meiosis, and sporulation. We have been analyzing *sam* (skip the requirement of starvation for mating) mutants, which frequently sporulate even in the presence of nitrogen sources that normally do not sporulate. The dominant mutations *sam3* and *sam9* are due to a missense mutation in *rad24* (E185K). The 14-3-3 protein encoded by the *rad24* gene controls the function of the target protein by interacting with it. We thought that the mutant site of E185K failed to interact with targets because it changed a hydrophobic site important for binding to proteins.

The effect of the missense mutation in Rad24 (E185K) on the interaction was analyzed by immunoprecipitation. We found that Rad24 (E185K) does not affect the interaction with Chk1, but it does affect the interaction with Ste11 and Mei2. This is consistent with the Rad24 (E185K) characteristics, namely UV insensitivity and *sam* phenotypes.

conan, pumpkin, okashi

発表責任者：大島智仁（n21m807@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4A06-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

オートファジックボディの膜分解メカニズムの解明

Investigating the membrane degradation mechanism of autophagic bodies

○籠橋 葉子[1,2,3]、川俣(堀江) 朋子[1]、大隅 良典[1] ([1]東京工業大学細胞制御工学センター、[2]東京工業大学生命理工学院、[3]ポーラ化成工業株式会社)
○ Yoko Kagohashi[1,2,3], Tomoko Kawamata -Horie[1], Yoshinori Ohsumi[1] ([1]Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, [2]Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, [3]POLA CHEMICAL INDUSTRIES, INC.)

オートファジーは細胞内の自己成分を液胞/リソソームで分解する機構である。酵母においてオートファジーが誘導されると、細胞質成分を隔離した二重膜構造が液胞と融合し、その内膜構造(オートファジックボディ、AB)が液胞内に放出される。その後、AB 膜が分解され、中の細胞質成分が液胞内加水分解酵素によって分解される。現在までに、AB 膜分解に必要な中心的因子として、液胞内唯一のリパーゼである Atg15、液胞内プロテアーゼである Pep4, Prb1 が同定されている。しかし、これらの因子がどのように膜分解に関わっているのは長い間不明のままだった。私たちはこの膜分解機構を解明する目的で、Atg15 由来の液胞内リパーゼ活性を検出する in vitro 評価系を確立した。このリパーゼ活性は Pep4, Prb1 非存在下では検出されなかった。続いて、Atg15 のトランケート体を用いて、局在解析を行った。これより、Atg15 は Mvb 経路によって液胞への輸送された後、Mvb 小胞から切り離されることで AB 膜に強く結合することが分かった。以上より、Atg15 は、リパーゼ活性化と AB 膜への局在の点で、Pep4, Prb1 から二段階の制御を受けていることが明らかになった。また、単離した AB を用いた in vitro での AB 分解活性評価系を構築し、液胞より精製した活性型 Atg15 が AB を分解することを示した。さらに、活性型 Atg15 の同定を試みた。これらの結果をもとに AB 膜分解機構のモデルを提案する。

Autophagy is a mechanism for the vacuolar/lysosomal degradation of intracellular self-component. When autophagy is induced in the yeast, a double membrane engulfing cytosolic contents fuses with the vacuole and its inner vesicle (called the autophagic body, AB) is released into the vacuole. Then the AB membrane is lysed and its sequestered materials are degraded by vacuolar hydrolases. To date, Atg15, a vacuolar lipase, and Pep4, Prb1, vacuolar proteases, are known as responsible proteins for the AB degradation. However, how these proteins cause the AB degradation has remained unclear. In order to elucidate the mechanism, we developed an in vitro assay system to evaluate Atg15-derived vacuolar lipase activity. The activity was not detected in the absence of Pep4 and Prb1. Then, using truncated Atg15 mutants, we conducted localization analysis. We found that Atg15, transported to the vacuole via MVB pathway, is bound to the AB membrane after cleaved off from the MVB vesicle. These results indicate that Atg15 is regulated in two steps by Pep4 and Prb1. Finally, we established in vitro AB degradation assay system using isolated ABs as substrates and show that our purified active Atg15 degrade ABs. Afterwards, we further analyzed the active form of Atg15. Based on these results, we propose a model for the degradation mechanism of the AB membrane.

autophagy, vacuole, phospholipase

発表責任者：Yoko Kagohashi（kagohashi.y.ab@m.titech.ac.jp）

講演番号：4A06-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

メタノール酵母 *Komagataella phaffii* Atg12-Atg5 複合体によるオートファジーの制御

Regulation of autophagy by non-covalent Atg12-Atg5 complex in yeast *Komagataella phaffii*

○光部 雅俊[1]、中辻 拓実[1]、白石 晃將[1]、奥 公秀[2]、阪井 康能[1]([1]京大農、[2]京都先端大バイオ環境)
○Masatoshi KOBE[1], Takumi NAKATSUJI[1], Kosuke SHIRAISHI[1], Masahide OKU[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ, [2]Kyoto Univ. Advanced Science)

オートファジーは、脂質二重膜構造体であるオートファゴソームが細胞内のたんぱく質や細胞小器官を取り囲み、液胞へと輸送、分解する細胞内の主要な分解系である。オートファゴソームの形成において、ユビキチン様共役系により形成される Atg12-Atg5 複合体が、Atg16 と共に E3 として Atg8 の脂質化を促進する過程は、全ての生物種で保存されている中心的な分子機構であると考えられてきた。我々はメタノール酵母 *Komagataella phaffii*（旧名 *Pichia pastoris*）を含む一部の生物種では、Atg12 と Atg5 が非共有結合により結合していること、Atg12-Atg5 の共有結合形成に必要な Atg10 をコードする E2 遺伝子がゲノム上にないことを発見し、オートファジー関連遺伝子が進化の過程で大きく変化し得ることを明らかにした（1）。本研究では、*K. phaffii* を用い、非共有結合性の Atg12-Atg5 複合体がオートファジーを誘導する分子機構の解明を目的とした。初めに、培養条件に応じた KpAtg8 の脂質化制御を解析したところ、オートファジー誘導条件でのみ KpAtg8 が脂質化されていた。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では培養条件に関わらず ScAtg8 の脂質化が見られることから、Atg8 の脂質化制御は *K. phaffii* 特有の機構であることが示唆された。現在、KpAtg12 の翻訳後修飾について解析中である。

Autophagy is a bulk degradation process in which the autophagosome, a double-membrane organelle, incorporates intracellular proteins and organelles, transports them to vacuoles, and decompose them. In the process of autophagosomal formation and maturation, lipidation of Atg8 is formed by a ubiquitin-like conjugation system, including Atg12-Atg5 by another UBL system. The Atg12-Atg5 conjugation system had been considered to be the central molecular mechanism conserved in all of the organisms. In recent research, we showed that in some yeast species such as *Komagataella phaffii* (previously *Pichia pastoris*), Atg12-Atg5 complex was formed by a non-covalent interaction (1). In this study, we aimed to elucidate the regulatory function of non-covalent Atg12-Atg5 complex in autophagy of *K. phaffii*.

(1) Pang, *et al, Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2019

Autophagy, Ubiquitin-like system, Methylotrophic yeast

講演番号：4A06-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

TORC1-Gtr 経路の新規上流因子の同定を目指したスクリーニング

Screening for the identification of novel upstream regulators in the TORC1-Gtr pathway

○谷川 美頼、外山 美奈、前田 達哉（浜松医科大）
○Mirai TANIGAWA, Mina TOYAMA, Tatsuya MAEDA (Hamamatsu Univ. Sch. of Med.)

TORC1（Target of Rapamycin Complex1）は、栄養によって活性化され、同化反応の促進と異化反応の抑制を行う代謝のマスターレギュレーターである。TORC1 は栄養の中でもアミノ酸によってよく活性化される。酵母ではアミノ酸による TORC1 の活性化は Pib2 経路、Gtr 経路の2つの独立した経路を介してなされることが明らかとなっている。Pib2 経路では液胞膜タンパク質 Pib2 がグルタミンを検知して TORC1 を直接活性化することが明らかになった一方で、Gtr 経路がどのようにアミノ酸によって制御されているのかの理解は進んでいない。

Gtr 経路は低分子量 G タンパク質である Gtr 複合体（哺乳類 Rag 複合体オルソログ）を介して TORC1 を活性化する。Gtr 複合体の負の制御因子として SEA 複合体（哺乳類 GATOR 複合体オルソログ）が同定されているが、SEA 複合体がどのようにアミノ酸に応答して経路の on/off を制御しているのか、その機構は明らかでない。本研究では、Gtr 複合体上流で機能する未知の制御因子の同定を目指して、Gtr 複合体の恒常的活性化型変異体を用いた新規スクリーニング系の構築を行ったのでその報告を行う。

TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) is a master regulator of metabolism that is activated in response to nutrients to promote anabolic reactions and inhibit catabolic reactions. In yeast, amino acids activate TORC1 through two independent pathways: the Pib2 pathway and the Gtr pathway. In the Pib2 pathway, the vacuolar membrane protein Pib2 detects glutamine and directly activates TORC1. On the other hand, how the Gtr pathway is regulated by amino acids is remained elusive.

The SEA complex (mammalian GATOR complex orthologue) has been identified as a negative regulator of the Gtr complex, although it is not clear how the SEA complex responds to amino acids to regulate the on/off of the pathway. In this study, we report a novel screening to identify unknown regulators that function upstream of the Gtr complex.

amino acid, TORC1, rapamycin

発表責任者：谷川美頼（tanigawa@hama-med.ac.jp）

講演番号：4A06-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

ウシグソヒトヨタケ子実体発生開始におけるオートファジーの関与

Involvement of autophagy machinery in the induction of fruiting body formation in *Coprinopsis cinerea*

○吉田 裕史、坂本 裕一 (岩手生工研)
○Hiroshi YOSHIDA, Yuichi SAKAMOTO (IBRC)

担子菌ウシグソヒトヨタケの平板培養コロニーに青色光を照射すると子実体発生が誘起されるが，高グルコース下で培養した場合は青色光を照射しても誘起されない。しかし，ラパマイシン作用下では高グルコース下でも子実体発生開始の兆候（hyphal knot 形成）が観察されることから，高グルコース下での子実体発生抑制にはキナーゼタンパク質 TOR（Target of rapamycin）が介在すると考えられる。そこで発表者らは，TOR 下で負に制御される経路のうち，オートファジーの働きが子実体発生開始に必要であるという仮説のもと，オートファジーの子実体発生への関与について検証を行った。オートファジー関連遺伝子 *atg13*，*vps27* をゲノム編集によりそれぞれ単独で破壊したところ，いずれも高栄養培地では正常なコロニー生育を示し，窒素欠乏下では *atg13* 破壊株のみが野生型株と比べて弱い生育を示した。青色光照射後の hyphal knot 形成量を評価したところ，*vps27* 破壊株のみ野生型株と比べて hyphal knot 形成が顕著に減少していた。TOR 下で直接リン酸化制御を受けるオートファジー関連因子としては Atg13 と Vps27 が知られ，それぞれ別経路を担う。上記結果を踏まえると，Vps27 経路が子実体発生開始に関与すると考えられる。子実体発生開始における Vps27 経路の働きや高グルコース下抑制との関連については今後の解析が待たれる。

The induction of fruiting body formation in *Coprinopsis cinerea* is stimulated by blue light but not when grown on high glucose. However, rapamycin, an inhibitor of the Ser/Thr kinase protein TOR, partially suppresses the repressive effect of glucose on the fruiting body induction, indicating the involvement of TOR in the repression of fruiting body induction under high glucose condition. Therefore, we hypothesized that some of the autophagy machinery, which is negatively controlled under TOR, participates in fruiting body induction. To address this, we obtained autophagy-related gene disruptants Δ*atg13* and Δ*vps27* in *C. cinerea* using genome editing. The resulting strains showed normal growth under nutrient-rich conditions, but Δ*atg13* was reduced in aerial hyphae when grown on nitrogen-restricted media. While Δ*atg13* normally formed the differentiated hyphal knot structures by blue light stimulation, Δ*vps27* was significantly reduced in hyphal knot formation compared with the wild-type strain. These observations suggest that Vps27 function, among the known TOR downstream targets, contributes to fruiting body induction under proper conditions.

fruiting body, autophagy, rapamycin

講演番号：4A06-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

Aspergillus 糸状菌におけるアミラーゼ生産を誘導する代謝耐性イソマルトースアナログ
Non-digested isomaltose analogues induce amylase production in *Aspergillus* fungi.
○沼本 穂[1]、森山 貴博[2]、田邉 理子[2]、寄立 麻琴[2]、平井 剛[2]、高橋 俊二[3]、加藤 直樹[1]([1]摂大農、[2]九大院薬、[3]理研 CSRS)
○ Minori NUMAMOTO[1], Takahiro MORIYAMA[2], Riko TANABE[2], Makoto YORITATE[2], Go HIRAI[2], Shunji TAKAHASHI[3], Naoki KATO[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Kyushu Univ., [3]RIKEN CSRS)

【背景・目的】 糸状菌が生産する多糖分解酵素は、食品・繊維産業などの用途から、酵素産業の中で大きな市場を占めている。糸状菌は多糖分解酵素を細胞外に分泌することで多糖をオリゴ糖や単糖に低分子化した後、細胞内に取り込み代謝する。*Aspergillus* 属におけるアミラーゼの発現は、デンプンの分解過程で生成されるイソマルトース (IM) がシグナルとなって誘導される。その発現は、経路特異的転写活性化因子 AmyR が細胞質から核に移行することで誘導される。しかしながら、IM は分解・代謝されてしまうこともあり、IM の受容体を含め、AmyR を活性化するまでの細胞内シグナル伝達経路は未解明のままである。そこで、IM のグリコシド結合を別元素に置換することで代謝耐性を賦与し、それをプローブとして受容体から AmyR に至るシグナル経路の解明を目指した。本発表では合成した数種類の代謝耐性 IM アナログのアミラーゼ生産誘導能を比較した結果について報告する。
【方法・結果】 麹菌α–アミラーゼ遺伝子 *amyB* を導入した *Aspergillus nidulans* を用いて、IM およびその誘導体のアミラーゼ生産誘導能力を調べた。その結果、C-グリコシド IM アナログ (*CH*$_2$-IM) は、添加後初期は IM の誘導と比べてアミラーゼ生産は劣るものの、添加 30 時間後には IM よりも高いアミラーゼ生産を示した。一方、S-グリコシド IM アナログ (*S*-IM) はアミラーゼ生産をほとんど誘導しなかった。また，発現解析を行ったところ，*CH*$_2$-IM は IM より遅れて AmyR 支配下の遺伝子の発現を誘導し、その遺伝子発現の持続時間は IM より長かった。一方、アミラーゼ生産の結果と一致して、*S*-IM は発現を誘導しなかった。以上の結果から、C-グリコシド IM アナログは、アミラーゼ生産の誘導シグナルとして機能することが明らかになった。

Filamentous fungi have ability to produce various enzymes for industrial use, including polysaccharide degrading enzymes. In *Aspergillii*, the amylase production is induced by isomaltose (IM) formed during starch degradation. IM triggers nuclear localization of AmyR, a pathway-specific transcriptional activator, followed by expression of amylase genes. However, the IM signaling pathway that activates AmyR remains largely unknown. In this study, we investigated the amylase inducing ability of metabolically stable IM analogues, in which the oxygen atom in the glycosidic bond was replaced with sulfur and carbon atoms.

Amylase, Isomaltose, Aspergillii

講演番号：4A06-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養時における菌体への物理刺激がもたらすα-1,3-グルカン合成量への影響の解析

Effect of physical stress to hyphal cells on cell wall α-1,3-glucan biosynthesis of *Aspergillus oryzae* under liquid culture conditions

○織田 隆太郎[1]、宮澤 拳[2]、吉見 啓[3,4]、阿部 敬悦[1,4]（[1]東北大院農、[2]感染研真菌部、[3]京大院農、[4]東北大 NICHe）

○Ryutaro ORITA[1], Ken MIYAZAWA[2], Akira YOSHIMI[3,4], Keietsu ABE[1,4] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Dep. Fungal Infection, NIID, [3]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ.)

糸状菌は様々な有用物質の生産宿主として利用されているが、液体培養において菌糸の形態制御が困難であることが課題となっている。我々はこれまでに麹菌において、細胞壁多糖 α-1,3-グルカン（AG）と細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクタン（GAG）の生合成遺伝子を共に破壊することにより、菌糸が塊を形成せずに分散することを発見した[1)]。また、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において AG 合成酵素遺伝子の転写制御に Cell Wall Integrity (CWI)経路が関与することが分かっている[2)]。そこで、本研究では菌体への物理的刺激が細胞壁多糖の合成量に与える影響とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

菌体へ刺激を与えることを目的として、麹菌(野生型株)を用いて、フラスコに 0, 20, 40, 60, 80 個のガラスビーズ(直径 6 mm)を入れた富栄養培地(YPD)を用いて液体振盪培養を行った。AG 合成酵素遺伝子の転写量は、フラスコ中のビーズの数が多くなるほど増加した。次に、各フラスコの菌体からの細胞壁多糖を熱水アルカリ抽出法により分画し、細胞壁 AG が主に分画されるアルカリ可溶(AS)画分および細胞壁キチン・β-1,3-グルカンが主に分画されるアルカリ不溶(AI)画分の構成糖を解析した。その結果、フラスコ中のビーズ数に比例して、AS 画分中のグルコース重量が増加した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞形態を観察したところ、ビーズを入れた条件では、菌糸先端の分岐が増え、菌糸の長さが短くなる傾向が見られた。これらのことから、培養中の物理的刺激に伴い、菌糸形態が変化し、細胞壁成分 AG が増加することが示唆された。現在、刺激を受けた菌体内での CWI 経路の MAP kinse の活性化状態を western blotting により評価している。

A difficulty in the industrial fermentation using filamentous fungi under submerged culture conditions is controlling the macromorphology, which largely affects fermentation productivity. We found that the *Aspergillus oryzae* hyphae scarcely formed pellets and dispersed by disrupting both the biosynthetic genes of the cell wall polysaccharide α-1,3-glucan (AG) and galactosaminogalactan (GAG)[1)]. The cell wall integrity (CWI) signaling pathway is known to involve in the transcriptional regulation of the AG synthase gene in *Aspergillus nidulans*[2)].

In the present study, we investigated the effect of physical stress on the cell wall components of *A. oryzae*. The wild-type *A. oryzae* was cultured with 100 ml of YPD liquid medium in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 0, 20, 40, 60 and 80 glass beads (Φ 6 mm). The transcription level of the AG synthase gene increased as the number of beads in the flasks. Cell wall components were fractionated and quantified, resulting in the increased levels of AG in proportion to the number of beads. In addition, the branching of the hyphal tips increased and the hyphal length tended to be shortened in the flask containing a larger number of beads. These results suggest that physical stress alters the hyphal morphology and increases in the cell wall AG. We are now investigating phosphorylation levels of MAP kinase MpkA in the fungal cells damaged by glass beads.

1) Miyazawa et al. Front. Microbiol., 2019, 10:2090; 2) Fujioka et al., Eukaryot. Cell, 2007, 6:1497-1510

α-1,3-glucan, cell wall, fungi

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：4A06-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるキチン合成酵素 ChsB のリン酸化修飾の解析

Importance of phosphorylation on chitin synthase ChsB in filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

○金 京運[1]、岩間 亮[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携)
○Jingyun Jin[1], Ryo Iwama[1,2], Hiroyuki Horiuchi[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

キチンは糸状菌細胞壁の主要構成成分の 1 つであり、糸状菌の生育において重要な役割を持つ。菌類のキチン合成酵素遺伝子の発現量とキチン合成酵素活性間に相関性が見られない場合もあることから、キチン合成酵素の転写後修飾の存在が示唆されているが、その機構については未解明の部分が多い。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸先端生長において重要な役割を果たすキチン合成酵素 ChsB のリン酸化修飾の解析を行った。ウエスタン解析において脱リン酸化酵素処理により ChsB の 2 本のバンドの内、上方のバンドが消失し、ChsB は一部リン酸化されていることが示された。*A. nidulans* におけるプロテインキナーゼ C の活性化型変異体（PkcAR429A）の高生産株においては、ChsB 上方バンドの量が増加しリン酸化の亢進がみられるとともに菌糸先端における ChsB の存在量が増加した。PkcA をコードする *pkcA* の温度感受性（*pkcA*-ts）株では、制限温度下において許容温度下と比較して菌糸先端における ChsB 存在量が低下していた。cell wall integrity（CWI）経路において PkcA の下流で働く MAP キナーゼをコードする *mpkA* を *pkcA*-ts 株において欠失させた変異株を作製し CWI 経路の関与について検討したところ、この株においても制限温度下で菌糸先端における ChsB の存在量の低下が見られた。これらのことから、*A. nidulans* において PkcA が CWI 経路非依存的に ChsB のリン酸化及び菌糸先端への局在の制御に関与することが示唆された。

Chitin is one of the major cell wall components in filamentous fungi and is important to the growth of filamentous fungi. Expression of fungal chitin synthase genes does not always correlate with the activity of its gene product, suggesting the presence of its post-transcriptional regulation. However, the mechanisms of the regulation remain largely unknown. In this study, we analyzed the phosphorylation of a chitin synthase ChsB, which plays a pivotal role in the hyphal tip growth of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. In the western blot analysis, a phosphatase treatment abolished the upper band of ChsB, indicated that ChsB was phosphorylated. Overproduction of an activated form of PkcA, a protein kinase C of *A. nidulans*, led to the hyperphosphorylation of ChsB and increased ChsB abundance in the hyphal tips. In the *pkcA* temperature sensitive (*pkcA*-ts) mutant, ChsB abundance in the hyphal tips decreased under the restrictive temperature. In the deletion mutant of the cell wall integrity (CWI) pathway MAP kinase-encoding gene *mpkA* in the *pkcA*-ts background, hyphal tip abundance of ChsB decreased under the restrictive condition. Taken together, PkcA is suggested to be involved in the regulations of the phosphorylation and localization of ChsB in the CWI pathway independent manner.

chitin synthase, *Aspergillus nidulans*, protein kinase C

発表責任者：堀内　裕之（ahhoriu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

糸状菌の生育において生体膜不飽和度が維持されることの意義

Significance of the maintenance of biological membrane unsaturation in the growth of filamentous fungi

○岩間 亮[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携)
○Ryo IWAMA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

生体膜は細胞を外界から区画化する役割を持ち、その大部分はリン脂質二重層が占めている。リン脂質の構造は親水性頭部と疎水性尾部に大別され、尾部は飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を含む多様な脂肪酸鎖から構成されている。脂肪酸鎖の種類は膜流動性に関わるなど、厳密に制御される必要がある。

Aspergillus nidulans 等の糸状菌は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などと比較してリン脂質に含まれる不飽和結合の数が多い。今回、糸状菌におけるこれらの意義を解析するため、Δ^9 デサチュラーゼをコードする *sdeA*、*sdeB*、Δ^{12} デサチュラーゼをコードする *odeA*、*odeB* をそれぞれ欠失させた株について様々な培養温度における表現型を観察した。その結果、*sdeA* 欠失株は高温（37℃, 42℃）でほとんど発芽しなかった。また、*sdeA* 欠失株を親株として高温で生育可能な変異株が取得され、その変異株ではその他の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現量が上昇していた。これらから、適切な膜不飽和度の維持が生育に重要であることが示唆された。また、その他の不飽和化酵素遺伝子欠失株も菌糸形態に異常が観察され、膜不飽和度が菌糸極性生長に影響を与えることも示唆された。

Biological membranes are the major components that compartmentalize cells from the outside environment, and most of them are composed of phospholipid bilayers. Phospholipids are composed of a polar head and a hydrophobic tail, and the tail consists of various fatty acid chains. As the composition of fatty acids is correlated with membrane fluidity, it must be strictly controlled.

Filamentous fungi, such as *Aspergillus nidulans*, contain more unsaturated bonds in their phospholipids than the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To analyze the significance of these bonds in filamentous fungi, we constructed strain with the deletion of each fatty acid desaturase gene, and observed its phenotypes at various temperatures. The results showed that the *sdeA*-deleted strains hardly germinated at high temperatures (37°C and 42°C). A mutant strain that could grow at the high temperature was obtained from the *sdeA*-deleted strain. The expression levels of other desaturase genes increased in this mutant strain. These results suggest that maintenance of an appropriate level of membrane unsaturation is important for cell growth. The deletion strains of other desaturase genes formed hyphae with abnormal morphologies, suggesting that the level of membrane unsaturation affects hyphal polar growth.

Fatty acid desaturase, *Aspergillus nidulnas*, phospholipid

発表責任者：堀内裕之（ahhoriu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

麹菌の同株どうしの対峙培養における増殖抑制に関与する因子の探索

Search for factors involved in the growth inhibition between colonies of the same strain in *Aspergillus oryzae*

○浜中 祐弥[1]、齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、黒田 裕樹[3]、丸山 潤一[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]慶應大・環境情報)
○ Yuya HAMANAKA[1], Naoya SAITO[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Hiroki KURODA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo, [3]Fac. of Environ. and Information Stds., Keio Univ.))

糸状菌では異種または異株どうしを対峙培養した際に 2 つのコロニー間で増殖が抑制される現象が生じ、拮抗作用 antagonistic effect として知られている。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株どうしを対峙培養すると 2 つのコロニー間に間隙が観察されるが、糸状菌において同じ株どうしで生じる増殖抑制に関しては報告がない。本研究では、*A. oryzae* でこの現象が生じるメカニズムを解明するため、対峙培養におけるコロニー間の増殖抑制に関与する物質および遺伝子の探索を行った。

最初に、コロニー間で産生される物質が増殖抑制に関与している可能性を考え、RIB40 株を対峙培養した寒天培地から抽出物を得て、同じ株を培養したコロニーの外側に滴下した。その結果、滴下部位においてコロニーの増殖抑制が観察され、なんらかの物質が対峙培養のコロニー間で産生され増殖抑制を引き起こすことが示唆された。また RNA-seq 解析により、RIB40 株どうしの対峙培養および単独コロニーのそれぞれの生育条件を比較した。その結果、対峙培養で約 1000 遺伝子の発現量が有意に増減していた。現在、発現量が有意に増加した遺伝子のうち転写因子などの制御因子をコードする遺伝子を破壊して対峙培養を行っており、増殖抑制に関与する遺伝子の探索について報告する。

As known in filamentous fungi, when different species or strains are dual-cultured, growth inhibition occurs between adjacent colonies, which is called “antagonistic effect”. On the other hand, when *Aspergillus oryzae* RIB40 strain is dual-cultured, the gap owing to the growth inhibition is formed between adjacent colonies. Growth inhibition between the same strain has not been reported in filamentous fungi. Therefore, in order to elucidate the mechanism of growth inhibition in *A. oryzae*, we try to find substances and genes involved in the growth inhibition during dual culture.

In this study, we obtained extracts from the agar medium where RIB40 was dual-cultured, and subsequently spotted them on the outside of RIB40 colony. As a result, growth inhibition of the colony was observed, suggesting that some substances produced between the dual-cultured colonies cause the growth inhibition. RNA-seq analysis was performed to compare between dual-cultured and single colonies. The expression levels of approximately 1000 genes were significantly increased or decreased in the dual culture. Among the genes with significantly increased expression, we are generating deletion strains of the genes for regulators such as transcription factors to search for genes involved in the growth inhibition during dual culture.

Aspergillus oryzae, antagonistic effect, RNA-seq

発表責任者：丸山潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

Mitochondria fission dysfunction alleviates heterokaryon incompatibility-triggered cell death in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○ Chan LU[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Ryota SAITO[3], Kazuhiro IWASHITA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM. UTokyo, [3]NRIB)

[Background] Filamentous fungi are capable of cell fusion to form vegetative heterokaryons while cell fusion between genetically incompatible strains triggers growth inhibition or cell death, which is termed heterokaryon incompatibility. In the industrially important filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, numerous strains are selectively used for different brewing purposes such as sake, soy sauce, and *miso*. Previously, we performed time-course fluorescence observation and directly demonstrated that cell death occurs upon incompatible cell fusion in *A. oryzae*[1)]. However, the underlying molecular mechanism of heterokaryon incompatibility remains elusive specifically on the subcellular dynamics during the incompatible response. In this study, we aim to provide cell-level evidence for physiological responses when co-culturing incompatible strains in *A. oryzae*, which facilitates the understanding of heterokaryon incompatibility mechanism.

[Results] To characterize the subcellular dynamics during the incompatible response, we visualized organelles such as nuclei, endoplasmic reticulum, and mitochondria with fluorescence proteins during the process of co-culture. The observation suggested that incompatible physiological responses involved functional disruption effects on the organelles, and notably, incompatible cell fusion immediately led to mitochondria fragmentation. To investigate a correlation between mitochondrial morphology change and incompatibility-triggered cell death, mitochondrial fission-related genes *Aofis1* and *Aodnm1* were deleted by CRISPR/Cas9 system[2)] in incompatible pairing. Through forced protoplast fusion, viable heterokaryons were found by microscopy in the incompatible pairing of *Aofis1/Aodnm1* deletions. The recovered heterokaryons were derived from incompatible pairing of the deletion strains as confirmed by auxotrophic complementation. In addition, when co-culturing incompatible strains of the gene deletions, the tubular structure of mitochondria still appeared in the fused cell. These results indicated that the incompatibility-triggered cell death was alleviated by deletions of the mitochondrial fission-related genes in *A. oryzae*.

This is the first study to demonstrate that mitochondrial fission is functionally involved in the heterokaryon incompatibility in filamentous fungi.

1) Lu *et al.*, *Annual meeting of JSBBA* (2021)
2) Katayama *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* (2019) 85, e01896-18.

Aspergillus oryzae, heterokaryon incompatibility, mitochondrial fission

発表責任者：Jun-ichi MARUYAMA（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム A

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* のファルネソール応答における ABC トランスポータ ーの機能解析
Functional analysis of ABC transporter of *Aspergillus fumigatus* in response to farnesol

○老木 紗予子[1]、浦山 俊一[1,2]、萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS）
○Sayoko OIKI[1], Syun-ichi URAYAMA[1,2], Daisuke HAGIWARA[1,2] ([1]Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba）

【背景と目的】現在広く使用される抗真菌薬は人工合成されており、これらの薬剤に対する病原菌耐性株の出現が問題となっている。精油は植物が産生する揮発性の親油性化合物であり、様々な微生物に対して抗菌作用がある。バラの主要な精油成分であるファルネソールは、ヒト病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* に抗菌活性を示し、天然由来の新たな抗真菌剤としての利用が期待される。本研究では、ファルネソールに対する *A. fumigatus* の詳細な応答分子機構を明らかにすることを目的とする。
【方法と結果】*Aspergillus oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーを用いた探索により、薬剤応答に機能する転写因子 AtrR がファルネソール応答に関与することを見出した。*A. fumigatus* においても同様に、AtrR がファルネソール処理時の生育に重要であることが明らかになった。RNA-seq 解析から、ファルネソール処理時に ABC トランスポーターAtrA と Cdr1B の遺伝子発現が AtrR 依存的に上昇することが示された。そこで両遺伝子の破壊株を作製し、ファルネソール感受性と、ファルネソール処理菌糸細胞のファルネソール蓄積量を調べた。*cdr1B* 破壊株は、野生株と比較してファルネソールに高い感受性を示し、細胞内に多くのファルネソールを蓄積していたため、Cdr1B がファルネソールへの応答に寄与することが示された。一方、*atrA* 破壊株のファルネソール感受性および細胞内ファルネソール蓄積量は野生株と同程度であった。これに対し、*A. oryzae* では、AtrA がファルネソール応答に機能し、Cdr1B オーソログの AtrG は関与しないことが分かった。したがって、糸状菌のファルネソール応答において、その関与因子が異なるものの、ABC トランスポーターが機能することが示された。

Currently, the emergence of resistant strains to synthetic antifungal drugs has become a problem. Farnesol, the major component of essential oil from rose, shows antifungal activity against pathogenic filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*, and is expected to be used as a new antifungal drug. Here, we aim to clarify the cellular response mechanism of farnesol in *A. fumigatus*. By RNA-seq analysis, we focused on ABC transporters, AtrA and Cdr1B, controlled by transcription factor, AtrR. The deletion of *cdr1B* resulted in higher sensitivity to farnesol and higher accumulation of intracellular farnesol compared with wild-type cells, indicating that Cdr1B contributes to the response to farnesol. However, farnesol sensitivity and accumulation of intracellular farnesol of *atrA*-disrupted strain were comparable with those of the wild-type strain. In contrast, *A. oryzae* revealed that AtrA is involved in the response to farnesol, but AtrG, ortholog of Cdr1B, is not. Therefore, ABC transporter was demonstrated to function in response to farnesol, while the determinants are different.

Aspergillus, Farnesol, ABC transporter

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A08-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

ウイルス不活化剤としてのプロピレングリコールの効果とメカニズムについて

The effect and mechanism of propylene glycol as a virus inactivator

○平間 結衣、大西 慎太郎、森 卓也、石田 浩彦（花王株式会社）
○Yui HIRAMA, Shintaro OONISHI, Takuya MORI, Hirohiko ISHIDA (Kao Corporation)

COVID-19 やインフルエンザなどの感染症は世界中に広がり、人々の健康に脅威を与え続けている。ウイルス感染を防ぐには、接触、飛沫、空気感染といった感染経路を制御することが重要である。本研究では化粧品素材や食品添加物、溶剤として使用実績のあるプロピレングリコール（PG）に着目した。これまでに PG は抗菌作用や一部ウイルス不活化作用が報告されており、本検討ではその作用機序解析、各感染経路における有効性をモデル実験で検証した。その結果、PG は 55%以上の濃度で著しくウイルス不活化作用が高まり、ウイルスエンベロープの脂質二重膜の流動性を高めることで不活化作用を発揮することが明らかになった。PG はエンベロープウイルスである SARS-CoV-2 に対しても不活化作用を示した。さらに、気化させた PG の効果を検証したところ、87 ppmv の空間中濃度でインフルエンザウイルスを 2.5 log 減少させた。以上の結果から、PG は人の生活空間で使用するためのウイルス不活性化剤として活用できる可能性があり、COVID-19 やインフルエンザだけでなく今後発生しパンデミックを引き起こす可能性が高い Disease-X の流行を制御することが期待される。

Infectious diseases, such as COVID-19 and influenza, have spread worldwide and continue to pose a severe threat to public health. It is important to control the transmission routes of viruses, such as direct contact and spraying of large droplets and droplet nuclei, to prevent viral infections. In this study, we focused on propylene glycol (PG), which has been used as a cosmetic material, food additive, and solvent. PG has been reported to have antibacterial and viral inactivating effects. In this study, we analyzed the mechanism of action of PG and verified its effectiveness in various infection routes through model experiments. As a result, in the liquid phase, we found that PG treatment caused a remarkable increase in viral membrane fluidity, showing antiviral activity against the influenza virus at concentrations above 55%. PG also inactivated SARS-CoV-2, the enveloped virus. In addition, we revealed that PG was effective in inactivating influenza viruses in volatilized forms and determined the effective PG concentration against influenza virus in the vapor phase was 87 ppmv. These results demonstrate that PG has potential as a viral inactivation technology for use in the human living space. This technology is expected to control the spread of not only the infectious diseases currently spreading worldwide, but also disease X, which will likely cause outbreaks and pandemics in the future.

antiviral agent, infection, propylene glycol

発表責任者：平間結衣（hirama.yui2@kao.com）

講演番号：4A08-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

塵芥収集作業における感染リスク評価とミスト型ウイルス除去剤の検討

Evaluation of Infection Risk in Dust Truck Operations and Examination of Mist-type Virus Removal Agents

○石田 浩彦[1]、平間 結衣[1]、西尾 正也[1]、藤井 健吉[1]、塚田 慎也[2]([1]花王株式会社、[2]株式会社モリタエコノス)
○Hirohiko ISHIDA[1], Yui HIRAMA[1], Masaya NISHIO[1], Kenkichi FUJII[1], Shinya TSUKADA[2] ([1]Kao Corporation, [2]Morita-econos Corporation)

＜目的＞コロナ禍の自宅療養者急増は、塵芥（ゴミ）収集作業者にとってウイルス感染リスクの高いごみの排出は、目に見えない新たな脅威となる。作業者の感染対策にむけた情報として作業におけるウイルス感染リスク評価、および感染防止対策として新たな提案に向けた検討を行う。
＜方法＞塵芥収集車作業のウイルス感染リスク評価としての仮定条件、東京都下自宅療養親子３人、ゴミ袋１袋あたりの感染性ウイルス量、１日収集量等を設定した。ミスト型ウイルス除去装置の提案に際し、抗ウイルス溶液は主成分プロピレングリコール水溶液、ウイルスはネブライザー、抗ウイルス溶液は噴霧器より噴霧するモデル系を構築し、ウイルス不活化について水ミストとの比較を行った。
＜結果＞作業の感染リスク評価の結果、高い順に「ゴミ袋破裂時の直接被曝」＞「常時ゴミ袋漏れ出し空気の被曝」＞「塵芥車内から戻ってくる空気の吸入」、「汚れた場所を触った手袋で無意識に目鼻を触る」と評価された。ミスト型抗ウイルス除去剤に関して、本試験系においてはブランクのウイルス数$10^{3.3}$に対して、水のみ$10^{2.5}$、抗ウイルス液$10^{0.3}$であり、水に対して約２log 減の効果が示された。今後現場での条件をさらに反映させ、作業現場への応用を目指す予定。
<Purpose>With the rapid increase in the number of people treated at home for Covid-19, the emission of garbage with a high risk of virus infection has become an invisible new threat for garbage collectors. In this study, we evaluated the risk of viral infection at working situations and examined new proposals for infection control measures.
<Method and Result>We set up various hypothetical conditions to evaluate the risk of virus infection at the working situations. For the proposed mist-type antiviral device, a model system was constructed using a propylene glycol solution as the main component of the antiviral solution, and a sprayer for the virus and antiviral solution, respectively. A comparison of virus inactivation against water was made. The results of the infection risk assessment of the work were, in descending order, "exposure to ruptured garbage bags" > "exposure to air leaking out of garbage bags every time" > "inhalation of returning air", and "unconsciously touching the eyes and nose with gloves that have touched the exposed mask". As for the mist-type antiviral agent, the number of viruses in the blank was $10^{3.3}$, while the number of viruses in the water only was $10^{2.5}$ and the antiviral solution was $10^{0.3}$, indicating a 2-log reduction in the effect of the water.

garbage truck, risk assessment, propylene glycol

発表責任者：石田浩彦（ishida.hirohiko@kao.com）

講演番号：4A08-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

細菌のペプチドグリカンが光触媒殺菌効果に及ぼす影響の解析

Analysis of the effect of bacterial peptidoglycan on the photocatalytic bactericidal effect

○本村 陽香[1]、高尾 綾乃[1]、藤島 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応生、[2]東理大・総研)
○Haruka Motomura[1], Ayano Takao[1], Akira Fujishima[2], Tomonori Suzuki[1,2] ([1]Depertment of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

TiO_2光触媒殺菌のメカニズム解明を目的とした当研究室の先行研究では、芽胞を形成せず、ペプチドグリカン層の厚い *Lactiplantibacillus plantarum* JCM 1149^T を用いて、ペプチドグリカン層が殺菌効果を高めることが示唆された。そこで本研究では、光触媒殺菌効果を高めているのが、細胞構造体としてのペプチドグリカン層であるのか、成分としてのペプチドグリカンであるのかを調べるために、元来細胞壁を持たない *Mesoplasma florum* NBRC 100688^T にペプチドグリカン標品を添加して、光触媒殺菌への影響を調べた。

本研究で決定した最適条件で作成したプロトプラスト細胞とインタクト細胞における光触媒反応後の生存率を求めたところ、先行研究の再現性が確認された。さらに、*M. florum* の細胞懸濁液に異なる濃度のペプチドグリカン懸濁液を添加して光触媒反応を行った結果、ペプチドグリカン標品の添加により生存率の低下が確認されたが、ペプチドグリカン標品の添加量の違いによる生存率の差は見られなかった。以上の結果から、ペプチドグリカンは光触媒殺菌効果を高めるが、その効果に量依存性は確認されなかった。

In our previous study to elucidate the mechanism of the photocatalytic bactericidal effect using *Lactiplantibacillus plantarum*, which does not form spores and has a thick peptidoglycan layer, it was suggested that the peptidoglycan layer enhances the bactericidal effect. To investigate whether the cause of enhancing the photocatalytic bactericidal effect was the peptidoglycan layer as a cell structure or the peptidoglycan as a component, we added peptidoglycan preparations to *Mesoplasma florum* which originally has no cell wall and compared the survival rates.

Survival rates after a photocatalytic reaction between protoplast cells prepared under the optimal conditions determined in this study and intact cells were counted and were confirmed the reproducibility of the previous study. Furthermore, the photocatalytic reaction of *M. florum* cell suspensions with different concentrations of peptidoglycan showed that the survival rate of the cells with the peptidoglycan preparations was lower, but there was no difference in the survival rate of the cells with different amounts of the peptidoglycan preparations. These results indicate that the peptidoglycan preparation enhances the photocatalytic bactericidal effect, but the amount dependence of the effect was not found.

photocatalysis, killing mechanism, peptidoglycan

講演番号：4A08-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

グラム陰性細菌の細胞壁が光触媒殺菌効果に与える影響の解析

Analyses of the effect of Gram-negative bacterial cell wall on the photocatalytic bactericidal effect

○菅佐原 ことね[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2]([1]東理大・応生、[2]東理大・総研)
○Kotone SUGASAWARA[1], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

TiO_2 の光触媒殺菌効果は、活性酸素種の強い酸化力によるとされているが、その殺菌メカニズムの詳細は明らかになっていない。当研究室の先行研究により、グラム陽性細菌のペプチドグリカン層が光触媒による殺菌効果を高めている可能性が示唆された。そこで本研究では、グラム陰性細菌である *Escherichia coli* IAM12119^T(未処理細胞)と、未処理細胞からペプチドグリカン層を取り除いたスフェロプラスト細胞を用いて、ペプチドグリカン層が光触媒反応に与える影響を調べた。さらに、ペプチドグリカンに対して光触媒反応した際に発生する過酸化水素の定量も行った。

光触媒反応後の未処理細胞とスフェロプラスト細胞の生存率を比較した結果、未処理細胞の生存率が有意に低い結果となり、グラム陰性細菌においてもペプチドグリカン層が光触媒反応による殺菌効果を高めている可能性が示唆された。また、上記の要因を調べるために、ペプチドグリカンを光触媒反応処理することで発生する過酸化水素を定量したところ、有意な増加が見られた。このことから、ペプチドグリカンの存在による過酸化水素発生量の増加が、光触媒による殺菌効果を高めることに繋がっている可能性が考えられた。

The details of the photocatalytic bactericidal mechanism have not yet been clarified. A previous study in our laboratory suggested that the peptidoglycan layer of Gram-positive bacteria enhances the bactericidal effect of the photocatalytic reaction. In this study, we investigated the effect of the peptidoglycan layer on the photocatalytic reaction using *Escherichia coli* IAM12119^T (intact cells), which is a gram-negative bacterium, and spheroplast cells from which the peptidoglycan layer was removed from intact cells. Furthermore, the amount of hydrogen peroxide generated during the photocatalytic reaction with peptidoglycan was also quantified.

After the photocatalytic reaction, the survival rates of intact cells were significantly lower than those of the spheroplast cells. This result was suggested that the peptidoglycan layer enhances the bactericidal effect by the photocatalytic reaction even in Gram-negative bacteria.

In addition, hydrogen peroxide generated by photocatalytic reaction with peptidoglycan was quantified, and a significant increase was observed. From this, it was considered that the increase in hydrogen peroxide due to the presence of peptidoglycan in the photocatalytic reaction may lead to the enhancement of the bactericidal effect of the photocatalytic reaction.

spheroplast, photocatalytic, peptidoglycan

講演番号：4A08-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

菌体外にスペルミジンを排出する芽胞形成乳酸菌 *Bacillus coagulans* YF1 株の発見

Discovery of a spore-forming lactic acid bacterium *Bacillus coagulans* that synthesizes and excretes spermidine into the extracellular space under anaerobic conditions

○鈴木 秀之、藤原 有希、THONGBHUBATE Kullathida、前田 将宏（京工繊大）
○ Hideyuki SUZUKI, Yuki FUJIWARA, Kullathida THONGBHUBATE, Masahiro MAEDA (Kyoto Inst. Technol.)

スペルミジンの健康寿命伸長効果が広く知られるようになってきた。ヒトはスペルミジンを初めとするポリアミンを生合成できるが、その生合成能は加齢と共に低下し、それが生活習慣病に繋がる要因の一つとされている。幸い、食品に含まれるポリアミンや腸内細菌が生合成するポリアミンを取り込むことで不足分を補うことができる。大腸菌や枯草菌のようにスペルミジンを生合成できるバクテリアは知られているが、菌体内で *de novo* に生合成されたスペルミジンが菌体外で観察されたという報告はない。そうだとすると、溶菌しない限り、バクテリアが生合成したスペルミジンをヒトは利用できない。私達は、京野菜や京漬物に含まれるポリアミン量を調べる中で、本学の所在地である京都松ヶ崎に伝わる「菜の花漬」のスペルミジン含量が非常に高いことを見出した。乳酸発酵を伴う漬物であることから、乳酸菌がスペルミジンを生合成していると考え、乳酸菌を単離した。単離した乳酸菌の一つは、16S rDNA 配列とグラム陽性桿菌、芽胞形成、カタラーゼ陽性、乳酸と酢酸を生成したことから、*Bacillus coagulans* であると同定し、YF1 株とした。YF1 株をポリアミン、セリン、ロイシン、アルギニン、アラニン、アデニン、ウラシルを含まない合成培地で、嫌気条件下、45℃で生育させたところ、培地中にスペルミジンを蓄積した。YF1 株は、アルギニンからアグマチン、プトレッシン、カルボキシスペルミジンを経てスペルミジンを合成すると考えられた。*B. coagulans* は、胃酸に耐えて生きたまま腸に届く芽胞を形成する唯一の乳酸菌であり、プロバイオティクスとしてすでに実用化されているが、YF1 株は菌体外にスペルミジンを排出するというさらに優れた性質を持つ。

The effect of spermidine on extending healthy longevity has been attracting attention. Along with aging, human’s ability to synthesize polyamines including spermidine declines, so it is important to make up for the deficiency by uptaking polyamines from foods or those synthesized by intestinal bacteria. Many bacteria are reported to synthesize spermidine, but no strains have been reported to excrete spermidine out of the cells. *Bacillus coagulans* strain YF1 found from “nanohanaduke” is the first bacterial strain shown to excrete spermidine from the cells. It synthesizes spermidine from arginine *via* agmatine, putrescine, and carboxyspermidine. *B. coagulans* is the only lactic acid bacterium that can form stomach acid-resistant spores and its positive effects on health have been reported so that it is recognized as an excellent probiotic. The new characteristics of this strain enhance the usefulness of this bacterium.

polyamine, probiotic, organic acid

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：4A08-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

ヤケイロタケ Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産

Production of lignin-degrading enzymes by *Bjerkandera adusuta* Iwa5b

○町田 龍晟、堀沢 栄 (高知工科大)
○Ryusei Machida, Sakae Horisawa (kochi university of technology)

担子菌類のうち、リグニン分解能を持つ白色腐朽菌の生産するリグニナーゼ類は、バイオマスの生物処理などの分野における利用が期待されている。われ割れはリグニン分解酵素高生産菌株としてヤケイロタケ（*Bjerkandera adusta*）Iwa5b 株をリグニン分解酵素のマンガンペルオキシダーゼ（MnP）を約 2 倍生産する。しかし、この株の MnP の生産に関して安定性がなく、突然生産が低下することがある。
本研究では、Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産を評価したうえで、ゲノム情報などから同株のリグニン分解酵素生産機構を解明しようと考えた。ヤケイロタケは Iwa5b 株を含め当研究室で保存されている 6 株を使用した。対象としたリグニン分解酵素は MnP とラッカーゼ(Lac)であり、それぞれ Guaiacol、*o*-phenylendiamine を基質とし、分光光度計を用いて反応生産物を測定した。Vladimir らの液体培地を用いて回転培養しながら、酵素生産を経時的に測定し、培養時間と酵素生産の関係を調べた。供試菌株のうち、Iwa5b 株を含むリグニン分解酵素生産株と、低生産株の全ゲノム配列を行った。現在ゲノム配列のアッセンブルおよびアノテーション作業を進めている。

In our laboratory, we have isolated *Bjerlandera adusta* Iwa5b from the environment, which produces about twice as much of the manganese peroxidase (MnP), a kind of ligninolytic enzyme, as the other strains in our laboratory. However, the strain doesn't produce MnP stably, or sometimes may stop it suddenly.
In this study, we evaluated the production of ligninolytic enzymes of the strain Iwa5b to elucidate the mechanism of ligninolytic enzyme production in this strain based on genomic information. Six strains of *B. adusta* including the strain Iwa5b were employed in this study. MnP and laccase (Lac) activities were evaluated using Guaiacol and *o*-phenylendiamine as substrates, respectively. The relationship between incubation time and enzyme production was investigated. The whole genome sequences of the ligninolytic enzyme-producing strains, including strain Iwa5b, and the low-producing strains were analyzed. The assembly and annotation of the genome sequences are currently going on.

manganese peroxidase, laccase, Bjerkandera adusuta

講演番号：4A08-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

バニリンによる大腸菌の有機溶媒耐性化とバニリン耐性への薬剤排出ポンプの関与

Improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by vanillin and involvement of multi-drug efflux pump in vanillin tolerance.

○池畑 優希、道久 則之（東洋大学）
○Yuuki IKEHATA, Noriyuki DOUKYU (Toyo Univ.)

バニラの主成分であるバニリンは一般的に有機合成により生産されている。また、木材系バイオマスからバイオ燃料を産生する過程で副産物として産生されることが報告されている。微生物へのバニリン添加の影響を調べることは、木材系バイオマス由来廃棄物の有効活用やバイオ燃料生産への影響を調べるうえで、重要である。本研究では、バニリンによる大腸菌の有機溶媒耐性化と、AcrAB-TolC 排出ポンプのバニリン耐性への関与について調べた。AcrAB-TolC 排出ポンプは有機溶媒耐性に関与することが知られている。実験の結果、バニリン添加により、大腸菌の有機溶媒耐性が向上することを見出した。また、AcrAB-TolC 排出ポンプの発現も増加した。AcrAB-TolC 排出ポンプは、MarA、Rob、SoxS などの転写活性化因子によって発現が制御されることが知られている。これら 3 つの転写活性化因子のうち、バニリン添加により *marA* の転写が増加することが示された。また、AcrAB-TolC 排出ポンプがバニリン耐性にも関与することを見出した。*acrB* 欠失株は親株に比べてバニリンに感受性であった。*acrB* 欠失株に *acrB* 遺伝子を導入した相補実験では、バニリン耐性が回復した。

Vanillin, the main component of vanilla, is generally produced by organic synthesis. In addition, it has been reported to be produced as a byproduct in the process of biofuel production from wood-based biomass. Investigating the effects of vanillin addition on microorganisms is important for studying the effective use of wood-based biomass waste and its impact on biofuel production. In this study, we investigated the improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by vanillin and involvement of AcrAB-TolC efflux pump in vanillin tolerance. AcrAB-TolC efflux pump is known to be implicated in organic solvent tolerance in *E. coli*. As the result, we found that vanillin improved the hydrophobic organic solvent tolerance of *E. coli*. In addition, the expression level of the AcrAB-TolC efflux pump was enhanced by the addition of vanillin. AcrAB-TolC efflux pump expression is known to be regulated by transcriptional activators such as MarA, SoxS, and Rob. Among these three transcription factors, *marA* transcription was significantly increased by the addition of vanillin. We found that the AcrAB-TolC efflux pump is involved also in vanillin tolerance. The Δ*acrB* mutant was more sensitive to vanillin than the parent strain. A complementation test revealed that the introduction of the *acrB* gene recovered the vanillin tolerance of the Δ*acrB* mutant.

Organic solvent tolerance, AcrAB-TolC, Vanillin

発表責任者：池畑優希（s39102100039@toyo.jp）

講演番号：4A08-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における insulysin ホモログの局在解析

Localization analysis of insulysin homologs in *Aspergillus oryzae*.

○小川 翠、溝上 哲哉、鈴木 遥香、佐々木 信光、田中 瑞己、山形 洋平（農工大院農応生化）
○Midori OGAWA, Tetsuya MIZOKAMI, Haruka SUZUKI, Nobumitsu SASAKI, Mizuki TANAKA, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

Insulysin は真核生物で広く見られる metalloendopeptidase の 1 つであり，黄麹菌 *Aspergillus oryzae* には 3 つの insulysin 遺伝子が存在する（以下 *insA*，*insB*，*insC*）。*A. oryzae* はヒトや酵母よりも多くの insulysin 遺伝子を有しており， *A. oryzae* に特異的な機能を有する可能性が考えられた。*Saccharomyces cerevisiae* の insulysin ホモログ Cym1, Ste23 はミトコンドリアに局在し，ミトコンドリアシグナルペプチドを分解する機能が明らかとなっており，*Schizosaccharomyces pombe* の insulysin ホモログ Iph1 は ER ストレス応答に関与することが明らかとなっている。*A. oryzae* においても酵母ホモログと類似した機能を有する可能性を考え，破壊株を用いた機能解析を行った結果，*insA* の欠損株は作製できず，重要な機能を有する必須遺伝子である可能性が考えられた。*insC* 欠損株では tunicamycin 感受性が低下したことから，InsC が Iph1 と同様に ER ストレス応答に関与する可能性が考えられた。一方，*insB* 欠損株では特徴的な表現型の変化が観察できなかった。また、*A. oryzae* における insulysin ホモログには明確なシグナル配列が存在しておらず局在が明らかとなっていない。本研究では InsA，InsB，InsC の機能を解析するにあたり，InsA，InsB，InsC と HA tag，DsRed の融合タンパク質発現株を作製し，蛍光観察や細胞分画とウエスタンブロット解析を用いた生化学的解析による局在解析を行った。その結果，InsA が酵母 insulysin である Cym1p と同様に，ミトコンドリアに局在する可能性が示唆された。一方，InsB，InsC に関しては，ミトコンドリア以外のオルガネラに局在する可能性が示唆された。そこで，InsB，InsC のより詳細な局在決定のために，細胞分画条件の検討を行い，ミトコンドリア，リソソーム，ペルオキシソームの分離を可能とした。ショ糖密度勾配を用いた細胞分画とマーカー酵素の活性測定による 各 insulysin ホモログの局在について報告する。

Insulysin is one of the metalloendopeptidases widely found in eukaryotes, and *Aspergillus oryzae* has three insulysin genes (*insA, insB, insC*). *A. oryzae* has more insulysin genes than humans and yeasts, and it is possible that *A. oryzae* has a specific function. In addition, the insulysin homolog in *A. oryzae* does not have a clear signal sequence and its localization is not clear. In analyzing the functions of InsA, InsB, and InsC, we prepared a fusion protein expression strain of InsA, InsB, InsC and HA tag, DsRed. Localization analysis was performed by biochemically using fluorescence observation, cell fractionation, and western blot analysis. The results suggest that InsA would be localized to mitochondria, similar to her Cym1p, a yeast insulysin. On the other hand, it was suggested that InsB and InsC would be localized in organelles other than mitochondria. Therefore, in order to determine the localization of InsB and InsC in more detail, we investigated cell fractionation conditions and made it possible to separate mitochondria, lysosomes, and peroxisomes. We would like to report the localization of insulysins in *A. oryzae*.

insulysin, *Aspergillus oryzae*, localization

発表責任者：山形洋平（y-yama@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4A08-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

新規有機肥料の開発

Development of a new organic fertilizer

○藤枝 由夏、タン コック ティン、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Yuka FUJIEDA, Quoc Thinh TRAN, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】有機肥料を用いた農法では、有機物を土中の微生物が無機物に分解し、それを養分に作物が生育することができる。我々は、牛糞堆肥や鶏糞堆肥などの発酵有機資材、骨粉や油カスなどの未発酵有機資材を適切に組み合わせ、土壌微生物を活性化させる有機肥料の作製を試みている。先行研究では発酵有機資材を多く含んだ有機肥料が微生物の働きを活性化させたことが示唆された。しかし、土壌によっては未発酵有機資材を中心に施肥する必要のあるものがあり、その肥料によって、いずれの土壌であっても微生物を活性化させるかどうかは分かっていない。本研究では、その肥料によっていずれの土壌であっても微生物が増加、活性化するかを調べることを目的として行なった。
【方法・結果】真砂土、立命館大学の荒地から採った土壌をポットに入れ、各土壌に未発酵有機資材（米糠・大豆カス・菜種油カス・骨粉）を中心に、牛糞堆肥・鶏糞堆肥を含む 6 種類の有機資材を投与した。1 週間ごとに、土壌細菌の数、リン循環活性評価値（フィチン酸の分解率)、窒素循環活性評価値（アンモニア態窒素分解率および亜硝酸態窒素分解率）の 3 項目を測定した。その結果、いずれの土壌においても、3 項目値が上昇した。ゆえに、未発酵有機資材を中心にこれら 6 種類の資材を加えたとしても、土壌中の微生物は増加し、物質循環することが示唆された。

In organic agricultural system, soil bacteria decompose organic matters into inorganic matters, and crops grow using them as nutrients. We are trying to develop organic fertilizers that activate soil bacteria by appropriately combining fermented organic materials and unfermented organic materials. Previous studies showed that organic fertilizers containing a large amount of fermented organic materials activated soil bacteria. In this study, soil fertilities were investigated with newly developed organic fertilizer using unfertile soils.

Mountain soil and soil from the wasteland were placed in pots, and 6 kinds of organic materials were administered. Every week, bacterial biomass, phosphorus circulation activity, and nitrogen circulation activity were measured. As a result, these values were increased using newly developed organic fertilizers.

organic materials, bacteria

講演番号：4A08-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

天然の有機触媒が示す抗菌活性のメカニズム

The mechanism of antibacterial activity exhibited by a natural organocatalyst

○西山 辰也、上田 賢志（日大生資科）
○Tatsuya NISHIYAMA, Kenji UEDA (College of Bioresource Sciences, Nihon University)

これまでに我々は、放線菌の生産するベンゾイソクロマンキノン系抗生物質 Actinorhodin (ACT) と Granaticin (GRA) が触媒活性を有する有機触媒であると報告してきた。これらは過酸化水素を産物とする酸化反応を触媒する。また、キノン化合物はキノンレドックスサイクル（キノンが酵素による作用を受けて酸化還元を繰り返す機構）の際にスーパーオキシドを発生し細胞毒性を示すことが報告されている。そこで、今回我々は GRA の示す抗菌活性と酸化触媒能の関連性を検証した。
カタラーゼ遺伝子に欠損変異をもつ *B. subtilis*、*E. coli* とその親株について GRA を添加、または無添加の条件で培養して生育を観察した。その結果、カタラーゼ遺伝子欠損株の方が GRA の添加による生育遅延が顕著であった。また、SOS 応答を担う *recA* を欠損した大腸菌と野生型でも同様の比較を行ったところ、*recA* 欠損株ではより生育が悪くなった。これは過酸化水素による DNA 損傷が増殖阻害の原因であることを推測させた。GRA や ACT は呼吸鎖のユビキノンを代表とするキノンとは異なり、自身の酸化還元に酵素を必要とせず、自発的にレドックスサイクルを行い、産物として過酸化水素を多量に生産する。これまでの GRA の細胞毒性に関する研究では、その標的がリボソーム RNA である可能性が挙げられているものの決定的ではない。今回の結果は、触媒反応で生成する過酸化水素が抗生物質活性の本体である可能性を強く示唆しており、抗生物質の新しい作用メカニズムを提唱することにつながると考えられる。

Previously, we reported that the *Streptomyces*-derived benzoisochromanquinone antibiotics Actinorhodin (ACT) and Granaticin (GRA) serve as an organocatalyst facilitating oxidation of some compounds. Here, we studied whether hydrogen peroxide generated along with the catalytic reaction correlates with the antibacterial activity of GRA. Catalase-deficient mutants of *B. subtilis* and *E. coli* were more sensitive to GRA than the parental type. Similar feature was observed with an *E. coli* mutant for *recA*, the master regulator of SOS response. Overall, the evidence supports the view that the toxicity of hydrogen peroxide causing damage to DNA and other cellular components is fundamental to the antibiotic activity of GRA. This will make us propose a new action mechanism of antibiotics.

granaticin, streptomyces, organocatalyst

講演番号：4A08-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム A

日光文化財に発生する真菌の防除に向けた光触媒殺菌試験

Photocatalytic fungicide test for controlling fungi that occur in Nikko Toshogu Shrine

○須崎 裕人[1]、小笠原 麻衣[1]、三浦 菜摘[1]、鈴木 孝宗[2]、寺島 千晶[2]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応生、[2]東理大・総研)
○ Yuto SUZAKI[1], Mai OGASAWARA[1], Natsumi MIURA[1], Norihiro SUZUKI[2], Chiaki TERASHIMA[2], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science., [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science.)

日光東照宮は、漆塗装、彩色、彫刻、金具などの多彩な技術が駆使されている。しかし、社殿を修繕して以来、彩色表面上に真菌が発生して黒く変色することが問題となっている。そこで、この問題を解決するために、比較的安価で安全性の高い光触媒を彩色部分の真菌防除に適用する検討を行うことにした。実用化に向けた抗真菌試験として、日光文化財で使用されている方法で彩色した木片に対して光触媒をコーティングした。そして、木片表面に日光分離株を接種した後、UVA 照射下で真菌の生育を確認した。加えて、多様な真菌に対する光触媒殺菌効果を評価するために、TiO_2 を用いた照射実験を JIS 規格に基づいて構築し、コロニー計数法による生存率評価を行った。供試菌株は日光分離株の中から胞子に色素を含んでいるものを選出し、色素の違いで殺菌効果が異なるかを評価した。
その結果、TiO_2彩色木片に UVA を照射することで、真菌は生育能力を失うことが示された。加えて、真菌胞子の色の違いによって光触媒殺菌性能に差が生じることが示唆された。

Nikko Toshogu Shrine uses various techniques such as lacquer painting, coloring, and sculpture. However, after repairing the shrine, the problem is that fungi grow on the colored surface and turn black. Therefore, we aimed to contribute to the protection of cultural properties by photocatalytic fungicidal tests for controlling the fungi. As a fungicidal test for practical use, a photocatalyst was coated on the colored wood pieces used in Nikko Toshogu Shrine. After inoculating the surface of the wood piece with the fungus, the growth of the fungus was confirmed under UVA irradiation. In addition, in order to evaluate the photocatalytic fungicidal effect on diverse fungi, an irradiation experiment using TiO_2 was constructed based on the JIS standard, and the survival rate was evaluated by the colony counting method. As the test strains, those containing a pigment in the spores were selected, and it was evaluated whether the fungicidal effect was different depending on the pigment.
The effectiveness of photocatalytic fungicidal was shown to have a fungicidal effect on the colored wood piece coated with TiO_2. Furthermore, it was suggested that the difference in the color of fungal spores causes different photocatalytic fungicidal effects.

photocatalysis, fungicidal effect, Reactive oxygen species

講演番号：4B02-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

ウェルシュ菌のキシロース及びセルビオース資化性株の構築

Construction of xylose and cellobiose-utilizing strain of *Clostridium perfringens*

○宮城 侑弥、川畑 博暉、森山 龍一、宮田 茂（中部大院応用生物）
○YUYA MIYAGI, Hiroki Kawahata, Ryuichi Moriyama, Shigeru Miyata (Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】ウェルシュ菌は、旺盛な有機物分解能を有し、特に糖の代謝に伴い大量の水素を生産するが、ヘミセルロース／セルロース資化性は有していない。本研究では、セルロースやヘミセルロースからウェルシュ菌を用いた One-step biomass conversion による水素の直接生産を目指して、ウェルシュ菌にキシロース及びセロビオース利用能を付与することを試みた。

【方法・結果】キシロース代謝能を付与するために、*C. beijerinckii* のキシロース利用オペロンをコードしていると考えられる遺伝子（*xylFGHAB*）をウェルシュ菌 13 株の θ 毒素をコードする *pfoA* と置換した。得られた組換え菌をキシロース含有培地で増殖させた結果、野生株と比較して増殖及びガス産生量が共に大きく向上した。また、セロビオース代謝能を付与するために、*C. acetobutylicum* から PEP-PTS の Enzyme II 及び菌体内 β-glucosidase をコードしていると考えられるオペロン Cel-EII-bgl（*licA-licB-bgl-licC*）を発現プラスミド pCC13 にクローニングした。当研究室で開発したウェルシュ菌 mT7VI 株を形質転換し、セロビオース含有培地で増殖試験を行った結果、0.1 % キシロース添加により Cel-EII-bgl の発現を誘導した場合、非誘導時と比較して増殖が有意に改善した。次に、ウェルシュ菌 13 株の L-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする *ldh* と Cel-EII-bgl をゲノム編集により置換した株を構築した。同様に、機能未知の 180 kDa 分泌タンパク質をコードする CPE1281 遺伝子座と置換した株も構築した。これらの置換株の増殖試験をセロビオース含有培地で行った結果、野生株のウェルシュ菌 13 株と比較して、若干の増殖改善効果が認められた。

C. perfringens is one of the fastest growing bacteria. However, the organism lacks the ability to utilize xylose and cellobiose. In this study, we have constructed genetically modified *C. perfringens* and examined its ability to produce H_2 from xylose and cellobiose.

In order to allow utilization of xylose, we constructed a mutant strain by replacement of *pfoA* with Xyl operon from *C. beijerinckii*. Furthermore, we constructed another mutant strain by replacement of *ldh* or CPE1281 locus with genes encoding Enzyme II and intracellular *β*-glucosidase of cellobiose-specific PEP-PTS from *C. acetobutylicum* to allow utilization of cellobiose. Their growth rates and H_2-productivities were improved dramatically and moderately, respectively, compared with wild-type strain.

Clostridium perfringens, Xylose, Cellobiose

発表責任者：宮城　侑弥（gr20027-0235@sti.chubu.ac.jp）

講演番号：4B02-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

Clostridium perfringens のグリセロール・デヒドラターゼ遺伝子の欠失が生育と水素生産に及ぼす影響

Effects of deletion of glycerol dehydratase gene on growth and H_2-produtivity in *Clostridium perfringens*

○佐藤 悠一朗、加藤 実希、矢野 智奈美、宮田 茂 (中部大院応生)
○Yuichiro SATO, Miki KATO, Chinami YANO, Sigeru MIYATA (Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】ウェルシュ菌は嫌気要求度の低い偏性嫌気性菌で、現在知られている細菌のなかで最も速い増殖速度を示す細菌の一種である。旺盛な有機物分解能を有し、生育に伴い大量の水素を産生するが、グリセロール含有培地で培養した結果、グルコース含有培地で培養した場合と比較して、到達菌体量及び水素産生量が大幅に低下した。そこで、本研究では、ウェルシュ菌のグリセロール代謝経路をその保有遺伝子から推測し、ゲノム編集により代謝経路を変更することにより、生育の改善及び水素産生量の増大を試みた。加えて、有用遺伝子を染色体に導入するためのゲノム編集ベクターの構築を試みた。
【方法・結果】ウェルシュ菌 13 株をグリセロール含有培地で培養した結果、培地中に 1,3-propanediol の蓄積が認められた。この結果及び保有遺伝子から、本菌のグリセロール代謝経路は、グリセロールを解糖系に流入させる経路と 1,3-propanediol 産生経路が主で、redox balance の維持のためにそれらの経路がカップリングしていると推測された。グリセロールから 1,3-propanediol に代謝される初発反応酵素である glycerol dehydratase 遺伝子（*pduCDE*）を欠失させた結果、到達菌体量と水素産生量がグルコース含有培地で培養した場合と同程度まで改善した。*pduCDE* の欠失により、グリセロールの解糖系への流入が増大し、redox balance 維持のため水素生産量が増大したためと考えられた。

C. perfringens is an anaerobic but relatively aerotolerant bacterium, and one of the fastest growing bacteria. Although the organism can degrade various organic matters and produce H_2 to obtain the energy needed for their metabolism, the growth rate in medium contains glycerol is lower than that contains glucose. In order to overcome the disadvantage to use of glycerol for H_2-prodction, we constructed a mutant strain by genome-editing in this study.
When *C. perfringens* was cultured in a glycerol-containing medium, 1,3-propanediol was accumulated in the medium. This result suggested that glycerol is mainly metabolized by flow into glycolysis and production of 1,3-propanediol. And it is also speculated that these pathways are coupled to maintain the redox balance. Therefore, we constructed a strain defected glycerol dehydratase, which catalyzes the initial reaction of glycerol to 1,3-propanediol. As a result, the cell density and amount of H_2 production of the strain were improved to the same level as when cultured in a glucose-containing medium.

Clostridium perfringens , hydrogen, glycerol

発表責任者：佐藤悠一朗（gr21017-8330@sti.chubu.ac.jp）

講演番号：4B02-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

Development of Gene Expression/Disruption Vectors for *Halomonas* sp. KM-1
○Ayaka TSUJI[1], Yasuko TAKEI[2], Minori MAEDA[2], Yuka TSUJII[2], Mei HIRATA[2], Yoshinao AZUMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of B.O.S.T, Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

Halomonas species, which are halophilic, alkaliphilic, and aerobic bacteria, are often isolated from salty environment such as salterns and hypersaline lakes. They are promising for industrial chemical production due to their magnificent abilities, for example, high proliferative ability, chemical productivities such as polyhydroxybutyrate (PHB) and ectoine, and less risks of contamination during fermentation. Although it is necessary to optimize the culture conditions and modify the metabolism of *Halomonas* in order to bring out better fermentability, genetic tools for gene expression and disruption in *Halomonas* hasn't been yet enough developed. In this study, we attempted to develop the genetic tools for *Halomonas* to modify its metabolism freely. Two independent shuttle vectors, pUCpHAw and pHA1AT_32, were developed using plasmids in *Halomonas* A020 isolated from an umeboshi effluent, and they could transform *Halomonas* sp. KM-1 (KM-1). Based on proteome analysis of KM-1, a protein, which was highly and constitutively accumulated, was identified as a hemolysin coregulated protein (HCP) using N-terminal amino acid sequencing. Under the *hcp* promoter in the pUCpHAw, five genes, such as phaA and EGFP genes, were successfully expressed. It implicates that *Halomonas* is a suitable platform for protein production as well. Attempting to establish a gene disruption system, *Streptococcus pyogenes cas9* gene and guide RNA for *pyrF* gene, a yeast *ura3* homologue, were expressed in the pUCpHAw and the pHA1AT_32, respectively. As results, gene disruption mutants were isolated based on phenotypes, 5-fuoroorotic acid (5-FOA) resistance and uracil auxotrophy. These vectors might be useful for engineering genomes of other *Halomonas* species as well as KM-1.

genetic tool, shuttle vector, CRISPR-Cas9

講演番号：4B02-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

酵母のアルコール発酵を制御するシグナル伝達・代謝経路

Signal transduction and metabolic pathways for the control of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

○渡辺 大輔、川島 幹也、吉岡 直哉、杉本 幸子、高木 博史（奈良先端大）
○Daisuke WATANABE, Mikiya KAWASHIMA, Naoya YOSHIOKA, Yukiko SUGIMOTO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、栄養環境に応答して必要なエネルギーを獲得するために、アルコール発酵を厳密に制御している。栄養シグナルに応答した TORC1-Rim15p-PP2A^{Cdc55p} 経路（発酵力のアクセル）[1]と、ストレス応答性転写因子 Msn2/4p（発酵力のブレーキ）[2]を鍵因子として同定してきた。本研究では、両者の関係から発酵力調節メカニズムの全体像を解明することを目的とした。

先行研究 [3]において、浸透圧ストレス応答では PP2A^{Cdc55p} が Msn2/4p を活性化することが報告されており、Msn2/4p 標的遺伝子の発現解析の結果、熱ショック応答においても同様であることを見出した。一方、アルコール発酵中の酵母細胞では、PP2A^{Cdc55p} の機能欠損が Msn2p の核内移行を促進し、転写活性を顕著に上昇させた。このことから、浸透圧や温度上昇のような急性ストレスとは異なるメカニズムによって Msn2/4p の活性が調節されていることが示唆された。アルコール発酵時に選択的に発現が誘導され、発酵力のブレーキとして機能する新規因子を探索した結果、細胞壁センサー遺伝子のホモログである *WSC3* および *WSC4* を同定した。Wsc3/4p は細胞壁の主要構成成分である 1,3-β-グルカンの合成を促進し、アルコール発酵に用いられるグルコースのフラックスを低下させると推察された。以上の結果を考え合わせると、アルコール発酵時における TORC1-Rim15p-PP2A^{Cdc55p} 経路の抑制が Msn2/4p の活性化につながり、1,3-β-グルカン合成の促進を介して発酵力を低下させると考えられる。本研究は、*S. cerevisiae* によるアルコール発酵力の調節メカニズムをシグナル伝達と代謝の両面から解明したものであり、「発酵デザイン技術」の確立の基盤となることが期待される。

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* strictly regulates alcoholic fermentation to gain energy in response to nutrient environments. Previous studies identified the positive regulator TORC1-Rim15p-PP2A^{Cdc55p} pathway[1] and the negative regulator Msn2/4p transcription factors[2]. Here, we found evidence to link them: loss of PP2A^{Cdc55p} functions led to nuclear import and activation of Msn2/4p during fermentation. Cell-wall sensor homologs, Wsc3/4p, were newly identified as fermentation inhibitors, which may act downstream of Msn2/4p to promote 1,3-β-glucan synthesis. This study first elucidated the mechanism for alcoholic fermentation control from the viewpoint of signal transduction and metabolism, establishing the basis for “fermentation design technology”.

[1] Watanabe *et al.*, *AEM*, 2019; [2] Watanabe *et al.*, *AEM*, 2016; [3] Reiter *et al.*, *MCB*, 2013.

yeast, alcoholic fermentation, fermentation design technology

発表責任者：渡辺 大輔（watanabe.daisuke@bs.naist.jp）

講演番号：4B02-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合性特異的遺伝子の発現制御機構
Expression control mechanism of mating type specific gene of miso and soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp.

○堀 遼太郎[1]、福田 萌々花[1]、黒木 克明[1]、福地 佐斗志[2]、尾形 智夫[1]([1]前橋工大・生物工、[2]前橋工大・生命情報)
○ Ryotarou HORI[1], Momoka Fukuda[1], Katsuaki Kuroki[1], Satoshi Fukuchi[2], Tomoo Ogata[1] ([1]Maebashi Institute of Technology, [2]Maebashi Insitute of Technology)

【目的】*Zygosaccharomyces* sp.酵母は、味噌醤油製造に使用される酵母である。高品質な味噌醤油製造に寄与するため、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合育種を試みている。本研究では、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性特異的遺伝子群の発現制御機構について調べた。接合性を恒常的に発現している出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と異なり、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性は、窒素飢餓条件下で発現がみられた[1)]。*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性 **a** 特異的遺伝子の発現は、HMG-box を有する転写因子 Mat**a2** により、転写活性化されていると推察している。この転写因子は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では消失している。*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性 **a** 特異的遺伝子の発現も窒素飢餓条件下で発現が誘導されていた。
【方法】*Zygosaccharomyces* sp.酵母から接合性 **a** で発現されると予想される *STE6* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、*lacZ* 遺伝子に接続させたレポーターアッセイによって測定した。
【結果】*STE6* 遺伝子のプロモーター領域 600bp を接続させたところ、窒素飢餓条件で接合性 **a** 特異的発現が認められた。UAS(upstream activation sequence)と予想される 37bp を削除すると *lacZ* の発現が失われた。この領域に、接合性 alpha 特異的発現する *MFalpha1* 遺伝子プロモーターの UAS 39bp を挿入すると、接合性 alpha 特異的発現がみられた。したがって、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性特異的遺伝子発現制御は、これらの UAS 配列によると推察された。この *STE6* 遺伝子の UAS に、系統的に比較的近縁である酵母 *Kluyveromy lactis* の接合性 **a** 特異的発現をすると予想される *BAR1*、*STE2* 遺伝子プロモーターの UAS 32bp、31bp に置換しても、接合性 **a** 特異的発現がみられた。また、系統的に遠縁である酵母株 *Candida albicans* の接合性 **a** 特異的発現をすると予想される *RAM2*、*STE2* 遺伝子プロモーターの UAS 35bp、33bp に置換しても、接合性 **a** 特異的発現がみられた。子嚢菌酵母の接合性 **a** 特異的発現は、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の UAS と類似した配列で発現制御されていると推察された。なお、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の転写因子 Mat**a2** の C 末端は、プリオン様構造が予想され、転写活性化能との関連性に興味が持たれる。

1) T. Ogarta & K. Kuroki Yeast Vol.38, 471-479 (2021)

It is speculated that the expression of the mating type **a**-specific gene in *Zygosaccharomyces* sp. yeast is transcriptionally activated by the transcription factor Mata2 having HMG-box. This transcription factor has disappeared in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. When 600 bp of the promoter region of the mating type **a**-specific *STE6* gene was ligated, mating type **a**-specific expression was observed under nitrogen starvation conditions.

Zygosaccharomyces, mating specific genes, regulation

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4B02-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合性発現に関与する転写因子 Ste12 の解析

Analysis of the transcription factor Ste12 involved in the mating expression of miso and soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp.

○大塚 智史[1]、黒木 克明[1]、福地 佐斗志[2]、尾形 智夫[1]([1]前橋工大生物工、[2]前橋工大生命情報)
○ Satoshi OTSUKA[1], Katsuaki KUROKI[1], Satoshi FUKUCHI[2], Tomoo OGATA[1] ([1]Maebashi Institute of Technology, Biotechnology, [2]Maebashi Institute of Technology, Bioinfomatics)

【目的】*Zygosaccharomyces* sp.酵母（味噌醤油製造に実際に使用されている酵母株は、自然交雑体がほとんどであるので、このように記載する）は、味噌醤油製造に使用される酵母である。高品質な味噌醤油製造に寄与するため、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合育種を試みている。欧州でよく使用されている酵母株、*Z. rouxii* CBS732 は、転写因子 *STE12* 遺伝子に変異があるので、接合性を示さないことを見出している[1)]。本研究では、転写因子 Ste12 の接合性発現への関与を調べた。*Zygosaccharomyces* sp.酵母の Ste12 の N 末端 200 アミノ酸残基は、DNA 結合領域であると推察され、子嚢菌酵母間で強い相同性があった。一方、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の Ste12 の C 末端配列は、種特徴的であり、43 個のグルタミン残基と 25 個のアルギニン残基が集中していて、バイオインフォマティクス解析より、プリオン様構造であると推察された。
【方法】*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合は、栄養要求性と薬剤耐性の相補により確認した。*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性関連遺伝子群の発現は、*lacZ* をレポーターとして測定した。
【結果】*Zygosaccharomyces* sp.酵母の Ste12 の C 末端配列の 43 個のグルタミン残基と 25 個のアルギニン残基が集中している領域を、それぞれ削除すると、接合性発現がみられなくなった。一方、43 個のグルタミン残基のうち、22 個のグルタミン残基にしたところ、*STE6-lacZ* 活性発現が回復した。また、DNA 結合領域であると推察される *Zygosaccharomyces* sp.酵母の Ste12 の N 末端 220 アミノ酸残基を、*Saccharomyces cerevisiae* の Ste12 の N 末端配列に置換しても、接合性の発現がみられた。以上のことより、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の転写因子 Ste12 は、N 末端配列は、接合性関連遺伝子群のプロモーターに結合することに機能し、C 末端配列は、プリオン様構造をとることで、接合遺伝子座にコードされている Mat**a2** との結合等によって、接合性関連遺伝子群の転写活性化に機能していると推察している。

1) T. Ogata & K. Kuroki Yeast Vol.38, 471-479 (2021)

Ste12 of miso and soy sauce yeast, *Zygosaccharomyces* sp. is involved in the mating expression. The C-terminal sequence of Ste12 is species-characteristic, with 43 glutamine residues and 25 arginine residues concentrated, and bioinformatics analysis suggests a prion-like structure. It is speculated that this prion-like structure functions for transcriptional activation of mating-related genes by binding to Mat**a2** encoded at the mating-type locus.

Zygosaccharomyces sp., mating type, *STE12*

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

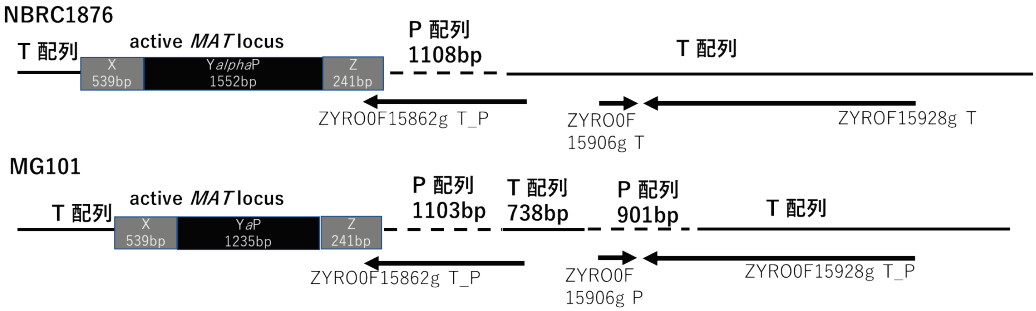
講演番号：4B02-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

味噌から分離された味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合遺伝子座の解析
Analysis of mating-type loci of miso and soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp. isolated from miso

○松浦 敦子[1]、福田 萌々花[1]、黒木 克明[1]、中村 建介[2]、藤原 朋子[3]、尾形 智夫[1] ([1]前橋工大・生物工、[2]前橋工大・生命情報、[3]広島総研食工技)
○Atsuko MATSURA[1], Momoka FUKUDA[1], Katsuaki KUROKI[1], Kensuke NAKAMURA[2], Tomoko FUJIWARA[3], Tomoo OGATA[1] ([1]Maebashi Institute of Technology, Biotechonogy, [2]Maebashi Insitute of Technology, Bioinformatics, [3]Hiroshima Technology Research Insitute)

【目的】高品質な味噌醤油製造に貢献することを目的として、味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合育種に取り組んでいる。味噌醤油の実製造では、*Z. rouxii*（ゲノム配列は T 配列と表記する）とその類縁菌（ゲノム配列は P 配列と表記する）の自然交雑体が利用されている。味噌から分離された NBRC1876 と醤油から分離された NBRC110957 は、active な接合遺伝子座(*MAT*)を含めた 6 か所の mating-type like locus (*MTL*)があることが報告されている[1)]。今回、広島県産の味噌から分離された酵母も同様な染色体構造であるかを調べた。
【結果】NBRC1876 と NBRC110957 の active な *MAT* locus は、*DIC1* 遺伝子と *SLA2* 遺伝子に挟まれた遺伝子座であると報告がある[1)]。これは、他の真菌類の接合遺伝子座の位置と一致していた。広島県で製造された味噌から分離された酵母株 5 株の想定される active な *MAT* locus 上の配列と接合性が一致していた。NBRC1876 の active な *MAT*locus は、左腕が T 配列であるのに対し、右腕は P 配列が 1108bp 挿入があった。広島県産の味噌から分離された酵母株 YA202 は、味噌から分離された NBRC1876 と同じ *MTL* の構造であった。一方、MG101 では、active な *MAT* locus の右腕側には、2 か所 P 配列の挿入があった。MG101 では、さらに 2 か所の *MTL* に Loss of heterozygosity (LOH)による染色体構造変化があることがわかった。味噌醤油の実製造で用いられている酵母株には、T 配列と P 配列の配列相同性が高い部分で、LOH が生じ、染色体構造変化があると予想された。

1) J. Watanabe et al. Appl Environm Microbiol Vol.83 e01187-17 (2017)



In *Zygosaccharomyces* sp. yeast strains used in the actual production of miso and soy sauce, LOH occurred in the part where the sequence homology of the T sequence and the P sequence was high, and it was predicted that there was a chromosomal structural change.

Zygosaccharomyces sp., mating type loci, LOH loss of heterozygosity

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4B02-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

製麹工程におけるタンパク分解酵素遺伝子の発現とそれに関わる転写因子の挙動

Expression of proteolytic enzyme genes and behavior of transcription factors in Aspergillus oryzae during koji making

○伊藤 一成[1]、谷野 有佳[1]、竹内 赴登[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3](株)フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Yuka TANINO[1], Hayato TAKEUCHI[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Ind. Technol. Center, Okayama Pref., [2]Grad. Sch. Agric.Sci., Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)

【目的】 我々は無通風箱培養法による試験製麹において、破精や酵素生産の評価のほか、関連する遺伝子発現について調べている。これまでに米麹の製麹工程においても、清酒製造で重要なグルコアミラーゼ（GlaB）や酸性プロテアーゼ（PepA）の発現に、転写因子 FlbC が関わっている可能性を示してきた。菌体量当たりの生産量では、糖化酵素は製麹が進むに従い増加する一方、酸性プロテアーゼや酸性カルボキシペプチダーゼは製麹中期にピークを迎える。タンパク質分解酵素は遺伝子が多いうえ、ある遺伝子を欠損させてもその働きを補完する遺伝子があるなど、製麹中に活躍する酵素は複雑であると予想される。本研究では、製麹工程における代表的なタンパク質分解酵素遺伝子と関連する転写因子 PrtR の発現量比較を行った。

【方法・結果】 精米歩合 60%の雄町と *Aspergillus oryzae* RIB128 株を用いて試験製麹を行い、製麹時間ごとの酵素力価、菌体量及び各遺伝子の発現量を測定した。*pepA*、*nptB*、*alpA* の各プロテアーゼ発現量は、菌体量当たりの生産プロファイルに相関するように製麹中期付近で多く、後期になるにつれ大きく減少した。一方、*cpI*、*ocpA*、*ocpB*、*ocpO* の各カルボキシペプチダーゼ発現量も同様の傾向だったが、*cpI* と *ocpB* は製麹後半でもある程度の発現が確認され、生産プロファイルと併せ、多様なペプチダーゼ遺伝子が製麹に関わることが示唆された。また、転写因子 PrtR の発現量は製麹中期で高く、その後減少したが一定量の発現は認められた。得られた結果から、製麹工程におけるタンパク質分解酵素遺伝子の発現と各転写因子との関連について考察する。

【Objective】 For obtaining intracellular information in *A. oryzae* during *koji* making, we have analyzed the gene expression level of enzymes and transcription factors associated with enzyme production. In this presentation, we describe comparison with the gene expression level and production between proteolytic enzymes and transcription factors every culture time.

【Method and result】 The steamed rice inoculated with conidiospores of *A. oryzae* RIB128 strain was incubated in a non-airflow box (NAB) culture method. The gene expression level of each proteolytic enzyme was increased in middle stage in *koji* making, followed by decreasing in the level continuously with progress of *koji* making. From the results, we discuss about the relationship between production of proteolytic enzymes and transcription factors in rice *koji* making.

proteolytic enzyme, transcription factor, *koji* making

発表責任者：伊藤一成（kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：4B02-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において酸性ペプチダーゼ PepO 及び OcpO の欠損が菌体外ペプチダーゼ生産に与える影響の解析

Effect of deficiency of acidic peptidases PepO and OcpO on extracellular peptidase production in *Aspergillus oryzae*

○佐藤 光希子、内平 瑛子、上野 綾子、田中 瑞己、山形 洋平（農工大院農応生化）
○Mikiko SATO, Eiko Uchihira, Ayako Ueno, Mizuki Tanaka, Youhei Yamagata (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

ゲノム解析の結果，黄麹菌 *A. oryzae* には酸性ペプチダーゼの遺伝子の割合が多いことが明らかになっている。本研究では *A. oryzae* の主要な菌体外分泌型酸性ペプチダーゼのうちアスパルティックエンドペプチダーゼ（APase）に分類される PepO およびセリンタイプカルボキシペプチダーゼ（CPase）に分類される OcpO の 2 つの酵素に着目し，*A. oryzae* RIB40 においてこれらの単欠損株および両欠損株を作製した。これらを大豆たんぱく質を窒素源とした液体培地で 36 時間培養し，培養上清中のペプチダーゼ活性，および酸性ペプチダーゼ遺伝子の転写解析を行った結果を報告する。pH 3.0 においてカゼインを基質としたペプチダーゼ活性は，PepO の欠損で約 2 割に低下した。この PepO 欠損時に残存する活性は，pepstatin，EDTA，PMSF，antipain のいずれにも阻害されなかった。pH 3.5 における Z-Glu-Tyr に対する CPase 活性は，コントロール株に比べΔ*ocpO* 株で約 5 割，Δ*pepO*Δ*ocpO* 株で約 8 割に低下した。pH 4.0 における Z-Arg-Arg-MCA 分解活性は，PepO の欠損で約 7 割に低下した。この活性は EDTA で約 1 割，antipain でほぼ完全に阻害された。pH 5.0 におけるトリペプチジルペプチダーゼ活性は，PepO の欠損で上昇する傾向が見られた。酸性ペプチダーゼ遺伝子の転写解析の結果，Δ*pepO*Δ*ocpO* 株ではコントロール株に比べ APase に分類される AO090013000667 および glutamic endopeptidase に分類される *pipA* の転写量が約 2 倍に上昇した。
これらのペプチダーゼ遺伝子欠損株に異種タンパク質としてウシキモシンの発現カセットを挿入し，発現量の比較を行う予定である。

We focused on two of the major extracellular acidic peptidases of *A. oryzae*, PepO, which is classified as an aspartic endopeptidase (APase), and OcpO, which is classified as a serine type carboxypeptidase (CPase). We generated single and double deficient strains of these enzymes in *A. oryzae* RIB40. We report the results of peptidase activity in the culture supernatant and transcriptional analysis of the acid peptidase gene after 36 hours of incubation in liquid medium containing soybean protein as a nitrogen source. We plan to insert an expression cassette of bovine chymosin as a heterologous protein into these peptidase deficient strains and compare the protein expression levels.

Aspergillus oryzae, aspartic endopeptidase, carboxypeptidase

発表責任者：山形洋平（y-yama@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4B02-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

鰹節カビ *Aspergillus chevalieri* の生活環に関わる遺伝子の解析
Analysis of the genes related to the life cycle in *Aspergillus chevalieri*

○平松 健太郎[1]、門岡 千尋[2]、森 一樹[3,4]、奥津 果優[1]、吉﨑 由美子[1]、髙峯 和則[1]、玉置 尚徳[1]、二神 泰基[1] ([1]鹿児島大農、[2]崇城大生物生命、[3]セルイノベーター、[4]九大農)
○ Kentaro HIRAMATSU[1], Chihiro KADOOKA[2], Kazuki MORI[3,4], Kayu OKUTSU[1], Yumiko YOSHIZAKI[1], Kazunori TAKAMINE[1], Hisanori TAMAKI[1], Taiki FUTAGAMI[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]Sojo Univ., [3]Cell Innovator Co.,Ltd., [4]Kyushu Univ.)

鰹節のうち本枯節は、カビ付けと天日干しを繰り返して製造される。鹿児島県枕崎市で製造されている本枯節の菌叢を解析した結果、*Aspergillus chevalieri*、*Aspergillus montevidensis*、*Aspergillus sydowii* の 3 種が同定された。また、*A. chevalieri* はその形態から有性世代と無性世代の両方の姿で存在していることが分かった。そこで本研究では、*A. chevalieri* においてこれらの生活環の違いを規定する遺伝子を同定することを目的とした。*A. chevalieri* の比較ゲノム解析の結果、無性世代の菌株には 4 つの遺伝子（*ACHE_40145A*、*ACHE_40420*、*ACHE_50514S*、*ACHE_70660A*）に機能が失われる可能性が高い変異が入っていた。*A. chevalieri* において標的とする遺伝子を相同組換えにより破壊することは困難であるため、有性世代をもつモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、推定転写制御因子をコードする *ACHE_40145A* と *ACHE_70660A* のホモログ *AN3761* と *AN11185* の破壊を行ったが、いずれも表現型に変化は見られなかった。次に、*A. chevalieri* における遺伝子組換え実験を効率よく行うため、有性世代株において、DNA ligase IV をコードする *ligD* 遺伝子を破壊した。今後、*ligD* 遺伝子破壊株を宿主として実験を行う予定である。

We previously analyzed the fungal population present during the production of Katsuobushi and identified three species *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus montevidensis*, and *Aspergillus sydowii*. *A. chevalieri* isolates were most dominant species and classified into teleomorphic and anamorphic strains. In this study, we analyzed the difference between the teleomorphic and anamorphic strains. The comparative genomic analysis indicated that four genes (*ACHE_40145A*, *ACHE_40420*, *ACHE_50514S*, *ACHE_70660A*) are functionally disrupted in the anamorphic strain compared to those in the teleomorphic strain. We performed the disruption of *AN3761* and *AN11185* genes, which are homologous to *ACHE_40145A* and *ACHE_70660A* in *Aspergillus nidulans*, however resulting in the no phenotypic change. To perform gene disruption experiment in *A. chevalieri*, we disrupted the *ligD* gene, which encodes DNA ligase IV, in the teleomorphic strain of *A. chevalieri*. We plan to use the *ligD* disruptant for the further experiment.

Aspergillus chevalieri, katsuobushi, *ligD*

発表責任者：二神泰基（futagami@agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：4B02-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム B

ゲノムおよび代謝産物の分析に基づくクエン酸高生産菌 Aspergillus tubingensis WU-2223L のマイコトキシン非生産性の検証

Evaluation of the mycotoxin non-production of Aspergillus tubingensis WU-2223L, a citric acid hyperproducer, based on the genome and metabolites analysis

○柴田 朗[1]、吉岡 育哲[2]、中川 博之[3]、桐村 光太郎[1,2] ([1]早稲田大学先進理工学部応用化学科、[2]早稲田大学理工学術院総合研究所、[3]農研機構・基盤技術研究本部高度分析研究センター)
○Akira SHIBATA[1], Isato YOSHIOKA[2], Hiroyuki NAKAGAWA[3], Kohtaro KIRIMURA[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Waseda res. Inst. Sci. Eng., [3]Research Center for Advanced Analysis, Core Technology Research Headquarters, NARO)

Aspergillus 属 *Nigri* 節の *A. niger* や *A. tubingensis* は、クエン酸や酵素の工業的発酵生産に使用されている。しかし、一部の菌株のゲノムには、カビ毒（マイコトキシン）生合成の遺伝子クラスタが存在するため、安全性の観点からマイコトキシン生産性の有無を判別することが重要である。演者らは、研究室保有のクエン酸高生産菌 *A. tubingensis* WU-2223L のマイコトキシン生産性について検証した。*Aspergillus* 属糸状菌で懸念されるマイコトキシンは、オクラトキシン、フモニシン、アフラトキシンおよびパツリンであるため、WU-2223L 株のゲノム情報 [1)]と代謝産物の両面からそれらの非生産性を検証した。WU-2223L 株のゲノム情報より各マイコトキシンの生合成遺伝子クラスタを探索した。オクラトキシンとフモニシンでは、それぞれの生産菌の有する完全長のクラスタと比べて数十 kb に渡る大規模な欠損が存在した。また、アフラトキシンとパツリンでは、該当する遺伝子が存在しなかった。代謝産物の解析では、クエン酸生産培地にて培養した培養液上清を濃縮して LC/MS-MS 分析に供し、いずれのマイコトキシンも不検出（検出限界未満）であることを確認した。以上より、*A. tubingensis* WU-2223L がマイコトキシン非生産性の安全なクエン酸高生産菌であることを明らかにした。

1) Yoshioka, I., et al., Microbiol. Resource Announce., **9**, 33, e00702-20 (2020).

Fungal strains belonging to *Aspergillus* section *Nigri*, such as *A. niger* and *A. tubingensis*, have been used in the fermentation industry for production of citric acid and enzymes. However, some strains have gene clusters encoding mycotoxins, and for fermentative use it is required to scrutinize the biosafety by analysis of mycotoxins productivity. Major mycotoxins produced by *Aspergilli* are ochratoxins, fumonisins, aflatoxins and patulin. Thus, we examined whether *A. tubingensis* WU-2223L, a citric acid-hyperproducer, has an ability to produce mycotoxins based on genome of strain WU-2223L [1)] and analysis of metabolites. We searched the biosynthetic gene clusters encoding mycotoxins in the genome of strain WU-2223L. As for ochratoxins and fumonisins, there was the large deletion (>10 kb) in their cluster regions, and the genome contained none of the biosynthetic gene clusters responsible for production of aflatoxin and patulin. On the other hands, the culture broth of strain WU-2223L was concentrated and subjected to LC-MS/MS, and none of the above mycotoxins was detected (less than detection limits). In summary, we revealed that *A. tubingensis* WU-2223L is a safe citric acid-hyperproducer since non-production of mycotoxins is confirmed based on the genome and metabolites analyses.

Aspergillus tubingensis (A. niger), citric acid, mycotoxin

講演番号：4B04-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌による異種天然物生産における高生産因子の発見と機能解析

Discovery and functional analysis of regulatory factors for higher-level production of heterologous natural products in *Aspergillus oryzae*

○原中 実穂[1]、齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[3]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理)
○ Miho HARANAKA[1], Naoya SAITO[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

糸状菌の一種である麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年、異種生産の宿主として主に生合成研究の目的で用いられている。*A. oryzae* の産業利用を目的とした異種天然物の生産量向上には、宿主の代謝フラックスを変化させることによる基質供給の強化が必要である。*A. oryzae* において代謝に関与する制御因子を発見し、その遺伝子改変により宿主の代謝フラックスを変化させることができれば、異種天然物生産の向上が可能になると期待される。そこで本研究では、*A. oryzae* を用いた異種天然物生産における高生産因子の探索と代謝における機能解析を目的とした。

A. oryzae の培養で経日的に行った RNA-seq 解析のデータに着目し、多数の遺伝子の発現変動が起こった時点で代謝フラックスが大きく変化していると仮定した。特に、転写因子・キナーゼ・ホスファターゼのような制御因子が代謝フラックス変化と関係していると考え、これらをコードする遺伝子から発現変動を示すものを絞り込んだ。選択した約 60 個の制御因子の遺伝子改変株を作製し、異種天然物生産のモデルとして担子菌由来の抗菌活性をもつジテルペン pleuromutilin の生産量を指標にスクリーニングを行った。その結果、生産量が増加した株を複数見いだし、最大で 2.1 倍の増加が得られたことから、*A. oryzae* の異種天然物生産における高生産因子の発見に成功した。さらに、生産量増加を示した遺伝子改変株の代謝産物の変化が見られたことから、その結果についても報告する。

The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* has been recently used as a production host for heterologous natural products. To improve the production for industrial use, it is necessary to enhance substrate supply by altering the host metabolism flux. It would be possible to improve the production of heterologous natural products by discovering regulatory factors not yet known to affect the metabolism. In this study, to identify regulatory factors related to higher-level production of heterologous natural products in *A. oryzae*, we focused on transcriptome profiles in the course of the culture, and regulatory factors whose expression fluctuated hypothetically with the metabolic flux change were selected. We constructed modified strains of ~60 genes for the regulatory factors to screen for higher-level production using an antibiotic diterpene pleuromutilin as a model for heterologous natural products. As a result, several strains increased pleuromutilin production, and the maximum production was 2.1-fold. Thus, we successfully found factors for higher-level production of heterologous natural product, and metabolic changes in the strains will be reported.

Aspergillus oryzae, metabolism, natural product

発表責任者：丸山潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B04-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

高グルコアミラーゼ活性・低チロシナーゼ活性麹菌株の育種に関する研究

Studies on the breeding of koji strains with high glucoamylase activity and low tyrosinase activity

○陳 俊、殿内 暁夫 (岩手大連農)
○JUN CHEN, Akio TONOUCHI (UGAS)

高糖化力活性かつ低チロシナーゼ活性麹菌株の開発の試みはされているが、形質の安定した株の育種成功例は少ない。青森県オリジナルの高グルコアミラーゼ活性麹菌 *A. oryzae* G-4 株からその高グルコアミラーゼ活性を保ち、麹や酒粕の褐変を引き起こすチロシナーゼの活性が低下し、かつその性質が世代を重ねても失わない株の育種を目的で、*A. oryzae* 5-1 株の育種に成功した。

比較ゲノム解析では、5-1 株は固体培地特異的チロシナーゼ発現遺伝子 *melB* のプロモーター、CDS、下流領域に G-4 との差異は検出されなかったが、遺伝子発現解析では *melB* の転写量が顕著に低下していた。一方で、*glaB* などの他の固体培地特異的遺伝子の転写に G-4 株と 5-1 株では差異はなく、*melB* の発現制御の特異性が示された。比較ゲノム解析により、5-1 株には表現型に大きな影響を与えるフレームシフト変異が 4 つの遺伝子に生じていることが確認された。現在、これらの変異と *melB* との発現との関連を調べるとともに、*melB* の発現制御領域の特定を試みている。

Although there have been attempts to develop strains of koji mold (*Aspergillus oryzae*) with high glucoamylase activity and low tyrosinase activity causes browning of koji and sake lees; there are few examples of successful breeding of strains with stable traits. We succeeded in breeding strain 5-1 from Aomori Prefecture's original high glucoamylase activity koji strain *A. oryzae* G-4. Strain 5-1 maintained high glucoamylase activity of strain G-4 but decreased tyrosinase activity.

The comparative genomic analysis did not detect any differences between strains 5-1 and G-4 in the promoter, CDS, and downstream region of *melB*, a solid medium-specific tyrosinase expression gene, but gene expression analysis showed a marked decrease in the transcript level of *melB*. On the other hand, there was no difference in the transcription of other solid medium-specific genes, such as *glaB*, between G-4 and 5-1 strains, indicating the specificity of *melB* expression regulation. Furthermore, the comparative genomic analysis confirmed that four genes in strain 5-1 harbor frameshift mutations that presumably cause significant impacts on the phenotype. We are currently investigating the relationship between these mutations and *melB* expression and attempting to identify the regulatory region of *melB* expression.

Aspergillus oryzae, Tyrosinase, *melB*

発表責任者：CHEN JUN（junsy.chin@gmail.com）

講演番号：4B04-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

輸送体選択技術を用いた新規有用化合物排出輸送体の網羅的探索

Comprehensive screening of transporters exporting commercially valuable compounds by using novel technology for transporter selection

○竹中 優馬[1]、七谷 圭[1,2]、中山 真由美[1,3]、石井 智子[1]、伊藤 隼哉[1]、阿部 敬悦[1]([1]東北大院・農、[2]東北大・INGEM、[3]東北大院・生命科学)
○Yuma TAKENAKA[1], Kei NANATANI[1,2], Mayumi NAKAYAMA[1,3], Tomoko ISHII[1], Junya ITO[1], KEIETSU ABE[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Tohoku Univ., [2]INGEM, Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.)

【研究背景】 微生物を用いた物質生産において、標的化合物の生産効率化に向けて、細胞内代謝改変など様々な試みが行われている。アミノ酸、有機酸など標的化合物が膜不透過性の場合、最終産物は細胞内に蓄積し、生合成反応を負に制御するフィードバック反応により生産効率を低下させる。そこで、標的化合物を細胞外へ排出する膜輸送体の発現が必要となる。微生物のゲノムには、300-600 の輸送体遺伝子がコードされている。しかしながら、膜輸送体の多くは機能の詳細な解析がなされておらず、正確に推定することが困難である。膜輸送体の機能解析が進まない理由として、細胞膜上での発現が困難であること、膜タンパク質として疎水性が高いため可溶性酵素と比べ扱いが困難であることが挙げられる。したがって、標的化合物を細胞外に排出する輸送体の探索には時間を要するのが現状である。本研究では、ゲノム解析技術と輸送体探索技術を組み合わせることで、標的化合物の輸送体探索をハイスループット化し、物質生産効率化の実現に向けた新たな探索技術を開発することを目的とした。標的として、香料の原料や半導体の加工材料として有用なカテコール生産を効率化する排出輸送体探索を実施した。

【方法・結果】 ゲノム情報をもとに推定されたコリネバクテリウム由来輸送体遺伝子をパートナーフュージョンタンパク質(*mstX*)の下流にクローニングし、輸送体安定発現ライブラリを構築した。大腸菌 C43(DE3)Rosetta 株を宿主として作製したカテコール生産株に輸送体ライブラリ全 205 遺伝子を発現させ、培養上清を高速液体クロマトグラフ法(HPLC)により分析した。複数回にわたるスクリーニングの結果、輸送体非導入株と比べて培養上清中のカテコール生産量を有意に向上させた排出輸送体候補を数遺伝子に絞り込むことに成功した。生産量としては、2～8 倍のカテコール量増加が見られた。この結果は、新たな探索技術により従来よりも簡便かつ短期間での輸送体探索が可能であることを示唆した。

In the production of chemicals by microbial fermentation, the export of chemicals from the cell becomes one of the rate-limiting step. In this study, we conducted a simple and comprehensive screening of catechol efflux transporters by combining genome information analysis technology and novel transporter search technology. As a result, we succeeded to search for the candidates of transporter genes that significantly improve catechol efflux capacity in catechol-producing strains.

Fermentation, Transporter, Screening

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：4B04-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸分散変異株を用いた酵素生産性の評価
Evaluation of enzyme productivity of *Aspergillus oryzae* mutant of which hyphae disperse.
○石川 健二[1]、水戸 光司[1]、高橋 哲也[1]、山城 寛[1]、片瀬 徹[1]、小池田 聡[1]、片山 琢也[2]、丸山 潤一[2]、宮澤 拳[3]、吉見 啓[4]、阿部 敬悦[3,4]、山口 庄太郎[1]([1]天野エンザイム、[2]東大院・農生科・応生工、[3]東北大院・農、[4]東北大・NICHe)
○Kenji ISHIKAWA[1], Koji MITO[1], Tetsuya TAKAHASHI[1], Kan YAMASHIRO[1], Toru KATASE[1], Satoshi KOIKEDA[1], Takuya KATAYAMA[2], Jun-ichi MARUYAMA[2], Ken MIYAZAWA[3], Akira YOSHIMI[4], Keietsu ABE[3,4], Shotaro YAMAGUTI[1] ([1]Amano Enzyme, [2]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ.)

日本の国菌として認定されている麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古くから清酒、味噌、醤油などの製造に用いられている一方、産業用酵素の生産菌、或いは異種遺伝子発現用宿主として広く用いられている。工業的な酵素生産法として、麹（固体）培養法と液体培養法がある。液体培養では、通気撹拌により菌体を増殖させ酵素を分泌させるが、菌体増殖に伴う培養液の粘度上昇により溶存酸素が不足し酵素生産性に影響を及ぼす。培養液の粘度上昇は菌体同士の絡まりが原因と考えられるが、細胞壁成分のα-1,3-グルカン(AG)とガラクトサミノガラクタン(GAG)の生成を低下させることにより、菌体を完全に分散させうることが報告されている。

本研究では、工業的に実用化されている麹菌株に対して、AG と GAG の生成抑制が酵素生産性に及ぼす影響を調べることを目的とした。*A. oryzae* のα-アミラーゼ生産株に対して、AG 合成酵素遺伝子 *agsA*、*agsB* 及び *agsC*、GAG 生合成遺伝子 *uge3*、*sph3* を欠損させた 5 重破壊株を取得した。本 5 重破壊株は、液体培養及び麹培養において酵素生産性を向上できる可能性を有することを見出した。

Koji mold, *Aspergillus oryzae*, recognized as a Japan's national fungus, has long been used in the production of sake, miso and soy sauce. It is also widely used as an industrial enzyme producer or as a host for heterologous gene expression. There are two industrial enzyme production methods: Koji (solid) culture and liquid culture. In a liquid culture, the koji mold is grown by aeration and agitation to secrete enzymes, but the viscosity of the culture broth increases with the growth of the fungi. This results in a lack of dissolved oxygen, which may affect enzyme productivity. Increase of viscosity is caused by the entanglement of the fungi. It has been reported that the fungi can be completely dispersed by decreasing the formation of cell wall components such as α-1,3-glucan (AG) and galactosaminogalactan (GAG).

The purpose of this study was to investigate the effect of inhibiting the formation of AG and GAG on enzyme productivity using commercial enzyme producing strains. 5-Gene disruptant of α-amylase producing *A.oryzae* was obtained, in which three AG synthetase genes, *agsA*, *agsB* and *agsC*, and two GAG biosynthesis genes, *uge3* and *sph3,* were disrupted. We found that the 5-gene disruptant had a potential to improve enzyme productivity in both liquid and Koji cultures.

Aspergillus oryzae, enzyme production, cell wall

発表責任者：石川健二（kenji_ishikawa@amano-enzyme.com）

講演番号：4B04-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

プトレッシンを産生する新規プロバイオティクス候補乳酸菌 *Latilactobacillus curvatus* KP 3-4 の分離と解析

Isolation and characterization of a new probiotic candidate lactic acid bacteria *Latilactobacillus curvatus* KP 3-4 that produces putrescine

○平野 里佳[1,2]、久米 愛子[3]、西山 知里[1]、本田 涼将[2]、白澤 秀斗[2]、凌 一葦[4]、杉山 友太[1]、奈良 未沙希[1]、下川 ひろみ[2]、河田 明輝[1]、小柳 喬[1]、芦田 久[2]、奥田 修二郎[4]、松本 光晴[3]、高木 宏樹[1]、栗原 新[2]（[1]石川県大生資環、[2]近畿大生物理工、[3]協同乳業・研究所、[4]新潟大医）

○ Rika HIRANO[1,2], Aiko KUME[3], Chisato NISHIYAMA[1], Ryosuke HONDA[2], Hideto SHIRASAWA[2], Yiwei LING[4], Yuta SUGIYAMA[1], Misaki NARA[1], Hiromi SHIMOKAWA[2], Hiroki KAWADA[1], Takashi KOYANAGI[1], Hisashi ASHIDA[2], Shujiro OKUDA[4], Mitsuharu MATSUMOTO[3], Hiroki TAKAGI[1], Shin KURIHARA[2] ([1]Ishikawa Prefect. Univ., [2]Kindai Univ., [3]Kyodo Milk Industry Co., Ltd., [4]Niigata Univ.)

ポリアミンは、アミノ基を二つ以上含む脂肪族化合物の総称である。これまでに、ポリアミンの経口摂取が動物に様々な健康増進効果を与えることが報告されてきた。ポリアミンを多量に産生する細菌を食品から分離することが出来れば、新規プロバイオティクスとなる可能性がある。本研究では、石川県産かぶらずしからプトレッシン高産生菌 *Latilactobacillus curvatus* KP 3-4 を分離した。代表的なプロバイオティクス乳酸菌や複数の *L. curvatus* 株を MRS 培地で培養し、ポリアミン合成能を比較したところ、*L. curvatus* KP3-4 のみがプトレッシンを高生産することが明らかとなり、その培養上清中の濃度は約 170 μM であった。さらに、*L. curvatus* KP3-4 によるプトレッシン合成メカニズムを解析することを目的として、プトレッシンの前駆体であるオルニチンを MRS 培地に添加したところ、*L. curvatus* KP3-4 のプトレッシン産生量が約 3.6 倍に増加した。次いで、*L. curvatus* KP3-4 の全ゲノム解析を行ったところ、ゲノム上にオルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子（*odc*）とプトレッシンエクスポーター遺伝子である *potE* がコードされていることが推測された。この二つのタンパク質について、代表的なプロバイオティクス乳酸菌や他の *L. curvatus* における保存性と比較すると、*odc* と *potE* の両方を有する株は *L. curvatus* KP 3-4 のみであった。さらに、無菌マウスに *L. curvatus* KP 3-4 を経口投与したところ、糞便中のポリアミン濃度が上昇した。以上の結果から、*L. curvatus* KP 3-4 は動物の腸管内でポリアミンを産生することが可能な新規プロバイオティクス候補として期待できる。

Polyamines are aliphatic hydrocarbons with amino groups at both ends of their molecular structure. It has been reported that polyamines have health-promoting effects on animals. If a bacterium that produces high levels of polyamines is isolated from foods, it could be utilized as a new probiotic. In this study, we isolated *Latilactobacillus curvatus* KP 3-4 from kabura-zushi as a strain that produces a high level of putrescine at about 170 μM in the culture supernatant. Ornithine supplementation to the medium increased putrescine production to about 3.6-fold in *L. curvatus* KP 3-4. Next, we performed whole genome analysis of *L. curvatus* KP 3-4 and inferred that ornithine decarboxylase (*odc*) and putrescine exporter *potE* are conserved in the genome. When compared to the conservation of these two proteins in typical probiotic lactic acid bacteria and other *L. curvatus*, *L. curvatus* KP 3-4 was the only strain that possessed both *odc* and *potE*. Furthermore, oral administration of *L. curvatus* KP 3-4 to germ-free mice increased the concentration of polyamine in the feces. These results suggest the potential of *L. curvatus* KP 3-4 as a new probiotic that produces polyamines in the intestine.

probiotic, Latilactobacillus curvatus, polyamine

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4B04-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

乳酸菌 *Lactobacillus amylovorus* と乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の相互作用が短鎖脂肪酸産生に与える影響

Short-chain fatty acid production in the co-culture of a lactate-producing bacterium, *Lactobacillus amylovorus*, and a lactate-utilizing bacterium, *Megasphaera elsdenii*.

○栗原 瑞穂[1]、板谷 かえで[1]、宮本 浩邦[1,2,3,4]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院・園芸、[2]日環科学、[3]サーマス、[4]理研・生命医科学)
○MIZUHO KURIBARA[1], KAEDE ITAYA[1], HIROKUNI MIYAMOTO[1,2,3,4], HIROAKI KODAMA[1] ([1]Grad. Sch. Horticulture., Chiba Univ., [2]Japan Eco-science, [3]Sermas, [4]RIKEN IMS.)

海産資源を 70～80℃の高温好気下で発酵させた飼料（以下、好熱菌発酵産物）をブタに供与すると、死産率の低下、成長促進、筋肉中の余分な脂肪分の減少など様々な生理作用が認められる。このような状況下では排泄糞中の乳酸含有量が低下することから、乳酸代謝に関わる腸内細菌叢の変化が示唆されている。実際にブタ排泄糞中の細菌組成を解析すると、好熱菌発酵産物を供与したブタ排泄糞中では、乳酸を資化して、短鎖脂肪酸（Short-chain fatty acid ： SCFA）を産生する乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* が増殖し、同時に優占乳酸菌種が *Streptococcus alactolyticus* から *Lactobacillus amylovorus* へと変化していた。本研究では好熱菌発酵産物を供与したブタ糞サンプルから単離された *L. amylovorus*4-4 株と *M. elsdenii*Y2 株の共存培養試験を行うことで、腸内における乳酸菌と乳酸資化菌の相互作用を明らかにすることを目的とした。結果として、*M. elsdenii*Y2 株は単独培養時と比較して共存培養時で約 2 倍の酪酸を産生すると共に、*M. elsdenii*Y2 株の増殖が大幅に促進された。また、*M. elsdenii*Y2 株の培養上清を用いて *L. amylovorus*4-4 株を培養すると、*L. amylovorus*4-4 株の増殖が促進されることはなかったが、乳酸の生成量が増えることが明らかになった。これらの結果から *M. elsdenii*Y2 株が共存することで *L. amylovorus*4-4 株の乳酸生成が促進され、*M. elsdenii*Y2 株の増殖と、SCFA、とくに酪酸の生成が促進されることが示唆された。このことから好熱菌発酵産物のプロバイオティクス効果の一部は乳酸代謝に関わる腸内細菌叢のバランスの変化に依存していることが示唆された。

Administration of a thermophile-fermented compost to the pig provides a probiotic effect. Under such conditions, a reduction of lactic acid content was observed in the feces, and simultaneously a lactate-producing bacterium, *Lactobacillus amylovorus*, and a lactate-utilizing bacterium, *Megasphaera elsdenii*, were increased. In this study, microbial interaction between *L. amylovorus* and *M. elsdenii* was investigated. The growth of *M. elsdenii* was significantly increased conincident with a rise of butyrate by co-cultured with *L. amylovorus*. Interestingly, the lactate production by *L. amylovorus* was stimulated by the supernatant of culture fluid of *M. elsdenii*. These results suggest that the gut condition of pigs is improved by the interaction of these two bacterial species.

Megasphaera elsdenii, lactate-utilizing bacterium, *Lactobacillus*

講演番号：4B04-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

味噌漬け豆腐由来 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの生合成機構に関する研究

Study on the mechanism of multiple bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 isolated from *misozuke-tofu*

○松田 明香里[1]、河原 あい[2]、善藤 威史[3]、松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県大・環境共生、[2]熊本県大院・環境共生、[3]九大院・農）
○Akari MATSUDA[1], Ai KAWAHARA[2], Takeshi ZENDO[3], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】食経験豊富な乳酸菌が生産する抗菌ペプチドのバクテリオシンは、食品の風味に影響を与えず、ヒトの腸管内の消化酵素で分解されるなど安全性が高いことから、天然の食品保存料として期待されている。*Lactiplantibacillus plantarum*（旧名 *Lacobacillus plantarum*）PUK6 は熊本県の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離されたバクテリオシン生産乳酸菌である。PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群（*pln* locus）の中には、機能が不明な遺伝子が存在する。そこで本研究では、PUK6 株の多成分バクテリオシン生産機構に関与する遺伝子について調べることを目的とした。
【方法および結果】データベースウェブ解析（BLAST、InterPro、Phobius）により *pln* locus 上の各遺伝子の機能を推定したところ、バクテリオシンの菌体外輸送に関与するタンパク質遺伝子（*plnG*）を見出した。さらに PlnG の機能を明らかにするため、*plnG* 遺伝子破壊株の作製を試みた。*plnG* の上流域（600 bp）と下流域（600 bp）の間にクロラムフェニコール耐性遺伝子（Cm^r）を挟んだ領域を pUC118 ベクターに挿入して、プラスミド pUC118Cm^r-*ΔplnG* を構築した。現在、作製したプラスミドをエレクトロポレーション法により PUK6 株に導入し、相同的組換えによって PUK6 株の *plnG* 遺伝子破壊株の作製を試みている。

Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides with antibacterial activities and are expected as food preservatives in food industry. *Lactiplantibacillus plantarum* (formerly *Lactobacillus plantarum*) PUK6, isolated from *misozuke-tofu*, *tofu* pickled in *miso*, made in the Kuma district of Kumamoto prefecture in Japan, produces multiple bacteriocins. The aim of this study was to investigate the mechanism of multiple bacteriocin production in the PUK6 strain.
Database web analyses show that the *plnG* gene probably encodes the transporter that produces bacteriocins extracellularly. In order to clarify the function of PlnG, the *plnG*-destructed strain have been prepared. The plasmid pUC118Cm^r-*ΔplnG* was constructed as follows. The DNA region, in which the chloramphenicol resistance gene (Cm^r) was inserted between the upstream 0.6 kb and the downstream 0.6 kb portions inside the *plnG* gene, was inserted into pUC118. Currently, pUC118Cm^r- *ΔplnG* is introduced into the PUK6 strains by electroporation. Subsequently, the *plnG*-disrupted strain, in which the *plnG* gene on the chromosome is replaced and the Cm^r is integrated, will be produced by homologous recombination.

lactic acid bacteria, bacteriocin, Lactiplantibacillus plantarum

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：4B04-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

新たに分離した乳酸菌からの新奇バクテリオシンの探索と構造・特性の解析
Screening and characterization of novel bacteriocins produced by newly isolated lactic acid bacteria
○庄野 陸太、野見山 泰成、吉田 遥海、中山 二郎、善藤 威史（九大院農）
○Rikuta SHONO, Taisei Nomiyama, Harumi Yoshida, Jiro Nakayama, Takeshi Zendo (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

バクテリオシンは細菌が生産する抗菌性ペプチドまたはタンパク質であり、熱や酸に対して安定で消化酵素によって容易に分解されるなどの優れた特徴をもつ。中でも乳酸菌が生産するものは安全な抗菌物質として期待され、様々な構造や特性をもつものが見出されている。そこで本研究では新たに分離した乳酸菌から新奇バクテリオシンを探索し、その構造や特性を明らかとすることを目的とした。様々な試料から分離した乳酸菌にバクテリオシン様の抗菌活性が認められた。そのうち、強い抗菌活性や特徴的な抗菌スペクトルを示した代表的な分離株を選抜し、バクテリオシンを種々のクロマトグラフィーによって精製し、分子量やN末端アミノ酸配列を解析した。また、必要に応じてPCR等によって、バクテリオシンをコードする遺伝子の解析を行った。その結果、それぞれ既知のバクテリオシンであるnisin Z、plantaricin A、enterocin B、lacticin Qを生産する乳酸菌が見出されたほか、シカの糞便から単離された *Lactiplantibacillus plantarum* 2210が生産するバクテリオシンは比較的広い抗菌スペクトルを示し、bactofencin Aに類似した構造をもつ新奇バクテリオシンであることが明らかとなった。さらに、土壌から分離された乳酸菌が特徴的な抗菌スペクトルをもつバクテリオシンを生産することを見出し、構造解析を進めている。

Based on their properties and safety, antimicrobial peptides, bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) are expected to be applied as safe antimicrobial agents. The purpose of this study was to search for novel bacteriocins with new properties and to clarify their structures. LAB isolates from various sources were evaluated for their antimicrobial activity. Some were found to show bacteriocin-like inhibitory activity, and their bacteriocins were purified by some chromatographies and characterized for structure. Some of the new LAB isolates were found to produce reported bacteriocins such as nisin Z, plantaricin A, enterocin B and lacticin Q. *Lactiplantibacillus plantarum* 2210 isolated from deer feces showed a broad antimicrobial spectrum against Gram-positive bacteria, and this antimicrobial substance was a novel bacteriocin possessing a similar sequence to bactofencin A with changes in some amino acid residues. Moreover, a LAB isolate from soil was found to produce a characteristic bacteriocin, which is being characterized for structure.

bacteriocin, antimicrobial peptide, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4B04-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

糸状菌 *Aspergillus terreus* が生産するイタコン酸による微生物の生育阻害効果

Antimicrobial effect of itaconic acid produced by filamentous fungi *Aspergillus terreus*

○川尻 康平[1]、浜田 勇和[1]、横前 滉太[2]、櫛田 冴希[2]、杉本 夏希[2]、鈴木 孝征[1,3]、金政 真[1,2]([1]中部大院・応生、[2]中部大・環生科、[3]中部大・応生化)
○ Kohei KAWAJIRI[1], Hayato HAMADA[1], Kota YOKOMAE[2], Saki KUSIDA[2], Natsuki SUGIMOTO[2], Takamasa SUZUKI[1,3], Shin KANAMASA[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., [3]Dept. Biol. Chem., Chubu Univ.)

イタコン酸は工業原料として重要な有機酸であり，その製造には糸状菌の一種である *A. terreus* が用いられている。微生物におけるイタコン酸の機能は不明であるが，イタコン酸はイソクエン酸リアーゼ(ICL)などの代謝酵素の活性を阻害することから，周囲の微生物の生育を阻害して自身の生存を有利にする役割があると考えられる。本菌は酸性条件で培養した場合に旺盛にイタコン酸を生産分泌するが，pH がイタコン酸の細菌生育抑制効果に与える影響は報告されていない。

本研究では，グラム陽性細菌として枯草菌 *Bacillus subtilis*，グラム陰性細菌として大腸菌 *Escherichia coli*，真菌類として酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を複数のイタコン酸濃度および pH 条件で培養し，生育に与える影響を評価した。その結果，*B. subtilis* および *E. coli* において，同じ pH ではイタコン酸濃度が高いほど，また同じイタコン酸濃度であれば pH が低い条件であるほど生育抑制効果が大きかった。一方，これら細菌の生育が抑制された培養条件で *S. cerevisiae* の生育は阻害されなかった。また，ICL に対する活性の阻害を確認するために，酢酸を単一炭素源とした培地における微生物の生育度合いの観察を行った結果についても報告する。

Itaconic acid is an organic acid that is widely used as an industrial raw material, produced by filamentous fungus *A. terreus*. The function of itaconic acid in microorganisms is unknown, but it inhibits the activity of some metabolic enzymes such as isocitrate lyase (ICL), suggesting that it may play a role in inhibiting the growth of surrounding microorganisms. This fungus produces and secretes itaconic acid when cultured under acidic conditions, but the effect of pH on the inhibitory effect of itaconic acid on bacterial growth has not been reported.

In this study, the growth of *B. subtilis*, *E. coli*, and *S. cerevisiae* were measured by culturing them with various concentrations of itaconic acid and multiple pH conditions. The results showed that the growth of *B. subtilis* and *E. coli* was inhibited by higher concentrations of itaconic acid and lower pH. On the other hand, the growth of *S. cerevisiae* was not inhibited under the culture conditions in which the growth of these bacteria was suppressed.

itaconic acid, antimicrobial effect, *Aspergillus terreus*

講演番号：4B04-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム B

Mycobacterium tuberculosis を選択的に殺す DNA ジャイレース阻害剤の発見

Discovery of a novel DNA gyrase inhibitor that selectively kills *Mycobacterium tuberculosis*

○今井 優[1]、HAUK Glenn[2]、QUIGLEY Jeffrey[1]、LIANG Libang[1]、SON Sangkeun[1]、GHIGLIERI Meghan[1]、GATES Michael[1]、MORRISSETTE Madeleine[1]、SHAHSAVARI Negar[1]、NILES Samantha[1]、HONRAO Chandrashekhar[3]、MA Xiaoyu[3]、GUO Jason[3]、BERGER James[2]、LEWIS Kim[1] ([1] ノースイースタン大学・抗生物質発見センター、[2] ジョンズ・ホプキンス大学、[3] ノースイースタン大学・創薬センター)

○ Yu IMAI[1], Glenn HAUK[2], Jeffrey QUIGLEY[1], Libang LIANG[1], Sangkeun SON[1], Meghan GHIGLIERI[1], Michael GATES[1], Madeleine MORRISSETTE[1], Negar SHAHSAVARI[1], Samantha NILES[1], Chandrashekhar HONRAO[3], Xiaoyu MA[3], Jason GUO[3], James BERGER[2], Kim LEWIS[1] ([1]Northeastern Univ. Antimicrobial Discovery Center, [2]Johns Hopkins Univ. School of Medicine, [3]Northeastern Univ. Center for Drug Discovery)

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の治療にはリファンピシン, イソニアジド, ピラジナミドおよびエタンブトールのカクテルが使用されている。一方, リファンピシン (広域スペクトル) による不必要な薬剤耐性変異株の出現や腸内細菌叢の攪乱が問題となっており, *M. tuberculosis* に特異的な活性を示す抗生物質の発見が求められている。

Photorhabdus 属細菌から培養抽出物を調製し, *M. tuberculosis* および *Staphylococcus aureus* (カウンタースクリーニング) に対する活性を調べたところ, *Photorhabdus noenieputensis* 培養物中に *M. tuberculosis* に対してのみ強い活性を示す化合物が含まれていることが明らかとなった。LC-MS および NMR 分析から, この化合物が分子量 1488 の新規物質であることが判った。Evybactin と命名されたこの化合物は, *Mycobacterium* 属やグラム陰性細菌に広く存在する BacA/SbmA トランスポーターによって細胞内に取り込まれた後, DNA ジャイレースに結合することで DNA 合成を阻害することを見出した。一方, グラム陰性細菌においては, 細胞内に取り込まれた Evybactin が, 薬剤排出ポンプ (TolC など) によって細胞外に排出されること, そしてその結果, Evybactin が *M. tuberculosis* において選択的な活性を示すことを突き止めた。Evybactin は *in vivo* 動物モデルにおいても効果を示すことから, 将来的なリード化合物として大きな期待が持てる。

To treat tuberculosis, a drug cocktail (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol) with different modes of action is used. However, this cocktail has the potential to generate drug-resistance in off-target pathogens and harms our microbiome due to the broad-spectrum antibiotic rifampicin. Therefore, compounds that can selectively kill *M. tuberculosis* are needed.

We found a novel antibiotic, which we named evybactin from the culture supernatant of *Photorhabdus noenieputensis*. Evybactin is smuggled into the bacterial cell by a hydroplilic compound transporter BacA and targets the bacterial DNA gyrase. BacA and its homologue SbmA are distributed among *Mycobacterium* spp. and Gram-negative bacteria. Interestingly, Gram-negative bacteria efficiently pumps out evybactin by multidrug efflux pump such as TolC, and as a result, evybactin serves as a highly selective compound against *M. tuberculosis*. Evybactin shows efficacy in the animal model. These results suggest that evybactin is a promising drug lead for tuberculosis treatment.

Antibiotic, Mycobacterium tuberculosis, DNA gyrase

発表責任者：今井 優（yimai1985@gmail.com）

講演番号：4B07-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

麹菌における異種タンパク質高発現系の開発
High-level heterologous protein production in *Aspergillus sojae*
○荒木 康子[1]、柚木 雅信[1]、鉞 陽介[1]、佐藤 敦史[2]、五味 恵子[1]、原 精一[1]、伊藤 考太郎[1] ([1]キッコーマン、[2]野田産研)
○Yasuko ARAKI[1], Masanobu YUZUKI[1], Yosuke MASAKARI[1], Atsushi Sato[2], Keiko GOMI[1], Seiichi HARA[1], Kotaro ITO[1] ([1]Kikkoman Corp., [2]NISR)

麹菌をはじめとする糸状菌はタンパク質の分泌生産能力が高く、タンパク質生産の宿主として有用である。我々は、しょうゆ麹菌 *Aspergillus sojae* を宿主とし、プロモーター長を短縮した選択マーカー遺伝子を用いることで、10 コピー以上の外来遺伝子を高効率でゲノム DNA 中に挿入できる方法を見出した[1)]。本方法は、選択マーカー遺伝子のプロモーター長を短縮化することにより、選択マーカー遺伝子の発現量を著しく低下させ、多コピーで挿入された際に十分な発現量が得られるように改変した選択マーカー遺伝子を用いることを特徴としている。

本講演では、*A. sojae* における *pyrG*（オロチジン 5’－リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子）及び *adeA*（ホスホリボシルアミノイミダゾールスクシノカルボキサミドシンターゼ遺伝子)選択マーカーを用いた多コピー導入方法の検討、及び、本方法を用いた異種タンパク質の高生産化例について紹介する。本方法を用いることで、50 コピー以上の外来遺伝子の挿入も可能であり、糸状菌由来や哺乳類由来の異種タンパク質に加え、二次代謝産物の高生産化にも成功した。

1）Araki Y., *et al.*, (2021). *J Gen Appl Microbiol.*

Filamentous fungi containing *Aspergillus sojae* have a high protein secretory production capacity and are useful host cells for recombinant protein production. We have found a method to insert more than 10 copies of a recombinant gene into genomic DNA by using a selective marker with a truncated promoter in *A. sojae* [1)].

In this presentation, we will introduce a method for inserting multiple copies of recombinant genes using selection markers, *pyrG* (orothidine-5’-phosphate decarboxylase gene) and *adeA* (phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase gene) in *A. sojae*. By using this expression system, it was possible to insert more than 50 copies of expression cassettes of heterologous genes, and we succeeded in increasing the production level of some heterologous proteins derived from filamentous fungi and mammals.

Aspergillus, heterologous expression, multi-copy integration

講演番号：4B07-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

微生物生産能向上を目的とした微生物 ロドプシンの改変

Bacterial Rhodopsin reconstruction for improving bioproduction

○佐藤 良樹[1]、川崎 真由[1]、弘埜 陽子[2]、菊川 寛史[1,2]、中野 祥吾[2]、石井 純[3]、松田 史生[4]、戸谷 吉博[4]、伊藤 創平[2]、原 清敬[1,2]([1]静県大院・薬食生命、[2]静県大・食栄、[3]神戸大院・科技イノベ、[4]阪大院・情報)

○Yoshiki Sato[1], Mayu Kawasaki[1], Yoko Hirono[2], Hiroshi Kikukawa[1,2], Syogo Nakano[2], Jun Ishii[3], Fumino Matsuda[4], Yoshihiro Toya[4], Sohei Ito[2], Kiyotaka Hara[1,2] ([1]Grad. Sch. Univ. Shizuoka, [2]Univ. Shizuoka, [3]Grad. Sch. Kobe Univ., [4]Grad. Sch. Osaka Univ.)

昨今、環境負荷軽減の観点から微生物を工業利用した有用物質の生産「バイオプロダクション」は注目を集めている。しかし、微生物を改変し目的産物の生産に特化させた場合、生体内エネルギーである ATP が目的物質生産に消費され、増殖の低下や生産性の頭打ちを引き起こす場合がある。

我々の研究ではこのエネルギー不足の改善を目的としており、光駆動型プロトンポンプの一種である「微生物ロドプシン」に着目した。これまでに我々は高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* がもつデルタロドプシンを微生物細胞に導入し、ATP 再生活性を向上させ有用物質の生産性を向上させることを報告している。また、様々な種類のロドプシンによって物質の生産性が異なることも先行研究より知見が得られている。そこで、本研究ではデータベースを用いたロドプシンの改変を行い、高い物質生産性を導くロドプシンの作製を目的として、大腸菌をモデルに実験を行った。

新たに作製したロドプシン変異体の幾つかでは、これらを発現した大腸菌の生育や生体内抗酸化物質グルタチオンの蓄積が、設計のベースとしたロドプシンを発現した場合に比べて向上したことが示された。また、ロドプシンの発色やプロトン輸送能等に独特な特徴が見られた。

Bioproduction, a method for producing valuable compounds using microorganisms, is drawing attention these days as it is eco-friendly. However, genetically engineered microorganisms often cause shortage of ATP, which works as a bioenergy in cell, leading to decrease in cell growth and productivity.

As a solution, we have reported that introducing delta-rhodopsin, a light driven proton pump derived from *Haloterrigena turkmenica*, into microbial cell enhanced the ATP regeneration resulting in the improvement of bioproduction. Furthermore, different rhodopsins showed different productivity and properties. Therefore, we developed more functional rhodopsins compared to the base rhodopsins obtained from database, when they were expressed in *E. coli* as a model microbial strain.

Several reconstructed rhodopsins based on predicted sequences showed the great increase in the cell growth and productivity of glutathione, a well-known intracellular antioxidant. Additionally, some of developed rhodopsins showed unique properties; different colors, proton pump activities, and so on.

rhodopsin, bioenergy, bioproduction

発表責任者：原清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4B07-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

液胞改良による出芽酵母のエネルギー代謝の改善

Vacuole engineering for Improving energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

○大長 薫、弘埜 陽子、菊川 寛史、田村 謙太郎、原 清敬（静県大・食栄）
○Kaoru Daichou, Yoko Hirono, Hiroshi Kikukawa, Kentaro Tamura, Kiyotaka Hara (Sch.Food Nutr.Sci.,Univ.Shizuoka)

現在、微生物を用いた有用物質生産において、遺伝子組換えにより物質生産性を向上させる方法が広く用いられている。本研究を行うにあたり、我々は出芽酵母内に存在し、内部の酸性化のために多くの ATP を消費している液胞に注目した。本研究では、光駆動型プロトンポンプであるデルタロドプシンを液胞膜に局在させることで、ATP 依存的なグルタチオン生産の補強を目的とした。BY4741 株にデルタロドプシンを発現させた株では、発現させていない株に対して細胞内グルタチオン濃度が上昇した。また時間経過に従ってグルタチオン濃度は減少したが、デルタロドプシンの存在によりグルタチオン濃度の低下は抑えられた。ATP 消費を伴うグルタチオン合成の活性化は、デルタロドプシンの液胞膜への局在により生じた ATP 供給量の増加に起因すると考えられる。

本発表では、上記の研究とともに、我々が現在取り組んでいる、液胞膜の ATP 駆動プロトンポンプである V-ATPase を欠損させた株を用いてデルタロドプシン発現の効果を検証する研究と、液胞膜へのデルタロドプシンの局在を確かめる研究についても紹介したい。

Today in valuable microbial productions, genetic engineering method is widely used to improve their production potency for target products. In the current study, we focused on *Saccharomyces cerevisiae* vacuole which consumes ATP for acidification inside. Delta-rhodopsin, a light-driven proton pump, was expressed and localized on vacuole membrane. In *S. cerevisiae* BY4741 strain, delta-rhodopsin expression and localization on vacuole membrane increased ATP-dependent glutathione production. Additionally, delta-rhodopsin expression suppressed a time-dependent decrease in the intracellular glutathione concentration. The activation of ATP-consuming glutathione synthesis would be due to an increase in the ATP supply by delta rhodopsin localization in *S. cerevisiae* vacuole membrane. In our presentation, we will also introduce our two approaches that investigation of the effect of delta-rhodopsin expression in a mutant strain deleting V-ATPase, which is ATP-driven proton pump, and confirmation of the specific localization of delta-rhodopsin on *S. cerevisiae* vacuole membrane.

rhodopsin, energy metabolism, glutathione

発表責任者：大長薫（f18212@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4B07-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

Methylorubrum extorquens 内でのメタノール代替資化経路の構築とその影響

Establishment of alternative methanol-assimilation pathway in *Methylorubrum extorquens*

○鶴田 爽、平林 翼、折田 和泉、福居 俊昭（東工大生命理工）
○So TSURUTA, Tsubasa HIRABAYASHI, Izumi ORITA, Toshiaki FUKUI (Tokyo Tech)

Methylorubrum extorquens AM1 は次世代資源であるメタノールを単一炭素源として生育が可能なメタノール資化性菌である。本菌のメタノール資化にはセリン回路とエチルマロニル-CoA（EMC）経路が機能しているが、EMC 経路中の各種 CoA チオエステル中間体は生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）をはじめとした有用物質の前駆体となりうる。我々はこれまでに EMC 経路中間体を PHA 生合成に利用するための代謝改変に取り組んできたが、PHA 生産強化に伴ってメタノール生育能が低下した。そこで、メタノール資化は代替経路が担うことで EMC 経路を物質生産用経路とすることを目指し、まず、EMC 経路を遮断した株に他の C_1 資化経路を導入することでメタノール資化能が回復した株の取得を試みた。代替経路としてリブロースモノリン酸（RuMP）経路またはキシロースモノリン酸（XuMP）経路の鍵酵素遺伝子を導入したが、いずれもメタノール資化能は回復せず、メタボローム解析によってこれら代替資化経路を維持する糖リン酸の細胞内濃度が十分ではないことが示唆された（2021 年度大会発表）。本研究では EMC 経路を遮断するのではなく抑制することで生育能が低下した株を宿主とし、代替資化経路を導入した。その結果、RuMP 経路の単独導入では生育能がさらに低下したが、RuMP 経路と XuMP 経路を同時に導入した株では生育が回復することが示された。本発表では、これら代謝改変が PHA 生産に及ぼす影響も合わせて報告する。

Methanol has been expected to be a sustainable feedstock, and *Methylorubrum extorquens* AM1 is a methylotrophic bacterium that can assimilate methanol through serine cycle and ethylmalonyl-CoA (EMC) pathway. It is supposed that several kinds of CoA-thioester intermediates in EMC pathway are potential precursors for biosynthesis of value-added compounds including polyhydroxyalkanoates (PHAs) known as biodegradable plastics. However, modifications in EMC pathway often resulted in low growth ability on methanol. This study aimed to establish novel *M. extorquens* strains capable of growing on methanol through alternative C_1-assimilation pathway thus utilizing EMC pathway for bioproduction. We introduced ribulose monophosphate (RuMP) and/or xylose monophosphate (XuMP) pathways into an *M. extorquens* strain of which growth on methanol had been impaired by a modification in EMC pathway. The introduction of RuMP pathway further decreased the growth on methanol, whereas the low growth ability possibly caused by the weakened EMC pathway was interestingly restored by introduction of both RuMP and XuMP pathways. The effects of these metabolic modifications on PHA production will be also mentioned in the presentation.

Methylotrophs, Methanol, Polyhydroxyalkanoates

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4B07-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

野外から単離した微細藻類による生物変換

Biotransformation by microalgae isolated from the natural field

○藤井 洸気[1]、伊藤 賢一[1]、谷川 実[1]、東 翔子[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○ Kouki FUJII[1], Ken-ichi ITOH[1], Minoru TANIGAWA[1], Shoko HIGASHI[1], Katsushi NISHIMURA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior Coll.)

微細藻類を利用した物質変換は，基質特異性が高く，温和な条件で反応が進むことから効果的な物質生産である。また増殖が陸上植物よりも速いことから，微細藻類の利用は大気中の二酸化炭素の効果的利用法として注目されている。本研究で目的物質としたフルフリルアルコールは，ファインケミカルやポリマー産業において幅広い用途で利用されており，一般にフルフラールを還元して生産される。その製造工程において，銅クロマイト触媒に代表される化学触媒が使用されているので，環境負荷が大きい。本研究では，化学触媒に代わり微細藻類を用いて，環境調和型のフルフリルアルコールの生物合成を試みた。微細藻類の細胞内では光合成により NADPH が生成するので，この NADPH が変換反応の還元力を担うと期待された。自然界から単離した微細藻類を培養した後，培養液 100 mL に対して 30 mg のフルフラールを添加し，1 週間反応させた。その結果，4 株においてフルフリルアルコールへの還元が見られ，それらの中で最も高い収率は 90%であった。

Biocatalytic reactions using microalgae have high substrate specificity and proceed effectively under moderate conditions. Since microalgae proliferate faster than land plants, their use is attracting increasing attention as an effective way to utilize atmospheric carbon dioxide. Furfuryl alcohol is generally synthesized by the reduction of furfural, and is widely used in the fine chemical and polymer industries. However, its industrial production process involves the use of chemical catalysts such as copper chromite, which have a high environmental burden. In this study, we attempted to develop an environmentally harmonized biosynthesis of furfuryl alcohol using microalgae instead of chemical catalysts. In the cells of microalgae, the biosynthesis was expected to use NADPH produced by photosynthesis as a reducing power. After culturing microalgae isolated from nature field, 30 mg of furfural was added to 100 mL of each culture medium and allowed to react for one week. The results showed that furfuryl alcohol was produced in the culture medium of each of the four strains, with the highest yield of 90%.

Microalgae, Biotransformation, Furfuryl alcohol

講演番号：4B07-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

発酵食品中に含まれる麹菌のプレバイオティクス効果

Administration of *Aspergillus oryzae* suppresses DSS-induced colitis

○野村 亮[1]、都築 翔[1]、木村 公俊[1]、兒島 孝明[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大院・農、[2]名大院・生命農学)
○Ryo Nomura[1], Sho Tsuzuki[1], Kimitoshi Kimura[1], Takaaki Kojima[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

麹菌は、清酒、醤油、味噌、甘酒、塩麹の製造など、我が国の醸造産業に利用されており、日本の食文化に必要不可欠な存在である。発酵過程で麹菌が生産する種々の酵素や代謝産物は、発酵食品に味や香りを付与するだけでなく、それらの摂取により様々な健康効果がもたらされることが明らかになってきている。また、味噌や甘酒などの発酵食品中には、麹菌の菌体そのものも少なからず含まれている。しかしながら、麹菌の菌体そのものの摂取が宿主にどのような影響を及ぼすかは、ほとんど解明されていない。本研究では、麹菌そのもの、および麹菌を含有した食品の摂取が宿主の腸内環境に及ぼす影響の解明を目的とした。まず、我々は麹菌の摂取が宿主の腸内細菌叢に及ぼす影響を解析した。生きた麹菌の胞子および加熱滅菌した麹菌の胞子 5.0 × 10^4 個をそれぞれマウスに 14 日間毎日経口投与した。糞便試料のメタゲノム解析の結果、麹菌の生死に関わらず、麹菌の胞子を摂取することで腸内細菌叢における Firmicutes 門（*Erysipelotrichaceae* 科）の細菌の割合が減少し、 Actinobacteria 門の細菌（*Bifidobacterium* 属）の割合が 2 倍に増加した。これまでに、 腸内細菌叢における *Erysipelotrichaceae* 科細菌の増加が腸炎を引き起こし、 *Bifidobacterium* 属細菌が生産する短鎖脂肪酸が大腸炎を緩和すると報告されている。そこで次に、麹菌の摂取が大腸炎を抑制するかを検討した。デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を用いて人為的に大腸炎を誘発させたマウスに、生きた麹菌の胞子および加熱滅菌した麹菌の胞子（5.0 × 10^4 個; 0.13 mg）を 19 日間毎日投与したところ、それらを投与しないマウス（コントロール）と比較して大腸炎による大腸の萎縮や組織の損傷が抑制され、炎症誘導性サイトカインの血漿中濃度も低下した。さらに、麹菌胞子から調製した細胞壁画分（0.10 mg）を投与することでも大腸炎が抑制された。本研究により、麹菌とその細胞壁画分がプレバイオティクス効果を有しており、新たな健康食品および素材として利用できることが示された。

Aspergillus oryzae, a filamentous fungus, has long been used for the production of traditional Japanese foods. Here, we analyzed how *A. oryzae* administration affects the intestinal environment in mice. The results of 16S rRNA gene sequencing of the gut microbiota indicated that after the administration of heat-killed *A. oryzae* spores, an anti-inflammatory *Bifidobacterium pseudolongum* strain showed an increase in relative abundance, reaching a population 2.0-fold higher than that of the control. Next, we examined the effect of *A. oryzae* spore administration on the development of colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) in mice; we found that the colitis was alleviated by not only heat-killed *A. oryzae* spores, but also the cell wall extracted from the spores. Our findings suggest that *A. oryzae* holds considerable potential for commercial application in the production of both traditional Japanese fermented foods and new foods with prebiotic functions.

Aspergillus oryzae, *Bifidobacterium pseudolongum*, DSS-induced colitis

発表責任者：野村亮（nomuraryo94@gmail.com）

講演番号：4B07-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

ニコチンアミドモノヌクレオチドを生産する乳酸菌の検索

Screening of lactic acid bacteria producing nicotinamide mononucleotide

○吉野 都[1]、杉山 風音[1]、飯島 加奈[1]、道羅 英夫[1,2]、時本 悠司[3]、西川 孝治[3]、井戸垣 秀聡[3]、吉田 信行[1] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研、[3](株)大阪ソーダ)
○Miyako YOSHINO[1], Kazane SUGIYAMA[1], Kana IIJIMA[1], Hideo DOHRA[1,2], Yuji TOKIMOTO[3], Koji NISHIKAWA[3], Hideaki IDOGAKI[3], Nobuyuki YOSHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST, [3]Osaka Soda Co., Ltd)

ニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）は、サーチュイン遺伝子を活性化し、加齢に伴う機能低下や様々な疾患予防に有効であることがマウスを用いた基礎研究で報告されている。また最近、ヒトに関しても初めての NMN の有効性を示す結果が報告され話題となっている。すでに NMN そのものあるいは、含有するサプリメントが上市されているが、それらは非常に高価である。本研究では、安価な NMN の供給、プロバイオティクス的な相乗効果も期待して、NMN を生産する乳酸菌をスクリーニングした。NMN の脱リン酸化化合物であるニコチンアミドリボシド(NR)を要求する酵母を用いた NMN/NR のバイオアッセイ系を構築し、通性嫌気性乳酸菌 174 株のライブラリーから 3 つの候補を得た。3 つの候補はいずれも *Fructobacillus* 属であり、MRS 培地で培養すると菌体外に NR を生産するが（0.8～1.5 mg/L）、菌体内には NMN が蓄積していることが分かった。候補株の 1 つである RD012353 株のゲノム解析の結果、哺乳類には存在するが、微生物ではあまり報告されていないニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼが、本菌の NMN および NR 産生の鍵となる酵素であることが示唆された。

Nicotinamide mononucleotide (NMN), an intermediate in nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis, is recently attracting attention as it has been reported that NMN activates the sirtuin genes and is effective against various diseases associated with aging. The surprising efficacy of NMN should promote commercial product of NMN-containing products, and some companies do provide some supplements containing NMN. However, current commercial products containing NMN are very high-priced. In this study, we screened lactic acid bacteria for intracellular and/or extracellular NMN production. An auxotrophic yeast that requires nicotinamide riboside (NR; dephosphorylated NMN) was used to construct a bioassay system for NMN/NR, and three candidates were obtained from a library of 174 strains of facultative anaerobic lactic acid bacteria. All three candidates belonged to the genus *Fructobacillus* and produced NR in the culture media (0.8-1.5 mg/L), and NMN in the cells (1.0-2.0 mg/L). Draft genome sequencing for one of the candidates, RD012353 suggested that nicotinamide phosphoribosyltransferase, which exists commonly in mammals but is less reported in microorganisms, is a key enzyme for NMN and NR production in the fructophilic bacteria.

nicotinamide mononucleotide, nicotinamide riboside, lactic acid bacteria

発表責任者：吉田信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4B07-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌による鰹節（荒節）の燻煙香成分の代謝分解
Metabolism of *O*-methoxyphenolic and pyrazine compounds in smoked katsuobushi by *Aspergillus* spp.
藤原 卓巳[1]、米子 響[1]、木村 行宏[1]、横田 仁子[2]、土居 幹治[2]、○竹中 慎治[1]（[1]神戸大院農、[2]マルトモ（株））
Takumi Fujiwara[1], Hibiki Yonago[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[2], Mikiharu Doi[2], ○Shinji Takenaka[1] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. of Agric., [2]Marutomo co.,)

【目的】鰹節は、荒節と枯節の 2 種類に大別される。鰹肉を煮熟・焙乾した荒節は、深い味わいとうま味のあるだしの素となり、荒節をかび付け発酵した枯節は、脂質の分解や焙乾由来燻煙香の低減から、まろやかで上品な味わいのだしの素となる。焙乾・燻蒸は、保存性の向上や燻煙特有の香味を付加するための加工法であったが、薬品臭や焦げ臭と表現される成分も含む燻煙香は、好みが分かれる。よって、同成分の微生物代謝に関する知見は、発酵期間の短縮や枯節の品質向上に寄与できる。本研究では、薬品臭や焦げ臭と表現されるメトキシフェノール類（MPs）およびピラジン類（Pyzs）の代謝産物の同定を行い、鰹節カビにおける代謝系を推定することを目的とした。
【方法】既報の方法を参考に[1,2]、MY20 液体培地で 5 種の鰹節カビを培養後、MPs または Pyzs を添加し、さらに 2 週間培養した。つづいて、ジエチルエーテルにて培養液中の MPs または Pyzs および代謝中間体を抽出後、GC-MS 分析に供した。[1) Yamauchi and Doi, Biosci. Biotechnol. Biochem., 61: 1386-87 (1997); 2) Takenaka et al., Int. J. Food Microbiol., 327: 108654 (2020)]
【結果】MPs (2-methoxyphenol, 2-methoxy-5-methylphenol, 2,6-dimethoxyphenol, 2-methoxy-4-propylphenol, 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldeyde (vanillin)) の中で、4H3MB 以外はその水酸基が *O*-メチル化されたジメトキシベンゼン類へと代謝されていた。一方、vanillin からは代謝中間体として methoxyhydroquinone (MHQ)、vanillyl alcohol 等を同定することができた。一方、Pyzs 由来代謝物は、70～80%が代謝されていた。5 種の試験菌株間において、代謝・変換率に相違は見られたが、いずれの鰹節カビも薬品臭や焦げ臭の低減に寄与すると結論した。
【Abstract】 Katsuobushi is divided into arabushi (smoke-dried filet) and karebushi, a tuna filet fermented and ripened by mycobiota consisted of xerophilic *Aspergillus* spp. The mycobiota contribute to the metabolism and/or degradation of smoke odor compounds, *O*-methoxyphenols (MPs) and pyrazines (Pyzs) in arabushi, the broth extracted from karebushi results in a clear liquid with a harmonious and rich taste. Our aim is to elucidate metabolic fate of the smoke odor compounds by those xerophilic molds via identification of the metabolites. Among five tested MPs, the MPs were converted to the corresponding dimethoxybenzenes, except 4H3MB (vanillin). 4H3MB was metabolized to MHQ and vanillyl alcohol. Pyzs were also metabolized by the four molds, among the tested five molds.

Aspergillus spp., *O*-methoxyphenol, pyrazine

発表責任者：竹中　慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4B07-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

バクテロイデス属細菌の胆汁酸脱抱合活性の比較解析

Comparative analysis of bile acid deconjugation activity of Bacteroides species

○今西 陸、パタナポン ターダッタ、中山 二郎（九大院農）
○Riku Imanishi, Therdtatha Phatthanaphong, Jiro Nakayama (Kyushu Univ.)

【目的】肝臓で合成され、胆嚢から腸管へと分泌される胆汁酸は、脂質の消化吸収の一次機能に加えて、宿主受容体を介するホルモン様作用も有することが注目されている。胆汁酸分解に関る腸内細菌は、胆汁酸を脱抱合し、これをさらに修飾し、二次胆汁酸へと変換する。先行研究 [1)] で２型糖尿病患者の抱合型胆汁酸量と *Bacteroides fragilis* が逆相関することが示されている。一方 *Bacteroides dorei* は優占種であるが、*B. fragilis* のような相関は示さなかった。またバクテロイデス属細菌はヒトの腸内に多く生息する常在菌であることから、本研究ではこの２菌種に着目し、胆汁酸脱抱合活性を *in vitro* で比較することにした。**【方法および結果】**600 μM および 900 μM の種々タウリンおよびグリシン抱合型胆汁酸（コール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸）をＧＡＭ培地に加え *B. fragilis* と *B. dorei* を２４時間培養し、OD 660 nm 測定とともに、培養液内の抱合型胆汁酸の残存量を LC-MS/MS で測定した。*B. fragilis* においてはタウリンおよびグリシン抱合型とも 12 時間で検出限界下まで分解したのに対し、*B. dorei* は特にグリシン抱合型胆汁酸が弱く、24 時間後でも 30% 以上の胆汁酸が残存していた。本発表では他種のバクテロイデスや脱抱合能を持つことが知られる乳酸菌やビフィズス菌とも比較解析結果も発表する予定である。

[Purpose] Bile acids (BAs) secreted into intestine are deconjugated by bile salt hydrolase (BSH) of some species of gut microbes and then further modified to secondary BAs. The series of BAs interplay between gut microbiota and host. For example, our previous study[1)] indicated that Type 2 Diabetes patients have high level of *Bacteroides fragilis* in association with depletion of conjugated BAs known as FXR antagonist to control blood glucose level. On the other hand, most dominant *Bacteroides* species, *B. dorei*, did not show the negative correlation. To understand this difference *in vitro*, BSH activity of these two *Bacteroides* species were compared. [**Methods]**These two *Bacteroides* species were cultured in GAM containing 600 μM BA, as well as 900 μM BA (conjugated forms of cholate, chenodexycholate, ursodeoxycholate). OD 660 nm and was recorded for 24 hours, and the amount of deconjugated BA was quantified by LC-MS/MS. **[Results]** The growth of *B. fragilis* and *B. dorei* were somewhat decreased at higher concentration of BA. *B. fragilis* depleted both taurine and glycine conjugated BAs at12 h, while *B. dorei* showed weaker BSH activity, especially for glycine conjugated BA even at 24h.

1) P. Therdthata et al., Microorganisms, 2021, 9, 897.

Gut microbiota, *Bacteroides*, Bile acids

講演番号：4B07-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

無機―生体ハイブリッド系による可視光駆動型水素生産

Visible light-driven hydrogen production using *Escherichia coli* expressing hydrogenase genes with cadmium sulfide precipitate

○本田 裕樹 [1]、篠原 優佳 [1]、渡邊 源規 [2]、石原 達己 [2,3]、藤井 浩 [1] ([1] 奈良女大理、[2] 九州大 WPI-I2CNER、[3] 九州大工)
○Yuki HONDA[1], Yuka SHINOHARA[1], Motonori WATANABE[2], Tatsumi ISHIHARA[2,3], Hiroshi FUJII[1] ([1]Nara Women's Univ., [2]WPI-I2CNER, Kyushu Univ., [3]Fac. Eng., Kyushu Univ.)

【背景・目的】演者らは、無機半導体光触媒による高安定で高効率な光―化学エネルギー変換と、酸化還元酵素による高選択的で高効率な物質変換を組み合わせた無機―生体ハイブリッド系を構築し、光を利用するクリーンな物質生産系の提案を目指してきた [1)]。本講演では、[FeFe]-ヒドロゲナーゼを高生産する組換え大腸菌に硫化カドミウム（CdS）を形成させた CdS-大腸菌系の構築と、その可視光駆動型水素生産能の評価 [2)]について報告する。
【方法および結果】*Clostridium acetobutylicum* 由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼおよび修飾酵素遺伝子を有するプラスミドを保持する大腸菌を供試菌とした。培養した菌体をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、$CdCl_2$ とシステインを添加して CdS を形成させた。CdS 形成後の菌体を回収後、[FeFe]-ヒドロゲナーゼを生産させ、これを回収して（CdS-大腸菌）を光駆動水素生産に供した。CdS-大腸菌、電子メディエータ（メチルビオローゲン）、電子供与剤（BisTris）を含む反応溶液を調製し、光照射下での水素生産を試験した。ヒドロゲナーゼ遺伝子を発現した CdS-大腸菌からは光照射依存的な水素生成が確認された一方、空ベクターを導入した CdS-大腸菌からは水素生成が検出されなかった。以上より、CdS 形成と[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子導入を組み合わせた微生物触媒による光駆動型水素生成に成功した [2)]。さらに、システインからの S^{2-} の生成を促進するシステインデスルフヒドラーゼの遺伝子を導入した大腸菌を作製し、CdS 形成能を評価した。
【謝辞】本研究は公益財団法人関西エネルギー・リサイクル科学研究振興財団 2020 年度試験研究助成を受けて実施した。
1) Honda, Y., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 8045-8048 (2016); *Appl. Catal. B*, **210**, 400-406 (2017).
2) Honda, Y., et al., *ChemBioChem*, **21**, 3389-3397 (2020).

An inorganic-bio hybrid, which integrates both features of stable and efficient semiconductor photocatalysts and selective and efficient biocatalysts, contributes to an efficient solar energy conversion. Here, we develop a new photocatalytic hydrogen production system, based on the combination of the bacterial cadmium sulfide (CdS) precipitation and the genetic engineering in *Escherichia coli* (CdS-*E. coli*). The CdS-*E. coli* hybrid achieved photocatalytic hydrogen production with a sacrificial electron donor, demonstrating the visible-light-driven hydrogen production using a whole-cell biocatalyst with a bacterially precipitated semiconductor.

hydrogenase, hydrogen production, photocatalyst

発表責任者：本田裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：4B07-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム B

ヒメマツタケ（*Agaricus blazei* Murrill）菌糸体由来抽出液が有する免疫チェックポイント阻害活性
Inhibition of immune checkpoint molecules by *Agaricus blazei* Murrill's mycelia extracts

○小堀 一[1]、多田 有人[1]、戸田 雅昭[2]、ダレッサンドロガバザ コリナ[2]、ガバザ エステバン[2] ([1]岩出菌学研究所、[2]三重大医)
○Hajime KOBORI[1], Naoto TADA[1], Masaaki TODA[2], Corina N. D'alessandro-Gabazza[2], Esteban C. Gabazza[2] ([1]Iwade Research Institute of Mycology CO., Ltd, [2]Mie University, School of Medicine)

【背景・目的】ヒメマツタケ（*Agaricus blazei* Murrill）は、ブラジル原産のハラタケ属に属する食用及び薬用キノコである。岩出亥之助が初めて人工栽培法を開発し、1975 年から株式会社岩出菌学研究所より栽培・提供されている[1,2)]。我々は過去の本大会において、ヒメマツタケ子実体由来のアルカリ抽出物や亜臨界水抽出物が *in vivo* 及び *in vitro* で免疫チェックポイント分子であるガン細胞上で発現するリガンド、PD-L1（Programmed cell death ligand 1）および PD-L2（Programmed cell death ligand 2）などの発現を有意に低下させることを報告した[3,4)]。本研究では、子実体の人工栽培が不要である菌糸体に注目し、ヒメマツタケ菌糸体由来の抽出物にも同様の活性があるか調べることを目的として、菌糸体の熱水抽出物、亜臨界水抽出物及び熱水抽出残渣亜臨界水抽出物の抽出条件の検討や活性の有無を調べた。

【方法・結果】ヒメマツタケ（岩出 101 株）菌糸体を 80～100℃の熱水で 3 時間抽出し、得られた熱水抽出液を凍結乾燥して熱水抽出物を得た。一方、菌糸体あるいは熱水抽出残渣を 2～5MPa、120～200℃の条件下で 5～240 分間亜臨界水抽出し、得られた抽出液をそれぞれ凍結乾燥に供して亜臨界抽出物および熱水抽出残渣亜臨界抽出物を得た。これらの抽出物を A549 肺ガン細胞に対する *in vitro* での免疫チェックポイント阻害活性試験に供した結果、いずれの抽出物にも免疫チェックポイント分子（PD-L1、PD-L2）や AXL の発現を有意に抑制する活性があることが明らかとなった。

Agaricus blazei Murrill (ABM; Japanese name: "Himematsutake," Iwade strain 101), an edible and medicinal mushroom belonging to the Agaricus family, has been produced at Iwade Research Institute of Mycology since 1975[1,2)]. We previously reported that the alkaline extract and subcritical water extract of ABM's fruiting bodies inhibit the expression of immune checkpoint molecules (PD-L1, PD-L2) and AXL in A549 lung cancer cells [3,4)]. In this study, we investigated whether ABM's mycelia extract inhibits the expression of immune checkpoint molecules and AXL. The present study results showed that the hot water extract, subcritical water extract, and the hot water extraction residue subcritical water extract from the ABM's mycelia significantly inhibit the expression of immune checkpoint molecules (PD-L1, PD-L2) and AXL in the A549 lung cancer cell line.

1）岩出　亥之助，日本菌学会会報，23，(1982)，p. 544-546
2）河岸　洋和ら，きのこの生物活性と応用展開，シーエムシー出版、(2021)，pp168-177
3）原田　栄津子ら，2019 年度日本農芸化学会大会講演要旨集
4）小堀　一ら，2020 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Agaricus blazei Murrill, subcritical water extraction, immune checkpoint inhibitory activity

発表責任者：小堀一（kobori@iwade101.com）

講演番号：4B09-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

脳機能改善に資するチロシンあるいは Dopa を含むジペプチドの効率的生産

Efficient Production of Dipeptides Containing Tyrosine or Dopa for Brain Function Improvement

○本元 敦也[1]、佐怒賀 悠[1]、古渡 翔[1]、中森 俊宏[2]、木野 邦器[1]([1]早大・先進理工・応化、[2]不二製油)
○Atsuya Hommoto[1], Yu Sanuka[1], Kakeru Kowatari[1], Toshihiro Nakamori[2], Kuniki Kino[1] ([1]Sci. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ, [2]Fuji Oil Holdings Inc)

L-チロシン(Tyr)やその水酸化物である L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa)は、容易に血液脳関門を通過し、脳内では神経伝達物質であるカテコールアミンの前駆体としての役割を有するため、脳機能改善に資する医薬品やサプリメントとして利用されている。一方、Tyr 含有ジペプチドの服用による脳内カテコールアミン代謝の活性化が報告されていることから、我々は Tyr 含有ジペプチドの効率的な酵素合成法を検討し、L-アミノ酸リガーゼ (Lal)を用いる菌体反応法により、β-Ala-Tyr を対象として基質アミノ酸に対してモル変換率 70%の高生産プロセスを報告した[1)]。本プロセスは当該合成反応に必須である補酵素 ATP の外部添加を必要としない工業的にも有用なプロセスである。しかしながら、生体内では Tyr の水酸化が律速であることから、カテコールアミン濃度を高めるには Dopa を含有するジペプチドの利用がより望ましいと考えた。本研究では、β-Ala-Tyr の生産法を踏まえてβ-Ala-Dopa の菌体反応系による効率的な生産プロセスの開発を検討した。

β-Ala-Dopa も Lal の精製酵素を用いた反応で合成は可能であったが、反応至適 pH であるアルカリ領域において Dopa の酸化による反応液の黒色化と低収率を観察した。還元剤の種類と添加条件を検討することで改善し、約 90%の高収率を達成した。一方、菌体反応系を利用した低コストプロセスでは、宿主大腸菌における基質の分解や透過性には問題はなかったが、β-Ala-Dopa の分解が顕在化した。ペプチド分解酵素である PepD の欠損変異を付与することで分解を抑制することができ、対基質モル変換率 70%を越える高収率を達成した。現在、反応条件の最適化を検討しており、併せて報告する。

1) 佐怒賀, 木野：日本農芸化学会 2020 年度大会, 4A16a03.

L-Tyrosine (Tyr) and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa) can easily cross the blood-brain barrier and serve as precursors of catecholamines, which are neurotransmitters in the brain, and are therefore used as drugs and supplements to improve brain function. Since it has been reported that Tyr-containing dipeptides activate the metabolism of catecholamines in the brain, we investigated an efficient enzymatic synthesis method using L-amino acid ligase (Lal) for Tyr-containing dipeptides such as β-Ala-Tyr and β-Ala-Dopa. In the case of the production process of β-Ala-Dopa by the whole cell reaction system, although some new issues became apparent, such as the decrease in synthesis yield due to oxidation of the substrate Dopa and the degradation of β-Ala-Dopa by the host *E. coli*, we achieved a high yield of over 70% in terms of substrate molar conversion.

dipeptide, L-amino acid ligase, catecholamine

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：4B09-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

バイオプロセスによるイミダゾールジペプチドの工業的生産技術の開発

Development of industrial production technology of imidazole dipeptide by bioprocess

○倉本 歩[1,3]、木野 邦器[1,2]、佐藤 謙一郎[3]、岡田 行夫[3]([1]早大・理工総研、[2]早大院・先進理工・応化、[3]東海物産株式会社)
○Ayumu KURAMOTO[1,3], Kuniki KINO[1,2], Kenichiro SATO[3], Yukio OKADA[3] ([1]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]Tokai bussan Co., Ltd.)

イミダゾールジペプチド（IDPs）は抗酸化作用や抗疲労効果、認知機能改善効果などの多様な生理機能を有する化合物として注目されている。IDPs の製造は、専ら魚肉や鶏肉からの抽出法に依存しているが、それぞれ天然原料の供給不安定性、養鶏時の温室効果ガス排出などの課題がある。我々はこれらの課題を解決するため、これまでに基質アミノ酸からの直接合成を可能とする L-アミノ酸リガーゼ(Lal)に着目し、その改変酵素を発現させた大腸菌を反応触媒とする ATP の外部添加を必要としない効率的な IDPs 生産法を開発してきた[1),2)]。本研究ではカルノシンを生産モデルとして工業プロセスの確立に向けて検討を行った。組換え大腸菌の調製における Lal の発現誘導に使用していた IPTG を安価で食品利用可能なラクトースへ変更し、5 L 容ジャーファーメンターで反応を検討したところ、対基質モル変換率 98.8%でカルノシン合成を達成した。さらに、当該反応液から数ステップの精製工程を経て、純度 98.3%の高純度粉末カルノシンの取得に成功した。

本研究の一部は、NEDO のバイオモノづくり PJ：PJ20011(JM08)の支援を受けて行われた。

1）駒林ら，日本生物工学会 2018 年度大会講演要旨集，3Ma03
2）倉本ら、日本農芸化学会 2019 年度大会講演要旨集，1D7p12

Imidazole dipeptides (IDPs) are well-known compounds with various physiological functions such as antioxidant, anti-fatigue and cognitive function improvement effects. The production of IDPs relies exclusively on extraction methods from fish meat and poultry meat, but each of these methods has its own problems, such as unstable supply of natural raw materials and greenhouse gas emissions during poultry farming. In order to solve these problems, we have focused on L-amino acid ligase (Lal), which enables direct synthesis from substrate amino acids, and have developed an efficient IDPs production method that does not require external addition of ATP using *E. coli* expressing the modified enzyme as a reaction catalyst[1),2)]. In this study, we used carnosine as a production model to establish an industrial process. IPTG, which was used to induce Lal expression in the preparation of recombinant *E. coli*, was changed to lactose which is inexpensive and available for food use. The carnosine synthesis with a molar conversion rate of 98.8% to substrate was achieved in a 5 L jar-fermentor. Furthermore, we succeeded in obtaining high-purity carnosine powder with 98.3% purity from the reaction solution through several steps of purification process. This research was partially supported by PJ20011(JM08) from NEDO.

Imidazole dipeptide, Bioprocess, L-amino acid-α-ligase

講演番号：4B09-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

非リボソーム型ペプチド合成酵素のモジュール構成に着目したアデニル化ドメインの探索とジペプチド類似体合成への展開

Search for Adenylation Domains in Non-Ribosomal Peptide Synthases and Their Application to the Synthesis of Dipeptide Analogues

○永瀬 あゆみ[1]、鈴木 伸[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大・先進理工、[2]早大・理工総研)
○Ayumi NAGASE[1], Shin Suzuki[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ)

ペプチドは血圧降下作用や鎮痛作用など様々な生理活性を有するが、生体内で加水分解を受けやすく膜透過性が低いことなどが創薬上の課題となっている。こうした課題に対し、我々は天然に存在する特殊ペプチドの構造に倣い、構成アミノ酸をα–ケト酸やα–ヒドロキシ酸に置換したペプチド類似体などの効率的な合成法の開発を行っている。これまでに、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)のアデニル化ドメイン(A ドメイン)を利用する化学酵素的反応によるジペプチド類似体の合成に成功している [1)]。本研究では、合成可能なジペプチド類似体の拡張を目的に A ドメインの探索を行った。

我々は、エピメリ化ドメインの上流に存在する A ドメインは、基質アミノ酸の光学異性に関わらずアデニル化するものが多いことを明らかにしている [1)]。その実験的事実を踏まえ、α–ケト酸を含有するペプチド合成を担う NRPS において、そのモジュール構成と A ドメインの基質認識においても、ケトレダクターゼドメイン(KR ドメイン)の上流に位置する A ドメインは生理基質であるα–ケト酸に加えα–ヒドロキシ酸も基質にするという仮説を立てた。そこで、*Streptomyces orinoci* NBRC 13466 由来 neoantimycin synthetase の中から候補となる 3 つの A ドメイン(NatB2-A, NatB3-A, NatD-A)を選択し、L-Pro を求核剤とした化学酵素的アミド結合形成反応によるジペプチド類似体の合成の可否によってこの仮説の検証を行った。その結果、予想通り、全ての A ドメインが生理基質であるα–ケト酸に加えα–ヒドロキシ酸を認識し、α–ケトイソ吉草酸など 16 種類のカルボン酸への拡張に成功した。

1) 木野ら，生化学，**93**(3), 338-348 (2021).

Peptides have various biological activities but their easily hydrolyzed is one of obstacles in drug development. To overcome this obstacle, we focused on dipeptide analogs containing α-keto acids or α-hydroxy acids. Dipeptide analogues have been successfully synthesized by chemoenzymatic amide bond formation using adenylation domain (A domain) of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS). The objective of this study is to obtain new A domains and to expand the range of synthesizable dipeptide analogues.

We selected three A domains of neoantimycin synthetase from *Streptomyces orinoci* NBRC 13466 (NatB2-A, NatB3-A, NatD-A) because these are located upstream of the ketoreductase domain (KR domain). Using these A domains, dipeptide analogues were synthesized 16 kinds of α-keto acids and α-hydroxy acids as substrates and L-Pro as a nucleophile, so that expanding the range of possible syntheses is succeeded. KR domain can be used as an indicator to search for A domains that recognize α-hydroxy acids as substrates.

dipeptide analogues, adenylation domain, chemoenzymatic synthesis

発表責任者：木野　邦器（kkino@waseda.jp）

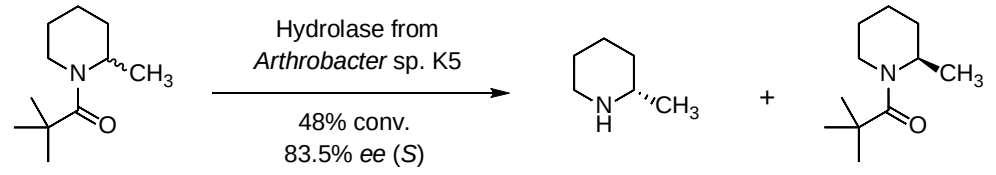
講演番号：4B09-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

Enantioselective synthesis of cyclic amines using a novel hydrolase

○Yuta FUKAWA, Yuta MIZUNO, Keisuke KAWADE, Koichi MITSUKURA, Toyokazu YOSHIDA (Gifu Univ.)

Chiral cyclic amines, which comprise a piperidine, piperazine, or pyrrolidine skeleton, are widely used as building blocks of pharmaceuticals and pesticides. The enzymatic synthesis of them has been successfully done via asymmetric reduction using imine reductases, but it requires the synthesis of cyclic imines as substrates. Kinetic resolution is another approach for preparing chiral compounds, in which the racemates are used as substrates. Although the existing hydrolases have been used to synthesize chiral secondary amines, there is no approach to directly obtain chiral 2-substituted piperidines from racemic *N*-acyl derivatives by an enantioselective hydrolase.

In this study, we screened the stereoselective hydrolases acting on *rac*-*N*-acyl-2-methylpiperidine from soil microorganisms for one-step preparation of chiral 2-methylpiperidine (2-MPI). We found that the strain K5 revealed moderate (*S*)-selectivity toward *N*-acetyl-2-MPI kinetically, yielding racemic 2-MPI. When we substituted the acetyl group with a bulky pivaloyl group, the whole cells of strain K5 exhibited high (*S*)-selectivity toward the substrate to yield (*S*)-2-MPI with 22% conversion and 88% *ee* in 72 h. The hydrolase gene was identified by analyses of partial amino acid sequences of the purified enzyme and genome sequence of *Arthrobacter* sp. K5. A BLAST search with full-length amino acid sequence of the hydrolase revealed moderate sequence identity with the amidohydrolase protein family, including phenylurea hydrolases (<66%), and the highest sequence identity (67%) with the molinate hydrolase from *Gulosibacter molinativorax*. The recombinant cells overexpressing the hydrolase gene produced (*S*)-2-MPI with 48% conversion and 83.5% *ee* from 100 mM *rac*-*N*-pivaloyl-2-MPI. These results suggest the possibility of an efficient preparation of chiral 2-MPI in kinetic resolution.



rac-*N*-Pivaloyl-2-methylpiperidine　(*S*)-2-Methylpiperidine　(*R*)-*N*-Pivaloyl-2-methylpiperidine

kinetic resolution, hydrolase, cyclic amine

発表責任者：満倉浩一（mitukura@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B09-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

微生物酵素を利用した S-置換システインスルフォキシドの立体選択的合成

Stereoselective synthesis of S-substituted cysteine sulfoxides by microbial enzymes

○水谷 拓[1]、原 良太郎[2]、竹内 道樹[2]、日比 慎[3]、上田 誠[2,4]、小川 順[1]([1]京大院農・応生、[2]京大院農・産業微生物、[3]富山県大工、[4]小山高専)

○Taku MIZUTANI[1], Ryotaro HARA[2], Michiki TAKEUCHI[2], Makoto HIBI[3], Makoto UEDA[2,4], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sci. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbial., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Toyama Pref. Univ., [4]NIT, Oyama College)

【目的】ニンニク特有の成分である(+)-alliin は，抗酸化作用，抗糖尿病効果などの多様な生理活性があり，健康増進効果が注目されている。その生産法は，主に植物からの抽出に依存しているが，安定供給に対する懸念から，代替プロセスが求められている。本研究では，微生物酵素に着目した新たな(+)-alliin 生産プロセスの開発を目指した。

【方法および結果】大腸菌由来トリプトファンシンターゼ (TrpAB) は，チオールと L-セリンから S-置換システイン合成を可能とする。当研究室で見出した *Bacillus thuringiensis* 2e2 由来 L-イソロイシンジオキシゲナーゼ (IDO) は立体選択的酸化により S-置換システインをスルフォキシド化する。そこで，これらの酵素を組み合わせることで(+)-alliin の生産が可能と推察した。TrpAB と IDO をコードする遺伝子を共発現させた大腸菌を調製し, 休止菌体反応を検討した。その結果, アリルメルカプタン, L-セリン，および α-ケトグルタル酸 (α-KG) からワンポットで立体選択的に(+)-alliin を合成することができた。さらに，様々なチオール類を基質とすることで，多様な S-置換システインのスルフォキシド合成も可能であった。本プロセスは，(+)-alliin の効率的な供給法の構築が望めるだけでなく，希少な S-置換システインスルフォキシドを合成するツールとしても期待できる。

(+)-Alliin, a unique sulfoxide contained in garlic, has recently attracted much attention as it has a great potential to prompt our health. Tryptophan synthase (TrpAB) from *E. coli* catalyzes the synthesis of S-substituted cysteines from thiol and L-serine. We revealed that L-isoleucine dioxygenase (IDO) from *Bacillus thuringiensis* 2e2 catalyzes stereoselective sulfoxidation of S-substituted cysteines. Then, we aim to develop a bioprocess for (+)-alliin using *E. coli* co-expressing genes encoding TrpAB and IDO. Consequently, (+)-alliin was obtained from allyl mercaptan, L-serine, and α-ketoglutaric acid with high stereoselectivity. Furthermore, this process enabled the synthesis of various S-substituted cysteine sulfoxides. These findings would serve as a promising tool for synthesizing useful S-substituted cysteine sulfoxides, including (+)-alliin.

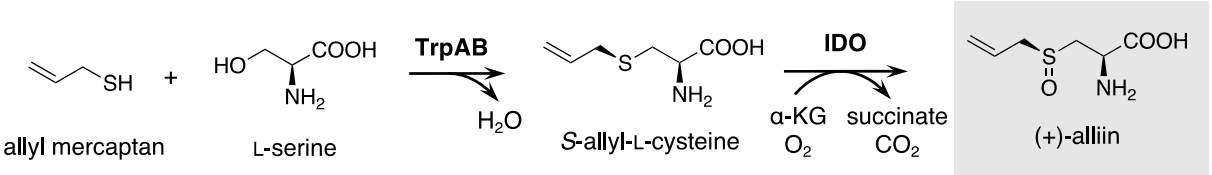


Fig. The stereoselective synthesis of (+)-alliin by TrpAB and IDO.

alliin, microbial enzyme, stereoselective

発表責任者：小川順（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B09-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

大腸菌のγ-グルタミルトランスペプチダーゼの菌体表面提示とその菌体を用いたγ-グルタミルバリルグリシンの酵素合成

Expression of GGT on the cell surface of *E.coli* and enzymatic synthesis of γ-Glu-Val-Gly using these strain

○笹生 明日香、鈴木 秀之（京工繊大応生）
○Asuka SASABU, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology)

γ-Glu-Val-Gly はコク味物質として食品添加物として登録されている。演者らは精製した大腸菌の γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)の転移反応を用いて、Gln と Val-Gly からγ-Glu-Val-Gly を酵素合成できることを報告した(1)。一般的に、酵素法による物質合成は、特異性が高く、マイルドな条件で反応が進むという長所がある一方で、酵素の調製コストが欠点となる。そこで、酵素を発現している菌体そのものの利用なども報告されている。精製した大腸菌 GGT の転移活性は塩基性条件下では、加水分解活性に比べて 10 倍程度ある。大腸菌 GGT はペリプラズム酵素であり、菌体のままでも酵素活性を示すが、ほとんどが加水分解活性であることから、γ-グルタミル化合物の合成には向いていない。GGT を菌体表面に提示すれば、反応液中の精製酵素に似た状況を作り出すことができ、GGT を精製することなく、γ-グルタミル化合物の合成に利用できると考えた。アンカータンパク質として知られている大腸菌の $YiaT^{R232}$ あるいは納豆菌の CapA (YwtB)に大腸菌の GGT をプロテインフュージョンさせるように設計したプラスミドをγ-グルタミル結合切断活性を持つ GGT と PuuD を欠失した大腸菌株に導入した。これらの菌体を抗大腸菌 GGT 抗体、次いで Alexa Fluor 488 を結合した抗ウサギ IgG 抗体と反応させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、菌体が蛍光を示したことから、GGT が菌体表面に提示できたことを確認した。GGT を菌体表面に提示できた大腸菌株はいずれも、食塩を含む反応液中で転移活性が優先となり、その菌体を用いて Gln と Val-Gly から約 15 mM のγ-Glu-Val-Gly を合成することに成功した。

E. coli GGT is a periplasmic enzyme, and the whole cells mainly hydrolyze γ-glutamyl linkages even in alkaline pH. We speculated that if GGT could be expressed on the outer surface of the cells, the surrounding of GGT might mimic the purified GGT in the reaction solution, and the whole cells could be used for γ-glutamyl compound production. Plasmids were designed to express fusion proteins $YiaT^{R232}$ *E. coli*-GGT and $CapA^{B.\ natto}$ (YwtB)-GGT. *E. coli* strain deficient in GGT and PuuD was transformed with these plasmids. The transformants were reacted with anti-*E. coli* GGT antibody, followed by Alexa Fluor 488 bound anti-rabbit IgG antibody, and observed under a fluorescence microscope. It was confirmed by fluorescence that GGT was expressed on the outer surface of the cells. The transpeptidation activity of these cells was higher than the hydrolysis activity, and approximately 15 mM of γ-Glu-Val-Gly was able to produce from Gln and Val-Gly using the whole cells of these strains.

Ref.-1 T. Fukao, H. Suzuki. **J. Agric. Food Chem.** *69*:7675-9 (2021).

γ-glutamyltransferase, kokumi peptide, poly-γ-glutamate synthetase

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：4B09-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

Putrescine production in Escherichia coli K-12 through the arginine decarboxylase pathway
○Kullathida Thongbhubate, Irie Kanako, Sakai Yumi, Itoh Akane, Suzuki Hideyuki (Division of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology)

Polyamines have been reported as an essential factor for cell growth and proliferation. Putrescine is one of the basic polyamines which consists of four methylene groups and two amino groups. Due to the properties of nylon 4,6 that resists the chemicals and is lightweight. The nylon 4,6 is applicable to use in the automobile industry. Putrescine is a precursor of nylon 4,6. With the increasing demand for nylon4,6, the market's interest in putrescine is also increasing. To synthesize putrescine through the chemical process emitted toxic and dangerous compounds. According to this problem, the biological process was introduced to be an alternative way. Putrescine has two synthesis pathways; the ornithine decarboxylase pathway (ODC pathway) and the arginine decarboxylase pathway (ACD pathway). Ornithine decarboxylase (SpeC) directly converts ornithine to putrescine. The ACD pathway comprises two steps to synthesize putrescine; the arginine was decarboxylated by arginine decarboxylase (SpeA) to agmatine. The sequential reaction of agmatinase (SpeB) converts agmatine to putrescine. We found the over-expression of both ODC and ADC pathways showed a lower amount of putrescine than the over-expression of only the ADC pathway. Therefore, we aimed to improve putrescine production through the ADC pathway. A previous study reported that the mutation on the 19th residue of *N*-acetyl glutamate synthase (ArgA) resulted in a high concentration of arginine. Therefore, we introduced the $argA^{ATG\ Y19C}$ on a plasmid with *speAB* under the T5 promoter. Moreover, to increase the extracellular putrescine, putrescine importer and degradation genes were disrupted from the genome of the host strain. In addition, we found that a mutation on YifE protein increased the concentration of putrescine and we could produce 19.8 mM of putrescine in terrific broth with the addition of 0.01 mM IPTG.

glutamate-putrescine ligase, N-acetylglutamate synthase, macrodomain Ori protein

発表責任者：Hideyuki Suzuki（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：4B09-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム B

化学酵素的アミド結合形成反応と分子内環化反応の連携によるジケトピペラジン合成における pH の影響と制御系導入による生産性向上

Diketopiperazine production by the combination of chemoenzymatic amide bond formation and intramolecular cyclization: Effects of pH and pH-controlled production

唐鎌 翔大[1]、○鈴木 伸[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大・先進理工、[2]早大・理工総研)
Shota KARAKAMA[1], ○Shin SUZUKI[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

ジケトピペラジン(DKP)は 2 分子のアミノ酸が縮合・環化した化合物であり、構成アミノ酸の種類や立体異性により様々な機能性を発揮する。我々はアデニル化酵素を利用した化学酵素的アミド結合形成反応によるジペプチドエステル合成とその自発的な分子内環化反応を連携させた DKP のワンポット合成法を開発しており、百種類を超える DKP の合成に成功している。一方で中間体ジペプチドエステルの蓄積や原料アミノ酸残存が確認され、生産性については改良の余地がある。これまでに、環化反応は pH が 6.5~9.5 では効率的に進行するがそれ以外では顕著に抑制され、pH 条件が非常に重要であると見出している。本研究では DKP 合成反応に対する pH の影響に着目し、L-Trp と L-Pro-OMe を原料とした cyclo(L-Trp-L-Pro)合成反応をモデルに、反応経過の解析と pH 条件の検討を行った。

50 mM HEPES 緩衝液中での反応では、開始から 3 h で pH が 6.0 まで低下し、cyclo(L-Trp-L-Pro)の合成が停止していた。pH 低下を防止するため緩衝液濃度を上昇させると、100 mM では 3 h 時点で pH が 6.5 と低下が緩やかになり cyclo(L-Trp-L-Pro)の合成量が増加した。一方、400 mM では pH は 7.4 で維持されるが L-Pro-OMe から L-Pro への加水分解に起因する L-Trp-L-Pro の副生が顕著になった。本結果より、pH を中性付近で維持することで DKP の合成効率向上が可能であると推測した。そこで、pH スタットによる制御系を導入し、下限 pH を 6.5, 6.7, 6.9, 7.1 に設定して合成量を比較した。その結果、下限 pH 6.9 の場合に 24 h で最大 4.4 mM の cyclo(L-Trp-L-Pro)合成(対 L-Trp モル収率 44%)を達成した。

Diketopiperazine (DKP) is a cyclic dipeptide which consists of two amino acids. DKPs exhibit various functionality depending on kinds and chirality of constituent amino acids. We have developed one-pot DKP synthesis method: chemoenzymatic dipeptide ester synthesis using adenylating enzymes and following spontaneous intramolecular cyclization. In this study, in order to improve productivity effects of pH on DKP synthesis were analyzed and investigate the optimal pH conditions, using cyclo(L-Trp-L-Pro) synthesis as a model.

In 50 mM HEPES buffer, the synthesis of cyclo(L-Trp-L-Pro) was stopped because the pH decreased to 6.0 at 3 h. When the buffer concentration was increased to prevent pH decrease, the pH was 6.5 at 3 h and cyclo(L-Trp-L-Pro) increased in 100 mM buffer. In contrast, byproduct was increased significantly although pH was kept at 7.4 in 400 mM buffer. Based on these results, we introduced a pH control system to maintain pH near neutral and set the lower pH limit at 6.5, 6.7, 6.9, and 7.1 to compare the DKP production. As a result, a maximum of 4.4 mM cyclo(L-Trp-L-Pro) synthesis (44% molar yield vs. L-Trp) was achieved in 24 h at the lower pH limit of 6.9.

diketopiperazine, chemoenzymatic synthesis, pH control

発表責任者：木野　邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：4C01-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

ダイズ根圏でのイソフラボン分解に関与する遺伝子の同定

Identification of genes involved in isoflavone degradation in soybean rhizosphere

○青木 愛賢[1]、島﨑 智久[1,2]、矢崎 渉[1]、中安 大[1]、安藤 晃規[3]、岸野 重信[3]、小川 順[3]、増田 幸子[4]、柴田 ありさ[4]、須田 亙[5]、白須 賢[4]、矢﨑 一史[1]、杉山 暁史[1]（[1]京大・生存研、[2]理研・BRC、[3]京大・農、[4]理研・CSRS、[5]理研・IMS）

○Noritaka AOKI[1], Tomohisa SHIMASAKI[1,2], Wataru YAZAKI[1], Masaru NAKAYASU[1], Akinori ANDO[3], Shigenobu KISNINO[3], Jun OGAWA[3], Sachiko MASUDA[4], Arisa SHIBATA[4], Wataru SUDA[5], Ken SHIRASU[4], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]RIKEN, BRC, [3]Grad. Sch. of Agri, Kyoto Univ., [4]RIKEN, CSRS, [5]RIKEN, IMS）

根圏とは根から影響を受ける土壌領域である。マメ科植物のダイズはイソフラボンであるダイゼインを根圏に分泌する。ダイゼインは根粒菌との共生に必要なシグナルとなる他、ダイズ根圏微生物叢の形成に関与する。ダイゼインを土壌に添加すると、ダイズ根圏における主要な細菌種であるコマモナス科細菌が濃度依存的に増加する。しかし、これらの土壌細菌によりダイゼインは分解されると予想されるが、その分子機構は未解明である。本研究では、根圏微生物叢形成におけるダイゼインの機能を解明するため、ダイズ根圏においてイソフラボン分解に関与する酵素遺伝子の同定を目的とした。

まず、ダイズ根圏からコマモナス科細菌を単離し、ダイゼインに対する分解活性を調べたところ、*Variovorax* 属および *Acidovorax* 属の単離菌の一部において分解活性が認められた。次に、PacBio シーケンスを用いてこれらの菌株の全ゲノム配列を解析するとともに、ダイゼイン分解活性が上昇するダイゼイン添加条件でのトランスクリプトーム解析を行い、イソフラボン分解に関与する酵素遺伝子の候補を得た。候補遺伝子のうち、ホモログと考えられる２遺伝子を欠損させたところ、野生株では蓄積しないダイゼイン由来の分解産物が変異体において蓄積した。また、この遺伝子を大腸菌に異種発現させて精製したタンパク質は、この分解産物さらに分解した。以上より、本酵素遺伝子はダイゼイン分解に関与することが明らかになった。現在、この分解産物の構造決定を行うとともに、別の候補遺伝子の欠損株を用いてダイズ根圏におけるイソフラボン分解経路の解明を進めている。

Rhizosphere is defined as the zone of soil surrounding plant roots. Soybean roots secrete daidzein into the rhizosphere. Daidzein is an isoflavone, which plays a role in nodulation and shaping the microbiota in soybean rhizosphere. The relative abundance of Comamonadaceae, which is abundant in the soybean rhizosphere, is enriched in daidzein-treated soil. In this study, we screened rhizosphere bacteria to identify enzymatic genes involved in isoflavone degradation, and to clarify how daidzein shapes rhizosphere bacterial communities.

We isolated Comamonadaceae bacteria that have daidzein degradation activity from the soybean rhizosphere. We sequenced its whole genomes and performed transcriptome analyses. Among candidate genes selected by these analyses, we knocked out two homologous genes. A putative decomosed product was accumulated in the mutant when incubated with daidzein. Heterologously expressed protein degraded this product, indicating that these enzymatic genes are involved in daidzein degradation. Structure determination of this product and characterization of other candidate genes are currently underway.

isoflavone, rhizosphere, soybean

発表責任者：青木 愛賢（aoki.noritaka.55c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C01-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の新規キサントフィル合成遺伝子の探索

Exploration of the novel xanthophyll synthetic genes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○小原 幹太、東根 徳広、森 勇輝、森本 大地、中川 聡、澤山 茂樹（京大農）
○Kanta OHARA, Tokuhiro HIGASHINE, Yuki MORI, Daichi MORIMOTO, Satoshi NAKAGAWA, Shigeki SAWAYAMA (Kyoto Univ.)

植物や藻類のカロテノイド生合成経路では、フィトエンからリコペンが合成されるまでの初期の経路は高度に保存されているのに対し、その下流にあたるキサントフィルの合成経路は多様に分岐しているため、合成に関わる遺伝子が未知のものも少なくない。オミクス解析などが一般的となった現在、光合成生物の環境適応において主要な役割を担うキサントフィルの生体内での動態を詳しく調べる上で、その合成遺伝子の特定は急務であると考える。そこで本研究では、モデル生物である緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を対象として、新規のキサントフィル合成遺伝子を探索した。

合成遺伝子探索の対象としたのは、藻類での合成遺伝子の報告例がなく、またストレス応答に重要なアブシジン酸合成の中間体となるネオキサンチンの合成遺伝子である。シロイヌナズナが持つネオキサンチン合成遺伝子との配列相同性及び葉緑体移行シグナルの有無によって、*C. reinhardtii* のネオキサンチン合成候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子を過剰発現させた株を作出し、カロテノイドの組成を野生株と比較した結果、過剰発現株ではネオキサンチン量の増加は見られなかったが、予想に反して、ロロキサンチン量が有意に減少していることが判明した。緑藻において、ロロキサンチンはルテインと共に、強光ストレスへの応答に関わるキサントフィルサイクルを形成していると推測されているが、そのサイクルに関わる遺伝子の報告例は未だない。本遺伝子がロロキサンチンとルテインのサイクルに関連するものであるか詳細に検討した。

In higher plants and algae, the initial step of the carotenoid pathway from phytoene to lycopene is well-conserved, whereas the downstream xanthophyll pathway is highly diverse. Therefore, several genes involved in xanthophyll pathway have not been identified. Identification of the uncharacterized xanthophyll genes is essential for omics approaches to investigate the cellular dynamics of xanthophylls which play major roles in the adaptation to environmental changes in photoautotrophs. Here, we explored the novel xanthophyll synthetic genes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Using a combination of blastp analysis and chloroplast-localized signal prediction, we identified the candidate gene encoding neoxanthin synthase, whose product is intermediate of stress hormone abscisic acid. In the overexpressed mutant, neoxanthin content did not show a significant increase. However, unexpectedly, loroxanthin content was significantly increased in the mutant. This result suggested that the candidate gene might contribute the xanthophyll cycle that is composed of interconversion between loroxanthin and lutein.

xanthophyll, carotenoid, *Chlamydomonas reinhardtii*

発表責任者：小原　幹太（ohara.kanta.23e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C01-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子嚢胞子の成熟に関わる細胞壁分解酵素 AsmA の機能解析

Functional analysis of the cell wall lytic enzyme AsmA involved in sporangiospore maturation in *Actinoplanes missouriensis*

○譚 鋳文[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Zhuwen TAN[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸伸長で増殖するが、栄養飢餓条件では内部に数百の胞子を含む胞子嚢を形成して休眠する。胞子嚢は水に浸されると開裂し、内部の胞子を放出する。我々はこのような生活環の中でも特に胞子嚢内部での胞子の成熟過程に注目しており、過去に、細胞壁分解酵素をコードする *gsmA* の破壊株では胞子嚢内部で胞子が十分に成熟せず連結されたままの胞子鎖が多数観察されることを発表している(1)。一方、*gsmA* 破壊株においても胞子の成熟はある程度進行していたことから、本研究では胞子成熟に関わる細胞壁分解酵素の更なる探索と機能解析を行った。【方法・結果】細胞壁分解酵素をコードすると予想される遺伝子のうち、胞子嚢形成期に転写が強く誘導される *asmA* (*AMIS_65730*) と *AMIS_7130* に着目した。それぞれの単独破壊株および *gsmA* との二重破壊株を作製し光学顕微鏡で観察したところ、Δ*gsmA*Δ*asmA* 二重破壊株において胞子嚢から放出された胞子鎖の長さが Δ*gsmA* 株と比較してやや伸びていた。そこで単独の胞子数、及び胞子鎖を構成している胞子数を計数したところ、解析した胞子の総数に占める単独の胞子の割合は野生株で 96.4%、Δ*gsmA* 株で 49.7%、Δ*gsmA*Δ*asmA* 二重破壊株で 19.5%であった。大腸菌を用いて AsmA の組換えタンパク質を生産、精製し zymography を行ったところ、AsmA は *A. missouriensis* の細胞壁成分に対して分解活性があることが示された。また、AsmA と GsmA を用いてツーハイブリッドアッセイを行ったところ、AsmA と GsmA の間に弱い相互作用が検出された。以上の結果より、AsmA は GsmA と協調的に機能して、胞子嚢内部で胞子が成熟する過程で連鎖状に形成された胞子間の切り離しを担う細胞壁分解酵素として働くことが明らかになった。 (1) Mitsuyama et al. 2019. *J. Bacteriol.* **201**:e00519-19.

[Backgrounds & Purposes] The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* forms sporangia that contain hundreds of spores. Sporangia release spores when immersed in water. We previously reported that the Δ*gsmA* mutant released not only free spores but also spore chains from sporangia (1). In this study, we investigated two putative cell wall lytic enzymes, which might be involved in spore maturation. [Methods & Results] We focused on genes whose transcriptional levels were significantly increased during sporangium formation. Among them, *asmA* (*AMIS_65730*) and *AMIS_7130* were deleted in this study. The Δ*gsmA*Δ*asmA* double mutant released longer spore chains than the Δ*gsmA* mutant. Quantitative analysis of the spore chains showed that this double mutant had a lower production of single spores than the Δ*gsmA* mutant. This and other results indicate that AsmA is involved in the process of sporangiospore maturation in cooperation with GsmA.

rare actinomycete, spore maturation, cell wall lytic enzyme-encoding gene

講演番号：4C01-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

Search for the acyltransferase genes required for the formation of triacylglycerol-containing sporangium membrane in *Actinoplanes missouriensis*

○SHIXUAN HU[1], Satoshi Maeda[1], Takeaki Tezuka[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

[Introduction]

The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* undergoes complex morphological differentiation. It forms sporangia which contain hundreds of flagellated spores that start swimming as zoospores in water. When reaching suitable conditions for vegetative growth, zoospores stop swimming and germinate. However, most of the molecular mechanisms of its life cycle remain to be elucidated. In our previous study, we revealed that sporangium membrane is composed of phospholipids, triacylglycerol, and at least four proteins. [1] Therefore, the sporangium membrane is expected to be a triacylglycerol-containing unique membrane. In this study, we searched for an acyltransferase gene(s) involved in the synthesis of triacylglycerol during sporangium formation.

[Methods & Results]

A total of 22 genes were expected to encode acyltransferases in *A. missouriensis*, and we disrupted each gene and compared the phenotype of each mutant with that of the wild-type strain. The growth of the Δ*AMIS_11360* mutant was extremely slower than that of the wild-type strain by macroscopic observation of mycelia on agar media. Because *in silico* analysis suggested that *AMIS_11360* encodes a monoacylglycerol acyltransferase, the growth of the mutant seemed to decrease due to the reduced pool of diacylglycerol. For the Δ*AMIS_52390* mutant, sporangia in squashed shapes were observed by scanning electron microscopy, showing that sporangium formation did not proceed appropriately in this mutant. Also, the number of spores released from the sporangia in this mutant was two orders of magnitude lower than in the wild-type strain. The number of released spores was completely restored by the complementation of *AMIS_52390*. From these results, it was suggested that *AMIS_52390* plays a pivotal role in the formation of sporangium membrane. Functional analysis of *AMIS_52390* is in progress.

[Reference]

[1]前田ら，希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢構成成分の同定と機能解析，
2019 年度日本放線菌学会大会，ポスター発表 (P-9).

rare actinomycete, sporangium membrane, acyltransferase

講演番号：4C01-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

ビフィズス菌のカラメル化糖資化性に関わる酵素群の解析

Analysis of the degradative enzymes involved in the assimilation of caramelized sugar on bifidobacteria

○海江田 麿千加[1]、堀米 綾子[2]、小田巻 俊孝[2]、清水（肖） 金忠[2]、北原 兼文[1]、藤田 清貴[1]([1]鹿児島大農、[2]森永乳業・基礎研)
○Machika KAIEDA[1], Ayako HORIGOME[2], Toshitaka ODAMAKI[2], Jin-Zhong Xiao[2], Kanefumi KITAHARA[1], Kiyotaka FUJITA[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]Morinaga Milk)

【目的】Di-Fructose Anhydride I(DFA-I: α-D-Fru*f* 1,2':2,1'- β-D-Fru*f*)はカラメルや黒糖に含まれるカラメル化糖の一つであり、ヒトは加熱調理により生じた DFA を日常的に摂取している。我々は、*Bifidobacterium dentium* から DFA-I の α-Fru*f* 結合を加水分解してイヌロビオース(Fru*f* β-2,1-Fru)を生じる新規 DFAI 加水分解酵素(αFFase1)を発見した。[1] そこで、DFA-I 分解酵素群をコードする *B. breve* と *B. longum* を解析対象に加え、ビフィズス菌における DFA-I の分解メカニズムの解析を目的とした。【方法】*B. dentium* JCM1195 株に加え、*B. breve* と *B. longum* の森永乳業保存菌株を用いて DFA-I 資化性試験を行い、濁度および残存糖の解析を行った。さらに、組換えαFFase1 と２種のβ-fructofuranosidase(βFFase1 及びβFFase2)を組み合わせた際の DFA-I 分解性を評価した。【結果】*B. dentium* JCM1195 株に加え DFA-I 分解酵素群をコードする *B. breve* の２菌株, *B. longum* の１菌株が DFA-I を資化し、培養上清で DFA-I の完全な消失が認められた。DFA-I は組換えαFFase1 と２種のβFFase のどちらを組み合わせた場合でもフルクトースにまで分解された。特に、αFFase1 遺伝子とタンデムに並ぶβFFase2 は、イヌロビオースに対して高い基質特異性を示した。したがって、ビフィズス菌菌体内ではαFFase1 とβFFase2 が協調的に働くことで DFA-I を効率的に分解すると考えられる。

1) T. Kashima *et al.*, *J. Biol. Chem,* 297, 101324, (2021)

Di-Fructose Anhydride I (DFA-I: α-D-Fru*f* 1,2':2,1'-β-D-Fru*f*) is a caramelized sugar contained in caramel and brown sugar. Recently, we discovered a novel DFA-I hydrolase (αFFase1) from *Bifidobacterium dentium* that hydrolyzes the α-Fru*f* linkage of DFA-I and produces inulobiose (Fru*f*β-2,1-Fru).[1] In this study, we analyzed the DFA-I degradative mechanism in bifidobacteria. DFA-I assimilation test was performed using by *B. dentium* JCM1195, *B. breve* and *B. longum* strains, and turbidity and residual sugar were analyzed. In addition to *B. dentium* JCM1195, two strains of *B. breve* and one strain of *B. longum* exhibited notable growth on DFA-I, and DFA-I was completely dissappered. Moreover, we evaluated the DFA-I degradation by the combination of recombinant αFFase1 and two β-fructofuranosidases (βFFase1 or βFFase2). DFA-I was degraded to fructose in both βFFase1 and βFFase2 by the combination of αFFase1. In particular, βFFase2 in tandem with the αFFase1 gene showed high substrate specificity for inulobiose. Therefore, it is likely that αFFase1 and βFFase2 work cooperatively for efficient degradation of DFA-I in bifidobacteria.

bifidobacteria, caramelized sugar, β-fructofuranosidase

発表責任者：藤田清貴（k4022897@kadai.jp）

講演番号：4C01-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

Insertion Sequencing 解析により同定されたアミノ酸代謝に関わるビフィズス菌遺伝子の通常飼育マウス腸内における定着と生存への寄与の評価

Evaluation of the contribution of the bifidobacterial genes involved in amino acid metabolism identified by Insertion Sequencing analysis to colonization and survival in the conventional mouse intestine

○井上 太貴、前田 智也、横田 篤、吹谷 智（北大院農）
○Taiki INOUE, Tomoya MAEDA, Atsushi YOKOTA, Satoru FUKIYA (Hokkaido Univ.)

ビフィズス菌はヒトに多くの健康効果を与える腸内細菌であるが，ビフィズス菌の腸内での定着・生存機構には，未だ不明な点が多い．我々はこれまでに，ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株を使用し，トランスポゾン変異株集団を用いた Insertion-Sequencing 解析により，無菌マウス腸内での定着と生存に寄与するビフィズス菌遺伝子を網羅的に同定した．しかしながら，通常ヒトやマウスには腸内細菌叢が存在するため，これらの遺伝子が，腸内細菌叢を持つ通常飼育マウスにおいても定着と生存に重要であるかを評価する必要がある．評価方法として，それぞれの遺伝子欠損株と，異なる薬剤耐性遺伝子を生育に影響のない領域に導入した比較株を作製して通常飼育マウスへ等量投与し，糞便中におけるそれぞれの生菌数を経時的に計測して比較する方法を用いた．昨年度は，網羅的に同定された遺伝子のうち，tight adherence pilus ATPase (*tadA*), cholate efflux transporter (*ctr*), sortaseE (*srtE*) の 3 遺伝子に着目し，通常飼育マウス腸内での検証を行うことで，*ctr* と *srtE* の腸内における重要性を明らかにした．今年度は，アミノ酸代謝に着目し，diaminopimelate decarboxylase (*lysA*), transcriptional regulator ArgR (*argR*) の 2 遺伝子について，昨年度と同様に検証を行った．その結果，Δ*lysA* 株と Δ*argR* 株の腸内における生菌数は比較株と比べて有意に減少したことから，*lysA* と *argR* は腸内細菌叢存在下での腸内における定着と生存に寄与することが示された．

Bifidobacteria are intestinal bacteria that exert various health-promoting effects on humans, but there is much room for clarification of the mechanisms of intestinal colonization and survival. We previously identified bifidobacterial genes contributing to colonization and survival in germ-free mice by Insertion-Sequencing analysis using transposon mutant library of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A. However, evaluation of the contribution of those genes is also required in conventional mice harboring gut microbiota. To evaluate each gene contribution, target genes and a control gene were disrupted by inserting different drug-resistance genes. Then, the constructed strains were administrated to conventional mice in equal doses, and the number of viable cells in feces was measured over time. In the last JSBBA conference, evaluation of the genes encoding tight adherence pilus ATPase (*tad*A), cholate efflux transporter (*ctr*), and sortaseE (*srtE*) revealed that *ctr* and *strE* are important genes in the presence of the gut microbiota. In this year, we focused on amino acid metabolism, and diaminopimelate decarboxylase (*lysA*) and transcriptional regulator ArgR (*argR*) genes were evaluated. *lysA* and *argR* were revealed to contribute to the colonization and survival in the presence of the gut microbiota.

Bifidobacteria, intestinal colonization, gene deletion

発表責任者：吹谷智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4C01-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

Accumulation and assimilation process of maltose that inhibits the growth of the *malT* deletion mutant in *Aspergillus oryzae*

○Yahong Zou, Silai Zhang, Akira Watanabe, Shoki Fujita, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

Aspergillus oryzae is an essential industrial microorganism in the brewing industry. One of its main characteristics is the production of large amounts of amylase (α-amylase, glucoamylase, and α-glucosidase). The activation substrate of the transcription factor AmyR essential for amylase gene expression is isomaltose converted from maltose, and intracellular α-glucosidase MalT plays an important role not only in maltose assimilation but also in isomaltose conversion. In previous studies, interestingly, we found that the *malT* deletion mutant can uptake maltose normally and accumulates maltose in the cells, thereby significantly inhibits the strain growth, but this accumulation can recover to normal levels gradually. This indicates that there may be other mechanisms for assimilation of maltose in *A. oryzae*.

In order to better understand the role of *malT* in the production mechanism of amylase, we studied the growth process of the *malT* deletion mutant of *A. oryzae* and the role of *amyR* in it. Analyzing the intracellular maltose content of strain which cultured in the liquid medium with different maltose concentration by HPLC showed that the growth process of the *malT* deletion mutant has undergone maltose accumulation and recovery. The intracellular maltose content first increased and then decreased rapidly. The *malT* and *amyR* double-deletion mutant requires a longer time to recover from maltose accumulation. As the concentration of maltose in the medium increases, the maltose accumulated in the cells no longer decomposes, even if after adding in other carbon sources. These suggest that *amyR* is critical to the recovery. The intracellular α-glucosidase activity in the *malT* deletion mutant is gradually increasing, but there is no obvious activity in the *malT* and *amyR* double-deletion mutant. In addition, RNA-seq and qRT-PCR data also shows that the expression patterns of α-glucosidase-related genes are not the same among them. Some genes regulated by *amyR* may be important in the growth recovery of *malT* deletion mutant, such as *agdA*/*agdB*. We will further study the mechanism that regulates maltose assimilation in *A. oryzae*, and the reasons for the growth inhibition caused by accumulation of maltose.

Aspergillus oryzae, maltose assimilation, *malT*

発表責任者：Gomi Katsuya（katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp）

講演番号：4C01-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

担子菌 Pleurotus ostreatus における自律複製配列 AMA1 の適用とゲノム編集への応用

Function of an autonomously replicating sequence AMA1 in the basidiomycete Pleurotus ostreatus and its application to genome editing

○越 大志朗、河内 護之、中沢 威人、坂本 正弘、本田 与一（京大農）
○Daishiro KOSHI, Moriyuki KAWAUCHI, Takehito NAKAZAWA, Masahiro SAKAMOTO, Yoichi HONDA (Kyoto Univ.)

AMA1 は、*Aspergillus nidulans* から単離された自律複製配列配列である。AMA1 プラスミドは形質転換効率が上昇し、継代を続けるとベクターが脱落しマーカーが再利用可能な為、複数の子嚢菌で利用されている。本研究では本システムの担子菌への応用を目指し、*Pleurotus ostreatus* を用いて AMA1 プラスミドの利用を試みた。AMA1 とハイグロマイシン B (Hyg) 耐性マーカー遺伝子（*hph*）を含むプラスミドをプロトプラスト PEG 法により細胞内に導入した。その結果、AMA1 プラスミドはコントロールより約 2 倍形質転換効率が上昇した。また Hyg 耐性は、数回の継代の間維持されその後欠失した。欠失前後の株で大腸菌へのプラスミドレスキューを行った結果、欠失前の株のみレスキューに成功した。したがって、AMA1 は担子菌 *P. ostreatus* においてプラスミド維持に関与することが示唆された。次に、Cas9 及び機能不全株を 5-fluorocytocine (5-FC)で選抜可能な *fcy1* を標的とした gRNA 発現カセットを AMA1 ベクターにクローニングし、これを細胞内に導入した。その後選抜と継代を行い、Hyg 感受性且つ 5-FC 耐性を有する株の取得に成功した。以上の結果より、AMA1 ベクターを用いたマーカーフリーなゲノム編集が可能なことが示唆された。

AMA1 is an autonomously replicating sequence derived from *Aspergillus nidulans*. The AMA1 plasmid has been reported to increase transformation efficiency and allow marker recycling by dropout it in many ascomycetes. In this study, AMA1 plasmid was applied for the transformation of basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. The plasmid harboring the AMA1 and a hygromycin B (Hyg) resistance marker gene (*hph*) were constructed and introduced into *P. ostreatus* by protoplast mediated-PEG method. As a result, the transformation efficiency was 2-fold higher than the control and a Hyg resistance was maintained for several transfers. In the plasmid rescue experiments using strains before/after loss of Hyg resistance, it was only successful with strains without Hyg resistance. This result suggested the AMA1 may be involved in plasmid maintenance in *P. ostreatus*. Cas9 and a gRNA targeting *fcy1*, which disruption gives 5-fluorocytocine (5-FC) resistance, were cloned into the AMA1 plasmid and introduced into *P. ostreatus*. After several subcultures, Hyg-sensitive but 5-FC resistant strains were successfully obtained. These results suggest that marker-free genome editing is possible using the AMA1 plasmid.

AMA1, Pleurotus ostreatus, genome editing

講演番号：4C01-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

糸状菌由来分泌型ホスホリパーゼ A2 の構造および機能解析
Structural and functional analyses of secretory phospholipases A2 derived from filamentous fungi
○川合 杏奈[1]、宮川 拓也[2]、田之倉 優[2]、吉田 稔[1,3,4]、有岡 学[1,3]([1]東大院農・応生工、[2]東大院農・応生化、[3]東大・微生物連携機構、[4]理研環境資源セ)
○Anna KAWAI[1], Takuya MIYAKAWA[2], Masaru TANOKURA[2], Minoru YOSHIDA[1,3,4], Manabu ARIOKA[1,3] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [3]CRIIM, UTokyo, [4]RIKEN CSRS)

【背景と目的】ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) は Ca^{2+}依存的にリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解し、1-アシルリゾリン脂質と脂肪酸を遊離する酵素である。当研究室では麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の $sPLA_2$ (sPlaA、sPlaB) の解析を行い、sPlaA が PLA_2 活性を示すのに対し、sPlaB はリン脂質の *sn*-1 位を加水分解する PLA_1 であることを見出した。活性中心近傍配列の 1 アミノ酸 (R または Q) の違いが PLA_2/PLA_1 活性の違いに寄与する可能性が見出されたことから、本研究では構造学的解析と、糸状菌における $sPLA_2$ の機能の解明を目的とした生理学的解析を試みた。
【結果と展望】活性中心近傍に Q を持ち PLA_1 活性を示す *Trichoderma reesei* 由来 XM006968 の結晶構造解析を行なった。既知の Ca^{2+}結合部位において基質の Ca^{2+}への配位状態を模倣した構造が得られ、活性の違いに対する R または Q の役割についての理解が深まった。また、新規 Ca^{2+}結合部位が見出され、この Ca^{2+}結合と活性との関係について解析を行っている。一方、アカパンカビ *Neurospora crassa* は R 型で PLA_2 活性を示す NCU06650、NCU09423 の二つの $sPLA_2$ を持つが、子嚢形成過程において *NCU09423* の発現量が上昇するとの報告がある。そこで単独破壊株と二重破壊株を用いて有性生殖過程への影響を調べている。また、*NCU06650* 破壊株が温度感受性を示すとの報告があることから、ストレス応答における $sPLA_2$ の役割の解明を試みている。

Phospholipase A_2 (PLA2) is an enzyme that hydrolyzes the ester bond at the *sn-2* position of phospholipids. Our group analyzed sPlaA and sPlaB, two $sPLA_2$s in *Aspergillus oryzae*, and found that sPlaB has PLA_1 activity that hydrolyzes the *sn-1* position. Since the differences in one amino acid (R or Q) may determine this regio-specificity, we aimed to elucidate the structure and function of $sPLA_2$s in the filamentous fungi. Crystal structure analysis of XM006968 derived from *Trichoderma reesei* showing PLA_1 activity revealed a novel Ca^{2+}-binding site in addition to that conserved in the fungal $sPLA_2$s showing PLA_2 activity. Considering that this difference may contribute to the difference in activity, further structural analysis is being conducted. Besides, *Neurospora crassa* has two $sPLA_2$s that display PLA_2 activity, NCU06650 and NCU09423, and it has been reported that the expression level of *NCU09423* increases during the process of ascus formation. Since $sPLA_2$ may play a role in the sexual reproduction, the effect of single and double deletion on the process of ascus formation is currently being analyzed. Furthermore, the involvement of $sPLA_2$ in the stress response of *N. crassa* is also being studied.

regio-specificity, sexual reproduction, stress response

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C01-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

Saccharomyces eubayanus のサブゲノムを持つ *Saccharomyces cerevisiae* に関する研究
The study on *Saccharomyces cerevisiae* of subgenomes from *Saccharomyces eubayanus*
○山下 敦士[1,2]、高橋 朋子[1,2,3]、加藤 拓[3]、只見 秀代[3]、永富 康司[3]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2]、野田 陽一[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ（株））
○Atsushi YAMASHITA[1,2], Tomoko TAKAHASHI[1,2,3], Taku KATO[3], Hideyo TADAMI[3], Yasushi NAGATOMI[3], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Yoichi NODA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, Dept. of Biotech., UTokyo, [3]Asahi Quality & Innovations, Ltd.)

（背景・目的）ラガービールの醸造に用いられる下面発酵酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、*Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* のハイブリット株がその起源とされ，それぞれのサブゲノムからなる異質倍数体である。異質倍数体のゲノムは不安定であるといわれているが、細胞内で異種由来の染色体もしくは遺伝子産物同士がどのように影響し合うのか不明な点が多い。そのため本研究では、異種由来の染色体、遺伝子産物がどのように影響し合って、現在の *S. pastorianus* の持つ染色体構造に至ったか、そのゲノムの不安定性の理由、異種由来の遺伝子産物が *S. pastorianus* においてどのように機能しているかを明らかにすることを目的とした。
（方法・結果）我々は *S. eubayanus* の染色体の導入が *S. cerevisiae* に与える影響を解析するため、*kar1Δ15* 変異による核融合の不全を利用した染色体の移行方法を用いた [1]。そして *S. eubayanus* が持つ 16 本の各染色体を一倍体の *S. cerevisiae* に移行した 16 種類の“disomy 株”の作製を試みた。そして取得した株の解析を行った結果、*S. eubayanus* の特定の染色体を持たせた一部の disomy 株、特に 8 番染色体を持たせた disomy 株では顕著な生育不全を引き起こすことが見出された。 さらに disomy 株を完全培地で継代を繰り返したところ、8 番染色体を持たせた disomy 株を含め一部の disomy 株では *S. eubayanus* の染色体が安定に引き継がれない現象が観察された。本発表では、*S. eubayanus* の染色体が *S. cerevisiae* に与える影響をゲノム不安定性の観点とも合わせて報告する。また disomy 株の発酵能や低温増殖能についても報告する予定である。
(Introduction) The bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*, used for brewing lager beer, is an allopolyploid composed of each subgenome from *S cerevisiae* and *S. eubayanus*. The genome of an allopolyploid is often unstable, but the reason is still unclear. The purpose of this study is to understand how heterologous chromosomes interact with each other to form the current chromosome structure of *S. pastorianus*.
(Methods and Results) To analyze how the introduction of chromosomes from *S. eubayanus* affects *S. cerevisiae*, we attempted to create “disomic strains” by separately transferring 16 chromosomes from *S. eubayanus* to a haploid *S. cerevisiae* [1]. We found that some disomic strains showed growth defects and genome instability.
[1] Torres et al., Science, 317, 916-924(2007)

yeast, hybrid, chromosome

講演番号：4C01-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

冬虫夏草サナギタケの新規交配型遺伝子における機能解析

Functional analysis of mating-type specific genes of caterpillar fungus *Cordyceps militaris*

○鈴木 稔之[1]、小野 晶子[1]、鈴木 貴也[2]、張 吉麗[1]、道羅 英夫[2,3]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・理、[3]静岡大・グリーン研)
○Toshiyuki SUZUKI[1], Akiko ONO[1], Takaya SUZUKI[2], Jili ZHANG[1], Hideo DOHRA[2,3], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Sci., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

子実体を形成する子嚢菌類であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*）はチョウ目の幼虫やサナギに寄生する冬虫夏草の一種であり、世界中に分布している。また、本菌は幅広い薬理活性を示すと報告されているため、サナギタケは様々な手法を用いて解析されている。一般的に、真菌の生活環には無性世代（anamorph）と有性世代（teleomorph）の 2 つの世代サイクルがある。無性世代において、真菌は一つの交配型のみを持ち、無性胞子を用いて増殖するが、異なる交配型を持った細胞同士が交配すると、有性世代に移行して有性生殖を行う。

サナギタケには MAT-α型と MAT-HMG 型の交配型が存在しており、予備実験において各交配型における子実体形成能が異なるということが分かった。そこで、異なる交配型における比較ゲノム解析を行った結果、交配型特異的な遺伝子は交配型遺伝子（*mat* 遺伝子）のみであることが分かった。さらに、MAT-HMG 型の交配型遺伝子座から 2 つの新規交配型遺伝子（*mat1-2-3a*、*mat1-2-3b*）が発見された。そこで、本研究では新規交配型遺伝子それぞれに関して破壊株を作出し、これら破壊株の子実体形成能などの機能を評価した。

The mushroom-forming fungus, *Cordyceps militaris*, parasitizes larvae or pupae of lepidopteran insects, and distributed worldwide. This fungus has been reported to contain bioactive compounds showing a wide range of pharmacological activities. Due to its beneficial properties, *C. militaris* has been studied using various methods, such as genomic sequencing, and transcriptomic and proteomic expression analyses. In general, fungi use reproductive strategies including two generation cycles, asexual generation (anamorph) and sexual generation (teleomorph). In asexual generation, anamorphic fungi have only one mating-type gene and they proliferate through asexual spores; however, different mating-type cells mate with each other to undergo sexual generation and perform sexual reproduction.

From the genome analysis of *C. militaris*, two mating-type genes have been identified in the MAT-α locus (*mat1-1-1* and *mat1-1-2*) and one mating-type gene has been identified in the MAT-HMG locus (*mat1-2-1*) to date. In this study, we constructed knockout strains of the novel mat genes to investigate the functions of these genes.

Cordyceps militaris, mating type, functional analysis

講演番号：4C01-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム C

シイタケ子実体保存関連遺伝子 *exp1* の解析

Repression of *Lentinula edodes exp1* gene by RNAi vector

○坂本 郁生、大畑 早弥香、橋本 侑香、吉田 一生、佐藤 利次（北見工大・食品科学）
○Ikuo SAKAMOTO, Sayaka OHATA, Yuka HASHIMOTO, Kazuki YOSHIDA, Toshitugu SATO (Food sci., Kitami Inst. Technol.)

研究背景）シイタケは、保存中にひだの褐変化や自己溶解によるレンチナンの減少など、商品価値が低下する場合がある。保存後のシイタケで特異的に発現している遺伝子の解析により、シイタケ子実体ひだの保存後半に発現が上昇している転写因子様遺伝子 *exp1* が報告された。モデル担子菌であるウシグソヒトヨタケの *exp1* 遺伝子破壊株では、子実体形成後の開傘とその後の褐変化や自己溶解が起こらないことが報告されている。そこで本研究では、*exp1* 発現抑制 RNAi ベクターを構築後、シイタケへ導入し、組換え体の解析を行った。
方法）シイタケ *exp*1 を発現抑制するために、RNAi ベクターpChGaS-exp1 を構築し、宿主株 SR-1 に導入した。得られた形質転換体は、リアルタイム PCR により *exp1* 発現の解析を行った。
結果）薬剤耐性選抜により pChGaS-exp1 導入株は 32 株得られ、PCR による導入ベクターの確認の結果、29 株がベクター導入株と同定された。その中から、20 株をランダムに選択し、リアルタイム PCR による *exp1* 発現量を定量した。その結果、20 株中 10 株において、*exp1* 遺伝子の宿主株との相対発現比が 0.039～0.000043 に減少していたことから、目的の exp1 発現抑制株が得られた。

Background) Gills browning and decrease of lentinan of *Lentinula edodes* during preservation diminish commercial value. Analysis of genes specifically expressed in *L. edodes* gills after preservation resulted in finding of a transcription factor-like gene *exp1* whose expression was increased in the late stage of preservation of *L. edodes* fruiting body. It has been reported that the *exp1* gene-disrupted strain of *Coprinus cinereus*, does not open its gill after fruiting body formation and does not cause browning and autolysis thereafter. In this study, we constructed an RNAi vector of *exp1* and then introduced it into *L. edodes* and transformants obtained were analyzed the expression of *exp1* by real-time PCR.
Methods) In order to suppress the *L. edodes exp1* expression, a RNAi vector pChGaS-exp1 was constructed and introduced into the host strain SR-1. The obtained transformants were subjected to analysis of *exp1* expression by real-time PCR.
Results) Thirty-two transformants were obtained by drug resistance selection, and 29 strains were identified as the vector integrated strains by PCR. Twenty strains were randomly selected from them, the expression of *exp1* by real-time PCR was quantified. As a result, 10 strains were confirmed that the expression of *exp1* was reduced to less than 0.039 of that of the host strain.

Lentinula edodes, RNAi, *exp1*

発表責任者：佐藤　利次（tosisato@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：4C03-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

Replication-Cycle Reaction 法による環境試料からのプラスミドの収集と性状解析

Collection and feature analysis of plasmid DNAs from environments by Replication-Cycle Reaction(RCR)

○一瀬 拓海[1]、池田 奈菜子[2]、森 光矢[1]、奈良 聖亜[3]、末次 正幸[3]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,4] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・工、[3]立教大院・理、[4]静大・グリーン研)
○Takumi ICHINOSE[1], Nanako IKEDA[2], Mitsuya MORI[1], Seia NARA[3], Masayuki SU'ETSUGU[3], Kazuhide KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Rikkyo Univ., [4]Shizuoka Univ. RIGST)

実環境中の「どこ」に「どのような」プラスミドが存在するのかを明らかにすることは，プラスミドを介した微生物の進化・適応機構を理解する上で重要である．我々は複製・維持・接合伝達能に依存しない手法によって，環状プラスミド DNA を環境中から直接収集してきた．まず，環境試料から環状 DNA 画分の抽出を行い，Replication-Cycle Reaction (RCR) 法[(1)]によって環状 DNA のみを増幅させ，その増幅産物の塩基配列を解読した．その結果，現在までに活性汚泥および牛糞厩肥から，1-12 kb の環状 DNA 計 18 本の完全長塩基配列の取得に成功した．また，取得した環状 DNA のうち 13 本には，プラスミドの複製・維持・接合伝達に寄与する推定遺伝子が含まれ，プラスミドであることが示唆された．そこで，得られたプラスミドの複製開始タンパク質をコードすると推定される遺伝子配列に基づき，公的データベース内に類似したプラスミドの配列が存在するかを調べたところ，6 本には類似した配列が見当たらず，新規性が高いことが示唆された．また，取得したプラスミドと同様のプラスミドについて，他の環境にも分布しているのかを，PCR-サザンブロット解析によって検証したところ，新規性の高いプラスミドのうち 3 本は，複数の土壌試料からもシグナルが検出された．以上のことから，本手法が，既知のプラスミドだけでなく，新規性の高いプラスミドの収集にも有効であることが示唆された．現在は，各プラスミドの複製に必要な DNA 領域の特定と，その宿主となる細菌の種類の特定を試みている．

Plasmids can promote bacterial evolution and adaptation. Thus, it is important to understand the entire plasmid community (plasmidome) in environment. The objective of this study was to collect plasmids from environments by a manner independent from replication and conjugation of plasmids. The circular DNAs were extracted from environmental samples, and amplified by Replication-Cycle Reaction (RCR)[(1)]. As a result, complete nucleotide sequences of 18 DNAs (2-12 kb) were successfully obtained. Thirteen of the DNAs had putative genes involved in the replication or mobilization of plasmids, suggesting they were plasmids. None of plasmids in public database showed similarity with six of the obtained plasmids. PCR-Southern blot analyses with total community DNA extracted from different environmental samples showed that three of the obtained plasmids could be present in soil. 1) Su'etsugu et al., 2017, Nucleic Acids Res. 45(20):11525-11534.

Plasmid, Replication-Cycle Reaction, Plasmidome

発表責任者：一瀬拓海（ichinose.takumi.17@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4C03-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

細菌の進化・多様化を促す IncP-1 群プラスミドの宿主域や接合伝達頻度を左右する因子の探索
Which factors could affect the host ranges and conjugation frequency of IncP-1 plasmids?
○梅木 穂乃花[1]、徳田 真穂[2]、雪 真弘[3]、大熊 盛也[3]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2,3,4] ([1]静大院・総合科技、[2]静大院・創造、[3]理研 BRC-JCM、[4]静大・グリーン研)
○ Honoka UMEKI[1], Maho TOKUDA[2], Masahiro YUKI[3], Moriya OHKUMA[3], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Integr. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]BRC-JCM, RIKEN, [4]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは接合伝達により異なる細菌間を水平伝播し，受け取った細菌の進化や多様化を促す．従って，プラスミドが接合伝達する細菌の種類（宿主域）の情報は極めて重要である．しかし，プラスミドの宿主域や接合伝達頻度に影響を及ぼす因子の全ては解明されていない．そこで本研究では，このような因子を探索・同定することを目的とした．研究材料として，同一の不和合性群 IncP-1 群に属し，遺伝子の構成は保存されているものの，その塩基配列の相同性が低い（42-60%の一致度） 3 本のプラスミド pBP136，pYKBG036，pMHAD031 を用いて宿主域や接合伝達頻度を比較した．受容菌に 25 種の細菌を混合したモデル受容菌群集を用いて接合実験を行った結果, 同定された接合完了体 7 種のうち，3 つのプラスミドで共通して得られた完了体は *Pseudomonas putida* の 1 種のみであった．また，pYKBG036 と pBP136 は *P. putida* が最も多くの割合を占め，pMHAD031 は *Aeromonas caviae* であった．伝達頻度は高い方から pMHAD031, pBP136, pYKBG036 の順となり，それぞれ 10 倍ずつ異なった．同一の不和合性群に属していても，異なる種類の細菌を宿主とする可能性が示されたことから，宿主域や伝達頻度を決定する因子は不和合性群では規定されないと考え，現在各プラスミド上の特定の遺伝子の有無や塩基配列の違いに着目している．発表では，宿主域や接合伝達頻度に影響を及ぼす因子を同定するため，1 種類の受容菌に対する伝達頻度や宿主内での安定性の比較を行った結果についても述べる．

Plasmids can promote bacterial rapid evolution and diversification by conjugative transfer. Host range and conjugation frequency are important features of the plasmid, but factors that decided them are still not completely clear. The objective of the present study is to investigate the factors. We compared the host ranges and conjugation frequency by conjugation assays using a bacterial community with 25 strains and the three plasmids belong to same incompatibility (IncP-1) group and have low sequence homology. As a result, the transconjugants belonging seven strains were obtained and only one strain was commonly obtained as a transconjugant of each plasmid. The conjugation frequency was highest in pMHAD031, followed by pBP136 and pYKBG036, which differed 10-times each. Our findings suggest that the plasmids in the same Inc group could have different host ranges and thus the factors that determine host range and conjugative frequency are not defined by their incompatibility but by differences in the other factors in the plasmid.

plasmid, IncP-1 group, host range

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4C03-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

なぜ PromA 群プラスミドはアクセサリ遺伝子をもちにくいのか
Why the PromA plasmids less likely to carry accessory genes?

○白木 友博[1]、山本 雪絵[2]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3] ([1]静大・工、[2]静大院・総合科技、[3]静大・グリーン研)
○Tomohiro SHIRAKI[1], Yukie YAMAMOTO[2], KAZUHIDE KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，宿主に特定の生理的機能をもたらすアクセサリ遺伝子を伴って微生物間を水平伝播することで，宿主の劇的な進化や適応に寄与する．しかし，PromA 群に属するプラスミドは広宿主域を示すものの，現在までに発見された PromA 群プラスミドの多くは，既知のアクセサリ遺伝子をもたない．また，一部の PromA 群プラスミドでは，宿主集団内でアクセサリ遺伝子群の脱落やプラスミドの遺伝子構造の変化が報告されている[(1, 2)]．PromA 群プラスミドがこうした性状を示す理由を明確にすることは，自然界で本群プラスミドの果たす役割を理解する上で重要である．我々は，PromA 群がアクセサリ遺伝子をもつと宿主内で不安定になり，その遺伝子やプラスミドが脱落するのではないかと仮説を立てた．本研究では，この仮説を検証することを目的に，アクセサリ遺伝子をもたない pSN1104-11 と *gfp* および抗生物質耐性遺伝子を挿入した pSN1104-11::*gfp* を研究対象とした. そして，大腸菌を宿主として，pSN1104-11 保持株とプラスミド非保持株，pSN1104-11::*gfp* 保持株とプラスミド非保持株の競合試験を行った．その後，定量 PCR を行って，集団内のプラスミドの存在量を比較した．その結果，pSN1104-11::*gfp* の存在量は pSN1104-11 に比べて有意に減少した．これは，PromA 群プラスミドが，アクセサリ遺伝子をもつことで，宿主の適応度を低下させる可能性を示していた．現在，プラスミドの存在量に加えて，アクセサリ遺伝子の集団内での存在量の変化を追跡している．

Many plasmids carry accessory genes provide a new phenotype(s) to their host cells. Nevertheless, PromA plasmids rarely carry accessory genes, although they show broad host range. Furthermore, previous studies showed that host cells harboring PromA plasmids with accessory genes lost the accessory genes and/or changed the genetic structure of the plasmid [(1,2)]. It is important to clarify why the PromA plasmids show these properties for understanding the role of them in nature. Thus, we hypothesized that (i) the plasmid with the accessory genes might be instable, (ii) the accessory genes could be lost from the plasmid. To assess these hypotheses, a PromA plasmid pSN1104-11 (without accessory genes) and pSN1104::*gfp* (with accessory genes) were studied. Then, a competition assay was performed with each plasmid-free and plasmid-harboring strain with above two plasmids. After the assay, quantitative PCR for the plasmid showed that the abundance of pSN1104-11::*gfp* decreased faster than that of pSN1104-11. This indicates the presence of accessory genes on the plasmids might reduce the fitness of their host. Now changes of the abundance of accessory genes are assessed. (1) Werner et al., 2020, Front Microbiol, 11:149 (2) Law et al., 2020, Front Microbiol, 12:606409

PromA plasmid, accessory gene, fitness

講演番号：4C03-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

IncP-1 群プラスミドの宿主域の違いを生む因子の探索

Identification of a factor(s) causing difference in host ranges of different IncP-1 plasmids

○徳田 真穂[1]、山田 亮[2]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3] ([1]静大院・創造、[2]静大院・総合科技、[3]静大・グリーン研)
○Maho TOKUDA[1], Ryo YAMADA[2], Kazuhide KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドの宿主域の情報は微生物の進化・適応機構を理解する上で重要であるが，宿主域を決定する因子についてはほとんど明らかになっていない．IncP-1 群に属するプラスミド pDS1[(1)]は，広宿主域を示す同群 pBP136[(2)]と同一細胞内に維持されない不和合性を示すが，宿主域が狭く，腸内細菌科細菌のみを宿主とすることが示唆されている．本研究では，同じ IncP-1 群に属する上記 2 本のプラスミドの宿主域が大きく異なる原因の解明を目的とした．まず，異なる細菌における 2 本のプラスミドの複製の可否を検証するため，プラスミドの複製に寄与する 3 つの遺伝子領域（single strand DNA binding protein *ssb*, replication initiation protein *trfA*, origin of vegetative replication *oriV*）のみを含むミニプラスミドを構築し，pDS1 が接合伝達しない *Pseudomonas putida* KT2440 株の形質転換を行った. その結果, pDS1 のミニプラスミドは KT2440 株内で複製されなかった（Table）. 次に，大腸菌と KT2440 株内で，別のベクターから pBP136 由来の TrfA を発現させ，それぞれの *oriV* を含む環状 DNA の複製の可否を評価した．その結果，pDS1 由来の *oriV* を含む DNA が大腸菌内では複製されたのに対し，KT2440 株では複製されなかった（Table）．pBP136 由来の TrfA が大腸菌内では pDS1 の *oriV* にも機能する一方で，KT2440 株内では機能しなかったことから，pDS1 が KT2440 内で複製するには *oriV* と KT2440 内で複製可能な pBP136 由来の TrfA 以外の因子が必要なことが示唆された．現在は，pDS1 の TrfA 存在下で pBP136 の *oriV* を含む環状 DNA が複製可能か検証するとともに，各プラスミドの *ssb* の関与についても検証を行っている．

Table pBP136 と pDS1 の複製の可否の違い
○：複製可　×：複製不可

Plasmid	Original plasmid		*trfA-oriV-ssb*		*oriV* (*trfA* $_{pBP136}$)	
	DH5α	KT2440	DH5α	KT2440	DH5α	KT2440
pBP136	○	○	○	○	○	○
pDS1	○	×	○	×	○	×

The host ranges of plasmids are important for understanding how plasmids can promote evolution and adaptation of bacteria. Although pDS1[(1)] and pBP136[(2)] belong to same incompatibility group P-1, their host range were different (only *Enterobacteriaceae* bacterium could be a host of pDS1). The objective of this study was to identify a factor(s) causing these differences in host ranges of two plasmids. First, a mini-plasmid of pDS1 with *trfA-oriV-ssb* was introduced into *Escherichia coli* DH5α or *Pseudomonas putida* KT2440 by electroporation. As a result, the mini-plasmid of pDS1 could not be replicated in KT2440 (Table). Second, a circular DNA with *oriV* of pDS1 was introduced into the above two strains. When the TrfA of pBP136 was supplied *in trans*, transformants of DH5α were obtained, while those of KT2440 were not (Table). These results indicated that other factors than TrfA might be required for the replication of *oriV* of pDS1 in KT2440.

(1) Brown CJ., *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(24):7684-7695, 2013
(2) Kamachi K., et al., Microbiology., 152(12):3477-3484, 2006

Plasmid, host range, replication

発表責任者：新谷政己（shinatni.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4C03-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

環境中の細菌から PromA 群プラスミドの「天然の宿主」を同定する
Identification of the “original hosts” of PromA plasmids in environmental microbes

○川北 鈴香[1,2]、山本 雪絵[2,3]、陶山 哲志[2]、髙木 妙子[2]、大田 悠理[2]、野田 尚宏[2]、金原 和秀[1,3]、新谷 政己[1,3,4] ([1]静大工、[2]産総研バイオメディカル、[3]静大院総合科技、[4]静大グリーン研)
○Suzuka KAWAKITA[1,2], Yukie YAMAMOTO[2,3], Tetsushi SUYAMA[2], Taeko TAKAGI[2], Yuri OOTA[2], Naohiro NODA[2], Kazuhide KIMBARA[1,3], Masaki SHINTANI[1,3,4] ([1]Shizuoka Univ., [2]BRI. AIST, [3]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ. RIGST.)

2009 年に提唱されたプラスミド群[1]，PromA 群は，これまで報告例が少なかったが，我々の先行研究で日本各地の種々の環境に存在し，異なる細菌間を伝播することが判明した[2]．従って，本群プラスミドは，これまで見過ごされてきた広宿主域プラスミド群であることが示された．この理由として，自然界から PromA 群プラスミドをもつ細菌（天然の宿主）を見出した例が少ないことが挙げられた．そこで，本研究では，water-in-oil droplets を利用して，本群の天然の宿主の同定を試みた．まず，蛍光プローブを含む PCR 反応液と環境細菌を混合して，単一 droplet 内に 1 細胞以下になるように封入し，droplet PCR を行った．その後，蛍光を指標にして標的プラスミドをもつ細菌細胞が入った droplet のみを回収し，DNA 抽出後，菌叢解析を行った．同じ地点で異なる時期（2021 年 5 月・10 月）に採取した 2 種類の環境細菌を対象にした結果，5 月分からは 422 個の droplet を回収し，20 の operational taxonomic unit(OTU)が検出され，10 月分からは 946 個の droplet を回収し，52 の OTU が検出された．このうち，5 つの OTU が重複して検出された．現在は，これらの天然の宿主候補から，擬陽性を排除するための方法として，single droplet 解析を試みている．

PromA is a plasmid group proposed in 2009. Our previous study showed that these plasmids were present in various environments in Japan and that they could be transferred among different bacteria. Nevertheless, PromA plasmids has been unnoticed for a long time, possibly due to unculturability of their natural hosts. The objective of this study was to identify the original hosts of PromA plasmids using water-in-oil droplets. PCR was performed in droplets contained less than a single cell of environmental microbes with specific primers and fluorescent probe for the PromA plasmid. Afterward, the droplets with fluorescence were collected and the DNAs from the collected droplets were extracted to identify the bacteria in these droplets. As a result, 20 operational taxonomic units (OTUs) were found from 422 droplets (May, 2021), and 52 OTUs were from 946 droplets (Oct, 2021). Five OTUs were commonly obtained in both analyses. The single droplet sorting system will be used for further investigation to exclude the bias of amplicon sequencing and the problem of false positive sample from these candidates of the original host.

1)van der Auwera et al, 2009, Antonie van Leeuwenhoek. 96:193
2) Yanagiya et al, 2018, Front. Microbiol. 9:2602.

plasmid, droplet, original host

講演番号：4C03-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

プラスミドの接合伝達現象に繊維状アミロイドタンパク質の有無が及ぼす影響

Effect of the presence or absence of fibrous amyloid protein on the plasmid conjugation

○白井 浩貴[1]、岩田 和樹[2]、田代 陽介[1,2]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3] ([1]静大工、[2]静大院・総合科技、[3]静大・グリーン研)
○ Hiroki SHIRAI[1], Kazuki IWATA[2], Yosuke TASHIRO[1,2], Kazuhide KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，接合伝達により異なる微生物間を，種々の遺伝子と共に水平伝播することで，汚染物質分解能，薬剤耐性能等の新たな性質を宿主に付与する．従って，実環境中におけるプラスミドの挙動を理解することは，環境・医療分野においても重要である．ここで，実環境中の微生物の大半は，バイオフィルム(BF)と呼ばれる細胞外マトリクスから成る構造体を形成し，プラスミドの接合伝達の多くは BF 内で生じていると考えられる(1)．しかし，接合伝達に影響を及ぼす BF 内の因子についての報告は少ない．本研究では，大腸菌 BF 形成に関与し、細胞同士や細胞と物質表面の接着を担う繊維状アミロイドタンパク質 curli に着目した．大腸菌野生株と，curli を過剰発現する大腸菌株，curli の主要構成要素をコードする *csgA* を欠損した大腸菌株について BF 形成量を測定した結果，野生株と比較して，過剰発現株は約 3 倍増加し，*csgA* 欠損株は約 1/2 まで低下した．次に，これらの菌株をそれぞれ 24 時間液体培地内で接合し，広宿主域 IncP-1 プラスミドである pBP136::*gfp* を，野生株間，過剰発現株間，および欠損株間で接合伝達させた．その後接合伝達頻度を，得られた接合完了体数(CFU/mL)と，受容菌数(CFU/mL)×供与菌数(CFU/mL)の比から算出した．その結果，野生株間の接合伝達頻度は約 5.0×10^{-12} で，過剰発現株間では約 5 倍上昇した．それに対して，*csgA* 欠損株の間では，その頻度が約 1/10 まで低下した．従って，curli の存在はプラスミドの接合伝達性に影響を及ぼすことが示唆された．現在，*csgA* を欠損した大腸菌変異株に *csgA* を相補した菌株での接合伝達頻度を測定している．

Plasmids transfer horizontally between different microbes, carrying genes and conferring new properties to the host. Therefore, understanding the behavior of plasmids in nature is important. Because most microbes in nature form biofilm (BF), it is likely that most of the plasmid conjugation occurs within the BF(1). However, there are few reports on the factor(s) involved in this phenomenon. In this study, we focused on a fibrous amyloid protein called curli, which plays an adhesion factor of BF of *Escherichia coli*. The amount of BF of wild-type (WT) strain of *E. coli*, an overexpressing strain of curli, and a *csgA*-deficient strain were compared, about three-fold higher in the overexpressing strain and about 1/2 lower in the *csgA*-deficient strain compared with the WT. Transfer frequency of plasmid pBP136::*gfp* between WT donor and recipient cells was about 5.0×10^{-12} The frequency between the overexpressing strains increased around five-fold, whereas that between the deficient strains decreased to about 1/10. Now the complementation assays are being performed for the *csgA*-deficient strains.

(1) Król et al., 2013, Plasmid. 70(1): 110–119.

Plasmid, Biofilm, Curli

講演番号：4C03-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

FrmR は IncP1 型プラスミドによる細菌間及び生物界間接合の供与菌側染色体コード抑制因子である。
FrmR: a donor chromosomal factor suppressing bacterial and *trans*-kingdom conjugal transfers by IncP1 type plasmids.
○守口 和基[1,2,3]、Zoolkefli Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad[2]、Cho Yunjae[3]、清川 一矢[1]、鈴木 克周[1,2,3] ([1]広島大院統合生命、[2]広島大院理、[3]広島大理)
○ Kazuki Moriguchi[1,2,3], Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad Zoolkefli[2], Yunjae Cho[3], Kazuya Kiyokawa[1], Katsunori Suzuki[1,2,3] ([1]Graduate School of Integrated Life Science, Hiroshima Univ., [2]Graduate School of Science, Hiroshima Univ., [3]School of Science, Hiroshima Univ.)

プラスミドの接合伝達に関連する遺伝子は、プラスミド内にコードされる遺伝子については古くから明らかにされてきたが、供与菌や受容菌の染色体にコードされる遺伝子については、意外にも解析が進んでいない。IncP1 型プラスミドはプロテオバクテリア門細菌を広く宿主とする広宿主域プラスミドとして知られており、抗生物質耐性遺伝子などを広く拡散させる。そのプラスミド伝達域はプロテオバクテリアを超え、古細菌や真核生物にも及ぶ。今回我々の研究グループでは、IncP1 型プラスミドの接合伝達に関与する供与菌側染色体遺伝子の解析を、大腸菌ノックアウト変異株を供与菌、出芽酵母を受容菌に用いた生物界間接合系によってゲノム網羅的に進めた。

スクリーニングの結果、生物界間接合効率上昇変異体の一つとして Δ*frmR* 変異株が単離された。この変異株では、バクテリア間の接合伝達効率も上昇していた。FrmR は *frm* オペロンのリプレッサータンパク質で、ホルムアルデヒドの分解に関与する *frmA, B* 遺伝子と自身の発現を、ホルムアルデヒド存在下ではオン、非存在下ではオフに制御する。細胞内アルデヒド濃度が上昇すると推測される Δ*frmA* または *B* 変異株でも生物界間接合効率は上昇し、接合伝達効率の上昇には *frmA, B* 遺伝子そのものは必要ないことがわかった。一方、*frmR* と同じ *csoR/rcnR* ファミリーに属する *rcnR* 遺伝子のノックアウト変異株では生物界間接合効率の有意な上昇は見られなかった。

We have little knowledge about how chromosomal genes are involved in bacterial conjugation though conjugation factors encoded on plasmids have been analyzed extensively. Conjugation system by several IncP1-type plasmids has been reported to transfer DNA even to eukaryotes and archaea, in addition to proteobacteria. To identify the potential chromosomal conjugation factor(s), we performed a genome-wide survey on a comprehensive collection of *Escherichia coli* gene knockout mutants (Keio collection) as donors to *Saccharomyces cerevisiae* recipients using a conjugal transfer system of an IncP1α plasmid RP4.

As a result, we identified a mutant strain, which showed an increase in conjugation efficiency, and it lacked *frmR* gene. FrmR is a CsoR/RcnR family transcriptional repressor, and rregulates *frm* operon, which is consist of *frmR, A,* and *B.* Absence of FrmR induces the expression of *frm* operon, however, both *ΔfrmA and ΔfrmB* mutant strains rather showed an increase in conjugation efficiency than a decrease. This result indicates that each function of these two proteins is unrelated to the RP4 conjugation. In addition, a deletion mutant strain of *rcnR* gene, another member of *csoR/rcnR* family genes, did not show the increase in conjugation efficiency.

Trans-kingdom conjugation, Horizontal gene transfer, IncP1 plasmid

発表責任者：守口和基（kmoriguc@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4C03-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

線状プラスミド SAP1 における認識領域の特定

Identification of the Recognition Sequence on SAP1

○土屋 建登[1]、深田 悠太[2]、片岡 正和[1]([1]信州大院　総合理工　生命医工、[2]信州大院　総合医理工　生命医工)
○Kento Tsuchiya[1], Yuta Fukada[2], Masakazu Kataoka[1] ([1]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., [2]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Med. Sci. tech., Shinshu Univ.)

Streptomyces 属放線菌は多種多様な系統を有している無性生物である。この放線菌が無性生物でありながらこのような多様性を獲得した要因として接合伝達が挙げられる。接合伝達は膜貫通蛋白質を介して、プラスミドが他の細胞へ伝達する現象である。一般に接合伝達にはプラスミド上に、膜貫通蛋白質の遺伝子と、その蛋白質が伝達させる DNA を判別するための認識配列が必要とされる。当研究室では *S. avermitilis* 由来の線状プラスミド SAP1 の伝達機構の解析を行っている。SAP1 は先行研究から接合伝達に必要最低限である３つの領域が特定されている。しかし SAP1 では膜貫通蛋白質によって認識される配列が発見されていない。

そこで本研究では、SAP１における認識配列の特定を目的とした。先行研究から必要最低限な 3 つの領域のいずれかが認識配列であると考えられるため、３つの領域に着目し、伝達効率の比較を行った。その結果、upstream of *traB* という領域が認識配列であることが示唆された。

Streptomyces is a genus of actinomycete that includes many species of bacteria. This actinomycete has acquired such diversity by conjugal transfer. Conjugal transfer is a phenomenon in which a plasmid is transferred to other cells through a transmembrane protein. In general, conjugal transfer requires a gene for the transmembrane protein and a recognition sequence on the plasmid. In our laboratory, we have been analyzing the transfer mechanism of SAP1, a linear plasmid isolated from *S. avermitilis*. We already identified three essential regions for conjugal transfer. It is strongly suggested that these three regions include the recognition sequence for SAP1.

The aim of this study is to identify the recognition sequence of SAP1 from preselected three regions by comparison of the transfer efficiency. The result indicated that the region located upstream of *traB* is the recognition sequence.

Conjugal transfer, *Streptomyces*, Linear plasmid

発表責任者：土屋 建登（21bs113k@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4C03-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

植物病原性卵菌 *Aphanomyces cochlioides* の遊走子形態変化時変動遺伝子の解析
Analysis of gene expression associated with morphological changes in the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces cochlioides* zoospore
○竹原 由希子、佐藤 優樹、橋本 誠、崎浜 靖子（北大院農）
○Yukiko TAKEHARA, Yuki SATO, Makoto HASHIMOTO, Yasuko SAKIHAMA (Hokkaido Univ.)

Aphanomyces cochlioides はホウレンソウやテンサイに感染する植物病原性卵菌であり、宿主感染時に遊泳能を持つ遊走子を形成する。遊走子は宿主特異的シグナル物質に誘引され、宿主根表面で被嚢化、発芽し感染が成立する。また、遊走子は振動などの非宿主特異的刺激によっても被嚢化するが、その場合発芽せず遊走子が再生される。遊走子の被嚢化および発芽は感染に必須の過程であるが、*Aphanomyces* 属卵菌の形態変化分子機構に関する知見は限られており、不明な点が多い。
これまでに我々は、*A. cochlioides* Cel 1 株（AC Cel 1）を用い、被嚢胞子発芽時に約 60 倍発現上昇する遺伝子 *V8-AC1100* を同定している。本研究では *V8-AC1100* 遺伝子の機能解明を目指し、同遺伝子のクローニングおよび大腸菌におけるタンパク質異種間発現を行った。また、終濃度 6 μM ニコチンアミド（NA）処理による遊走子再生系を構築し、発現変動遺伝子の経時解析を行った結果、NA 処理 180 分後に約 20 倍に発現上昇する遊走子再生時誘導遺伝子（*NA-AC850* ）を見出した。*NA-AC850* の DNA 部分配列を用いて相同性解析を行った結果、*A. invadans* の機能未知遺伝子と相同性が示された。現在、これらの遺伝子の過剰発現または発現抑制のための卵菌用ベクター構築を試みている。
Aphanomyces cochlioides is a phytopathogenic oomycete that produces motile zoospores. The zoospores are attracted and encysted by the host-specific signal, after which they germinate and infect the host. They also encysted by non-host-specific stimuli such as vibration, but in that case, the zoospores are regenerated without germination. Although the morphological change of zoospores is essential for host infection, the molecular mechanism in *Aphanomyces* is still unclear. We previously fined the gene *V8-AC1100*, which is induced during cyst germination in *A. cochlioides* strain Cel 1 (ACCel 1). In this study, the V8-AC1100 protein was heterologously expressed in *Escherichia coli* for functional analysis of the *V8-AC1100*. As a result of gene expression analysis using the nicotinamide (NA, final conc. 6mM) dependent zoospore regeneration system, the *NA-AC850* gene whose expression increased approximately 20-fold after 180 min of NA treatment was detected. The partial DNA sequence of *NA-AC850* showed homology to the gene encoding a hypothetical protein in *A. invadans*. Vector for overexpression or suppression of these genes in *Aphanomyces* cells are currently under construction.

infection, host recognition, zoospore regeneration

発表責任者：竹原由希子（penguin-3rd@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：4C03-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子べん毛形成に必須な 2 つの遺伝子（*trxA*, *AMIS1780*）に対するサプレッサー変異株の取得と解析

Analysis of suppressor mutants derived from disruptants of *trxA* and *AMIS1780*, two essential genes for zoospore flagellar biogenesis in *Actinoplanes missouriensis*

○鈴木 玲実[1]、前田 聡史[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○Remi SUZUKI[1], Satoshi MAEDA[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci. The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は貧栄養環境で胞子嚢を形成する。胞子嚢は浸潤すると開裂し、胞子を放出する。胞子はべん毛をもち、走化性によって菌糸生長に適した環境へと移動する遊走子となる。べん毛遺伝子群の転写や翻訳は胞子嚢形成時に行われるが、べん毛の組立てがいつ行われるのかは不明である。我々は、*A. missouriensis* はこれまでに解析された他の細菌とは異なる制御機構でべん毛を合成すると予想した。これまでに、Δ*trxA* 株や Δ*AMIS1780* 株ではべん毛が正常に形成されないことが判明している。*trxA* はチオレドキシンをコードするが、チオレドキシンとしての活性はべん毛形成に関与しない。*AMIS1780* は機能未知タンパク質をコードする。本研究では、*trxA* と *AMIS1780* によるべん毛形成の制御機構の解明を目指した。【結果・考察】Δ*trxA* 株および Δ*AMIS1780* 株の遊走子に UV を照射し、運動能を回復したサプレッサー変異株を取得した。Δ*trxA* 株由来のサプレッサーでは、6 株中 5 株で Clp プロテアーゼ複合体の ATPase サブユニットをコードすると予想される *clpC* に変異があった。また、Δ*AMIS1780* 株由来のサプレッサーでは、7 株中 2 株でべん毛基部の分泌ゲートを構成するタンパク質をコードする *fliR* に、別の 1 株で *clpC* に変異があった。それぞれのサプレッサーに野生型の *clpC* または *fliR* を導入したところ、遊走子の運動性が低下した。さらに、Δ*trxA* 株と Δ*AMIS1780* 株いずれも *fliR* または *clpC* の点変異によって運動性が回復した。現在、べん毛不要時において Clp プロテアーゼがべん毛形成に必要なタンパク質を分解しているというモデルを立て、Clp プロテアーゼによって分解されるタンパク質の探索を行っている。

[Backgrounds & Purposes] The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* forms sporangia that contain hundreds of spores. When released, these spores swim using flagella as zoospores until they find niches for germination. The mechanism of this unique temporal flagellation is largely unknown. Previously, we revealed that Δ*trxA* and Δ*AMIS1780* mutants are nonmotile. Here, we aimed to elucidate the regulatory mechanism of flagellar formation by *trxA* and *AMIS1780*. [Results] We obtained motile suppressor mutants from Δ*trxA* and Δ*AMIS1780* mutants. By genome sequencing of suppressor mutants, *clpC* and *fliR* were identified as candidate genes involved in flagellar formation. *clpC* encodes an ATPase subunit of Clp protease. *fliR* encodes a flagellar basal body component. The motility of the Δ*trxA* and Δ*AMIS1780* mutants were recovered by the introduction of a point mutation into *fliR* or *clpC*. Now we search for a protein(s) degraded by Clp protease, based on our working model that Clp protease degrades a protein(s) necessary for flagellar formation when flagella are not required.

rare actinomycete, zoospore, flagellar formation

講演番号：4C03-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

Methylobacterium sp. OR01 株におけるメタノール走化性に関わる MCP タンパク質の同定
Identification of MCPs involved in methanol chemotaxis in *Methylobacterium* sp. OR01
○加地 奏絵[1]、川端 和弥[1]、片山 志織[1]、谷 明生[2]、由里本 博也[1]、阪井 康能[1]([1]京大農、[2]岡山大植物研)
○Kanae KAJI[1], Kazuya KAWABATA[1], Shiori KATAYAMA[1], Akio TANI[2], Hiroya YURIMOTO[1], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Okayama Univ.)

メタノール資化性 *Methylobacterium* 属細菌は、植物表層に存在するメタノールを利用して葉面微生物の優占種として棲息している。我々はこれまでに、アカシソに高度に優占化する菌株として単離した *Methylobacterium* sp. OR01 株の葉面での分布・動態解析を行い、アカシソの葉の先端や周辺部に多く定着し、メタノールに対して強い走化性を示すことを昨年度本大会で報告した[1)]。

本研究では、メタノール走化性の分子機構を明らかにすることを目的とし、OR01 株のメタノール走化性に関わるセンサータンパク質（methyl-accepting protein, MCP）の探索を行った。OR01 ゲノム配列に見出した複数の MCP 候補遺伝子について遺伝子破壊株を作成し、それぞれ蛍光タンパク質で標識した株を構築した。メタノールを含むガラスキャピラリー内に侵入した細胞の蛍光顕微鏡観察とフローサイトメトリーでの細胞数測定により、各遺伝子破壊株のメタノール走化性を評価した。その結果、遺伝子破壊によりメタノール走化性をほとんど示さなくなった遺伝子と、野生株よりも走化性が弱まった遺伝子を同定した。さらに、これらの二重遺伝子破壊株はメタノール走化性を示さなくなった。現在、各遺伝子破壊株のアカシソへの定着能や分布動態を解析している。

1）片山ら、日本農芸化学会 2021 年度大会講演要旨 3C06-04

Methylobacterium spp. inhabit on the phyllosphere and utilize methanol present on plant surfaces. Previously, we reported that *Methylobacterium* sp. strain OR01 dominantly colonizes the leaves and stems of red perilla and is strongly chemotactic to methanol. In this study, we searched for methyl-accepting proteins (MCPs) responsible for methanol chemotaxis in strain OR01. Methanol chemotaxis of MCP gene-deletion mutants labeled by fluorescent proteins were evaluated by fluorescent microscope observation and flow cytometry. As a result, we identified several candidate MCP genes whose gene-deletion strains exhibited weaker chemotaxis than the wild-type strain. We are now analyzing the ability of each gene-deletion strain to colonize red perilla and its distribution dynamics on leaves.

chemotaxis, *Methylobacterium*, methanol

講演番号：4C03-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム C

Methylobacterium aquaticum 22A 株におけるメタノール走化性の分子機構の解明

Molecular mechanism of methanol chemotaxis in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A

○菊池 志保[1]、藤谷 良子[1]、加藤 純一[2]、谷 明生[1]([1]岡大植物研、[2]広大院統合生命)
○Shiho KIKUCHI[1], Yoshiko FUJITANI[1], Junichi KATO[2], Akio TANI[1] ([1]IPSR, Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Methylobacterium 属細菌は植物が放出するメタノールを利用して生育する植物共生細菌であり、カルシウム依存の MxaF とランタノイド (Ln) 依存の XoxF の二つのメタノール脱水素酵素 (MDH) を持つ。私たちは *M. aquaticum* 22A 株のメタノールへの走化性（メチロタキシス）に関わるセンサーMCP を３つ(MCP1,2,3)同定し、3 遺伝子欠失株はメチロタキシスを完全に失うことを見出した。これらは独立して機能し、Ln の有無に応答して発現量やタンパク質の細胞内局在が変化する。本研究ではこれらのリガンドやメタノール代謝との関係を明らかにすることを目的とした。
22A 株は MDH 活性によりメタノールから生成されるホルムアルデヒドにも走化性を示したことから、MCP, MDH の多重遺伝子欠失株を作製して走化性評価に用いた。また、Ln や酸素の有無の条件下での走化性試験や MCP 遺伝子発現解析、Differential Scanning Fluorometry 分析などを行い MCP の機能解析を行った。その結果、それぞれ MxaF と XoxF の活性に依存している MCP があること、細胞内でホルムアルデヒドを認識している MCP があることが示唆された。
Methylobacterium species are methylotrophic bacteria symbiotic with plants. The *M. aquaticum* strain 22A genome encodes two types of methanol dehydrogenase (MDH), a calcium-dependent MxaF and a lanthanide (Ln)-dependent XoxF. Strain 22A shows strong chemotaxis to methanol “methylotaxis”. We identified three methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) genes responsible for methylotaxis, and the triple gene-knockout mutant completely lost methylotaxis. The three MCPs work independently, and their expression level and subcellular localization of proteins change in response to the presence or absence of Ln. We aim to clarify the relationship the ligands of MCPs and their relation with the methanol metabolism. Strain 22A also showed chemotaxis to formaldehyde as a product of MDH activity. We generated multiple gene-deletion mutants of MDHs and MCPs. We analyzed the functions of MCPs, by examining their dependency on Ln, oxygen, and MDHs, and through differential scanning fluorometry analysis and promoter-reporter assays. Collectively, the results suggested that two of MCPs are dependent on the activity of MxaF and XoxF respectively, and the other recognizes formaldehyde in cytoplasm.

Methylobacterium, methanol, chemotaxis

講演番号：4C05-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

超好熱菌由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素の電極用素子への応用

Application to an element for the electrode of PQQ-dependent aldose sugar dehydrogenase

○里村 武範[1,2]、三木 佑介[1]、大島 敏久[3]、高村 映一郎[1]、坂元 博昭[1]、櫻庭 春彦[4]、末 信一朗[1]([1]福井大学工、[2]福井大ライフ、[3]大阪工大工、[4]香川大農)
○Takenori SATOMURA[1,2], Yusuke MIKI[1], Toshihisa OHSHIMA[3], Eiichiro TAKAMURA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1], Haruhiko SAKURABA[4], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Fukui Univ., [2]Life Univ. Fukui, [3]Osaka Inst.Tech., [4]Kagawa Univ.)

超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素（PQQ-ADH）は、グルコースやマルトースなどの様々な糖の酸化反応を触媒する酵素である [1)]。本酵素は 80 °C、10 min の熱処理でも全く変性しないなどの非常に優れた安定性を持っている。また、本酵素は、人工の電子受容体をメディエータとすることで、基質の電子を電極に伝達することが可能である。これらのことか PQQ-ADH は、バイオ電池やバイオセンサのようなバイオデバイス用素子として有望視されている。しかしながら、本酵素の応用利用の課題として酵素活性の低さが挙げられる。我々は分子進化工学的手法を用いて酵素活性が向上した PQQ-ADH 変異体を作成することに成功した。本研究では、酵素活性が向上した変異型 PQQ-ASD を電極に修飾した変異型 PQQ-ASD 修飾電極の電気化学的性質の解析を行った。

PQQ-dependent aldose sugar dehydrogenase (PQQ-ADH) from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum,* catalyzes the oxidation of various sugars such as glucose and maltose[1)]. The enzyme was extremely thermostable, and the activity of the enzyme was not lost after incubation at 80°C for 10 min. In addition, the electrons from the substrate extracted by the enzyme reaction can transfer to an electrode via artificial electron acceptor. Therefore, PQQ-ADH is promising as a specific element for bio-devices such as biosensor and biofuel cell. However, the application to the bio-devices has been limited due to its low enzyme activity. We have successfully constructed PQQ-ADH mutant with high enzyme activity by molecular evolution engineering techniques. In this study, we investigated the electrochemical properties of the PQQ-ADH mutant immobilized electrode.

(1) Sakuraba H et al., 502, 81-88, *Arch. Biochem. Biophys.* (2010)

PQQ, dye-linked dehydrogenase, hyperthermophile

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：4C05-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

アルドース C-6 位酸化菌によるトレハロース二酸化物の合成経路の解明

Treharose dicarboxylate producing pathways by *Pseudogluconobacter saccharoketgenes*

○桐生 高明、木曽 太郎、靜間 基博、村上 洋（大阪産業技術研）
○Takaaki Kiryu, Taro Kiso, Motohiro Shizuma, Hiromi Murakami (Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology)

【目的】トレハロースを *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* の休止菌体で酸化すると、二か所ある D-グルコース残基の C-6 位のヒドロキシメチルがカルボキシル基に酸化され、トレハロース二酸化物が生成する。このトレハロース酸化物を加水分解すると医薬品や食品に利用されているグルカル酸を生成する。本研究ではトレハロース二酸化物生成経路の解明を目的に研究を行った。
【方法と結果】*P. saccharoketogenes* IFO14483 株の休止菌体でトレハロースを酸化したところ、4 つの反応中間体が生成することが分かった。これらの中間体を TLC により分離回収した。回収した中間体を塩酸とともに煮沸して加水分解し、その組成より構造の推定を行った。反応初期にできる中間体はグルカルアルデヒド（グルコースの C-6 位がアルデヒド基になったもの、aldo-Glc）とグルコースからなる aldo-Glc α1↔1α Glc であることがわかった。さらに aldo-Glc α1↔1α Glc のグルコース残基が酸化され aldo-Glc α1↔1α aldo-Glc が生成することがわかった。残りの二つの中間体を完全に分離することができなかったが、混合物を加水分解したところ、グルクロン酸（GlcUA）、グルコース、グルカルアルデヒドの 3 種が生成したことから、それぞれ、aldo-Glcα1↔1α Glc のグルカルアルデヒド基が酸化された aldo-GlcUA α1↔1α Glc と、aldo-GlcUA α1↔1α Glc 及び aldo-Glc α1↔1α aldo-Glc が酸化された GlcUA α1↔1α aldo-Glc であると推定された。

Two C-6 hydroxymethyl residues of trehalose were oxidized by resting cells of *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* and converted to carboxyl residues. Hydrolysis of this trehalose oxide (trehalose dicarboxylate) produce D-glucuronic acid used for medicine and foods. We studied production pathways of trehalose dicarboxylate from trehalose.

Oxidation of trehalose by *P. saccharoketogenes* IFO14483 cells produced four intermediates. These intermediates were separated using TLC and recovered from the plate. The recovered intermediates were boiled with 2N HCl to hydrolyze. The structure of intermediates were decided from hydrolysis products. The intermediate formed in the early stage of the reaction was composed of glucaraldehyde (hydroxymethyl residue of C-6 position was converted to aldehyde residue, aldo-Glc) and glucose. This result indicate this intermediate was aldo-Glc α1↔1α Glc. Furthermore, this product was converted to aldo-Glc α1↔1α aldo-Glc. Although the remaining two intermediates could not be separated, hydrolysis products of the mixture were indicated that the intermediates were aldo-GlcUA α1↔1α Glc and GlcUA α1↔1α aldo-Glc.

treharose, D-glucuronic acid, alcohol dehydrogenase

発表責任者：桐生　高明（kiryu@omtri.or.jp）

講演番号：4C05-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規 Flavin monooxygenase (FMO) の 機能解析

Functional Analysis of Novel Flavin Monooxygenase from White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*

○早坂 実夏、森 玲香、鈴木 裕満、加藤 雅士、志水 元亨（名城大農）
○Mika HAYASAKA, Reini MORI, Hiromitsu SUZUKI, Masashi KATO, Motoyuki SHIMIZU (Meijo Univ.)

白色腐朽菌担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、難分解性樹木成分リグニンをリグニン分解酵素により種々のリグニンフラグメントへと低分子化して細胞内へ取り込み、分解・資化する。リグニンフラグメントの分解に関与する酵素の詳細は未だ明らかとなっていない。代表的なリグニンフラグメントである バニリン酸（VA） は、脱炭酸・脱メトキシ化を経てトリヒドロキシベンゼンとなり環開裂されると推定されている。40 年前の研究において *P. chrysosporium* の細胞破砕液に NADPH を添加すると VA を脱炭酸すると報告されていることから、VA の脱炭酸には補酵素として NADPH を用いる酵素が関与すると考えられた。芳香族化合物の変換に関与する酵素にモノオキシゲナーゼが知られており、フラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）は補酵素として NAD(P)H を用いることから、*P. chrysosporium* 由来の FMO をターゲットに VA の脱炭酸酵素の探索と機能解析を行った。*P. chrysosporium* のゲノム中にコードされている 59 種の FMO の分子系統樹を作成し、リグニンフラグメントを基質にする可能性のある FMO を 11 種選抜した。11 種の FMO のうち、7 種の FMO を種々のリグニンフラグメントと反応させ、その反応生成物を GC-MS にて同定した結果、FMO11 が VA、シリング酸（SA）を脱炭酸することが明らかとなった。VA、SA は共に代表的なリグニンフラグメントであるが、これまでに VA、SA の脱炭酸を触媒する酵素は報告されていない。本研究では、世界で初めてリグニンフラグメントの脱炭酸を触媒する酵素 FMO11 を見出した。以上の結果より、FMO11 の生理的意義とリグニンフラグメントの分解について考察する。

White-rot fungi extracellularly attack lignin polymers utilizing these nonspecific one-electron oxidizing enzymes resulting in the formation of a variety of coniferyl (G), syringyl (S), and hydroxyphenyl (H) units such as e. g., vanillin, vanillic acid (VA), syringaldehyde, syringic acid (SA), *p*-hydroxybenzaldehyde, and *p*-hydroxybenzoic acid, which are further metabolized intracellularly. The current study aimed to identify enzymes involved in oxidative-decarboxylation of VA from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Seven FMOs, named FMO2, FMO4, FMO7, FMO8, FMO9, FMO10, and FMO11 were characterized, and FMO11 catalyzed the oxidative-decarboxylation of VA and SA. Kinetic parameters were analyzed to evaluate the substrate specificity of FMO11 against a variety of VA derivatives. The results are discussed with respect to the physiological roles of FMO11 and the degradation of lignin-derived aromatic compounds by *P. chrysosporium*.

flavin monooxygenase, *Phanerochaete chrysosporium*, lignin

発表責任者：早坂実夏（180562094@ccmailg.meijo-u.ac.jp）

講演番号：4C05-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

Engineering Cofactor Specificity of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase for a Highly Efficient and Robust NADPH Regeneration System

○Gamal Nasser Abdel-Hady[1,2], Takeshi Ikeda[1], Takenori Ishida[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1], Ryuichi Hirota[1] ([1]Hiroshima University, [2]Minia University)

NADP-dependent dehydrogenases have great potential as biocatalysts for the chemical, pharmaceutical, and energy industries. However, their dependency on costly cofactor NAD(P)H remains a challenge that must be addressed. To overcome such limitations, cofactors are regenerated in situ using cheaply available sacrificial substrates. With this goal in mind, we relaxed the cofactor specificity of a thermotolerant phosphite dehydrogenase isolated from soil bacterium *Ralstonia* sp. 4506 (RsPtxD) for a highly efficient and robust NADPH regeneration system. The five amino acid residues, Cys174–Pro178, located at the C-terminus of β7-strand region in the Rossman-fold domain of RsPtxD, were changed. Four mutants were obtained via site-directed mutagenesis with significantly improved NADP preference. The best mutant $RsPtxD_{HARRA}$ exhibited catalytic efficiency for NADP $(K_{cat}/K_M)^{NADP}$ about 44.1 μM^{-1} min^{-1}, which was the highest among phosphite dehydrogenases reported previously. Moreover, the $RsPtxD_{HARRA}$ exhibited high thermostability at 45°C for up to 6 hours and high tolerance to organic solvents, when bound with NADP. By using the $RsPtxD_{HARRA}$ mutant as an NADPH-regeneration system, we demonstrated the chiral conversion of 3-dehydroshikimate to shikimic acid by the thermophilic shikimate dehydrogenase of *Thermus thermophilus* HB8 at 45°C, which could not be supported by the parent RsPtxD enzyme. Therefore, the highly proficient $RsPtxD_{HARRA}$ mutant might be a promising alternative NADPH regeneration system for practical applications.

phosphite dehydrogenase, cofactor regeneration, NAD(P)H

発表責任者：Ryuichi Hirota（hirota@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4C05-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

Geobacter sulfurreducens におけるポリスルフィド取り込みへの *extHIJ* 遺伝子の関与
Involvement of *extHIJ* in polysulfide uptake in *Geobacter sulfurreducens*
○藤田 大樹、Jahan Mst. Ishrat、伊豆 由記子、井上 真男、青野 陸、三原 久明（立命大生命）
○ Daiki Fujita, Mst. Ishrat Jahan, Yukiko Izu, Masao Inoue, Riku Aono, Hisaaki Mihara (Ritsumeikan Univ.)

Geobacter sulfurreducens は不溶性の元素状硫黄（S^0）を用いた呼吸を行う硫黄還元細菌である。我々は、本菌のペリプラズム局在型ポリスルフィド（S_n^{2-}）還元酵素 $ExtK_L$ を同定し、本菌が S^0 を S_n^{2-} に変換してペリプラズム内に取り込み、還元する可能性を示してきた。しかし、S_n^{2-} 取り込み機構は未だ明らかとなっていない。$ExtK_L$ の遺伝子（*extK*$_L$）を含むオペロンには、ロダネーゼ様タンパク質（*extH*）や外膜ポーリン（*extI*）、推定硫黄キャリアー（*extJ*）がコードされ、S_n^{2-} 取り込みへの関与が考えられた。そこで本研究では、各遺伝子を欠損した株（Δ*extH*、Δ*extI*、Δ*extJ*）を用いた遺伝的解析を行ない、本菌における S_n^{2-} 取り込み機構の解明を試みた。

まず、S^0 を添加した培地で各欠損株を嫌気培養し、HS^- の生成量を測定した。その結果、全ての遺伝子欠失株で、野生株と比べ HS^-の生成量が減少したことから、ExtH、ExtI、ExtJ は S_n^{2-} の取り込みから $ExtK_L$ への基質供給までのいずれかの過程に関わることが示唆された。ExtH、ExtI、ExtJ は各々保存された Cys 残基を持ち、ExtI では物質透過孔の中心（Cys147）に存在すると予測された。そこで、野生型 ExtI 及び変異体（C147A）の各遺伝子を Δ*extI* に導入したところ、野生型 ExtI 相補株では HS^-の生成量が回復したが、C147A 発現株では回復しなかった。したがって、ExtI の Cys147 が S_n^{2-}の取り込みに重要であることが示唆された。

Geobacter sulfurreducens is known as a sulfur-reducing bacterium, which uses elemental sulfur (S^0) for respiration. Previously, we identified the periplasmic polysulfide (S_n^{2-}) reductase $ExtK_L$, suggesting the uptake of S_n^{2-} after conversion from S^0. However, the mechanism of S_n^{2-} uptake remains unknown. Coexistence of the *extK*$_L$ and rhodanese-like protein (*extH*), outer membrane porin (*extI*), and putative sulfur carrier (*extJ*) implied their involvement in the uptake of S_n^{2-}. Therefore, we performed a genetic analysis using mutants (Δ*extH*, Δ*extI*, Δ*extJ*) to elucidate the S_n^{2-} uptake mechanism. Anaerobic cultivation study in the presence of S^0 showed that the amount of HS^- produced in mutant was lower than that in the wild-type strain, suggesting the involvement of the genes in a step during the uptake of S_n^{2-}. Each of ExtH, ExtI, and ExtJ has a conserved Cys. The corresponding Cys147 of ExtI was predicted to be in the center of the substance permeation pore. The amount of HS^- produced in Δ*extI* was restored by complementation with the wild-type *extI*, but not restored by introduction of a C147A, suggesting an import role of Cys147 of ExtI in S_n^{2-} uptake.

sulfur, reduction, polysulfide

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4C05-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

好熱菌由来色素依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素の性質の解析

Enzymatic characterization of thermophilic dye-linked L-glutamate dehydrogenase

○岩田 峻弥[1]、伊藤 佑衣[1]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、里村 武範[2,3]、末 信一朗[2]([1]福井大院・工、[2]福井大・工、[3]福井大・生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大)
○ Shunya IWATA[1], Yui ITO[1], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Takenori SATOMURA[2,3], Shinichiro SUYE[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Eng., Fukui Univ., [3]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [4]Kagawa Univ. Agric., [5]Osaka Inst. Technol.)

色素依存性脱水素酵素（Dye-DH）は、FAD や FMN を補酵素として含み人工の酸化還元色素をメディエーターとして基質の酸化反応を触媒する一群の酵素である。Dye-GDH は酸化還元色素を介して基質の電子を電極へ伝達できることから基質の濃度を電気化学的に検出できるバイオセンサや基質を燃料とするバイオ電池用素子としての応用が期待できる。我々は L-グルタミン酸を基質とする色素依存性グルタミン酸脱水素酵素（Dye-GDH）活性を好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* から初めて見出し、大腸菌での組換えタンパク質の発現系の構築に成功した。

本研究では、組換え Dye-GDH の詳細な酵素化学的性質の解析を行った。また、本酵素の電気化学的な特性の評価も行った。

Dye-linked dehydrogenase (Dye-DH) containing FAD or FMN as a coenzyme catalyzes the oxidation of the substrate in the presence of an artificial dye. Dye-DH is high potential for application in an electrode element for biosensor and biofuel cell because electrons derived from the substrate by the enzyme reaction easily are transferred to the electrode via artificial dye. We successfully identified a novel dye-linked L-glutamate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus,* and constructed recombinant expression system in *E. coli.*

In this study, we performed enzymatic characterization and electrochemical characterization of the Dye-GDH.

dye-linked dehydrogenase, thermophile, L-glutamate

講演番号：4C05-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

異種生産したヒメツリガネゴケ由来のペルオキシダーゼ（Prx34）の特徴づけ

Heterologous production and characterization of a peroxidase (Prx34) derived from *Physcomitrium patens*

○伊藤 健司[1]、中 雄輝[2]、秋田 求[2] ([1]近畿大院　生物工学、[2]近畿大　生物工学)
○Kenji ITO[1], Yuki NAKA[2], Motomu AKITA[2] ([1]Major Biotech. Sci., Kindai Univ., [2]Dept. Biotech. Sci., Kindai Univ.)

ペルオキシダーゼは汎用性の高い酵素であり、臨床や工業分野などで広く使用されている。代表的なクラスⅢペルオキシダーゼである西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）は、植物体から抽出され精製されており、生産効率などに多くの課題がある。HRP の異種発現による生産も試みられてきたが、それらでは必ずしも生産性が高いとは言えなかった。私たちは、モデル植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrium patens*）からクラスⅢペルオキシダーゼ（Prx34)を見いだした（Lehtonen et al. 2009）。Prx34 はヒメツリガネゴケのカビ抵抗性に重要な役割を担うことが示唆されている。Prx34 (rPrx34）を、大腸菌と *Brevibacullus chosinensis* で発現させた結果、ともに培養液中に高い ABTS 酸化活性を確認した。大腸菌の場合、その活性は約 10000 U/L であり、精製したタンパク質は、10000 U/mg 以上の高い比活性を示した。rPrx34 は HRP と比較してより酸性側で活性を維持した。本発表では、rPrx34 の生産性について検討し、その特徴づけを行い、HRP と比較した結果を報告する。

Peroxidase is an important and widely used enzyme in various fields of research and industry. Horseradish peroxidase (HRP), a classical class Ⅲ peroxidase, is commercially used, however, it is extracted and purified from the raw materials and has many disadvantages such as low productivity. Production of heterologous HRP has been reported but the productivity was not sufficiently high. We previously reported a moss *Physcomitrium patens* produces a class Ⅲ peroxidase, Prx34, as a secreted peroxidase which was indicated to play an important role in the control of pathogenic fungal infection. For characterization and showing the applicability of Prx34, we studied to produce the heterologous Prx34 (rPrx34) in the broth of *Escherichia coli* or *Brevibacillus choshinensis*. As a result, we found high peroxidase activity (ABTS) in both systems. In *E. coli*, the titer reached ca. 10000 U/L and specific activity after purification was 10000 U/mg. rPrx34 maintained the activity under more acidic conditions compared to HRP. Productivity and characterization of rPrx34 will be discussed.

Peroxidase, Heterologous production, *Physcomitrium patens*

発表責任者：伊藤 健司（2144710002a@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4C05-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

乳酸センサ用フラビン依存性乳酸デヒドロゲナーゼの探索および特性評価

Screening and characterization of flavin-dependent lactate dehydrogenase for lactate sensor

○鈴木 遼太、鉞 陽介、一柳 敦（キッコーマン 研開本部）
○Ryota SUZUZKI, Yosuke MASAKARI, Atsushi ICHIYANAGI (Kikkoman Corp. R&D Div.)

酵素センサを用いた検体の連続乳酸測定は、例えば敗血症の診断や治療効果を判定する手法として重要である。乳酸測定用酵素としては乳酸オキシダーゼ（LOX）やニコチンアミドジヌクレオチド依存性乳酸デヒドロゲナーゼ（NAD-LDH)、フラビン依存性乳酸デヒドロゲナーゼ（F-LDH）が知られている。しかし、LOX を用いる場合、検体中の溶存酸素濃度が測定結果に影響を与える恐れがある。また、NAD-LDH は補酵素が脱離しやすく、その上ピルビン酸から乳酸への逆反応も触媒してしまうために定量性にも問題がある。一方 F-LDH は (i) 補酵素結合型である、(ii) 乳酸と不可逆的に反応する、(iii) 測定結果が溶存酸素濃度に影響を受けない、という点でセンサへの利用に適しているが、これまでに報告のある F-LDH には耐熱性が低いという課題があった。

そこで我々はこの課題解決に向けて、耐熱性酵母の中から F-LDH を探索した結果、従来の酵素よりも耐熱性に優れた *Pichia kudriavzevii* 由来 F-LDH を見出した。この F-LDH を固定化した電極を作製し、応答電流値を測定したところ、7 mM までの乳酸を定量することが可能であった。

Continuous monitoring of lactate in a sample using enzyme-based sensor is an important method, for example, for the diagnosis and evaluating the treatment effect of sepsis. Lactate oxidase (LOX), nicotinamide dinucleotide-dependent lactate dehydrogenase (NAD-LDH), and flavin-dependent lactate dehydrogenase (F-LDH) are known as enzymes for lactate measurement. However, the dissolved oxygen concentration in the sample may affect the measurements because LOX reacts with oxygen. NAD-LDH easily releases a cofactor NAD and catalyzes the reverse reaction from pyruvate to lactate, which interferes accurate measurement. On the other hand, F-LDH is suitable for use in sensors because (i) it is cofactor-bound, (ii) it reacts irreversibly with lactate, and (iii) the measurements are not affected by the dissolved oxygen concentration, however, the reported F-LDH has a problem in low thermal stability.

To solve this problem, we searched for F-LDH from thermotolerant yeasts and found one from *Pichia kudriavzevii*. This F-LDH is more thermostable than the reported one. The linear relationship between lactate concentration and output current was observed up to 7 mM with F-LDH-modified electrode.

lactate monitoring, dehydrogenase, enzyme-based sensor

発表責任者：鈴木　遼太（rsuzuki@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：4C05-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

リグニンモデル化合物で特異的に発現誘導される *Novosphingobium* sp. MBES04 株遺伝子の機能解析

Functional analysis of the *Novosphingobium* sp. MBES04 gene specifically induced by lignin model compounds

○熊川 恵理[1]、吉川 昂宏[1]、勝亦 まどか[2]、粕谷 健一[1,2]、大田 ゆかり[2] ([1]群大院理工、[2]食健康センター)
○Eri Kumagawa[1], Takahiro Yoshikawa[1], Madoka Katsumata[2], Ken-ichi Kasuya[1,2], Yukari Ohta[2] ([1]Gunma Univ., [2]GUCFW)

リグニンは天然に豊富に存在する芳香族を含むバイオマスであり、高付加価値材料の創出への可能性が示唆される。微生物の代謝能を応用したリグニン変換システムの構築には、リグニンの代謝に関わる遺伝子を同定し、それら遺伝子の機能を理解することが重要である。以前我々は *Novoshingobium* sp. MBES04 株を用いたトランスクリプトーム解析において、リグニンモデルダイマーである guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether に対して特異的に発現が誘導される 4 つの遺伝子が報告された。本研究ではこれらの遺伝子群のうちの 2 つの遺伝子について、それらがコードするタンパク質を組換え発現させ、生化学的解析を行った。

2 つの被験遺伝子は BLAST 検索の結果いずれも 2,4'-dihydroxyacetophenone dioxyganase と推定された。推定基質とされる 2,4'-dihydroxyacetophenone(DHA)は 2-bromo-4'-hydroxyacetophenone から求核置換反応により合成した。酵素反応による生成物を液体クロマトグラフィーに供し、4-hydroxybenzoic acid(4HB)の生成を確認した。

上記の結果より被験遺伝子がコードするタンパク質は DHA の側鎖 C-C 結合を酸化的に開裂し 4HB への変換反応を触媒することが分かった。

Lignin is a naturally abundant aromatic biomass that has the potential to create high value-added materials. In order to design a lignin conversion system based on microbial metabolism, it is important to identify the genes involved in lignin metabolism and to understand their functions. In our previous study, the transcriptome analysis of *Novoshingobium* sp. MBES04 reported the four genes which expression was specifically induced by the lignin model dimer, guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether. In this reseach, we focus on these genes. We recombinantly expressed the proteins encoded by the two of these genes and performed biochemical analysis. The two genes were both identified as 2,4'-dihydroxyacetophenone dioxyganases by the BLAST search. The putative substrate, 2,4'-dihydroxyacetophenone (DHA), was synthesized from 2-bromo-4'-hydroxyacetophenone. The product of the enzymatic reaction was analyzed by liquid chromatography, and the production of 4-hydroxybenzoic acid (4HB) was identified. These results showed that the protein encoded by the gene oxidatively cleaved the C-C bond in DHA to produce 4HB.

Lignin, *Novosphingobium*, dioxyganase

発表責任者：大田ゆかり（y-ohta@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4C05-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

膜結合型フルクトース脱水素酵素における直接電子移動型酵素電極反応の機構解明

Elucidation of the direct electron transfer-type bioelectrocatalysis with membrane-bound fructose dehydrogenase

○宋和 慶盛[1]、鈴木 洋平[1]、加納 健司[2]、北隅 優希[1]、白井 理[1] ([1]京大院農、[2]京大産官学連携)
○KEISEI SOWA[1], YOHEI SUZUKI[1], KENJI KANO[2], YUKI KITAZUMI[1], OSAMU SHIRAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. SACI)

酵素反応と電極反応が共役した反応を「酵素電極反応」と呼称する．本反応は，酸化還元酵素を電気化学デバイスへと産業利用する上で重要な反応であり，バイオセンサやバイオリアクタ，バイオ電池などの基盤技術である．特に，酵素が直接的に電極と電子移動を行う直接電子移動（DET）型反応は，従来では不可欠であった低分子酸化還元物質を必要としないため，熱力学的エネルギーロスの最小化と低コストを同時に実現できる理想的な反応システムである．しかしながら，本反応が可能な酵素の報告例は少なく，その稀有な反応機構も完全には解明されていない．そこで，本研究では，DET 型反応におけるモデル酵素として知られている酢酸菌 *Gluconobacter japonicus* 由来の膜結合型フルクトース脱水素酵素（FDH）に着目する．FDH は，非常に大きい DET 型触媒電流を実現できるため，酵素工学と電気化学を組み合わせた反応機構解明や，第三世代型バイオセンサやバイオ電池への応用展開が進められている．一方で，膜結合型酵素である FDH の X 線結晶構造解析には成功しておらず，立体構造は解明されていない．そこで，構造予測技術および構造解析技術を駆使し，生物電気化学的な検討を行った．解明した FDH の立体構造（PDB:7W2J）を，構造生物学／酵素工学／電気化学的知見から考察することで，酵素内電子移動経路や電極との電子移動経路を速度論と平衡論の観点から解析した．本研究で明らかした FDH のユニークな特性は，さらなる DET 型酵素の機構解明と新規 DET 型酵素の探索を進める上で大きなブレイクスルーとなる．

The reaction in which an enzymatic reaction and an electrode reaction are coupled is called "bioelectrocatalysis" The reaction is important for developing electrochemical devices such as biosensors, bioreactors, and biofuel cells. In particular, the direct electron transfer (DET)-type bioelectrocatalysis, in which electrons directly shuttle between enzymes and electrodes, is an ideal system, since it does not require conventional small redox mediators. However, there have been few reports of the enzymes capable of the reaction, and the unique mechanism has not yet been elucidated. In this study, we focused on the membrane-bound fructose dehydrogenase (FDH) from *Gluconobacter japonicus*, which is known as a model enzyme for DET-type bioelectrocatalysis. Since FDH can achieve a large DET-type catalytic current, it is being used to elucidate the mechanism and to develop applications for third-generation biosensors and biofuel cells. However, the X-ray crystal structure of FDH has not been successfully analyzed. In this study, we investigated the bioelectrochemical properties of FDH based on structure prediction/analysis techniques. The 3-D structure of FDH (PDB:7W2J) was examined with structural biology, enzyme engineering, and electrochemistry. We analyzed the electron transfer pathway of FDH in DET-type bioelectrocatalysis from the viewpoints of kinetics and thermodynamics.

direct electron transfer, bioelectrocatalysis, fructose dehydrogenase

発表責任者：宋和　慶盛（sowa.keisei.2u@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C05-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

有機溶媒耐性ブロモラクトン化酵素の開発

Development of organic solvent-resistant bromolactonization enzyme

○知名 秀泰[1]、松浦 拓哉[2]、中村 卓[1] ([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]長浜バイオ大院・バイオ)
○Hideyasu CHINA[1], Takuya MASUURA[2], Takashi Nakamura[1] ([1]Dept. of Bio-sci., Nagahama Inst of Bio-sci and Tech., [2]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech.)

【背景・目的】ブロモ化などのハロゲン化は、様々な化合物に対する有機合成を効率良く行うための重要な工程であるが、ハロゲン化試薬などの犠牲試薬を用いる化学法は多量の廃棄物を残すことから、環境負荷を軽減できる触媒的な方法が求められている。ブロモペルオキシダーゼは、自然界にありふれた臭化物イオンとグリーン酸化剤の過酸化水素を用いて有機化合物にブロモ基を導入できるハロゲン化酵素の一種であり、化学法で生じるような非分解性廃棄物を残さないため、環境調和に優れた生体触媒である。ただし、有機合成でのブロモペルオキシダーゼの活用には、対応する有機溶媒耐性酵素を獲得し、医薬品合成等に有用なハロ環化反応へ適用可能にする必要がある。本研究では、*Streptomyces aureofacience* から獲得した有機溶媒耐性非金属型ブロモペルオキシダーゼ BPO-A1 における有機合成への利用を志向し、更なる酵素安定性の向上と酵素学的ハロ環化反応の開発を試みた。
【方法・結果】人工遺伝子合成による BPO-A1 コドンの最適化は、可溶性画分への発現効率を高めた。N 末端への His_8 タグの付与は酵素の安定性を低下させたが、C 末端への His_8 タグの付与は酵素の安定性を高めた。また、様々な極性アミノ酸オリゴペプチドの導入検討は、C 末端 Asp_8 ペプチドの有効性を示した。更に、ハロゲンイオン結合部位の変異導入体を用いた不飽和脂肪酸における基質汎用性の検討から、酵素反応に基づいた高選択的な *exo* 環化型ブロモラクトン化反応を見出した。

Halogenation such as bromination is an important step for efficient organic synthesis of various compounds, however chemical methods using sacrificial reagents such as halogenating reagents leave a large amount of waste, which is an environmental burden. Thus, there is a need for a catalytic method that can alleviate the problem. Bromoperoxidase is a type of halogenating enzyme that can introduce a bromo group into various organic compounds using naturally occurring bromide ions and hydrogen peroxide, which is a green oxidant. In addition, it is an environmentally friendly biocatalyst because it does not leave non-decomposable waste as generated by chemical methods. In order to widely use bromoperoxidase in organic synthesis, it is necessary to acquire a corresponding organic solvent-resistant enzyme and make it applicable to a selective halocyclization reaction useful for pharmaceutical synthesis. In this study, we aimed to utilize the organic solvent-resistant metal-free bromoperoxidase BPO-A1 obtained from *Streptomyces aureofacience* for organic synthesis, and attempted to further improve the enzyme stability and develop an enzymatic halocyclization reaction.

bromolactonization, BPO-A1, organic solvent-resistant enzyme

発表責任者：知名　秀泰（h_china@nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：4C05-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム C

ハブ毒腺組織由来プロテインジスルフィドイソメラーゼタンパク質のリコンビ ナント発現系の構築と機能解析

Construction of expression system and functional analysis of the venom derived Protein Disulfide Isomerase family proteins in habu snake

○竹林 聖純[1]、磯本 明子[2]、日高 將文[1]、二井 勇人[1]、柴田 弘紀[2]、小川 智久[1]([1]東北大院農、[2]九州大生医研)
○Seijun TAKEBAYASHI[1], Akiko ISOMOTO[2], Masafumi HIDAKA[1], Eugene FUTAI[1], Hiroki SHIBATA[2], Tomohisa OGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】毒蛇ハブ（*Protobothrops flavoviridis*）は、200 種類以上の毒タンパク質・ペプチドを生産する。それらは多くのジスルフィド結合を有しており、堅牢な立体構造を形成する。一方、イモガイは自身のジスルフィドリッチな毒ペプチドのフォールディングを特異的に促進するプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）を持つ。本研究では、同様にジスルフィドリッチな毒タンパク質を持つハブの PDI ファミリータンパク質に着目し、PDIA3 と P4HB の２種のリコンビナント発現系の構築と機能・特性を解析し、毒タンパク質に対するフォールディング能を調べた。
【方法】ハブ由来 PDIA3、P4HB の配列を大腸菌コドンに最適化し、発現ベクターpET22b（＋）に組み込み、His タグでの大腸菌発現系を構築した。発現した PDIA3 および P4HB を Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、高純度の PDIA3 および P4HB を得た。Insulin Turbidity Assay により、市販のウシ肝臓 PDI と比較した。
【結果・考察】大腸菌 1 L 培養あたり～1.6 mg の PDIA3 および P4HB の発現・精製に成功した。Insulin Turbidity Assay による PDIA3 の還元活性はウシ PDI よりも高い活性を示した。ハブ P4HB の Insulin Turbidity Assay による活性評価のほか、ハブ毒タンパク質に対するフォールディング能の解析も進めており、あわせて報告する。

Habu snake (*Protobothrops flavoviridis*) produces more than 200 kinds of venom proteins and peptides, which include many S-S bonds that stabilize their rigid conformational structures. On the other hand, in the corn snail, specific PDI (Protein Disulfide Isomerase) that promotes the folding of its own venom peptide has been reported. In this study, we focused on the PDI family proteins of habu snake, and constructed recombinant expression and purification systems for PDIA3 and P4HB. Then we characterised these PDI family proteins from habu snake by comparison to bovine PDI. The two genes encoding PDIA3 and P4HB from the habu snake were optimized to the codons for *E. coli*, and were subcloned into the expression vector pET22b(+), and then constructed the expression system for habu PDIA3 and P4HB, respectively. After purification of the expressed PDIA3 and P4HB by Ni affinity chromatography, Insulin Turbidity Assay was conducted to evaluate their folding activities.

As a result, PDIA3 and P4HB were successfully expressed in *E. coli*, and obtained purified proteins. Habu PDIa3 possessed more effective reducing activity compared with that of bovine liver PDI. In addition, we will discuss about the potential folding activities of habu PDI family proteins, PDIA3 and P4HB, against Cys-rich venome proteins and peptides.

*Takebayashi S（竹林聖純）and Isomoto A（磯本明子）：These authors contributed equally.

Protein Disulfide Isomerase, Protobothrops flavoviridis, redoxidation

発表責任者：竹林聖純（seijun.takebayashi.s5@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C06-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

黄色と赤色を示すイソギンチャク Corynactis californica 由来の蛍光タンパク質 eCcRFP の構造形成に影響する要因の解析

Analysis of factors that affect structure formation of eCcRFP, a fluorescent protein emitting yellow and red colors from sea anemone Corynactis californica

○藤原 郁也、赤田 倫司、星田 尚司（山口大創）
○Fumiya FUJIWARA, Rinji AKADA, Hisashi HOSHIDA (Yamaguchi Univ.)

一般に、単一の遺伝子は細胞内で特定の構造を持つタンパク質を発現する。しかし、様々な海洋生物由来の蛍光タンパク質遺伝子を出芽酵母や大腸菌で発現させたところ、いくつかの蛍光タンパク質が宿主によって異なる蛍光色を示した。ここから同一の遺伝子が宿主によって異なる構造のタンパク質を産出するという仮説を立てた。そこで本研究では、大腸菌と酵母で大きく蛍光特性の異なった eCcRFP の蛍光に影響する要因を解析した。eCcRFP を発現させた大腸菌を pH 8 または pH 10 の緩衝液と界面活性剤（Triton X-100）の混合液に懸濁し、50℃で 3 時間加温しタンパク質を抽出した後、4℃で 3 日間保管したときに抽出物の色や観測される蛍光スペクトルが異なることを発見した。そこで、水に eCcRFP を発現する大腸菌を懸濁し、超音波破砕でタンパク質を取り出し、水、pH 8 または pH 10 の緩衝液を混合し 4℃で変化を観測した。混ぜた直後はどの溶液でも色や蛍光を示さなかったが、1 日で pH 10 の溶液に黄色が現れた。2 日後には pH 8 の溶液にも赤色が現れ、それぞれ蛍光強度が高くなった。これらの結果から、タンパク質構造形成に pH 及び低温での時間が影響し、抽出直後のタンパク質構造は不安定であり各 pH 環境より異なる構造で安定化したと考えている。

It is generally recognized that a single gene produces a single protein that forms a single structure in the cell. However, when several fluorescent protein genes were expressed in *S. cerevisiae* and *E. coli*, the fluorescence characteristics of some of the proteins were different. Thus, we hypothesized that a single gene can produce proteins with different structures depending on the host environment. In this study, we analyzed the fluorecent protein eCcRFP which showed different fluorescence properties in yeast and *E. coli* in order to understand factors affecting structure formation. *E. coli* cells expressing eCcRFP were suspended in pH 8 or pH 10 buffers with Triton X-100 and incubated at 50°C for 3 hours. Then, the extracts were incubated at 4°C. The colors of the extracts and the observed fluorescence spectra were different when incubated in pH 8 and 10, indicating that pH is one of the factors affecting structure formation process. When *E. coli* cells expressing eCcRFP were suspended in water and sonicated for cell disruption, the sonicated suspension showed no color and fluorescence. Then, the suspension was a mixed with pH 8 or pH 10 buffer and further incubation at 4℃. After the incubation for 1d at pH 10, yellow color appeared. After 2d, red color appeared at pH 8. We consider that eCcRFP protein immediately after extraction is unstable and form different structures in each pH environment.

fluorescent protein, pH, fluorescent spectra

講演番号：4C06-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

緑膿菌においてシアン化物イオンにより発現が誘導される亜硫酸還元酵素ホモログ遺伝子の機能解明

Identification the function of the cyanide-inducible sulfite reductase gene homolog in *Pseudomonas aeruginosa*

○長田 瑞希[1]、亀谷 将史[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2] ([1]東大 農生科 応生工、[2]東大微生物連携機構)
○ Mizuki NAGATA[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Masaharu ISHII[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo)

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は感染症を引き起こす病原菌として知られている。緑膿菌はシアン化物イオン(CN-)を生合成することができ、CN^-は周囲の微生物の生育を阻害するのに役立っていると考えられる。また、緑膿菌にはCN^-により発現量が上昇する遺伝子群が存在しており、この遺伝子群は緑膿菌のCN^-耐性に関わっていることが予想される。このうち、*PA4130* は亜硫酸還元酵素をコードする *cysI* と相同性がある。シロヘム含酵素である CysI はCN^-による阻害が予想されることから、PA4130 は CN-存在下で CysI の役割を代替する酵素であることが予想された。

PA4130 の機能を明らかにするため、その遺伝子破壊株を作製し、CN^-存在下での生育を測定した。その結果、*PA4130* 破壊株の生育が野生株に比べて抑えられる現象が確認された。続いて、*cysI* 破壊株を作製し、生育に亜硫酸還元を必要とするシステイン制限培地での生育を観察した結果、*cysI* 破壊株は生育することができた。また、*cysI* と *PA4130* の二重破壊株では、CN^-の有無によらずシステイン要求性を示した。これらの結果から、PA4130 が CN^-非感受性の亜硫酸還元酵素であることが示唆された。

Pseudomonas aeruginosa is a pathogen that causes infectious disease. *P. aeruginosa* produces cyanide, which inhibits the growth of other bacteria. There is a gene cluster specifically upregulated by cyanide in *P. aeruginosa* genome, and the genes in the cluster are expected to be involved in cyanide tolerance of *P. aeruginosa*. *PA4130*, one of the genes in the cluster, has high homology to *cysI*, which encodes a sulfite reductase involved in cysteine synthesis. CysI is thought to be sensitive to cyanide because it contains siroheme. Therefore, I hypothesized that PA4130 is an alternative sulfite reductase in the presence of cyanide.

For identification of the function of PA4130, the *PA4130* gene deletion mutant was constructed and the growth profile was investigated. The mutant strain showed poor growth in the presence of cyanide compared to the wild-type strain. The *cysI* deletion mutant was able to grow in the cysteine limited medium. The *cysI PA4130* double mutant required cysteine for growth irrespective of cyanide addition. These results clearly indicate that PA4130 functions as a cyanide-insensitive sulfite reductase.

Pseudomonas aeruginosa, sulfite reductase, cyanide

講演番号：4C06-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

昆虫病原性真菌類由来レクチンの異種発現と諸性質決定

Heterologous expression and characterization of lectins from entomopathogenic fungi

○小野 晶子[1,2]、竹島 愛乃[3]、崔 宰熏[3,4]、尾形 慎[5]、平井 浩文[4]、道羅 英夫[4]、河岸 洋和[3,4]、鈴木 智大[2]([1]東京農工大院・連合農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研、[5]福島大・農)

○Akiko ONO[1,2], Yoshino TAKESHIMA[3], Jae-hoon CHOI[3,4], Makoto OGATA[5], Hirofumi HIRAI[4], Hideo DOHRA[4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Tomohiro SUZUKI[2] ([1]United Grad. Sch. of Agri. Sci., Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]C-Bio, Utsunomiya Univ., [3]Dept. of Agr., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [5]Fac. of Food and Agric. Sci., Fukushima Univ.)

本研究室ではこれまでに、子嚢菌ボタンタケ目ノムシタケ科サナギタケ（*Cordyceps militaris*）のレクチンタンパク質が、菌と昆虫との相互作用に関与しているのではないかという仮説のもと、子実体から新規のサナギタケ由来レクチン（*C. militaris* lectin 4、CmLec4）を精製・諸性質を決定し、本レクチンが宿主であるカイコ蛹中の性特異的貯蔵タンパク質（Sex-specific storage-protein 2、SP2）に結合することを見出した[1)]。さらに、同じノムシタケ科の *Beauveria bassiana* のゲノム中からオルソログ遺伝子を探索した結果、CmLec4 に存在する構造モチーフである Ricin B-related lectin domain を有するタンパク質が 3 つ推定された（Cell wall protein 1-3, CWP）。昆虫病原性真菌はこれまでに、宿主範囲が広くなると遺伝子数が増加することが明らかになっていることから[2)]、本レクチンタンパク質も宿主範囲に関与している可能性が高い。そこで本研究では、宿主範囲が異なる二つの病原性真菌のレクチンの生化学的諸性質を比較することで、真菌-宿主昆虫間の相互作用の推定を行うこととした。CmLec4 および CWP1-3 のレクチン遺伝子をクローニングし、pColdI ベクターと連結することで発現用ベクターを構築した。*Escherichia coli* BL21-CodonPlus（DE3）を宿主として異種発現を行った結果、得られた組換えタンパク質はレクチン活性を有することを明らかにした。現在これらの諸性質を検討中である。

To date, we succeeded in purification and characterization of a novel lectin (*Cordyceps militaris* lectin: CmLec4) from the mushroom *C. militaris* and found that CmLec4 binds to the sex-specific storage protein (SP2) in silkworm extract of *Bombyx mori* [1)]. As a result of mining for CmLec4-homologous genes from *Beauveria bassiana* genome, which belongs to the same *Cordycipitaceae* as *C. militaris*, three cell wall proteins (CWP1-3) were identified. Thus, the purpose of this study is to estimate the interaction between fungi and host insects by comparing the biochemical properties of these lectins from two entomopathogenic fungi with different host ranges.

The expression vectors were constructed by ligating the full-length cDNA sequences of *cmlec4* and *cwp1-3* into the pColdI vector. The constructed vectors were transformed into *E. coli* BL21-CodonPlus and recombinant proteins were successfully expressed and purified. The biochemical properties of obtained lectins, including sugar-binding specificity, are currently under investigation.

1) 小野ら、日本農芸化学会 2019 年度大会、2) G. Xiao, et. al., *Sci Rep* 2 : 483 (2012).

Cordyceps militaris, lectin, sugar-binding specificity

講演番号：4C06-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

Csr sRNA 安定性制御に関わる CsrD のアミノ酸残基の解析

Analysis of CsrD amino acid residues in control of Csr sRNA decay

○吉田 将来[1]、Gladyshchuk Olga[1]、藤樫 紅梅[2]、岡村 龍盛[1]、小谷 果穂[2]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2,3] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農、[3]新潟大・日本酒学センター)
○Masaki YOSHIDA[1], Olga GLADYSHCHUK[1], Koume TOGASHI[2], Ryusei OKAMURA[1], Kaho KOTANI[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Fac. of Agric., Niigata Univ., [3]Sakeology Ctr., Niigata Univ.)

Csr（Carbon storage regulator）システムは多くの細菌に存在するグローバル制御システムであり、バイオフィルム形成やグリコーゲン生合成、病原性などに関する遺伝子の発現を制御する。大腸菌の Csr システムは、2 つのタンパク質と 2 つの small RNA からなる。RNA 結合タンパク質 CsrA は、標的 mRNA に結合し、翻訳および mRNA 安定性を変化させることで様々な遺伝子発現を制御する。Small RNA である CsrB と CsrC は、CsrA と結合して標的 mRNA から CsrA を隔離する。CsrD は CsrB/C RNA の RNase E 依存的分解を調節し、それにより標的 mRNA に結合可能な遊離 CsrA 数を制御する。

今回、CsrD ホモログ間で保存性の高いアミノ酸残基をアラニンに置換し、*E. coli* で発現させて CsrB の安定性に与える影響を調べた。その結果、CsrD 活性に影響を与えるアミノ酸残基が同定された。

また、大腸菌と系統的に離れている *Aeromonas salmonicida* の *csr* 遺伝子を同定した。*A. salmonicida* の *csr* 遺伝子をプラスミド上で発現させた場合、相当する大腸菌 *csr* 変異株の表現型を補完した。*A. salmonicida* の CsrD は大腸菌 CsrD 活性に重要なアミノ酸残基が高度に保存されており、大腸菌 *csrD* 変異株で発現させたところ、CsrB RNA の分解に影響を与えた。

The Csr (Carbon storage regulator) system is a global regulatory system that exists in many bacteria and regulates the expression of various genes, related to biofilm formation, glycogen biosynthesis, virulence, etc. In *Escherichia coli*, the Csr system comprises two proteins and two small RNAs. The RNA-binding protein CsrA regulates the expression of various genes by binding to target mRNA and regulating translation as well as mRNA stability. Small RNAs CsrB and CsrC bind to CsrA and sequester CsrA from the target mRNA. The other protein, CsrD, regulates RNase E-dependent degradation of CsrB and CsrC RNAs, thereby controlling the number of free CsrA that can bind to the target mRNA.

In this study, we replaced well-conserved CsrD amino acid residues in its homolog with alanine residues and expressed the CsrD mutant in *E. coli* to investigate the effect on CsrB stability. As a result, the residues affecting CsrD activity were determined. Also, we investigated Csr system in *Aeromonas salmonicida*, which is phylogenetically distant from *E. coli*. Overexpression of *A. salmonicida csr* genes on the plasmid complemented the phenotype of corresponding *csr* mutation in *E. coli*. *A. salmonicida* CsrD contains most of the amino acid residues important for *E. coli* CsrD activity and affects the decay of CsrB RNA in *E. coli csrD* mutant.

small RNA, Csr system, CsrD

発表責任者：鈴木 一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4C06-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

多重遺伝子破壊による黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン遺伝子群の機能解析

Functional analysis of hydrophobins by multiple disruption in *Aspergillus oryzae*

○田丸 詩織、近藤 永治、安藤 祐人、中島 春紫（明治大農・農化）
○Shiori TAMARU, Eiji KONDO, Yuto ANDO, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

ハイドロフォービンは、糸状菌や担子菌が生産する低分子量の両親媒性タンパク質である。単量体として菌体外へ分泌された後、菌体表面に自己集合して強固な単層を形成し、気中菌糸や分生子に撥水性を付与する。特徴的な８つのシステイン残基の配列パターンがあることを除き相同的な領域がみられない。１つの菌株につき複数のハイドロフォービン遺伝子を保有することから、それぞれのハイドロフォービンを機能的に使い分けていると考えられる。

筆者らは、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムから９種類のハイドロフォービン遺伝子（*hypA-hypI*）を単離し、それぞれ発現時期や発現量が大きく異なることを確認している。本研究では、９種類のハイドロフォービン遺伝子群の破壊株を系統的に作製し、表現型を解析することにより *A. oryzae* におけるハイドロフォービン遺伝子群の生態的意義の解析を行っている。

現在までに *pyrG* 遺伝子を利用したマーカーリサイクリング法により７重破壊株（*ΔhypA, B, C, D, E, F, G*）まで構築しており、破壊したハイドロフォービン遺伝子が増えるほど、特定のストレス下における気中菌糸密度が増加し、分生子形成能が低下する傾向を観察している。ハイドロフォービン遺伝子の破壊は徐々に困難になっており、*adeA* 遺伝子を示標に７重破壊株の形質転換能など遺伝生化学的性質を検討し、多重破壊株の構築とハイドロフォービンの機能の解明をめざしている。

Hydrophobins are amphiphilic, low-molecular-weight proteins produced by filamentous fungi and basidiomycetes, and self-assemble on the surface of aerial hyphae and conidia to confer water repellency. Since each strain contains multiple hydrophobin genes, it is suggested that each hydrophobin plays its own roles. We have isolated nine hydrophobin genes (*hypA-I*) from the genome of *A. oryzae*. In this study, we investigate biological functions of the hydrophobin genes in *A. oryzae* by systematic construction of disruptant strains of the hydrophobin genes and comparing their phenotypes.

We have constructed the septuple disruptant (*ΔhypA, B, C, D, E, F, G*) by marker recycling method using the *pyrG* gene, and observed the tendency for increase of aerial hyphal density and decrease of conidia formation under several stresses as the number of disrupted *hyp* genes. We also experienced that disruption of *hyp* genes become gradually difficult. We analyze the transformation capability and phenotypic properties of the multiple *hyp* disruptants using the *adeA* gene as a marker.

Aspergillus oryzae, hydrophobin, disruption

講演番号：4C06-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン生産における、培地 pH が生産性・糖鎖修飾に及ぼす影響

Effect of medium pH on productivity of hydrophobins in *Aspergillus oryzae*.

○羽生 龍真、田近 麻友子、天貝 拓海、竹内 南優紀、中野 宏軌、中島 春紫（明治大農・農化）
○Ryushin HANYU, Mayuko TADIKA, Takumi AMAGAI, Miyuki TAKEUCHI, Hiroki NAKANO, Harushi NAKJIMA (Meiji Univ.)

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する低分子量の分泌タンパク質である。単量体として分泌され、細胞表層に自己集合して菌体に撥水性を付与する。近年、ハイドロフォービンの表面活性作用や吸着性などの特徴を活用した応用利用が試みられているが、産業利用のためにはハイドロフォービンの大量生産および精製システムの構築が必要である。

筆者らはこれまでに *Aspergillus oryzae* から 9 種類のハイドロフォービン HypA～I を見出し、HypA については解糖系の *enoA* プロモーターを用いた液体培養による大量生産および精製システムを確立している。しかし、HypA 以外のハイドロフォービンについては同様の培養条件では大量生産、精製が難しいことが分かってきた。*enoA* プロモーター制御下で *hypD* 遺伝子を発現させて液体培養を行った時、pH4.0 のクエン酸 buffer の添加により 15～50 kDa の夾雑タンパク質が減少し HypD の純度が増大することを見い出した。そこで、HypA、B、D について液体培養時の培地の pH と生産性・純度・糖鎖付加状況の関連性を系統的に検討している。

Hydrophobins are low molecular weight secretory proteins produced by filamentous fungi and basidiomycetes. Hydrophobins self-assemble on the cell surface and confer water repellency. In recent years, utilization of hydrophobins for industrial application are attempts with the features of surface activity and adhesion. In this purpose, production and purification system of the hydrophobins is needed to be constructed.

We have found 9 hydrophobins HypA-I from *Aspergillus oryzae*, and have constructed effective production and purification system for HypA in submerged culture utilizing glycolytic *enoA* promoter and *A.oryzae* host. Unfortunately, it has been found to be difficult for the other hydrophobins to produce under the same method. We also found that addition of citric buffer (pH 4.0) clearly reduced the unintended proteins of 15 to 50 kDa in the *hypD* expressing culture medium. We are systematically investigating for the relationship between the initial pH of medium and properties and productivity of HypA, B, and D.

hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, citric buffer

講演番号：4C06-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

qTn-Seq 法を用いた *Sphingobium japonicum* UT26 株の超低栄養環境での増殖に関わる遺伝子の同定

Identification of genes involved in the high-yield growth under oligotrophic conditions in *Sphingobium japonicum* strain UT26 using qTn-Seq method

○野々山 翔太、柳 熙盟、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Shouta NONOYAMA, Ximeng LIU, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

我々は、従属栄養細菌である有機塩素系殺虫剤分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株が alcohol dehydrogenase をコードする *adhX* 遺伝子の高発現により有機炭素源非添加無機塩培地で CO_2 の固定を伴い活発に増殖する現象 (HYGO 表現型) を見出した (*Microbiology* **166**: 531-545, 2020)。本研究では、本表現型の機構解明を目的として、qTn-Seq 法を HYGO 表現型株に適用し、本表現型に関与する遺伝子を同定した。qTn-Seq 法が可能な Tn カセットと transposase 遺伝子を有するプラスミドを HYGO 表現型株に導入し、ゲノム上にランダムに Tn カセットが挿入された約 1,1000 クローンからなるライブラリーを作製した。本ライブラリーを (i) 完全培地、(ii) グルコースを添加した無機塩培地、および (iii) 有機炭素源非添加無機塩培地に接種し、増殖した菌体の Tn カセット挿入部位を NGS で解読し、リード数を比較した。その結果、グリオキシル酸回路関連酵素、各種制御因子、TonB-dependent receptor like protein、glycine dehydrogenase, NAD(P) transhydrogenase, urea carboxylase をコードする遺伝子などが本表現型に重要な遺伝子として同定された。また、pyruvate dehydrogenase 遺伝子の破壊が HYGO 表現型を促進することも明らかになった。RNA-Seq 解析の結果等も総合し、本表現型株ではグリオキシル酸回路によって脱炭酸を抑えると共にアナプレロティック反応により CO_2 を固定し、培地中に極微量に存在するアルコール類等の有機物をエネルギー源・炭素源として利用して増殖している可能性が考えられる。

A heterotrophic organochlorine pesticide degrading bacterium *Sphingobium japonicum* strain UT26 grows well with CO_2 fixation in inorganic salt medium without addition of any organic carbon source (HYGO phenotype) by high expression of the *adhX* gene encoding alcohol dehydrogenase (Microbiology 166: 531-545, 2020). In this study, we applied the qTn-Seq method to the HYGO phenotype strain. As a result, genes encoding glyoxylate circuit-related enzymes, various regulatory factors, TonB-dependent receptor-like protein, glycine dehydrogenase, NAD(P) transhydrogenase, and urea carboxylase were found to be important for this phenotype. In addition, disruption of pyruvate dehydrogenase gene promoted the HYGO phenotype. These results including RNA-Seq analysis suggest that this phenotype strain suppresses decarboxylation by the glyoxylate circuit, fixes CO_2 by anaplerotic reaction, and utilizes organic substances such as alcohols present in minute amounts in the medium as energy and carbon sources.

oligotroph, Tn-Seq, sphingomonads

講演番号：4C06-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

水田土壌において鉄還元窒素固定菌への炭素源供給を担う微生物群の解明

Clarification of microbes contributing to carbon source supply to iron-reducing nitrogen-fixing bacteria in rice paddy field

○笠原 拓己[1]、増田 曜子[1]、妹尾 啓史[1,2] ([1]東京大・院農、[2]東京大・微生物連携機構)
○Takumi KASAHARA[1], Yoko MASUDA[1], Keishi SENOO[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ.CRIIM)

水田土壌では微生物による窒素固定が窒素肥沃度維持に大きな役割を果たしていると考えられる。我々が行った水田土壌のメタトランスクリプトーム解析等により、鉄還元窒素固定菌（*Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌）が水田における窒素固定のキープレイヤーである可能性が示された。鉄還元窒素固定菌が生育し窒素固定を行うためには、炭素源・エネルギー源となる炭素化合物が必須であり、水田土壌における炭素化合物の主要な供給源は水稲であると考えられる。これまでに我々は、鉄還元窒素固定菌は酢酸等の低分子炭素化合物を利用すること、一部は不溶性セルロース等の高分子炭素化合物も利用できることを明らかにした。これらのことから、鉄還元窒素固定菌は、稲わら由来の高分子炭素化合物および、その分解により生じた低分子炭素化合物を資化して窒素固定を行う、との仮説が考えられた。本研究では、水田土壌ミクロコズムを用いた 13C-DNA-SIP を行い、鉄還元窒素固定菌への稲わら由来炭素の取り込みを証明するとともに、稲わら分解を通じて鉄還元窒素固定菌に炭素源を供給する微生物群集の解明を試みた。その結果、両属鉄還元菌に稲わら添加後 28 日目に最も顕著な 13C の取り込みが確認された。また、培養期間全体を通じて *Geobacter* 属への 13C の取り込みが他の細菌と比べて著しく多いことから、高分子炭素化合物の分解能を有する *Geobacter* 属の細菌が、稲わら分解における主要な役割を果たしていることが示唆された。

Nitrogen-fixing microorganisms play an important role in sustainable nitrogen fertility of paddy soils. Our metatranscriptomics revealed that iron-reducing bacteria (*Anaeromyxobacter*, *Geobacter*) are key players of nitrogen fixation in paddy soils. Carbon compounds are essential for the growth of iron-reducing bacteria, and rice straw is a major source of carbon compounds in paddy soil. We hypothesized that iron-reducing bacteria fix nitrogen by utilizing both high molecular carbon compounds derived from rice straw and low molecular carbon compounds generated by microbial decomposition of rice straw. In this study, we conducted 13C-DNA-SIP using paddy soil microcosms added with 13C rice straw to confirm the uptake of rice straw-derived carbon by iron-reducing bacteria and to elucidate the microbial community responsible for carbon supply to iron-reducing bacteria through straw decomposition. As a result, significant incorporation of 13C into *Geobacter* was observed, suggesting that *Geobacter* with the ability to degrade high molecular carbon compounds plays a significant role in rice straw decomposition.

Iron reducing bacteria, Paddy soil, 13C stable isotope probing

講演番号：4C06-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* とその近縁種における異なるアミラーゼ生産制御様式

Difference in amylase production regulatory fashions in *Aspergillus luchuensis* and its closely related species

○森瀬 太一[1]、橋本 渉[1]、塚原 正俊[2]、水谷 治[3]、山田 修[4]、渡部 昭[1]、藤田 翔貴[1]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大院・農、[2]株式会社バイオジェット、[3]琉球大・農、[4]酒総研)

○Taichi Morise[1], Wataru Hashimoto[1], Masatoshi Tsukahara[2], Osamu Mizutani[3], Osamu Yamada[4], Akira Watanabe[1], Syoki Fujita[1], Takahiro Shintani[1], Katsuya Gomi[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]BioJet Co., Ltd., [3]Fac. Agric., Univ. of Ryukyus, [4]Natl. Res. Inst. Brew.)

産業上重要なアミラーゼの生産制御機構に関する研究はこれまで主に黄麹菌 *Aspergillus oryzae* やモデルカビ *A. nidulans* で行われてきた。未解明であった黒麹菌 *A. luchuensis* についても研究が行われ、上記 2 種とはアミラーゼ遺伝子およびそれらの発現を制御する転写因子 AmyR の発現様式が異なる可能性が示唆された。本研究ではこれら可能性の検証に加え、黒麹菌の近縁種である *A. niger* と *A. tubingensis* についてアミラーゼ関連遺伝子の発現および AmyR の機能を調べることで、*Aspergillus* 属 *Nigri* 節のアミラーゼ生産制御機構を比較することとした。

イソマルトース含有培地で培養した黒麹菌、*A. niger*、*A. tubingensis* において、定量 PCR によりアミラーゼ関連遺伝子（α-アミラーゼ *amyA*、α-グルコシダーゼ *agdA*、グルコアミラーゼ *glaA*、耐酸性α-アミラーゼ *asaA/aamA*、転写因子 *amyR*）の発現を調べた。黒麹菌ではアミラーゼ遺伝子発現が遅れて誘導されることが再確認された。一方、*A. niger* ではそれら遺伝子が構成的に発現しており、その後さらに発現が誘導され、*A. tubingensis* では黒麹菌よりもさらに遅れて遺伝子発現が誘導された。アミラーゼ遺伝子の発現様式の違いは *amyR* の発現様式の違いに起因すると考え、現在 *amyR* の発現機構についての解析とともに、各種 AmyR の機能解析を進めているところである。

Regulatory mechanisms for amylase production have been mainly studied on *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans*. However, recent researches have suggested that the expression pattern of the amylase-related genes differ between the black koji mold *A. luchuensis* and the above two species. In this study, we investigated the expression of amylase-related genes and the function of the transcription factor AmyR in *A. niger* and *A. tubingensis* as well as *A. luchuensis* and compared that mechanism among the genus *Aspergillus* section *Nigri*.

We examined the expression of amylase-related genes (*amyA*, *agdA*, *glaA*, *asaA/aamA*, and *amyR*) in three fungal species grown in the isomaltose medium by quantitative RT-PCR. The relatively and extremely delayed expression of amylase genes were observed in *A. luchuensis* and *A. tubingensis*, respectively, while constitutive and further induced expression was observed in *A. niger*. These results suggested that the difference in amylase genes expression profiles was due to the difference in the expression pattern of amyR and the function of AmyR, thus which are currently investigated.

Aspergillus section *Nigri*, amylase gene expression, AmyR

発表責任者：森瀬太一（taichi.morise.p1@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C06-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析

Study on transcription factor PrtR of *Aspergillus oryzae*

○沼澤 里佳[1]、田中 優花子[2]、西岡 佐和子[2]、辻 遼太郎[2]、田中 瑞己[2]、山形 洋平[1,2]([1]農工大院連農、[2]農工大院農応生化)
○ Rika NUMAZAWA[1], Yukako TANAKA[2], Sawako NISHIOKA[2], Ryotaro TSUJI[2], Mizuki TANAKA[2], Youhei YAMAGATA[1,2] ([1]United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の有する転写因子 PrtR は他の *Aspergillus* 属で見出されている PrtT のオルソログであり、広範な分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写を制御すると考えられている。本研究では PrtR 欠損株を用い、小麦ふすまを用いた固体培養における PrtR の制御下にある遺伝子の同定並びに制御機構の解明を目指した。分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写解析の結果、アスパルティックエンドペプチダーゼ（APase）遺伝子 *pepO*、セリンタイプカルボキシペプチターゼ（CPase）遺伝子 *ocpO*、セリンエンドペプチダーゼ遺伝子 *alpA*、トリペプチジルペプチダーゼ遺伝子 *tppA* が PrtR により正に制御されることが明らかになった。また、固体培養時に高発現することが報告されているセリンエンドペプチダーゼ、メタロエンドペプチターゼ、CPase をそれぞれコードする遺伝子 *aorA*, *deuA, ocpA* も正に制御されることが示された。一方、転写量の低いいくつかの APase と CPase、ジペプチジルペプチダーゼ遺伝子 *dppB*, *dppE*, *dppF* 並びにトリペプチジルペプチダーゼ遺伝子 *tppC* は PrtR により負の制御を受けることが示された。

このように、小麦ふすまを用いた固体培養において転写量の高い主要なペプチターゼ遺伝子は PrtR により正に制御され、転写量の低いエンドペプチダーゼやエキソペプチダーゼに分類されるジペプチジル・トリペプチジルペプチダーゼ遺伝子では負に制御されるものが見られた。液体培養と固体培養における結果を比較すると、PrtR による制御様式が異なる遺伝子が多数存在しており、固体培養の方が PrtR の制御下にある遺伝子の数が多いことが明らかになった。

Aspergillus oryzae PrtR is an ortholog of PrtT, which is found in other *Aspergillus* species, has been supposed to regulate the transcription of broad-ranging secreted peptidase genes. In this study, we aimed to identify the genes under the control of PrtR in solid-state culture and to elucidate the regulatory mechanism. *prtR* deletion mutant strains were cultured in wheat bran medium for transcription analysis of secreted peptidase genes. The results suggested that aspartic endopeptidase gene, *pepO* and serine type carboxypeptidase genes, *ocpO* and *ocpA* were positively regulated by PrtR. In addition, the major peptidase genes with high transcript levels, such as *alpA*, *aorA*, and *deuA*, were also positively regulated by PrtR. On the other hand, dipeptidyl peptidases genes, *dppB*, *dppE*, and *dppF* and some peptidase genes with low transcriptional levels were negatively regulated by PrtR.

Aspergillus oryzae, transcription factor, extracellular peptidases

発表責任者：沼澤里佳（s212196r@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：4C06-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム C

麹菌由来の転写因子 AoXlnR による発現制御と結合部位近傍における DNA 構造との関連性の解明

Analysis of the relationship between the regulation of expression by the transcription factor AoXlnR from *Aspergillus oryzae* and the DNA structure around the binding site

○岡 大椰[1]、兒島 孝明[1]、加藤 竜司[2]、井原 邦夫[3]、中野 秀雄[1]（[1]名大院・生命農、[2]名大院・創薬、[3]名大・遺伝子解析施設）
○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Ryuji Kato[2], Kunio Ihara[3], Hideo Nakano[1] ([1]Graduate school of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Nagoya Univ., [3]Center for Gene research, Nagoya Univ.)

当研究グループでは、転写因子の結合部位解析の一つである Genomic SELEX-Seq と発現変動解析をバイオインフォマティクスにより融合し、麹菌由来のキシラン及びセルロース代謝に関与する転写因子 AoXlnR を介した転写制御機構を網羅的に解析した。これらの解析過程で、開始コドン上流に AoXlnR 結合モチーフを保有するにも関わらず、標的転写因子の高発現に応答しない遺伝子が多数検出されることを見出した。このことは、転写因子-DNA 間相互作用には DNA 一次配列情報に加え、未知の要因が関与していることを示唆している。本研究では、AoXlnR の転写制御情報を基に、結合モチーフ付近の配列から DNA 構造情報を抽出し、それらを用いて機械学習による転写因子-DNA 結合メカニズム予測モデルの構築を実施した。さらには、得られた予測モデルを用い、野生株の持つプロモーターと同等の発現が期待される DNA 構造を有する新たなプロモーター設計し、それらを相同組み換えによって麹菌ゲノムに導入することで、その発現量を解析した。その結果、予測モデルによって発現を期待されたプロモーターでは、麹菌内で野生株と同等以上のキシラン誘導への発現応答が観察された。一方、予測モデルにおいて下流に位置する遺伝子がキシラン誘導に応答しないと判定されたプロモーターでは、麹菌内で野生型プロモーターより少ない発現量を示した。

By integrating information obtained from genomic SELEX-Seq and expression differences analysis, we genome-widely identified genes that are regulated directly by a transcription factor (TF) in our previous work. The study also showed that thousands of genes carrying one or more copies of the binding motif of the TF, AoXlnR from *Aspergillus oryzae*, in their promoter regions display no response to the over expression of AoXlnR in *A.oryzae*. This suggests that the interaction between the TF and DNA involves unknown factors in addition to the sequence of the binding motif. In this study, we tried to construct a discriminant model by a support vector machine using the obtained DNA structure values as input parameters and an expression level in response to high expression of AoXlnR as an output parameter. In addition, based on these prediction models, DNA structural promoters that are expected to be expressed at the same level as the promoters of the wild strains were introduced into *A. oryzae* using the CRISPR-Cas9 system, and their expression levels were analyzed. The results showed that the promoters expected to be expressed by the prediction model were expressed at the same or higher levels in *A. oryzae* than in the wild strain, while the promoters not expected to be expressed were expressed at lower levels in *A. oryzae*.

Transcriptome, *Aspergillus oryzae*, Bioinfomatics

発表責任者：兒島孝明（kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4C08-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

Candida boidinii におけるメタノール誘導性転写因子 Mpp1 の生理機能解析

Physiological function of the methanol-induced transcription factor Mpp1 in *Candida boidinii*

○井上 紘一、岩瀬 公佑、由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○Koichi Inoue, Kosuke Iwase, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

メタノール資化性酵母は、メタノールによって強力かつ特異的に誘導される遺伝子プロモーターを有し、異種遺伝子発現のための宿主として広く利用されている。メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* では、これまで同定したメタノール誘導性遺伝子発現に関与する転写活性化因子のうち Mpp1 のみがメタノール誘導性を示し、メタノール誘導初期において中心的な役割を果たすと考えられる。本研究では、Mpp1 の発現制御や発現レベルを改変することによるメタノール生育やメタノール誘導性遺伝子発現への影響を解析し、Mpp1 の生理機能を調べた。

mpp1 Δ 株において構成的 *TDH3* プロモーター支配下に *MPP1* を恒常発現させた場合、シングルコピー導入株はメタノール培地に生育できず、マルチコピー導入株でも生育遅延が認められた。また野生株において *MPP1* プロモーター支配下に *MPP1* を過剰発現させた場合も、メタノール培地での生育遅延が認められた。これらの株では、メタノール誘導性遺伝子（*AOD1, DAS1*）の発現レベルが野生株よりも著しく低下していたことから、適切なメタノール誘導性遺伝子発現には、一定量以上の Mpp1 が必要であり、過剰量の Mpp1 はメタノール誘導性遺伝子発現を負に制御すること、Mpp1 の発現量によってメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが厳密に調節されていることが示唆された。

Methylotrophic yeasts are capable of growth on methanol as the sole carbon and energy source. They have been used as hosts for heterologous protein production, which is achieved with their strongly and tightly regulated methanol-induced promoters. The transcription factor Mpp1 is necessary for methanol induction in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. The unique feature is that Mpp1 itself is induced by methanol. In this study, several types of Mpp1-constitutively expressed strains and overexpressing strains possessing different gene copies were analyzed to seek the physiological function of Mpp1. The *MPP1*-expressing strain with lower expression level than the control strain showed significant growth delay and the decrease of methanol-induced gene expression (e.g., *AOD1, DAS1*). Moreover, the *MPP1*-overexpressing strain also exhibited growth retardation. These results suggest that the appropriate expression level of Mpp1 is important for the strict regulation of methanol-induced expression.

Methylotrophic yeast, Transcription factor, Methanol-induced gene expression

講演番号：4C08-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* における、C2H2 型転写因子 PaMig1 のグルコース抑制への寄与の解析

Identification and functional analysis of the C2H2 transcription factor Mig1 from the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*.

○田中 拓未[1]、三浦 敦宏[1]、田中 瑞己[2]、北本 宏子[1] ([1]農研機構・農環研、[2]農工大・農)
○TAKUMI TANAKA[1], ATSUHIRO MIURA[1], MIZUKI TANAKA[2], HIROKO KITAMOTO[1] ([1]NARO, [2]TUAT)

一般に、微生物が保有するキシラナーゼ等の多糖分解酵素遺伝子群の発現は、グルコース存在下で強く抑制される（炭素源カタボライト抑制；CCR)。真核微生物の CCR の機構は、子嚢菌において C2H2 型転写因子 Mig1（又は CreA と呼ばれる）が直接抑制に作用する[1]一方、担子菌では殆ど研究されていない。我々はこれまで、担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* を酵素生産宿主菌として育種[2]や遺伝子操作手法構築[2,3]を行っており、本研究では転写因子 Mig1 の同定とその機能解析を試みた。

複数の真菌由来の CreA/Mig1 の DNA 結合ドメイン配列を用いた BLAST 解析により、*P. antarctica* 全ゲノム配列から 1 つの *Mig1* 遺伝子候補配列を抽出し、Pa*Mig1* と名付けた。Pa*Mig1* から推定されるアミノ酸配列（PaMig1）は、他の CreA/Mig1 と比較して DNA 結合ドメイン以外の相同性が非常に低かった。Pa*Mig1* 破壊株と相補株を作製して培養試験を行ったところ、Pa*Mig1* 破壊株はグルコース存在下でのキシラナーゼプロモーターの抑制が解除され、相補株では抑制が復帰した。このことから、PaMig1 は CCR 制御因子であることが示唆された。また、培養試験から、PaMig1 がキシラナーゼのみならずリパーゼやクチナーゼの発現にも関与することが示唆された。さらに、Pa*Mig1* 破壊株に C 末端側を削り込んだ Pa*Mig1* を導入し、得られた株の表現型解析から、PaMig1 の抑制ドメインと思われる領域も見出すことができた。

本研究は、生研支援センターの支援の下実施した（課題番号 01029C)。

Expression of polysaccharide-degrading enzyme genes (e.g. cellulase, hemicellulase etc.) of eukaryotic microorganisms are repressed by glucose (Carbon catabolite repression; CCR). In ascomycetes, the C2H2-transcription factor Mig1 or CreA directly involves in CCR [1], whereas, CCR has been poorly studied in basidiomycetes. In this study, we identified the Mig1 (PaMig1) of the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* [2,3], and constructed Pa*Mig1*-desrupting and complementing strains. Analysis of their phenotypes suggested that PaMig1 involves in the repression of xylanase genes. It was also suggested that PaMig1 also regulates the expression of lipases and cutinase. Therefore, PaMig1 appears to be a CCR-regulating factor of *P. antarctica*.

[1] Adman M et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, **19**: 48
[2] Watanabe T et al. *J. Biosci. Bioeng*. 2014, **117**: 325-329
[3] Kunitake et al. *Fungal. Genet. Biol.* **130**: 82-90,

Pseudozyma antarctica, carbon catabolite repression, transcription factor

講演番号：4C08-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

出芽酵母における部位特異的にクロマチン凝縮度を制御する新規手法の開発

Development of a novel method to regulate site-specific chromatin condensation in *Saccharomyces cerevisiae*

○山本 凌大、天井 貴光、植田 充美、黒田 浩一（京大院農）
○Ryota YAMAMOTO, Takamitsu AMAI, Mitsuyoshi UEDA, Kouichi KURODA (Kyoto Univ.)

【背景】

真核生物の DNA はヒストンと結合し、クロマチンを形成する。クロマチンは、自身の凝縮度を変化させることで、遺伝子発現や DNA 複製に大きな影響を与える。そのため、クロマチン凝縮度を部位特異的に制御することで、細胞分化などの生命現象の制御やクロマチン構造異常に起因する疾患の治療などにつながることが期待される。しかし、狙った領域にてクロマチン凝縮度を人工的に制御する技術は未だに確立できていない。そこで、私たちは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、クロマチン凝縮度を部位特異的に制御できる新規手法の開発に挑んでいる。

【方法と結果】

クロマチン構造を制御する機構の一つであるヒストン修飾に着目し、目的領域においてヒストンを修飾する系の導入を試みた。ヌクレアーゼ活性を欠損させた dead Cas9 とヒストンアセチル化酵素・脱アセチル酵素をそれぞれ融合させ、目的領域を認識する guide RNA とともに恒常的に発現させることで、目的領域でのクロマチン構造変換を促した。その結果、クロマチンが弛緩および凝縮したと考えられる表現型を示す酵母を獲得できた。この酵母株について、FAIRE-qPCR を用いて弛緩したクロマチンの DNA を選択的に回収し、クロマチン凝縮度を調べたところ、実際に凝縮度が変化していることが分かったためまとめて報告する [1]。

In eukaryotic cells, nuclear DNA and histone forms chromatin. Chromatin changes its own condensation level, which greatly influences gene expression and DNA replication. Therefore, artificial control of chromatin structure would enable us to regulate biological phenomena and treat diseases caused by abnormal chromatin structure. However, the technology to control the condensation of chromatin in a site-specific region has not been established. In this study, we attempted to establish technologies for site-specific regulation of chromatin condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. We focused on histone modification, one of the mechanisms for regulating chromatin condensation. We fused a histone acetyltransferase or deacetylase to dead Cas9, which lacks nuclease activity, and expressed it together with a guide RNA that recognizes the target region. As a result, we obtained the yeast strain whose chromatin condensation seemed to be altered. Furthermore, FAIRE-qPCR analysis suggested that the chromatin condensation in target region was actually changed [1].

[1] Yamamoto *et al*. submitted.

Chromatin structure, Histone modification, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：山本凌大（yamamoto.ryota.25c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C08-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

Saccharomyces cerevisiae HKR1 遺伝子の 3´ 末端側部分配列はエキソン内部から独立して転写される

The 3´ portion of *HKR1* of *Saccharomyces cerevisiae* is independently transcribed from inside of the exon

○今藤 俊宏、細川 佑奈、小澤 良太郎、笠原 紳（宮城大・食産業）
○Toshihiro KONDO, Yuna HOSOKAWA, Ryotaro OZAWA, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムから，過剰発現により他属のキラー酵母である *Lindnera mrakii*（*Hansenula mrakii*）が産生する HM-1 キラートキシンに耐性をもたらす遺伝子が単離され，*HKR1* と命名されている。*HKR1* は全長約 5.4 kb のイントロンをもたない遺伝子で，ムチン様 I 型膜タンパク質である Hkr1p をコードしている。Hkr1p は，細胞内領域にカルシウム結合モチーフの EF ハンドや DNA 結合モチーフのロイシンジッパーの共通配列をもつことから，シグナル伝達経路や転写制御系への関与が考えられる。本研究では，*HKR1* のコード領域後半にある *Hin*dⅢ部位からターミネーター領域に至る約 2.6 kb の断片のみを酵母細胞へ導入した場合でも強い HM-1 耐性を獲得することを見出し，検証を行った。また，蛍光タンパク質を用いたレポーターアッセイにより，*HKR1* においては 5´末端上流域にあるプロモーター領域とは別に，エキソンの内部からも転写が開始されうることを確認した。1 つの遺伝子が複数の転写開始点を有し，しかもエキソンの内部という，本来であれば遺伝子の発現調節領域ではない部分にも転写開始点が存在し，それにより発現パターンの多様化を示すのであれば，限られた数の遺伝子からより複雑な生命現象を展開する新たな例として注目に値すると考えられる。

HKR1 was isolated from the genome of *Saccharomyces cerevisiae* as a gene that confers resistance by its overexpression to HM-1 killer toxin produced by the killer yeast *Lindnera mrakii* (synonym *Hansenula mrakii*). *HKR1* is an intronless gene with a 5.4 kb ORF encoding a mucin-like type I transmembrane protein, Hkr1p. Hkr1p has a consensus sequence of EF hand, a calcium-binding motif and the DNA-binding leucine zipper motif in the cytoplasmic tail, and likely that it is involved in a certain signal transduction pathway or transcriptional regulation. In this study, we found that a partial 2.6 kb fragment from the *Hin*dⅢ site in the coding region of *HKR1* to its terminator induces adequate resistance to HM-1 in *S. cerevisiae* cells. We confirmed by reporter assay using a fluorescent protein that transcription of *HKR1* is initiated not only from the promoter region upstream of the 5´end, but also from inside of the exon. If a single gene has multiple transcription initiation sites and some of those exist in exons, which are not the regulatory region of gene expression, resulting in diverse expression patterns, it will be a new, remarkable example of how a limited number of genes can generate more complex biological phenomena.

yeast, promoter, transcriptional regulation

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：4C08-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

Saccharomyces cerevisiae HKR1 遺伝子のエキソンに内在するプロモーター様配列とその転写活性

Promoter-like sequence intrinsic to the exon of *Saccharomyces cerevisiae HKR1* gene and its transcriptional activity

○小澤 良太郎、今藤 俊宏、細川 佑奈、笠原 紳（宮城大・食産業）
○Ryotaro OZAWA, Toshihiro KONDO, Yuna HOSOKAWA, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HM-1 キラートキシン耐性遺伝子である HKR1 は，全長を過剰発現させた場合に加えて，その後半の配列のみをプロモーターレスの状態で多コピープラスミドを用いて *S. cerevisiae* に導入しても HM-1 キラートキシン耐性の形質を付与することから，タンパク質のアミノ酸配列をコードする領域，すなわちエキソンの内部にも転写開始が可能な配列が存在すると考えられた。それは，5´末端の翻訳開始点である ATG から 3249 塩基目にある *Hin*dⅢ部位以降 3409 塩基目の ATG（Met^{1137} に対応）までの 160 bp の領域内に存在すると考えられた。プラスミド上に当該の 160 bp の領域をサブクローニングして，*Hin*dⅢ部位側から 27 bp，54 bp，81 bp，108 bp，133 bp，148 bp，160 bp と段階的に欠失させ，それぞれの下に *lacZ* を連結して *S. cerevisiae* に導入し，β-ガラクトシダーゼ活性を測定することで転写活性を定量的に評価した。*Hin*dⅢ部位から 108 bp を欠損させると活性が大きく低下し，133 bp まで欠損させると活性が認められなくなった。これらの結果から，*HKR1* のエキソンに内在する形でプロモーター様の活性を示す配列が存在し，5´末端にある本来のプロモーターとは独立してエキソン内部からも転写が開始される可能性が示され，またその領域を特定することができた。

HKR1 is a single exon gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which provides resistance to HM-1 killer toxin to *S. cerevisiae* not only when the full length of the gene is overexpressed but even when its 3´ portion is introduced using a multicopy vector. Thus, it was suggested that there is a sequence within the exon that can initiate transcription. In addition, it was considered to exist within a 160 bp region from the *Hin*dIII site at the 3249th base from the ATG, the translation initiation site at the 5´ end, to ATG at the 3409th base (corresponding to Met^{1137}). The 160 bp region was subcloned into the plasmid and deleted in steps of 27 bp, 54 bp, 81 bp, 108 bp, 133 bp, 148 bp, and 160 bp from the *Hin*dIII site, and the *lacZ* gene was ligated to each deletion to be introduced into *S. cerevisiae*. Then, transcriptional activity was quantitatively evaluated by measuring β-galactosidase activity. Deletion of 108 bp from the *Hin*dIII site resulted in a significant decrease in activity, and deletion of up to 133 bp resulted in virtually no activity. These results suggest that there is a sequence exhibited promoter-like activity intrinsic to the exon of *HKR1*, and that transcription may be initiated from within the exon independently of the primary promoter at the 5´ terminus.

yeast, promoter, transcriptional regulation

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：4C08-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

好熱性真正細菌 *Geobacillus* sp. Kps3 の *in vivo* 及び *in vitro* での選択的スプライシングについての調査研究

Investigation of alternative splicing of the thermophilic eubacterium *Geobacillus* sp. Kps3 *in vivo* and *in vitro*.

○中原 悠輔[1]、高橋 莉央[1]、石田 達矢[1]、早川 準平[1]、粟井 貴子[1]、赤沼 元気[2]、石塚 盛雄[1]([1]中央大・理工・応化、[2]学習院大・理・化学)
○YUSUKE NAKAHARA[1], RIO TAKAHASHI[1], TATSUYA ISHIIDA[1], JUMPEI HAYAKAWA[1], TAKAKO AWAI[1], GENKI AKANUMA[2], MORIO ISHIZUKA[1] ([1]Department of Applied Chemistry, Chuo University,, [2]Department of Life Science, Gakushuin University,)

多くの真核生物、原核生物にはアミノ酸に翻訳されないイントロンと呼ばれる遺伝子配列が存在する。イントロンは RNA への転写後スプライシングによって除去される。イントロンの存在意義には様々な説が提唱されており、転写速度、核外輸送及び転写物の安定性に影響しすることや、選択的スプライシングによって単一の遺伝子から多様なタンパク質を得ることなどと言われている。

当研究室で単離された好熱性真正細菌である *Geobacillus* sp. Kps3 は、当研究室のこれまでの研究により Flagellin をコードする遺伝子（*hag*）に二つのイントロン様の配列が存在することが分かっている。

様々な温度や塩濃度で培養した *Geobacillus* sp. Kps3 から精製した Flagellin のアミノ酸配列を解析したところ、培地の塩濃度を 3% にした条件で培養した Kps3 の Flagellin は通常の Flagellin のみでなく、選択的スプライシングによって生合成される Flagellin も用いていることがわかり、高塩濃度の条件下において生体内で Kps3 が選択的スプライシングすることがわかった。

本研究では *in vivo* での選択的スプライシングについて、塩濃度の差異によって 2 種類の Flagellin が生合成されていることを RNA 抽出によって確認する。さらに、*in vitro* において Kps3 の選択的スプライシングを再現することで、塩濃度が選択的スプライシングに起因するものなのかを特定することを目的とした実験結果を報告する。

Many eukaryotes and prokaryotes have gene sequences called introns that are not translated into amino acids. Introns are removed by splicing after transcription into RNA. Various theories have been proposed for the significance of introns, such as that they affect transcription rate, nuclear export, and stability of transcripts, and that they can be used to obtain a variety of proteins from a single gene by selective splicing.

In *Geobacillus* sp. Kps3, a thermophilic eubacterium isolated in our laboratory, two intron-like sequences exist in the gene encoding Flagellin (hag), which is one of the proteins constituting flagellar fibers in eubacteria.

We analyzed the amino acid sequence of Flagellin purified from *Geobacillus* sp. Kps3 cultured at various temperatures and salt concentrations, and found that Flagellin in Kps3 cultured at 3% salt concentration was not only normal Flagellin, but also Flagellin biosynthesized by selective splicing. We found that Kps3 uses not only normal Flagellin but also Flagellin biosynthesized by selective splicing, indicating selective splicing of Kps3 *in vivo* under high salt concentration conditions.

In this study, we will confirm that two types of Flagellin are biosynthesized under different salt concentrations by using RNA extraction for *in vivo* selective splicing. Furthermore, we will report the results of experiments aimed at reproducing the selective splicing of Kps3 *in vitro* and identifying whether salinity is responsible for the selective splicing.

Alternative splicing, Group I self-splicing intron, *Geobacillus* sp.

発表責任者：中原悠輔（a17.annb@g.chuo-u.ac.jp）

講演番号：4C08-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB はユビキチンリガーゼアダプターCreD の転写誘導とタンパク質安定性を制御する

The deubiquitinating enzyme CreB regulates gene expression and protein stability of CreD in *Aspergillus oryzae*

○田中 瑞己[1]、藤田 翔貴[2]、河原崎 泰昌[3]、山形 洋平[1]、新谷 尚弘[2]、五味 勝也[2]([1]東農工大院農、[2]東北大院農、[3]静県大食栄)
○Mizuki TANAKA[1], Shoki FUJITA[2], YASUAKI KAWARASAKI[3], Youhei YAMAGATA[1], Takahiro SHINTANI[2], Katsuya GOMI[2] ([1]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]Tohoku Univ., [3]Univ. of Shizuoka)

糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制制御因子として，脱ユビキチン化酵素 CreB とユビキチンリガーゼアダプターとして働くアレスチン様タンパク質 CreD が同定されている。出芽酵母においては，アレスチン様タンパク質がユビキチン化され，脱ユビキチン化酵素がその安定化に関与することが報告されている。しかし，CreB はそれらの脱ユビキチン化酵素とは相同性が低く，その機能は不明である。本研究では，麹菌における CreD の発現量制御への CreB の関与について解析した。
炭素源が CreD の発現量に与える影響を調べた結果，野生株ではグルコース存在下で *creD* の転写産物量と翻訳産物量がそれぞれ増加した。一方，*creB* 破壊株においては，グルコース存在下における CreD タンパク質量が著しく減少し，*creD* の発現誘導も抑制された。このことから，CreB はグルコースによる *creD* の転写発現誘導の制御に関与していることが示唆された。また，CreD タンパク質の安定性を調べた結果，*creB* 破壊株ではグルコース添加後の CreD の安定性が著しく低下した。このことから，CreB はグルコース存在下における CreD タンパク質の安定化にも関与していることが示された。以上の結果から，CreB はグルコース存在下における CreD の発現量を転写レベルとタンパク質レベルで二重に制御していることが示唆された。

In filamentous fungi, the deubiquitinating enzyme CreB and the arrestin-like protein CreD have been identified as regulators of carbon catabolite repression. In budding yeast, two deubiquitinating enzymes are involved in stabilization of the arrestin-like proteins. However, CreB has a low homology with these yeast deubiquitinating enzymes and its function is not clear. In this study, we investigated the involvement of CreB in the regulation of CreD expression level.

In the wild-type strain, the amount of both transcriptional and translational products of *creD* increases in the presence of glucose. However, the amount of CreD protein was markedly reduced by *creB* disruption. In the *creB* disruption mutant, the induction of *creD* transcriptional expression after glucose addition was also repressed. On the other hand, stability of CreD protein after glucose addition was significantly reduced by *creB* disruption. These results indicate that CreB is involved in both the *creD* transcriptional induction and the stabilization of CreD protein, suggesting that CreB plays a dual role in regulating CreD expression levels.

Aspergillus oryzae, Carbon catabolite repression, Ubiquitin

発表責任者：田中瑞己（mizuki-tanaka@go.tuat.ac.jp）

講演番号：4C08-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

Aspergillus aculeatus SrpkF の 1 アミノ酸置換による非誘導条件下におけるセルラーゼ遺伝子発現の亢進

Aspergillus aculeatus $SrpkF_{S356A}$ stimulated the expression of cellulase gene under non-inducing condition.

○源 健太朗、炭谷 順一、川口 剛司、谷 修治（阪府大院・生環科）
○ Kentaro MINAMOTO, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI, Shuji TANI（Osaka Prefecture Univ.）

【背景・目的】これまでに我々は、*Aspergillus aculeatus* serine-arginine protein kinase like protein ($SrpkF_{1-418}$) が、その C 末端部分（328-418 a.a.）を介して分生子形成関連遺伝子の発現とセルロースに応答した多糖分解酵素遺伝子の発現を調節することを明らかにした。本研究では、SrpkF C-末端部分を介した多糖分解酵素遺伝子発現調節機構と分生子形成機構を遺伝学的に解明することを目的とした。
【方法・結果】Kinase-specific Phosphorylation Site Prediction プログラム (GPS 5.0)によりリン酸化部位と推測された 356 番目のセリンをグルタミン酸($SrpkF_{S356E}$)とアラニン($SrpkF_{S356A}$)に置換した SrpkF を高発現する株を作出した。*srpkF* は炭素源に応答して遺伝子発現量が変化するため、改変 *srpkF* 発現には構成的高発現プロモーターを用いた。$SrpkF_{S356E}$ と $SrpkF_{S356A}$ の高発現株, および野生型 SrpkF 発現株 ($SrpkF_{1-418}$)、$SrpkF_{1-418}$ 高発現株(OEsrpkF) 間における分生子形成に違いは観察されなかった。次に、誘導、非誘導、抑制条件下における多糖分解酵素遺伝子の発現量を qRT-PCR により定量した。非誘導条件下におけるセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子(*cbhII*)の発現が、$SrpkF_{S356E}$ と $SrpkF_{S356A}$ それぞれで OEsrpkF に対し約 8 倍、約 4 倍と有意に増加した。また、グルコース抑制条件下において、*cbhII* 発現量が OEsrpkF や $SrpkF_{S356E}$ で減少するのとは対照的に、$SrpkF_{S356A}$ では抑制されなかった。以上の結果は、SrpkF S356 のリン酸化が SrpkF の機能発現を調節しており、この調節が特定の酵素遺伝子の発現量亢進に向けた鍵となることが示唆された。

Aspergillus aculeatus serine-arginine protein kinase like protein ($SrpkF_{1-418}$) regulates the expression of polysaccharide degrading enzyme genes and conidiation-related genes. We also revealed that C-terminus region of SrpkF (328-418 a.a.) plays a critical role on their regulation. In this study, we aimed to genetically elucidate the regulation mechanisms of polysaccharide-degrading enzyme genes and conidiation via the SrpkF C-terminal region.
Overexpressing strain of $SrpkF_{S356A}$ showed constitutive expression of *cbhII* without inducers. Furthermore, the *cbhII* expression in $SrpkF_{S356A}$ was not repressed in the presence of glucose, in contrast the expression was completely repressed in the control strain. These results showed that the phosphorylation of SrpkF S356 regulates the functional expression of SrpkF, and which is the key to enhance the expression of specific enzyme genes in *A. aculeatus*.

regulation, kinase, enzyme production

発表責任者：谷　修治（shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4C08-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

麹菌における固体培養特異的な遺伝子発現に関与する転写因子 FlbC のシスエレメント解析

The *cis*-element analysis of the transcription factor FlbC involved in solid-state culture-specific gene expression in *Aspergillus oryzae*

○大沼 司、荒井 啓、小嶋 慧、藤田 翔貴、日髙 將文、新谷 尚弘、五味 勝也 (東北大農)
○Tsukasa ONUMA, Hiraku ARAI, Kei KOJIMA, Shoki FUJITA, Masafumi HIDAKA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

我が国の伝統的な醸造産業に利用される麹菌 *Aspergillus oryzae* は、米や小麦ふすまといった固体を基質とした培養、すなわち固体培養において特異的に発現する遺伝子を有する。我々は、麹菌においてグルコアミラーゼ B 遺伝子 *glaB* などの固体培養特異的な遺伝子発現に FlbC という転写因子が関与することを明らかにしてきた(１)。さらに FlbC のシスエレメントの同定に向け、*glaB* プロモーターを対象としたゲルシフトアッセイ(EMSA)やインシリコ解析を行い、Region III と TATA-box の間に存在する 7 塩基から成る配列が重要と推定された。しかし、*glaB* プロモーター上にはこの配列および類似した配列が複数存在するとともに、*in vivo* における知見が乏しく、シスエレメントの同定には至っていない。そこで今回は、EMSA に加え、レポーターアッセイなどの *in vivo* 解析も行いシスエレメントの同定を目指した。その結果、7 塩基内の後半 4 塩基が特に重要であるとともに、複数存在する領域のうちの一つがプロモーター活性に寄与していることを明らかとした。

Aspergillus oryzae, a koji mold used in traditional fermentation industries in Japan, has genes that are specifically expressed in solid-state culture, which includes solid substrates such as rice and wheat bran. We have shown that the transcription factor FlbC is involved in the transcriptional regulation of genes specifically expressed under solid-state cultivation in *A. oryzae* (1). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using the *glaB* promoter and *in silico* analysis have suggested the region consisting of 7 nucleotides between Region III and TATA-box as a *cis*-element candidate of FlbC. However, this region and similar regions exist on the *glaB* promoter, and the most important region or sequence has not yet been confirmed. In this study, we aimed to identify the *cis*-element of FlbC by using EMSA and *in vivo* analysis such as reporter assay. The results showed that the latter 4 bases of the 7 bases are essential for the *cis*-element and that one among the regions on the *glaB* promoter predominantly contributes to the promoter activity.

(１)Tanaka et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 5859–5868 (2016).

Aspergillus oryzae, Solid-state culture, Transcription factor

発表責任者：大沼司（tsukasa.onuma.t5@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C08-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)における内在性 NO による形態分化制御メカニズムの解明

Nitric oxide produced by nitrogen oxide cycle regulates morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大院）
○Sota HONMA, Shinsaku ITO, Shunsuke YAZIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. Agric.)

放線菌 *Streptomyces* 属細菌は、抗生物質をはじめとした多種多様な二次代謝産物の生産能と複雑な形態分化機構を有する特徴的なグラム陽性細菌である。本菌の二次代謝の開始は形態分化の各段階と密接に関与しているため、形態分化の制御メカニズムを理解する事は発酵産業への応用のために重要である。我々は放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)(*S. coelicolor*)において硝酸、亜硝酸、一酸化窒素（NO）を順次循環する NO 生産サイクルを見出した。NO 低生産変異株において気中菌糸の形成が促進された事から、内在性 NO は形態分化に関与するシグナル分子である事が示唆された。しかし、NO による形態分化制御メカニズムは不明であるため、その解明を目的として研究を実施した。

今回、NO 発生剤により気中菌糸形成が抑制される事が見出され、気中菌糸形成必須因子 BldM をコードする遺伝子（*bldM*）の発現が、NO 濃度依存的に調節される事が明らかとなった。*bldM* の発現制御に関与する事が示唆されている cyclic-di-GMP（c-di-GMP）に着目した結果、NO 低生産変異株における c-di-GMP 分解酵素を含む酵素の活性が増大した。また、精製したヘム含有型 c-di-GMP 分解酵素の活性は NO 存在下で有意に減少した。これらの結果は、内在性 NO がヘム含有型 c-di-GMP 分解酵素の活性を介して *bldM* 遺伝子の発現を制御する事により気中菌糸形成を調節している事を示唆した。

Streptomyces genus is well known to produce a diversity of secondary metabolites, including antibiotics. They have a complex life cycle compared to other bacteria. Since the initiation of secondary metabolism in *Streptomyces* is closely related to the stage of morphological differentiation, it is important to understand the regulatory mechanism of morphological differentiation. We found a nitric oxide (NO) formation cycle consisting of three nitrogen oxides, nitrate, nitrite and NO in *Strptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor*). The mutant lacking NO production ability showed a precocious aerial mycelium, suggesting that NO is a signaling molecule for morphological differentiation in this bacteria. However, since the mechanism how NO regulates morphological differentiation is unclear, we studied to elucidate the regulatory mechanism.

We found that NO generators repressed aerial mycelium formation. The production of BldM, an essential factor for aerial mycelium formation, were increased in the mutant lacking NO production ability. Since the cyclic-di-GMP (c-di-GMP) regulates the *bldM* expression, we investigated the effect of NO on c-di-GMP. The activity of enzymes including c-di-GMP digestive enzyme was increased in the mutant decreasing NO production ability. Moreover, the activity of heme-containing c-di-GMP digestive enzyme was decreased when expose of NO.

Actinomycete, signal transduction, morphological differentiation

講演番号：4C08-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム C

RNA-seq を用いた *Mycolicibacterium smegmatis* のイソニアジド分解酵素発現機序の解析

Analysis of the regulation mechanism of isoniazid degrading enzyme expression in *Mycolicibacterium smegmatis* using RNA-seq

○栄山 新[1]、老沼 研一[1,2]、金子 幸弘[1,2] ([1]大阪市大院医・細菌、[2]大阪市大院医・感染症セ)
○Arata Sakiyama[1], Ken-Ichi Oinuma[1,2], Yukihiro Kaneko[1,2] ([1]Osaka City Univ. Bacteriol., [2]Osaka City Univ. RCIDS)

我々は、結核を代表とするマイコバクテリアの抗結核薬イソニアジド(INH)への耐性機序の解明を目指し研究を行っている。これまでに、非病原性細菌である *Mycolicibacterium smegmatis* から INH を加水分解する酵素(PzaA)を発見し、その諸性質を明らかにしてきた。これまでの研究から *pzaA* の転写は INH に誘導され、NH_4Cl により抑制されることが判明している。この転写制御機構は、本菌の INH 耐性に寄与している可能性がある。そこで、本研究では、*pzaA* の転写制御機構の解明を目指した。まず、INH への暴露により転写量が変化する遺伝子を網羅的に特定するため、RNA-seq 解析を実施した。その結果、30 個の遺伝子が今回用いた条件で INH により転写に変化が見られた。*pzaA* は 14 個の遺伝子からなる約 13 kbp の遺伝子クラスターに含まれていた。本クラスターにはペプチド/ニッケルトランスポーターをコードする遺伝子群、機能未知アミダーゼ遺伝子、*pzaA*、ウレアーゼ様遺伝子群が含まれており、それらは一つのオペロンを形成していることが示唆された。5'-RACE 法による転写開始点の特定を試みた結果、本遺伝子群の転写開始点は、先頭に位置する遺伝子の翻訳開始点より 96 bp 上流に位置することが判明した。長い 5'非翻訳領域はリボスイッチや制御因子結合領域の存在を示唆しており、実際に配列から 2 次構造の形成が予想された。現在、本クラスターの転写システムの理解を目指し、本非翻訳領域の配列の解析を進めている。

We have been studying the isoniazid (INH) resistance mechanism in mycobacteria. We have identified and characterized PzaA as an INH-degrading enzyme of *Mycolicibacterium smegmatis*. Our previous study showed that transcription of *pzaA* is induced by INH and suppressed by NH_4Cl. In this study, we aimed to further understand the transcriptional regulation mechanism of PzaA. We first performed RNA-seq to identify INH-inducible genes. Interestingly, a cluster of 14 genes in a 13 kbp region, including *pzaA*, were the largest cluster genes that were up-regulated by the addition of INH under the given growth condition. These genes were suggested to form a single operon. We then performed 5'-RACE to determine the transcription starts site, which revealed that this transcription unit has a 5'-untransrated region (UTR) of 96 bp. In general, a long 5'-UTR suggests the presence of regulatory elements such as riboswitch and attenuation sites. Indeed, the 5'-UTR found herein was predicted to form a secondary structure. Further analysis on this transcriptional system is in progress.

RNA-seq, Isoniazid degrading enzyme, Mycobacteria

発表責任者：老沼　研一（oinuma.kenichi@med.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：4D02-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

T7 RNA ポリメラーゼを利用した枯草菌宿主での高効率フラボノイド誘導型発現系の開発

Efficient flavonoid-inducible protein expression system using T7 RNA polymerase in *Bacillus subtilis*

○是枝 亜実、小林 衿花、亀田 那波、尾村 優太、広岡 和丈（福山大生命工・生物工）
○Ami Koreeda, Erika Kobayashi, Nanami Kameda, Yuta Omura, Kazutake Hirooka (Fukuyama Univ.)

【目的】安全性が認められている枯草菌を宿主として、植物由来低毒性物質であるフラボノイドを誘導物質とするタンパク質高発現系の開発を試みている。枯草菌のケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼ (QdoI) の遺伝子を含む *qdoI-yxaH* オペロンのプロモーター (P*qdoI*) は、２つの転写因子 (LmrA と QdoR) によって負に制御され、特定のフラボノイドで脱抑制される [1)]。これまでの研究では P*qdoI* のコアプロモーター、その上流域、および SD 配列を改変した構築を染色体に組み込んだシングルコピー発現系を作製して評価を行ったが、厳密な発現制御と誘導条件での高発現量の両立が困難であった。本研究では T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (*T7 pol*) を染色体上の P*qdoI* の制御下に置き、目的遺伝子 (*egfp*) をマルチコピープラスミド上の T7 プロモーター下流に組み込むことで、新規の高効率フラボノイド誘導型発現系を作製し、評価した。【方法・結果】P*qdoI* と *T7 pol* との連結を枯草菌 168 株染色体の *amyE* 座に組み込み、T7 プロモーターと *egfp* との連結を保持するプラスミドを導入した。このレポーター株と 168 株をフラボノイド添加・未添加の LB 培地で培養して蛍光強度を測定した。その結果、非誘導条件で目的遺伝子の発現がほぼ完全に抑えられ、フラボノイド添加でこれまでで最大の発現量となり、フラボノイド特異的誘導能と高発現量の両立が確かめられた。また、ケルセチンよりフィセチンの方が誘導効果が高く、これは QdoI の基質特異性に起因すると考えられた。

In *Bacillus subtilis*, the *qdoI-yxaH* operon includes the gene encoding quercetin 2,3-dioxygenase (QdoI), and this operon's promoter (P*qdoI*) is repressed by two transcriptional factors (LmrA and QdoR) and derepressed by specific flavonoids[1)]. We developed a novel flavonoid-inducible protein expression system in the *B. subtilis* host, where the T7 RNA polymerase gene (*T7 pol*) under the control of P*qdoI* was integrated into the chromosome and a multicopy plasmid carrying the target gene (*egfp*) fused to T7 promoter was contained in the cytosol. The reporter strain having this expression system was cultivated in the presence or absence of flavonoids (quercetin and fisetin), and the distinct EGFP expression was observed in the presence of each flavonoid and the expression level was negligible in the absence of either flavonoid. The inducing effect of fisetin was higher than that of quercetin, probably due to QdoI's substrate specificity; quercetin is more sensitive to QdoI than fisetin is.

1) Hirooka K, Fujita Y. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75:1325-1334.

Bacillus subtilis, flavonoid, T7 RNA polymerase

発表責任者：広岡和丈（hirooka@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：4D02-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

枯草菌の接合伝達を介したバチルス属細菌のゲノム改変系の構築

Construction of gene alteration system in *Bacillus* species mediated by conjugation transfer from *Bacillus subtilis*

○朝井 計[1]、須田 和奏[1]、千田 桃子[1]、板谷 光泰[2] ([1]東農大バイオ、[2]信大工)
○Kei Asai[1], Wakana Suda[1], Momoko Chida[1], Mitsuhiro Itaya[2] ([1]Tokyo Univ. of Agricul., [2]Shinshu Univ.)

枯草菌(*Bacillus subtilis*)に代表される *Bacillus* 属細菌は、発酵食品（納豆菌）や生物農薬として利用される有用細菌を数多く含むが、実験室株の枯草菌 168 株のように自然形質転換効率が高いものは多くない。ゲノム編集の普及により、今後は有用微生物についても、遺伝子操作による育種がより必要になると思われる。納豆菌由来の pLS20 は枯草菌から他の *Bacillus* 属細菌間に転移する接合伝達プラスミドである。また、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pUB110 は pLS20 をヘルパーとして、枯草菌から他の *Bacillus* 属細菌間に転移する mobilizable plasmid である。そこで、pUB110 を元にして、枯草菌から納豆菌やその他の *Bacillus* 属細菌へ接合伝達により移送可能で、ゲノム編集や遺伝子組換えを誘発する、大腸菌―枯草菌のシャトルベクターの作製を行った。

大腸菌細胞内での複製に必要な ColE1 型の複製領域、枯草菌細胞内での複製に必要な pUB110 の複製領域及び接合伝達に必要な oriT110 と mob、大腸菌―枯草菌間で有効な抗生物質耐性遺伝子、外来 DNA のノックインのためのドナーDNA と sgRNA のクローニング部位を有する pCJ 系列のプラスミドと pCJ に cas9 遺伝子を導入した pCJGE を作製した。pCJGE を用いて枯草菌に温度感受性点変異が導入できた。枯草菌から納豆菌への pCJ の接合移送を解析中である。

Bacillus genus bacteria contain many useful bacteria used as fermented foods and biopesticide, however transformation efficiency of these natural *Bacilli* is not usually high. With the spread of genome editing, breeding useful microorganisms by genetic engineering will become necessary. The conjugative plasmid, pLS20, of *B. subtilis* (natto) mediates biparental transfer of the *Staphylococcus aureus* plasmid, pUB110, from *B. subtilis* to the Bacillus species. Application of these tools to transferring plasmid by conjugation facilitates genetic alteration with genome editing and gene recombination.

We constructed a shuttle vector of *Escherichia coli-B. subtilis*, pCJ and pCJGE, by combination of ColE1 type replication region, pUB110 replication region, oriT110 and mob required for conjugal transmission, and antibiotic-resistance genes, and *cas9* gene, respectively. A temperature sensitive point mutation could be introduced into *B. subtilis* genome using pCJGE. We have been investigating whether pCJ could be transferred from *B. subtilis* to *Bacillus* species.

conjugation, genome editing, Bacilli

講演番号：4D02-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

ICE 接合伝達に関与する推定転写因子 TraR の標的遺伝子の探索

Identification of genes regulated by a transcriptional regulator TraR controlling ICE_{KKS102}*4677* transfer

○松本 哲、永田 裕二、大坪 嘉行（東北大生命）
○Satoshi MATSUMOTO, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

Acidovorax sp. KKS102 株の染色体上には、PCB/ビフェニル分解遺伝子群 (*bph* 遺伝子群)を乗せた可動性遺伝因子 integrative and conjugative element (ICE_{KKS102}*4677*)が存在する。*bph* 遺伝子群の直下流に位置する *traR* 遺伝子は LysR ファミリーに属する転写因子をコードすることが推測され、高発現によって ICE_{KKS102}*4677* の接合伝達頻度が向上する。本研究では、TraR の転写制御標的遺伝子の同定を目的に、以下の解析を行った。

まず、標的遺伝子の候補として ICE の染色体からの切り出しに寄与することが確認された *xis* 遺伝子に着目した。*xis* 上流領域と *gfp-lacZ* を連結したコンストラクトを KKS102 株の染色体に導入したレポーター株に、アラビノースにより *traR* を発現誘導可能なプラスミド pNITaraKm_traR を導入し、*traR* 発現誘導時の *xis* プロモーター活性を測定した。その結果、*traR* の発現誘導によらず LacZ 活性に変化はみられなかった。また qRT-PCR 法を用いて *xis* およびレポーター株の *lacZ* の転写量を測定した結果、*traR* の発現誘導条件で *xis* の転写量上昇がみられた一方、*lacZ* の転写量には差がみられなかった。これらのことから、*traR* は *xis* の転写活性化に寄与するが、活性化後の転写レベルは LacZ で検出できるレベルよりもずっと低いことが示唆された。

次に、他種細菌に伝達された ICE_{KKS102}*4677* の接合伝達頻度が *traR* の発現誘導により向上するか検証した。KKS102 株と *Pseudomonas putida* KT2440 株との接合伝達試験によって得られた接合伝達体に、pNITaraKm_traR を導入した。本株を供与菌、KT2440 株を受容菌とした接合試験において、*traR* 発現誘導条件における接合伝達頻度が 100 倍程度上昇した。このことから、TraR の標的遺伝子は ICE 領域内にあることが考えられる。現在、TraR の *xis* 以外の標的遺伝子の探索に加え、TraR が転写因子以外の機能を持つ可能性を考え、検討を行っている。

The integrative and conjugative element (ICE_{KKS102}*4677*) in *Acidovorax* sp. KKS102 carries genes for PCB/biphenyl degradation (*bph* genes). *traR* gene is located downstream of *bph* genes and encodes a putative LysR-type transcriptional regulator. In this study, we focused on identifying genes regulated by TraR. To test whether *xis* promoter is activated by *traR*, a reporter strain was constructed by integrating the fusion construct of the *xis*-upstream region and *gfp-lacZ* into the genome of KKS102. In the reporter strain, *traR* gene was expressed from a plasmid vector, and the *xis* transcriptional level and LacZ activities were measured. While the *xis* transcriptional level was increased, LacZ activity was not. This result suggests that TraR activates *xis* transcription, but the activated level of transcription is not high enough for LacZ measurement. We also found that the transfer frequency of ICE_{KKS102}*4677* in *Pseudomonas putida* KT2440 was increased by inducing *traR* expression. These data suggested that activation of a gene(s) on lCE_{KKS102}*4677 traR* is sufficient to activate the ICE transfer.

Integrative and conjugative elements, mobile genetic element, conjugation

発表責任者：松本　哲（s.matsumoto@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4D02-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

プラスミド獲得後の細菌のプラスミド保持に対する適応過程の解析
Adaptation process of host to plasmid-carriage revealed by transcriptome analysis
○高島 綾[1]、河野 響[1]、チャン フイティン[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大院・農生科・AgTECH、[2]東大・微生物連携機構)
○ Aya TAKASHIMA[1], Hibiki KAWANO[1], Huiting Zhang[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】細菌の染色体上の遺伝子の転写プロファイルは、プラスミドの獲得により劇的に、かつ経時的に変化する。しかしプラスミド保持に対する「適応」にどの程度の時間が必要なのかは、十分培養を経たプラスミド保持株を使う限り知ることは不可能であった。そこで、本研究では、IncP-1 群プラスミド pBP136 を材料に、接合伝達直後の経時的なトランスクリプトーム変化の解析に取り組んだ。宿主としては、各種のプラスミド・ベクターを保持しても負荷を受けず非保持株との競合培養条件でも淘汰されない株である *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株と、対照的にプラスミド保持に伴う負荷が認められ競合培養条件で淘汰される *P. putida* KT2440 株をモデルとして用いた。
【方法・結果】プラスミド上の *gfp* 遺伝子が接合伝達体のみで発現する実験系を用いて、供与菌と受容菌を 2 時間接合させ、GFP 蛍光を発する接合伝達体由来の細胞のみをフローサイトメーターで分取した。さらに、この一部を計 4 日間植え継ぎ培養した細胞も取得して、合わせて RNA-Seq 解析を行った。その結果、CA10dm4 株では接合伝達直後に多くの遺伝子（特に炭素や窒素、リン酸、硫黄代謝に関与する遺伝子）が強く転写される事が確認された。硫黄代謝に関与する遺伝子群の転写調節は CA10dm4 株においてプラスミド保持に伴う負荷回避に重要である事が当グループで既に明らかにされており、この機能が接合伝達後の短い間に駆動されていることが示唆された。一方、KT2440 株では CA10dm4 株よりも遅れて硫黄代謝を含む各種代謝系遺伝子の発現が誘導される事が明らかになった。今回の結果を総合的に考察すると、CA10dm4 株のプラスミド保持に対する早期の転写レベルでの応答が、プラスミド保持に伴う負荷の回避に重要である可能性が示唆された。

Cultivation after conjugation likely allows the host to adapt to plasmid carriage by changing the transcriptional profiles. To elucidate this process, we performed RNA-Seq analysis using *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 and *P. putida* KT2440 strains harboring a plasmid pBP136. Transconjugants after 2-hour mating that express GFP were collected by flow cytometer, and then serially cultivated in rich nutrient medium. Transcriptional profiles of transconjugants immediately after sorting and cultivation were compared. As a result, particularly, genes related with sulfur metabolism were expressed in earlier phase in CA10dm4 than in KT2440. Transcriptional regulation of genes involved in sulfur metabolism has been shown to be important for burden evasion associated with plasmid carriage in CA10dm4. Thus, it was suggested that the early response to plasmid carriage at the transcriptional level may be important for avoiding burden associate with plasmid carriage.

Pseudomonas, plasmid, transcriptome

講演番号：4D02-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

ウシ胎児血清成分による Bacillus 属細菌の抗がん活性誘導と RNA-seq 解析

RNA-seq analysis of Bacillus spp. under the anticancer activity induction by fetal bovine serum

市川 俊輔[1]、○勝尾 徳斗[1]、岡﨑 文美[2]、中山 寛子[3]、西村 訓弘[4]、島田 康人[5] ([1]三重大学教育、[2]三重大院生資・先端セ、[3]三重大院地域イノベ・ゼブラセ、[4]三重大院地域イノベ、[5]三重大院医・先端セ・ゼブラセ)

Shunsuke Ichikawa[1], ○Norito Katsuo[1], Fumiyoshi Okazaki[2], Hiroko Nakayama[3], Norihiro Nishimura[4], Yasuhito Shimada[5] ([1]Fac. Edu., Mie Univ., [2]Grad. Bio., Mie Univ., [3]Grad. Reg., Zebrafish Cen., Mie Univ., [4]Grad. Reg., Mie Univ., [5]Grad. Med., Zebrafish Cen., Mie Univ.)

三重県内 50 地点の土壌から複合微生物培養液を調製した。この複合培養液は、ヒト由来大腸がん細胞 HT-29 の増殖を、培養環境下（*in vitro*）およびゼブラフィッシュ移植下（*in vivo*）で抑制した。複合微生物培養液から HT-29 に対して高い抗がん活性を示す *Bacillus cereus* M48 株を単離した。

B. cereus M48 株培養液をプロテアーゼ処理すると，その抗がん活性は低下した。*B. cereus* M48 株はウシ胎児血清（FBS）添加条件で培養した場合に抗がん活性を示した。したがって，抗がん化合物は FBS 中の成分により発現誘導されるタンパク質であることが予想された。RNA-seq 解析を行うことで，FBS 添加条件で有意に発現上昇する遺伝子が 680 個存在することを明らかにした。抗がん活性を示さない近縁株 *Bacillus cereus* ATCC 10702 や ATCC 13061 とのゲノム比較解析を行うことにより，*B. cereus* M48 株が独自に持つ遺伝子が 1197 個あることを明らかにした。RNA-seq 解析とゲノム比較解析の結果を統合して，候補抗がんタンパク質を複数抽出した。

B. cereus M48 の近縁種である *Bacillus thuringiensis* A1462 が産生するがん細胞選択的な細胞毒性を示すタンパク質として，パラスポリンが報告されている。*B. cereus* M48 株が独自に持つ遺伝子群内から，パラスポリンと類似性を示すものを発見し，このタンパク質には抗がん活性が認められることを確認した。

Some microbial cultures prepared from soils in Mie Prefecture inhibited the proliferation of a human colon cancer HT-29 cell under culture condition and zebrafish xenograft without toxicity in zebrafish. *B. cereus* M48 strain, which showed high anticancer activity against HT-29, was isolated from the microbial culture. *B. cereus* M48 required fetal bovine serum (FBS) to express the anticancer activity. A protease treatment reduced the anticancer activity of *Bacillus* M48 broth. Thus, *B. cereus* M48 proteins induced by FBS seems to be anticancer compounds.

We next performed RNA-seq analysis to retrieve gene list upregulated by FBS treatment. In addition, we clarified the unique genes of *B. cereus* M48 by genome comparative analysis with closely related strains *Bacillus cereus* ATCC 10702 and ATCC 13061, which do not show anticancer activity. Parasporin, a cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1462, a close relative of *B. cereus* M48, has been reported to be selective for cancer cells. We found a gene similar to parasporin in *B. cereus* M48, and confirmed that this protein has anticancer activity.

RNA-seq, Anticancer activity, Bacillus

発表責任者：市川俊輔（ichikawa@edu.mie-u.ac.jp）

講演番号：4D02-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

ラビリンチュラ類の脂質代謝の制御機構に関与する遺伝子の探索

Search for genes involved in the regulation of lipid metabolism in thraustochytrid

○石橋 洋平、伊東 周敏、沖野 望 (九大院農)
○Yohei ISHIBASHI, Chumin ITO, Nozomu OKINO (Kyushu Univ.)

ラビリンチュラ類は高度不飽和脂肪酸やステロール類などの有用脂質を生産、蓄積することが出来る海洋性の油糧微生物である。様々な条件下でラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* を培養し、脂質生産レベルや油滴の形態、油滴の数への影響を調べ、その際の遺伝子発現変動を調べることでラビリンチュラ類の油滴形成、脂質生産の制御機構に関する分子基盤の解明を試みた。ラビリンチュラ類の培養には通常､窒素源として 1%の酵母エキスを使用する｡酵母エキスの量が 0.5%の際に、油滴の肥大化およびトリアシルグリセロールが増加し、逆に 2%になると油滴が縮小しトリアシルグリセロールが減少することを見出したことから、これらのサンプルの RNA-seq 解析を行った。変動遺伝子のクラスタリングを行った結果、酵母エキスの濃度に応じて発現量が負に制御される遺伝子を 1022 個、正に制御される遺伝子を 528 個見出した。トリアシルグリセロールが増加する 0.5%酵母エキス条件下では､グリセロ脂質の生合成に関与する Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (GPAT) および 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase (AGPAT) の発現が増加し、逆にタンパク質の合成に関与する遺伝子発現が大幅に低下していることが分かった。この際、転写因子と予想される複数の遺伝子の発現変動も確認できており、今後これらの機能を解明することでラビリンチュラ類の脂質生産、油滴形成に関与する重要な因子の同定に結びつくことが期待される。

Aurantiochytrium limacinum is marine oil-producing microorganisms capable of producing and accumulating useful lipids such as poly unsaturated fatty acids and sterols. We found that enlargement of lipid droplet and increase of triacylglycerol level were observed in *A. limacinum* cultured in the medium containing 0.5% yeast extract (YE). On the other hand, decrease of the amount of lipid droplet and triacylglycerol level was occurred in the 2% YE medium. RNA-seq analysis revealed that 1022 gene were negatively regulated and 528 genes were positively regulated according to the concentration of yeast extract, respectively. Under the condition of 0.5% YE, and *GPAT* and *AGPAT*, which are involved in the de novo synthesis of glycerolipid, were significantly increased, while the expression of genes involved in protein synthesis was greatly decreased.

Thraustochytrid, lipid, fatty acid

発表責任者：石橋　洋平（ishibashiyo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D02-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

大腸菌の GcvB small RNA によるアミノ酸トランスポーターの転写後調節

Post-transcriptional regulation of amino acid transporters by GcvB small RNA in E. coli

○宮腰 昌利、神田 健（筑波大医）
○Masatoshi MIYAKOSHI, Takeshi KANDA (Univ. Tsukuba)

GcvB は大腸菌などの腸内細菌科を含むγ-プロテオバクテリアに広く保存されている small RNA（sRNA）である。大腸菌において 3 種類の RNA-seq 法（RIL-seq、CLASH、MAPS）のデータを精査し、共通する 47 遺伝子を抽出した。GcvB は少なくとも２つのシード配列 R1、R3 を用いて標的 mRNA と塩基対形成する。R1、R3 のいずれか、もしくは両方と塩基対を形成して制御されるものとして、アミノ酸の輸送系・生合成経路だけでなく、核酸合成、細胞膜合成や翻訳制御に関与する 21 遺伝子を新たに同定した（Miyakoshi, Okayama et al. Mol. Microbiol. 2021）。さらに、上記の 47 遺伝子に含まれなかった Asn, Gln, Pro, Phe, Tyr, Trp のトランスポーター遺伝子も、in silico で GcvB と塩基対形成することが予測された。翻訳融合レポーター解析によって、実際にこれらの遺伝子が GcvB によって制御されることが示された。これにより、GcvB は全てのアミノ酸のトランスポーターの転写後調節に関与することが明らかになった

GcvB is a small regulatory RNA (sRNA) which is highly conserved among γ-Proteobacteria including *Enterobacteriaceae*. We investigated three RNA-seq datasets in *E. coli*, and extracted 47 mRNAs which are commonly detected to interact with GcvB. GcvB has at least two regions, R1 and R3, to interact with its target mRNAs. We identified 21 new GcvB targets which are regulated via either R1, R3 or both (Miyakoshi, Okayama et al. Mol. Microbiol. 2021). We further investigated putative GcvB target genes encoding transporters of Asn, Gln, Pro, Phe, Tyr and Trp, which were not included in the RNA-seq datasets. These mRNAs were predicted to base-pair with GcvB *in silico*, and the translational fusions of these genes were repressed by GcvB. Altogether, we conclude that GcvB is involved in the post-transcriptional regulation of transporters of all amino acids.

small RNA, amino acid, transporter

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4D02-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

好熱バチルスに見いだされた 5 炭糖によるカタボライト抑制
Catabolite repression by pentose found in *Geobacillus kaustophilus*
○吉田 健一、福井 香帆、石川 周 (神戸大イノベ)
○Ken-ichi YOSHIDA, Kaho FUKUI, Shu ISHIKAWA (Kobe Univ.)

Geobacillus kaustophilus HTA426 (以下 GK) は、イノシトールを単一炭素源として生育する。イノシトール代謝は *iol* オペロンにコードされている。その転写は IolQ によって制御されており、*myo*-inositol (MI) が作用して転写が誘導される。一方、*iol* 遺伝子群が誘導されず MI 非資化性となった変異株 PS8 が単離されたが、その原因は不明であった。そこで、PS8 を継代培養して *iol* 発現が復帰した複数のサプレッサーを取得したところ、何れにおいても *crh* の翻訳不全が確認された。さらに、PS8 とそのサプレッサーには共通して *hprK* に変異があり Crh のリン酸化が昂進する可能性が示唆された。GK 親株に変異 PS8 型 *hprK* を導入、逆に PS8 に Chr の脱リン酸化を担う野生型 *hprK* を導入し、さらに *crh* が翻訳されないサプレッサー変異株には野生型 *crh* を導入した。その結果、変異型 hprK の導入で *iol* 遺伝子群が抑制され、野生型 hprK の導入で誘導が回復、野生型 *crh* の導入で *iol* 遺伝子が再抑制された。すなわち、GK の *iol* 遺伝子群が HPrK による Crh のリン酸化を介した何らかの機構で抑制されることが強く示唆された。従来、Crh はグルコースによるカタボライト抑制に関わる因子とされてきたが、GK の *iol* 遺伝子群はグルコースによる抑制をほとんど受けないので、5 炭糖による Crh を介した抑制機構の存在を考察したい。

Geobacillus kaustophilus HTA426 (GK) grows on inositol as a single carbon source. Inositol metabolism is encoded by the *iol* operon. Its transcription is regulated by IolQ, and *myo*-inositol (MI) acts to induce transcription. On the other hand, a mysterious mutant, PS8 was isolated in which the *iol* gene cluster was not induced as *hprK* was mutated. In this study, we obtained several suppressors that reverted to *iol* expression in PS8, and found that *crh* translation was defective in all of them. We introduced the PS8-type *hprK* into the GK parent strain, oppositely wild-type *hprK* into PS8, and also wild-type *crh* into the suppressors. In addition, wild-type *crh* was introduced into the suppressor mutant strain. As the results, introduction of the PS8-type *hprK* suppressed the *iol* gene cluster, introduction of the wild-type *hprK* restored *iol* induction, and introduction of the wild-type *crh* re-repressed the *iol* genes. These results strongly suggest that the *iol* gene cluster in GK is repressed by some mechanism through the phosphorylation of Crh by HPrK. Although Crh has been considered to be a factor involved in glucose-dependent catabolite repression, the *iol* gene cluster in GK is not repressed by glucose at all. Our preliminary observation suggests the existence of a Crh-mediated catabolite repression mechanism depending on pentose.

Geobacillus kaustophilus, catabolite repression, pentose

発表責任者：吉田健一（kenyoshi@kobe-u.ac.jp）

講演番号：4D02-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

Liquorilactobacillus satsumensis の産生する菌体外多糖の生産に関わるグルカンスクラーゼ
Glucansucrases responsible for the production of exopolysaccharides in *Liquorilactobacillus satsumensis*

手塚 武揚[2,3]、○今尾 遥[1]、石田 淳也[4]、山本 恵理[4]、大西 康夫[2,3]（[1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生工、[3]東大・微生物イノベ連携機構、[4]（株）明治・乳酸菌研）
Takeaki Tezuka[2,3], ○Haruka Imao[1], Junya Ishida[4], Eri Yamamoto[4], Yasuo Ohnishi[2,3] ([1]Fac. of Agric., The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [4]R&D Division, Meiji Co., Ltd.)

乳酸菌が生産する菌体外多糖には、発酵食品への食感の変化や健康機能性付与といった有用な機能があることが知られている。伝統的な発酵飲料であるウォーターケフィア等から単離される乳酸菌 *Liquorilactobacillus satsumensis* はスクロース含有培地で菌体外に多量の難消化性グルカンを生産する。しかし、グルカン合成酵素とその遺伝子発現制御機構は未知であり、本研究では *L. satsumensis* JCM12392 株（以下 JCM12392 株）を研究材料としてこれらの解明を目指した。JCM12392 株をグルコース、スクロース、フルクトース、ラフィノースのいずれか 1 つを含む培地で培養したところ、スクロース存在下でのみ菌体外に多量のグルカンを生産した。そこで、各培養液上清中のタンパク質を比較し、スクロース存在下で特異的に培養液上清に分泌されるタンパク質を少なくとも 3 種見出した。SDS-PAGE 後のゲルをスクロース溶液とインキュベートした後 PAS 染色をすると、これらの分泌タンパク質は全て陽性を示し、多糖の合成が示唆された。また、培養上清からそのうちの 1 つを精製し、本酵素がスクロースを含む溶液中でグルカン様の物質を生産することを示した。一方、JCM12392 株のゲノム中から、グルカン合成酵素として知られるグルカンスクラーゼをコードする遺伝子を探索し、4 つの候補遺伝子を見出した。qRT-PCR を用いた転写量解析で、このうちの 3 遺伝子にスクロース添加による転写誘導が見られた。また、異種発現系または無細胞発現系で生産させたこれら 4 つのタンパク質は、いずれも上述の方法で PAS 染色陽性を示した。これらの結果より、JCM12392 株はスクロースに応答してこれらの遺伝子の発現量を増大させ、菌体外で難消化性グルカンを生産すると考えられる。現在行っている転写開始点や遺伝子破壊株の解析結果についても発表する予定である。

Exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria can impart unique texture and/or beneficial health effects to foods. *Liquorilactobacillus satsumensis* is known for its EPS production from sucrose, but the biosynthetic enzymes of EPS remain unclear. *L. satsumensis* JCM12392 produced a large amount of glucan in a sucrose-containing medium, and three extracellular proteins were inductively produced in the medium, one of which showed glucansucrase activity determined by PAS staining. We found four putative glucansucrase genes in the JCM12392 genome. Transcriptional analysis by qRT-PCR showed that sucrose induced the transcription of three of the four genes. Furthermore, all of the four proteins produced in *E. coli* or by a cell-free expression system showed glucansucrase activity. These results suggested that these proteins are involved in the glucan production in the sucrose-containing medium.

Liquorilactobacillus satsumensis, glucan production, glucansucrase

講演番号：4D02-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

Serratia plymuthica における小分子 RNA ChiX と Hfq によるキチナーゼ系の制御
Regulation of Chitinase System by small RNA ChiX and Hfq in *Serratia plymuthica*

○樋口 響[1]、石田 知輝[2]、小嶋 優常[2]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2,3] ([1]新潟大農、[2]新潟大院自然科学、[3]新潟大日本酒学センター)
○ Hibiki HIGUCHI[1], Tomoki ISHIDA[2], Yujo KOJIMA[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., [3]Sakeology Ctr., Niigata Univ.)

Serratia marcescens は複数のキチナーゼと LPMO を産生し，不溶性多糖キチンを効率的に分解して利用している．*S. marcescens* 2170 を用いた先行研究において，$(GlcNAc)_2$ の取り込みによる *chiP* の転写活性化が sRNA ChiX による *chiR*（キチン分解酵素遺伝子の発現に必須な転写因子の遺伝子）の発現抑制を解除し，キチン分解酵素が発現することが示された．更に，この制御には RNA シャペロンタンパク質である Hfq が関与していると考えられた．

今回，*S. marcescens* と同様のキチン分解酵素系を有する *S. plymuthica* SWSY 3.47 の *hfq, chiX* 遺伝子を抗生物質耐性遺伝子に置換した．次に，*hfq*::*kan* 変異株の *chiX* 遺伝子を *sp*/*sm* カセットで置換した *hfq*::*kan chiX*::*sp*/*sm* 二重変異株を構築し，野生株を含む計 4 株について解析した．その結果，*chiX*::*kan* 変異株は野生株よりも高いキチン分解能を示したため，*S. marcescens* と同様に ChiX が *chiR* 遺伝子発現を抑制していることが示唆された．一方，*hfq*::*kan* 変異株と *hfq*::*kan chiX*::*sp*/*sm* 二重変異株はキチン分解能を示さなかったが，*chiR* は転写されていた．これらの結果から，Hfq は ChiX 非依存的に *chiR* の転写後調節に関与していることが示唆された．

Serratia marcescens produces multiple chitinases and LPMOs and efficiently degrades and utilizes the insoluble polysaccharide chitin. Previous studies on *S. marcescens* 2170 showed that transcriptional activation of *chiP* by uptake of $(GlcNAc)_2$ derepresse *chiR*, encoding a transcriptional activator for chitinase genes, by sRNA ChiX, resulting in the production of chitinases. Furthermore, we predicted that an RNA chaperon, Hfq, is involved in this regulation.

In this study, the *hfq* and *chiX* genes of *S. plymuthica* SWSY 3.47, which have the same chitinase system as *S. marcescens*, were replaced with antibiotic resistance genes. Next, a double mutant of *hfq*::*kan chiX*::*sp/sm* was constructed by substituting the *chiX* gene of the *hfq::kan* mutant with an *sp/sm* cassette, and a total of four strains, including a wild type, were analyzed. As a result, the *chiX*::*kan* mutant showed higher chitin degradation than the wild-type strain, suggesting that ChiX represses the *chiR* expression similarly to *S. marcescens*. On the other hand, the *hfq*::*kan* mutant and the *hfq*::*kan chiX*::*sp/sm* double mutant did not show chitin degradation, but *chiR* was transcribed. These results suggest that Hfq is involved in the posttranscriptional regulation of *chiR* in a ChiX-independent manner.

Small RNA, ChiX, Hfq

発表責任者：鈴木一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4D02-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム D

植物共生メチロトローフ細菌 *Methylorubrum extorquens* AM1 のランタノイドに応答したメタノールデヒドロゲナーゼ XoxF1 の発現調節機構の解析

Analysis of transcriptional regulation for expression of *xoxF1*, encode Ln-dependent MDH, in *Methylorubrum extorquens* AM1

○高橋 莉史[1]、矢野 嵩典[1]、中川 智行[2]、谷 明生[3]、三井 亮司[1]（[1]岡山理大理、[2]岐阜大応生科、[3]岡山大植物研）
○RIHITO TAKAHASHI[1], TAKANORI YANO[1], TOMOYUKI NAKAGAWA[2], AKIO TANI[3], RYOJI MITSUI[1] ([1]Okayama Univ. of Sci., [2]Gifu Univ., [3]Okayama Univ.)

Methylobacterium 属は植物の成長に伴い葉上等から放出されるメタノールを炭素源とする一方、細菌側から植物の生育を促進させる物質を提供する共生関係を築いている。本研究ではこの共生のモデル株として使用される *Methylorubrum extorquens* AM1 を用い、植物の成長に伴い刻々と変化する生育環境を認識適応して生育するメカニズムを明らかにすることを目的としている。この過程において植物から供給されたメタノールの代謝初発酵素であるメタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）が鍵となると考えている。*M. extorquens* AM1 は少なくとも 3 つの MDH を有しており、いずれも発現誘導条件が異なっている。3 つの MDH のうち 2 つがランタノイド(Ln)に誘導され、XoxF1 および XoxF2 と呼ばれている。Ln であるランタン(La^{3+})を用いて培養すると活性中心に配位する。土壌から植物体上部にかけて La^{3+}濃度が希薄になることが報告されていること、また XoxF1 および XoxF2 ともに La^{3+}濃度に依存して発現量が変化することから環境認識の鍵物質であることが示唆された。今回はレポーター遺伝子を用い、*xoxF1* 発現調節に着目して検討を行った。まず *xoxF1* の上流域 700bp に着目し、この領域を欠損させることによるレポーターの発現量を確認した。この結果プロモーター上流に発現を制御する領域があることが示唆された。また、二成分制御系としてヒスチジンキナーゼとレギュレーションタンパク質である MxbDM が *xoxF1* の発現に関与することが報告されていることから、Δ*mxbDM* 株を作製し、同様にレポーターを用いて解析することで La^{3+}への応答を調べた。この結果、MxbDM は *xoxF1* 発現を強く抑制しており、La^{3+}の濃度を検知して *xoxF1* の発現を調節していることが明らかになった。

M. extorquens AM1 is a model strain of microbe-plant symbiosis in the phyllosphere. *M. extorquens* AM1 utilizes plant-released methanol and produces some substances to promote plant growth. Methanol dehydrogenases (MDHs) are key enzymes that strictly regulated expression by Ln for plant symbiosis in *M. extorquens* AM1. In this study, we conducted an expression analysis of the Ln-dependent XoxF1 gene with a reporter gene. Expression analysis with deletion of the *xoxF1* upstream region indicated that there was a suppression region for *xoxF1* expression. In addition, MxbDM, which was reported to be concerned in the regulation of *xoxF1* expression as a two-component regulatory system, disruption mutant was analyzed in the same way. The results showed that MxbDM has a role with Ln-concentration dependent regulation on the expression of *xoxF1*.

Plant-symbiotic methylotrophic bacteria, *Methylorubrum extorquens* AM1, Lanthanide

発表責任者：三井　亮司（rmitsui@dbc.ous.ac.jp）

講演番号：4D04-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

ヒトマイクロバイオーム解析のための高精度な mock community（微生物カクテル）の開発

Development of high-quality mock communities for human microbiome study

○大山 良文[1]、三浦 隆匡[1]、島村 麻美子[1]、古川 雅崇[1]、成田 興司[2]、Tourlousse Dieter[3]、坂本 光央[4,5]、大熊 盛也[4,5]、亀山 恵司[2]、久田 貴義[2]、笠原 堅[2]、寺内 淳[2]、関口 勇地[3]、川﨑 浩子[1]
([1]NITE/NBRC、[2]JMBC、[3]産総研、[4]理研 BRC-JCM、[5]AMED)
○Yoshifumi OHYAMA[1], Takamasa MIURA[1], Mamiko SHIMAMURA[1], Masataka FURUKAWA[1], Koji NARITA[2], Dieter Tourlousse[3], Mitsuo SAKAMOTO[4,5], Moriya OHKUMA[4,5], Keishi KAMEYAMA[2], Takayoshi HISADA[2], Ken KASAHARA[2], Jun TERAUCHI[2], Yuji SEKIGUCHI[3], Hiroko KAWASAKI[1] ([1]NITE/NBRC, [2]JMBC, [3]AIST, [4]RIKEN BRC-JCM, [5]AMED)

マイクロバイオーム研究の進展と共に、一定の種構成と構成比から成る mock community（微生物カクテル）を実験コントロールに用いることが、解析手法や結果の妥当性評価に重要であると認識されるようになってきている。これまでに我々は、ヒトマイクロバイオーム解析を対象とした微生物カクテル（cell mock、DNA mock）の開発を進めてきた（*Tourlousse*, Microbiome, 2021）。計測コントロールとなる微生物カクテルの製造では、細胞あるいは DNA の量を正確に把握し、決められた比率で混合することが求められる。これを実現するにあたり、特に細菌細胞数の正確な測定が課題となったが、HPLC を用いて細菌 DNA のアデニン残基量を測定した値（*de Bruin*, BMC Microbiol, 2016）から、細胞数へと変換することにより、精度の高い微生物カクテル（cell mock）を作製することに成功した。本発表では、その製造方法と、作製した微生物カクテルの性能評価について報告する。また本研究で開発した微生物カクテルは、今後 NITE/NBRC からの提供を予定している。

Analyses of microbiomes by metagenomics plays an indispensable role in many biotechnology fields. Workflows for metagenomics are complex and prone to bias and errors at all steps. To improve consistency of the measurements, we have developed reference materials, mock communities (microbial cocktail) for human microbiome study (*Tourlousse*, Microbiome, 2021). The microbial cocktails (DNA mock and cell mock) were designed using human resident microorganisms as a mixture of equal amounts of bacterial DNA or cells. However, it was difficult to accurately measure the number of cells for constructing cell mock. To solve this problem, we applied a method reported by *de Bruin* and *Birnboim* (*de Bruin*, BMC Microbiol, 2016). In their method, the total amounts of adenine in bacterial cells would be measured by HPLC and the amounts of adenine could be converted into the number of cells. By using this method, we have succeeded in developing highly accurate microbial cocktails as measurement references for human microbiome study. In here, we will report on the manufacturing methods for high quality microbial cocktails and their performance evaluation.

human microbiome, mock communities, microbial cocktail

発表責任者：三浦隆匡（miura-takamasa@nite.go.jp）

講演番号：4D04-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

ヒトマイクロバイオーム解析のための推奨分析手法開発および室間共同試験による検証

Development and validation of standard measurement methods for human microbiome analysis

○成田 興司[1]、Dieter M Tourlousse[2]、三浦 隆匡[3]、大山 良文[3]、島村 麻美子[3]、古川 雅崇[3]、坂本 光央[4]、大熊 盛也[4]、清水 律子[5]、齋藤 さかえ[5]、後藤 まき[5]、中山 二郎[6]、三島 梨子[6]、國澤 純[7]、細見 晃司[7]、亀山 恵司[1]、久田 貴義[1]、笠原 堅[1]、川﨑 浩子[3]、関口 勇地[2]、寺内 淳[1]（[1]JMBC、[2]産総研、[3]NITE/NBRC、[4]理研、[5]ToMMo、[6]九大院農、[7]NIBIOHN）

○ Koji NARITA[1], Dieter M Tourlousse[2], Takamasa MIURA[3], Yoshifumi OHYAMA[3], Mamiko SHIMAMURA[3], Masataka FURUKAWA[3], Mitsuo SAKAMOTO[4], Moriya OHKUMA[4], Ritsuko SHIMIZU[5], Sakae SAITO[5], Maki GOTO[5], Jiro NAKAYAMA[6], Riko MISHIMA[6], Jun KUNISAWA[7], Koji HOSOMI[7], Keishi KAMEYAMA[1], Takayoshi HISADA[1], Ken KASAHARA[1], Hiroko KAWASAKI[3], Yuji SEKIGUCHI[2], Jun TERAUCHI[1] ([1]JMBC, [2]AIST, [3]NITE/NBRC, [4]BRC-JCM, [5]Tohoku Univ., [6]Kyushu Univ., [7]NIBIOHN)

ヒトマイクロバイオームはさまざまな疾患や健康状態との関連が知られ、食品開発や疾患予防・健康維持などの分野において新たな産業の創出が期待されている。次世代シーケンサーを利用したマイクロバイオーム解析においては、サンプル採取や保存、DNA 抽出、ライブラリ調製、シーケンシング、データ解析など工程ごとの手法の違いによるバイアスの蓄積が解析結果に影響を与えることが知られており、データの信頼性や計測施設間における比較互換性の乏しさが懸念されている。そこで本研究では、精度管理用標準試料を用いて、産業界が広く実施でき、計測結果の比較互換性が担保できるヒトマイクロバイオーム推奨分析手法を開発した。

まず、精度管理における比較参照用標準試料として、ヒト糞便等を想定した cell mock および DNA mock を開発した（前発表参照）。DNA 抽出の工程において、cell mock およびヒト糞便試料を用いて計 21 種の手法を検証し、高精度かつ簡便な手法を選定した。同様に、ライブラリ調製の工程において、DNA mock を用いて計 28 種の手法を検証し、高精度かつ簡便な手法を 2 種類選定した。これらを推奨分析手法として標準手順書（SOP）に取りまとめた。さらに、本 SOP および標準試料を用いて複数施設間での室間共同試験を実施した結果、分析結果の期待値からの偏差は推定される許容範囲内に収まることが確認された。これにより、本 SOP は多くの機関において高精度な計測が可能な手法であり、マイクロバイオーム解析における比較互換性の向上に資することが実証された[1)]。

Validation and standardization of methodologies for microbiome analysis by high-throughput DNA sequencing are necessary to support and accelerate human microbiome research and development. Workflows for microbiome analysis include complex steps, from sample collection and storage to DNA extraction, sequencing and bioinformatics analysis. Methodological bias and errors can lead to substantial differences in observed microbiota profiles, resulting in considerable variability in results across studies and laboratories using different protocols. Here, we performed widely comparison of protocols for DNA extraction and sequencing library construction using defined mock communities to development our recommended protocols and establish SOPs. Further, we validated SOPs with respect to their variability of measurement results as well as interlaboratory comparability and reproducibility through collaborative study.

1) Tourlousse DM et al. *Microbiome.* 2021;**9**:95.

microbiome, metagenome, human gut

発表責任者：成田興司（koji.narita@chitose-bio.com）

講演番号：4D04-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

実験室内および野外ダイズにおける根圏細菌叢の時空間変動解析

Analysis of soil microbial spatiotemporal variation in laboratory and field soybean

○木伏 真子[1,2]、西川 洋平[2,3]、細川 正人[1,2,3,4]、井手 圭吾[1,2]、小川 雅人[3]、穴井 豊昭[5]、竹山 春子[1,2,3,4] ([1]早大院・先進理工、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大・ナノライフ創新研、[4]早大・生命動態研、[5]九大院・農)

○Masako KIFUSHI[1,2], Yohei NISHIKAWA[2,3], Masahito HOSOKAWA[1,2,3,4], Keigo IDE[1,2], Masato KOGAWA[3], Toyoaki ANAI[5], Haruko TAKEYAMA[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., [4]Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [5]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

植物根から分泌される成分の影響を強く受ける根圏領域には，周辺の土壌とは異なる細菌が定着し，植物体との相互作用が活発に行われている。近年，メタゲノム解析によって配列ビッグデータが蓄積され，難培養細菌を含む多様な環境細菌の概括的な機能が推定されている一方，個々の細菌の詳細な機能については依然として未解明なものが多い。そこで我々は，土壌の作物生産力の向上につながる植物-細菌相互作用の解明を目標に掲げ，16S rRNA 遺伝子解析を用いた細菌叢解析に加え，細菌ゲノムの特徴を個々に評価するシングルセルゲノム解析を用いることで，標的作物であるダイズの成長に伴った根圏細菌の時空間的な変動評価を試みている。現在，ポット栽培のダイズおよび，7 種類の異なる作物の前作履歴を持つ圃場で栽培したダイズを対象として，植物体の成長段階ごとの土壌・植物体の解析を進めている。600 個以上のサンプルにわたって細菌叢の比較を行い，ダイズの成長段階ごとに特異的な細菌を特定した。さらに，ポット栽培のダイズから 5376 個のシングルセルドラフトゲノムを取得し，16S rRNA 遺伝子解析では同一種に分類される根粒菌の，株レベルでの配列多様性を検出した。細菌叢全体の変動解析と細菌シングルセルゲノムの詳細な機能解析を組み合わせることで，有用な根圏細菌の網羅的探索が可能になると期待される。

本研究は，内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（管理法人：生研支援センター）によって実施された。

While the general functions of environmental microbiome have been estimated by metagenomic big data, the detailed functions of individual bacteria remain largely unexplored. In this study, we evaluated the spatiotemporal rhizosphere microbial variation throughout the soybean growth using single-cell genome analysis and 16S rRNA gene analysis. Soybean plants were sampled from pots, and fields with previous cropping histories of seven different crops. In 16S rRNA gene analysis, more than 600 samples were collected, and growth-stage specific rhizosphere bacteria were identified. In single-cell genome analysis, 5376 single-cell amplified genomes were obtained from pot-grown soybean plant. From rhizobium single-cell genomes, sequence diversity was revealed at strain-level resolution, which would not be able to be distinguished by 16S rRNA gene analysis. The combination of the entire microbial dynamics analysis and the individual genome function analysis will enable a comprehensive search for the useful rhizosphere bacteria.

single-cell genome analysis, soybean, rhizosphere

発表責任者：竹山春子（haruko-takeyama@waseda.jp）

講演番号：4D04-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

高完成度の 1 細胞ゲノム配列取得を可能とする，アガロースゲル・マイクロカプセルの開発と簡便な作製手法

Agarose gel microcapsules enable easy-to-prepare, picolitre-scale single-cell genomics, yielding near-complete genome sequences

○青木 弘良[1]、雪 真弘[2]、本郷 裕一[3]、大熊 盛也[2]、山形 豊[1]([1]理研 RAP、[2]理研 BRC、[3]東工大・生命理工)
○ Hiroyoshi AOKI[1], Masahiro YUKI[2], Yuichi HONGOH[3], Moriya OHKUMA[2], Yutaka YAMAGATA[1] ([1]RAP, RIKEN, [2]BRC, RIKEN, [3]Dept. Life Sci, Tokyo Tech)

近年環境 DNA の**メタゲノム解析**により，環境中**難培養微生物叢**の，複雑で多様な生態が解明されつつある．一方微生物の**シングルセルゲノム解析**は，(1) 少数微生物のゲノム解析，(2) メタゲノムアセンブリのリファレンス配列，および(3) プラスミド DNA 解析などに有用である．しかし従来のシングルセルゲノム解析は，ゲノム DNA の多重置換増幅(MDA)時の増幅バイアスにより，ゲノム情報全体の取得が困難だった．我々が開発した**アガロースゲルマイクロカプセル**(AGM)は，液状コアとアガロースゲルシェルから構成され，一般的な実験機器を用いて同時に数十万個作製できる．AGM における約 30 µm 径 (約 20 pL)のコア内での，シングルセルのゲノム DNA の MDA (MDA-in-AGM) により，大腸菌ゲノムカバー率を約 52%から約 98%に向上できた (Fig. 1)．今後 AGM を用いたシングルセルゲノム解析により，環境中難培養微生物の機能解明が期待される．

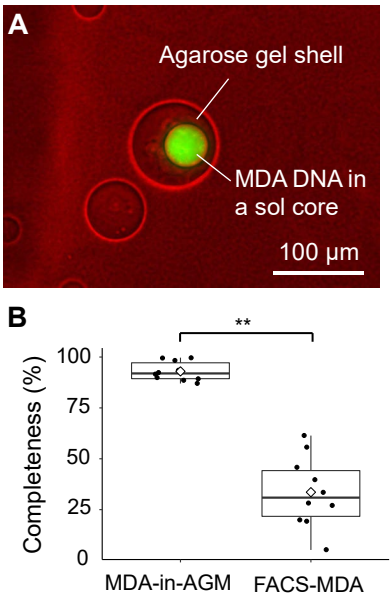


Fig. 1 Agarose Gel Microcapsule
A. MDA of genomic DNA from single *E. coli* in AGM. B. Genome completeness of MDA-in-AGM and conventional MDA using FACS (FACS-MDA).**: $P < 0.01$.

Metagenomics revealed complex and wide variety of yet-uncultured microbial community in the environment. Single-cell genomics analyzed the microbiome based on single-cell genome sequencing. Single-cell genomics is used for (1) analyses of minor species in the microbial community, (2) reference sequence for metagenome sequence bins, and/or (3) plasmid analyses. However, single-cell genome was difficult to obtain entire genome sequence owing to amplification bias on multiple displacement amplification (MDA) of genomic DNA. To suppress the amplification bias, agarose gel microcapsule (AGM), which was consisted of agarose gel shell and alginate sol core, was developed. AGM was easily prepared several hundred thousands capsules per batch using inexpensive equipment such as a vortex mixer and a centrifuge. After AGM was prepared to contain single *E. coli* cell per capsule, MDA of the genomic DNA in the AGM core (approximately 20 pL) (MDA-in-AGM) suppressed the amplification bias and improved genome completeness from 52% to 98%. Our new method using the AGM allows many researchers to perform single cell genomics, and can accelerate the genome analysis of yet-uncultured microbes.

Single-cell genomics, Multiple Displacement Amplification, Hydrogel Microcapsule

発表責任者：青木　弘良（haoki@riken.jp）

講演番号：4D04-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

ゲノム情報を用いた日本海溝の海底微生物の多様性と機能の解明

Genomic analysis of bacterial diversity and function along the Japan Trench

○實野 佳奈[1,2]、西川 洋平[2,3]、小川 雅人[3]、星野 辰彦[4]、稲垣 史生[4]、竹山 春子[1,2,3,5] ([1]早大院・先進理工、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大・ナノライフ創新研、[4]国立研究開発法人海洋研究開発機構、[5]早大・生命動態研)
○Kana Jitsuno[1,2], Yohei Nishikawa[2,3], Masato Kogawa[3], Tatsuhiko Hoshino[4], Fumio Inagaki[4], Haruko Takeyama[1,2,3,5] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]JAMSTEC, [5]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

水深 6,000m を超える超深海とその海底堆積物には、表層から供給される有機物をエネルギー源とする従属栄養型微生物生態系が存在しており、地球の生物地球化学的な物質循環システムにおいて重要な役割を担っている。しかしながら、海溝軸に沿った広範囲の深海環境を対象とした大規模な調査例は報告が少なく、海水-堆積物環境における微生物群集の多様性や、物質循環を担う個々の微生物の詳細な代謝機構や地理的空間分布については未だ多くが明らかにされていない。

本研究では、国際深海科学掘削計画第 386 次研究航海において、南北 600km に渡る日本海溝軸（水深約 7,500m）の合計 15 地点から堆積物コアと直上の海水を採取した。まず、16S rRNA 遺伝子解析を用いて、サンプル中に存在する微生物群集の地点ごとの多様性を調べた。また、当研究室で独自に開発された 1 細胞ゲノム解析技術を用いて、現在までに、直上海水及び表層堆積物に生息する微生物のシングルセルゲノムを 2,303 個獲得した。今後は、微生物群集構造や個々の微生物の機能遺伝子解析と環境因子との相関解析に取り組む予定であり、本公演ではその予察結果を踏まえた議論を行いたい。

Hadal trench (>6,000m below sea level) harbors various heterotrophic microorganisms, which depend on organic matter. These microorganisms play an important role in marine environment, where 90% of carbon on Earth is stored. On the other hand, spatial variations of subseafloor microbial community and the detailed metabolic function along trench axis still remains largely unexplored.

In this study, during International Ocean Discovery Program (IODP) Expedition 386, we drilled the seafloor from 15 sites along the Japan Trench (7,500m depth, 600km distance) and collected sediments and bottom water. First, we examined the microbial diversity in each site using 16S rRNA gene analysis. In addition, we have obtained 2,303 single-cell genomes (SAG) of subseafloor microorganisms using microdroplets originally developed in our laboratory. Currently, we are working on microbial community analysis based on environmental factors and functional gene analysis of individual microorganisms, part of which will be introduced in this study.

Single-cell genome analysis, Hadal zone, Japan trench

講演番号：4D04-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

ゲノム配列中の連続三塩基出現頻度を利用した細菌種の高速予測

Rapid prediction of microorganism species using triplet frequency profiles of genome sequences

○鈴木 宏和、中川 翔太、杉原 辰典、大城 隆（鳥取大工）
○Hirokazu SUZUKI, Shota NAKAGAWA, Tatsunori SUGIHARA, Takashi OHSHIRO (Tottori Univ.)

微生物の新種判定は，既知微生物とのゲノム類似性を DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって実験科学的に測定し，その値に基づき確定するのが通例である。しかし，その実験操作には高度な技術が求められ，誤った判定も起こりうる。そこでゲノム配列からゲノム類似性（dDDH）を算出することで，より正確な判定を行う方法も提案されているが，計算に掛る時間が長く，dDDH 値を網羅的に算出することは現実的に難しい。本研究では，ゲノム配列中の連続三塩基出現頻度（TFP）に基づいて高速かつ網羅的に dDDH 値を予測する手法を考案した。本発表では，その有効性について議論する。

約 2 万種（真正細菌と古細菌）の完全ゲノム配列を収集し，それらの TFP をデータベース化した。大腸菌 K-12 の TFP をインプットデータとして，類似 TFP をもつ細菌種をデータベースから検索したところ，K-12 株を最上位としながら大腸菌株が上位に出力された。上位 10%の生物種について類似度と dDDH 値を比較すると，dDDH 値が 60%以上の場合において相関性が見られた。K-12 株のゲノム配列にランダム変異を発生させたところ，変異率 0.1%以下ならば K-12 株が最上位に出力された。ゲノム配列を削除した場合は，削除率 1%でも K-12 株が上位に出力された。これまでに約 36 万種のデータベースを構築した。重要なことに，dDDH が 75 データの解析に半日かかるのに対し，本手法は 36 万データに対する計算を 10 分程度で完了できた。本会では，データベース外の細菌種ゲノムをインプットデータとして検索した結果などについても報告する。

Genome similarities play an important role when microorganism species are defined. The similarity is experimentally estimated using DNA-DNA hybridization or calculated on genome sequences with an computational approach (dDDH). The former approach is not simple, and the later requires a long computation time; thus, we designed a simple and rapid approach to predict dDDH based on triplet frequency profiles (TFP) of the genome sequences. To evaluate this approach, a TFP database was constructed from complete genome sequences of bacteria and archaea (20000 species). The database was analyzed to identify the species whose TFP were more similar to that of *Escherichia coli* K-12, which successfully outputted the K-12 strain followed by other *E. coli* strains. The same result was produced even when the genome data were mutated or deleted. Notably, the calculation was rapid compared with dDDH analysis. Additional data will be shown in our presentation.

bioinformatics, prediction, classification

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4D04-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

Stenotrophomonas maltophilia 基準株と biovar2 群の再分類のための比較ゲノム解析

Comparative genomics for reclassification of Stenotrophomonas maltophilia reference strains and biovar II group

○小川 泰地[1]、久富 敦[2]、志波 優[1]、藤田 信之[1]、田中 尚人[1]([1]東農大・分子微生物、[2]東農大・環境共生)

○ TAICHI OGAWA[1], ATSUSHI HISATOMI[2], YUH SIWA[1], NOBUYUKI HUJITA[1], NAOTO TANAKA[1] ([1]Tokyo Univ. Agr., Microbiol., [2]Tokyo Univ. Agr., Ecological symbiotic.)

Stenotrophomonas maltophilia は感染症患者、環境や動植物に生息するなど生態や性状において多様な種である。これまで本属は一属一種であったが、近年 19 種が提唱されており *S. maltophilia* の多様な株は様々な種に再分類される可能性がある。本種の分別性状の 1 つにメチオニン要求性があり、基準株を含む要求性の biovar I 群と非要求性の biovar II 群が提唱された。我々は両群の株のゲノム配列を決定し、ゲノム上のメチオニン生合成関連遺伝子を検証したところ両群に違いはなく、さらに表現型では biovar II 群の一部の株が要求性を示した。Biovar II 群の株においては ANI と系統解析の結果、基準株と異なる 3 種であったため、本種はヘテロである可能性が高くなった。そこで基準株の新たな分別性状をパンゲノム解析により検討した結果、基準株のみカテコール型シデロフォア生合成関連遺伝子 *dhbA* を保持しており、LC/MS 分析によって産生が確認された。したがって、これまでの *S. maltophilia* 株の中で基準株を含む biovar I 群の分類指標の候補の 1 つはシデロフォア産生能と考えられた。今後は他の種も含めたシデロフォア産生能の検証、またメチオニン生合成経路については転写レベルでも検証する。

The genus *Stenotrophomonas* has been consisted of one species, *Stenotrophomonas maltophilia*. This species is a diverse species in ecology and habitat, including infectious agents, the environment, plants and animals. Recently 19 species have been proposed, and the diverse strains of *S. maltophilia* may be reclassified into several species. One of the distinguishing characteristics of *S. maltophilia* is methionine requirement, and two groups have been proposed: the requirement biovar I group, including type strain, and the non-requirement biovar II group. We have sequenced the genomes of strains of both groups and examined the genes related to methionine biosynthesis on the genomes. As a result, no differences between the two groups were found. And then, ANI and phylogenetic analysis showed that *S. maltophilia* strains are consisted of some species. Thus, novel discriminative characteristics for the biovar I including the type strain was researched by pan-genome analysis and a core gene of the biovar I strain was *dhbA* related to the catecholate-type siderophore production. This result was supported by LC/MS analysis. Therefore, the ability of siderophore production might be discriminative characteristics of the biovar I strains of *S. maltophilia*.

stenotrophomonas maltophilia, classification, comparative genomics

講演番号：4D04-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

Arthrobacter 属細菌におけるニコチン分解遺伝子群の比較ゲノム解析
Comparative genome analysis of nicotine-degrading gene cluster of genus *Arthrobacter*
○島崎 智久[1]、増田 幸子[2]、柴田 ありさ[2]、須田 亙[3]、白須 賢[2]、矢﨑 一史[4]、市橋 泰範[1]、杉山 暁史[4]、中野 亮平[5]([1]理研・BRC、[2]理研・CSRS、[3]理研・IMS、[4]京都大・生存研、[5]MPIPZ (Germany))
○ Tomohisa Shimasaki[1], Masuda Sachiko[2], Arisa Shibata[2], Wataru Suda[3], Ken Shirasu[2], Kazufumi Yazaki[4], Yasunori Ichihashi[1], Akifumi Sugiyama[4], Ryohei Nakano[5] ([1]RIKEN・BRC, [2]RIKEN・CSRS, [3]RIKEN・IMS, [4]RISH, Kyoto Univ., [5]MPIPZ (Germany))

植物が根から分泌する特化代謝産物はシグナル分子として根圏微生物との相互作用において多様な役割を担う。我々はナス科植物のタバコ (*Nicotiana tabacum)* が生産する毒性アルカロイドであるニコチンのタバコ根細菌叢形成における機能解析を進めてきた。タバコ根やニコチンを添加した土壌から単離された *Arthrobacter* 属細菌がニコチン分解活性を示したことから、これらの細菌種がニコチンを利用し定着することでタバコ根に特徴的な細菌叢が形成されると考えられた (Shimasaki, *et al*., 2021)。そこで、*Arthrobacter* 属細菌のより詳細な解析を進めるため、単離した *Arthrobacter* 属細菌の全ゲノム解析を行い、これらを用いたニコチン分解遺伝子群の比較ゲノム解析を行なった。

これまでに単離された *Arthrobacter* 属細菌はニコチン分解遺伝子群をプラスミド上にコードしていたことから、ニコチン分解遺伝子群はプラスミドを介して *Arthrobacter* 属細菌間を伝播すると考えられてきた。一方、本研究において単離された菌株のうち 3 菌株がニコチン分解遺伝子群を染色体 DNA 上に有していた。なかでも、NtRootA9 株ではニコチン分解遺伝子群の両端が IS5 ファミリートランスポザーゼに挟まれた構造をしており、他の細菌株においても保存された染色体 DNA 領域にニコチン分解遺伝子群が挿入されていることが明らかになった。以上の結果から、ニコチン分解遺伝子群が *Arthrobacter* 属細菌間をプラスミドに加えトランスポゾンによって伝播する可能性が示唆されるとともに、これらの可動性遺伝因子を介したニコチン分解遺伝子群の獲得が *Arthrobacter* 属細菌のタバコ根への定着に重要であると考えられた。

Plant specialized metabolites play diverse roles in interactions with their root microbiota. We previously showed that *Arthrobacter* isolates-derived from tobacco roots degraded nicotine, suggesting that the utilization of nicotine is associated with the ability to colonize tobacco roots. To deeper understand the nicotine-mediated tobacco–*Arthrobacter* interaction, we sequenced *Arthrobacter* strains isolated from tobacco roots or nicotine-treated soils and performed comparative genome analysis. Previous studies proposed that nicotine-degrading gene cluster can be spread within *Arthrobacter* via plasmid. On the other hand, three strains isolated in our study harbored nicotine-degrading genes on the chromosome. Particularly, in the strain NtRootA9, IS5 family transposases are located at both ends of the nicotine-degrading gene cluster. These results indicate that nicotine-degrading genes can also be transferred via transposon in addition to the delivery as a plasmid, and the horizontal acquisition of nicotine-degrading genes contributes to the colonization of *Arthrobacter* to tobacco roots.

Plant specialized metabolite, Plant microbe interactions, Comparative genomics

発表責任者：島崎　智久（tomohisa.shimasaki@riken.jp）

講演番号：4D04-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

放線菌のカルコフォア合成様遺伝子群の発現に関与するシグマ因子 SigC の解析

Analysis of sigma factor SigC involved in transcriptional regulation of chalkophore-like biosynthesis genes in *Streptomyces* spp.

藤本 正浩[1]、Salvatore Cosentino[2]、按田 瑞恵[2]、佐藤 光彦[3]、中村 佳司[3]、小椋 義俊[3]、林 哲也[3]、岩崎 渉[2]、上田 賢志[1]、○高野 英晃[1]([1]日大・生資科・生命研、[2]東大・院理・生物科学、[3]九大院・医学研究院)

Masahiro FUJIMOTO[1], Cosentino Salvatore[2], Mizue ANDA[2], Mitsuhiko SATO[3], Keiji NAKAMURA[3], Yoshitoshi OGURA[3], Tetsuya HAYASHI[3], Wataru IWASAKI[2], Kenji UEDA[1], ○Hideaki TAKANO[1] ([1]Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., The Univ. of Tokyo, [3]Dept. of Bacteriol, Fac. of Med. Sci., Kyushu Univ.)

銅シャペロン ScoC は放線菌 *Streptomyces griseus* において呼吸鎖複合体 IV やラッカーゼなどへの銅運搬に関わる。*scoC* は銅欠乏条件において発現する一方で、銅十分存在下では発現が抑制される。*scoC* と同じく銅欠乏時特異的な発現を示す遺伝子として *SGR6227* を見出した。機能未知 *SGR6227* とオペロンを成す RNA ポリメラーゼシグマ因子 *sigC* に加えて、下流の *SGR6229-6232* オペロンも銅欠乏時特異的な発現を示した。*SGR6229-6232* オペロンの発現は *sigC* 破壊株では著しく低下していたことから、SigC は SGR6232 プロモーターを認識することが示唆された。SGR6229-6232 酵素群は、環境中からの銅獲得を担うカルコフォア合成・輸送に関与することが予想される。放線菌ゲノムにおいて *SGR6227-sigC* 遺伝子セットは高度に保存され、その近傍にはカルコフォア合成を担うと推測される酵素群がコードされ、それらの推定機能よりクラス I から IV に分類した。すべてのクラスにおいて銅欠乏時特異的な発現が確認された。そのうち、*Streptomyces thioluteus* 由来のクラス III はカルコフォア化合物 SF2768 の合成遺伝子群であることが報告されている。本研究によって、放線菌 *sigC* の近傍にはカルコフォア合成様酵素群がコードされている共通性を見出した。

ScoC serves as a chaperone to transport copper to the respiratory chain complex IV and laccase in *Streptomyces griseus*. ScoC is specifically expressed under copper-deficient conditions. We found that a gene cluster including *SGR6227*, RNA polymerase sigma factor *sigC* (SGR6228), and the downstream *SGR6229-6232* operon also showed a similar expression pattern with *scoC*. The expression of *SGR6229-6232* operon was markedly reduced in *sigC* null mutant, suggesting that SigC recognizes the promoter of *SGR6229-6232* operon. The SGR6229-6232 enzymes were predicted to be involved in synthesis and transport of chalcophore for copper acquisition from the environment. The gene set of *SGR6227-sigC* is highly conserved, and chalcophore-like synthesis enzymes are encoded in the vicinity of *SGR6227-sigC* in *Streptomyces* spp. We classified the chalcophore-like synthesis enzymes into four classes based on their putative function. In all classes, the specific expression during copper deficiency was observed. Among them, class III from *Streptomyces thioluteus* has been reported to be genes for the synthesis of the chalcophore compound SF2768. In this study, we found that chalcophore synthesis-like enzymes are encoded in the vicinity of *sigC* in *Streptomyces* spp.

sigma factor, chalkophore, streptomyces

講演番号：4D04-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム D

ラッカーゼ発現に変異が生じたシイタケ組換え体のラッカーゼ遺伝子の解析

Analysis of *lcc* genes of expression in *Lentinula edodes* transformants having a different Lcc expression pattern

○鈴木 未由太、野地岡 侑輝、佐藤 利次（北見工大院・食品科学）
○Myuta SUZUKI, Yuki NOJIOKA, Toshitsugu SATO (Food sci., Kitami Inst. Technol.)

【緒言】シイタケは、栽培過程でラッカーゼ(Lcc)を生産するが、その発現制御メカニズムは不明である。これまでに、薬剤耐性遺伝子発現ベクターを導入した組換え株の中から、宿主株(SR-1)とは Lcc の発現パターンが異なる#590 株及び同株由来の胞子株#590-67 が選抜された。これらの菌体を液体培養すると，宿主株では Lcc1 のみの分泌､#590 株では Lcc1 の発現抑制と Lcc5 の新規分泌が確認された。本研究では、これらの株の *lcc* 遺伝子の発現を、リアルタイム PCR により解析した。
【方法】宿主株、#590 株、及び#590-67 株を MYPG 液体培地で培養し、培養液の Lcc 活性がピーク時の菌体を回収した。これらの菌体から RNA を抽出し、cDNA 合成後、*lcc1* と *lcc5* 遺伝子のリアルタイム PCR を行った。組換え体の *lcc* 遺伝子の発現量は、ΔΔCt 法により宿主株に対する相対値として求めた。
【結果】組換え体の宿主株に対する *lcc1* の発現量は、#590 の一次ピークでは 0.1、#590 の二次ピークと#590-67 ではそれぞれ 0.01 未満となり、その発現が大きく低下した。これに対して、*lcc5* はすべての組換え体において 3 以上となり、特に#590 の二次ピークでは、43 で最大の発現量を示した。以上の結果より、宿主株と組換え体では *lcc1* と *lcc5* の発現が大きく変化したことが明らかとなった。

Lentinula edodes produces laccases (Lccs) during cultivation, its expression mechanism is unknown. A transformant #590 strain and its spore strain #590-67 were selected which have a different Lcc expression pattern from the host strain (SR-1) among transformants into which a vector pLC-hph has been integrated. In the SR-1, only Lcc1 was secreted during liquid culture, whereas in the #590, repression of Lcc1 and novel secretion of Lcc5 were confirmed. In this study, the expressions of the *lcc* genes in these strains were analyzed by real-time PCR. *L. edodes* strains were cultured in MYPG liquid culture, the cultivated mycelia at the peak activity were collected. RNA was extracted from the mycelia and after cDNA synthesis, real-time PCR was performed for the *lcc* genes. The relative expression levels of the transformants *lcc* genes were analyzed when the expression of that of the host strain was 1 by the ΔΔCt method. The expressions of *lcc1* were 0.1 at the primary peak of # 590 and less than 0.01 at the secondary peak of # 590 and # 590-67, respectively. Whereas, *lcc5* were 3 or more in all transformants. These results indicated that the expressions of *lcc1* and *lcc5* were significantly changed between the host strain and the transformants.

Lentinula edodes, Laccase, Transformant

発表責任者：佐藤利次（tosisato@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：4D07-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

超好熱性ウイルス由来キャプシドタンパク質の大腸菌でのタンパク質発現系の構築と発現タンパク質の機能解析

Construction of recombinant protein expression system for capsid protein from hyperthermophilic virus in *E.coli* and characterization of the recombinant protein.

○炭竈 優花[1]、里村 武範[2]、望月 智弘[3]、末 信一朗[2] ([1]福井大院・工、[2]福井大学・工、[3]東工大)
○Yuka Sumikama[1], Takenori Satomura[2], Tomohiro Mochizuki[3], Shin-ichiro Suye[2] ([1]Eng., Fukui Univ., [2]Fukui Univ., [3]Tokyo Titech.)

超好熱性アーキアが生産するタンパク質は高い耐熱性に加え、様々な種類の有機溶媒やタンパク質変性に対して高い耐性を有していることが報告されている。近年、この超好熱性アーキアに感染するウイルスが発見され注目されている。超好熱性ウイルスは宿主が超好熱性アーキアであることから、これらのウイルス由来タンパク質も高い安定性を有していることが考えられるためナノマテリアルへの応用などが期待されている。これまでに多くの超好熱性ウイルスが単離されゲノム解析が行われてきたが、超好熱性ウイルスがコードするオープンリーディングフレーム（ORF）は既知の ORF との相同性が認められないため超好熱性ウイルスタンパク質の機能解析は進んでいない。本研究では、近年、ゲノム解析とウイルス構造が明らかとなった好気性超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* に感染するウイルス *Aeropyrum pernix* bacilliform virus 1（APBV1）に焦点を当てた。APBV1 の持つ 14 個の ORF の塩基配列は既知のどの遺伝子とも相同性が見られず、タンパク質の機能は全く分かっていない [1)]。しかしながら、キャプシドタンパク質は 14 個の ORF のうち ORF6～9 によって構成され、その中でも ORF6 が主要なキャプシドタンパク質を構成していることが明らかとなっている [2)]。そこで、APBV1 の主なキャプシドタンパク質をコードする ORF6 の組換えタンパク質発現と粒子形成解析を行った。

Proteins from hyperthermophilic archaea is known to be highly thermostable and highly resistant to various organic solvents and protein denaturants. Virus infecting hyperthermophilic archaea have attracted attention. The hyperthermophilic viruses have high potential utilization as nanomaterials because it is expected the proteins from the viruses have high stability against high temperature, wide range of pHs and high concentration of organic solvents Although many hyperthermophilic viruses have been isolated and characterized including genome analysis. However, the information for the function of protein from hyperthermophilic virus has been limited because the open reading frames (ORFs) from the hyperthermophilic viruses show no homology to known ORFs. We focused on *Aeropyrum pernix* bacilliform virus 1 (APBV1) infecting the aerobic hyperthermophilic archaea, *Aeropyrum pernix*. APBV1 has recently been isolated from coastal hot spring in Kagoshima, Japan, and its particle structure has been revealed[2)]. In this study, we constructed the recombinant protein expression system in *E. coli* of ORF6 composed the main capsid protein of APBV1.

1) T. Mochizuki, *et al.*, Virology., **402**, 347-354 (2010).
2) Ptchelkine *et al.*, Nat Commun., **8**, 1436-1442 (2017).

hyperthermophilic archaea, virus, capsid protein

講演番号：4D07-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*）由来 PRI3 タンパク質の子実体特異的発現と機能

Fruiting body-specific expression and function of the PRI3 protein from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*

○蔵谷 大和[1]、椙松 知香[1]、椿 捺菜美[1]、宮原 浩二[1]、松本 顕[2]、岩田 眞人[3]、安藤 祥司[1]([1]崇城大生物生命、[2]順天堂大医、[3]アイエムビー（株））

○ Yamato KURATANI[1], Chika ABEMATSU[1], Nanami TSUBAKI[1], Koji MIYAHARA[1], Akira MATSUMOTO[2], Makoto IWATA[3], Shoji ANDO[1] ([1]Fac. Biotech. Life Sci., Sojo Univ.,, [2]Fac.Med.,Juntendo Univ.,, [3]IMB)

食用キノコの多くは担子菌類に属するが、キノコの生活環（成長と子実体形成）に関する分子機構は依然不明点が多い。*Pri3* 遺伝子はヤナギマツタケ種群（*Agrocybe* complex）の子実体形成に関わる遺伝子として、原基で特異的に発現されることが報告された。しかし、コードするタンパク質の機能は未解明である。今回、ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*／福岡県産株）を用いて *Pri3* 遺伝子の cDNA クローニングと遺伝子発現部位解析、PRI3 タンパク質の免疫組織化学的解析、及び組換え PRI3 タンパク質の調製と機能解析を行った。

ヤナギマツタケの子実体から全 RNA を抽出、1 本鎖 cDNA を合成し、塩基配列を決定し、*Pri3* 遺伝子を得た。Northern blotting、*in situ* hybridization 及び免疫組織染色の結果、*Pri3* 遺伝子は、原基ではなく、幼若な子実体の傘で発現が高く、PRI3 タンパク質は傘の表面に局在することが示された。また、酵母に発現させた組換え PRI3 タンパク質は線虫（*C. elegans*）の生育を抑制することが示された。これらのことより、PRI3 タンパク質は生体防御に関わるタンパク質であると推測される。

Molecular mechanisms of fruiting body formation of edible mushrooms are poorly understood. The *Pri3* gene has been reported to be specifically expressed in the primordia of the *Agrocybe* complex, although physiological function of the translated product PRI3 is still unknown. We cloned the *Pri3* cDNA from *Agr. cylindracea* cultivated in Fukuoka Prefecture, and characterized its expression pattern in the mushroom by Northern blotting and *in situ* hybridization. The localization of the PRI3 protein in the mushroom was also determined by immunohistochemistry. The results suggest that the *Pri3* gene is expressed specifically in the surface of pileus during fruiting body maturation, but not in the primordia. The recombinant PRI3 protein produced by yeast expression system showed growth inhibition against *C. elegans*. These results suggest that PRI3 is a host defense protein of *Agr. cylindracea*.

basidiomycete, fruiting body, host defense protein

講演番号：4D07-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

カイコガ前胸腺刺激ホルモン PTTH 組換体分子種の性状解析

Characterization of molecular species of recombinant silkworm prothoracicotropic hormone (PTTH)

○兒島 憲二、石垣 悠里、平田 康祐、岡田 歩実、岡屋 琳、下田 佳苗、齋藤 一樹（姫路獨協大薬）
○ Kenji KOJIMA, Yuri ISHIGAKI, Kousuke HIRATA, Ayumi OKADA, Rin OKAYA, Kanae SHIMODA, Kazuki SAITO (Himeji Dokkyo Univ.)

カイコガ前胸腺刺激ホルモン PTTH の組換えタンパク質は、先行研究では、常法通り、大腸菌を用いて産生され、鎖内に 3 本ずつ鎖間に 1 本のジスルフィド架橋を有するホモ二量体であることが明らかにされた。しかし、分子内に計 7 本ものジスルフィド架橋を有する組換体を大腸菌で大量に発現させることは難しく、私たちの研究室では、分泌発現系を備えたブレビバチルス菌を用いてカイコガ PTTH の組換体を調製している。C 端に His_6 タグを付加したカイコガ PTTH（PTTH-His_6）を同菌に分泌発現させ、その培養上清を Ni-NTA カラムに供すると、A 群と B 群に分かれて溶出された。質量分析の結果から、B 群が全長で A 群はその分解物であることがわかったので、B 群をさらにゲルろ過と逆相 HPLC で精製した。すると、B 群の組換体はさらに 2 つの分子種（B-1, B-2）に分かれた。B-1 と B-2 は、質量分析でほぼ同じ質量を示すにもかかわらず、非還元 SDS-PAGE での移動度が異なった。そこで、本研究では、B-1 と B-2 の間にどのような違いがあるのかを明らかにすることにした。

まず、CD スペクトルおよびその温度依存性を測定したところ、B-1 も B-2 も同じような結果を示し、二次構造やジスルフィド架橋の一部の切断に伴う違いではないと推察された。これに対して、両分子種はトリプシンに対する消化抵抗性に大きな違いを示した。そこで、二次構造にあまり影響を与えない範囲で、分子内部のジスルフィド架橋の架かり方に差違があるのではないかと考え、現在、両分子種の内部ジスルフィド架橋構造を明らかにしようと試みている。

Previously, a recombinant protein of silkworm PTTH (prothoracicotropic hormone) was expressed in *Escherichia coli* and was found to be a homodimer possessing seven disulfide bridges. In this study, to prepare the hormone with the multiple bridges in a larger amount, its His_6-tagged protein (PTTH-His_6) was expressed in *Brevibacillus choshinensis*, instead. Recently, however, the recombinant hormone secreted in the culture was found to consist of two different species, B-1 and B-2, with similar molecular masses in mass spec, but clearly distinguishable in a non-reducing SDS-PAGE gel, after chromatographic purification. In addition, the species exhibited different resistance to trypsin digestion, whereas they showed similar CD spectra at every temperature measured. To discover where the differences lie between B-1 and B-2, we are now trying to precisely examine bridged positions through the disulfide bonds in the homodimers obtained with the *Brevibacillus* cells.

prothoracicotropic hormone, Brevibacillus secretory expression, disulfide bridge

発表責任者：兒島憲二（kojima@gm.himeji-du.ac.jp）

講演番号：4D07-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

バクテリオファージφX174 スパイク H タンパク質 C 末端ドメインの LPS 結合能の解析

Analysis of the LPS binding ability of the C-terminal domain of bacteriophage φX174 spike H protein

○伊藤 恭平、秋田 総理、増田 裕一、稲垣 穣（三重大生物資源）
○Kyohei ITO, Fusamichi AKITA, Yuichi MASUDA, Minoru INAGAKI (Mie Univ.)

バクテリオファージϕX174 はグラム陰性菌の細胞表層に存在する LPS をレセプターとして認識し感染する。宿主認識には G, H と呼ばれる 2 種類のスパイクタンパク質が関与しており、中でも H タンパク質の C 末端ドメイン（Met^{198}~Lys^{328}）は V8 プロテアーゼに耐性があるため、まとまったドメインを作り宿主選択に重要な役割を果たすと考えられている。また、CD スペクトル測定によりα-ヘリックス構造をとることが分かっているが、その立体構造や LPS との結合部位は完全には解明されていない。以上の背景から、本研究ではスパイク H タンパク質の C 末端ドメインの LPS 結合能と宿主選択性を明らかにすることを目的とした。遺伝子工学的な手法により C 末端ドメインを His タグ融合タンパク質として調製し、Trp 残基の蛍光を観察することで LPS との相互作用を分析した。C 末端ドメインは LPS の脂質部分と疎水的に相互作用し、蛍光強度が増大した。ϕX174 の宿主の LPS と比べて、宿主でない *E. coli* K-12 株 LPS との結合が弱いことから、C 末端ドメインは末端糖鎖の違いも認識することが分かった（図 1）。

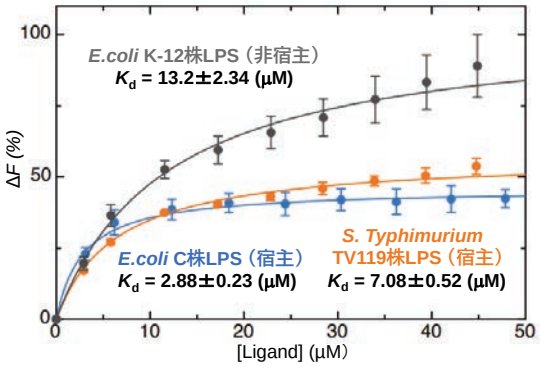


図 1 各種 LPS 添加による蛍光強度の変化

Bacteriophage ϕX174 recognizes LPS as a receptor and infects. Two types of spike proteins called G and H are involved in host recognition, the C-terminal domain (Met^{198}~Lys^{328}) of H protein is thought to play an important role in host selection. Because of resistance to V8 protease, it is expected to form a domain. Although CD spectrum has shown that it forms α-helix, its 3D-structure and binding site to LPS have not been fully elucidated. In this study, we aimed to clarify the binding ability with LPS and the host selectivity of the C-terminal domain. The C-terminal domain was prepared as a His-tagged fusion protein by genetic engineering. The interaction with LPS was analyzed by observing the fluorescence change of Trp residues. The C-terminal domain binds with LPS by hydrophobic interaction to increase fluorescence intensity. Affinity of host strains LPS are stronger than that of non-host *E. coli* K-12 strain LPS. Therefore, the C-terminal domain is involved in host selection, recognizing a lipid part as well as saccharide part of LPS (Fig.1).

φX174, spike protein, lipopolysaccharide

講演番号：4D07-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

サンゴ由来レクチンの C 末端領域がウサギ赤血球に対する反応に与える影響の解明

Elucidation of the effect of C-terminal region of the coral lectin for the reaction to the rabbit erythrocyte

○郷田 秀一郎[1,2]、上村 亮介[1]、古賀 萌子[1]、外山 諒[1]、海野 英昭[1]、畠山 智充[1] ([1]長崎大院工、[2]創価大糖鎖研)
○Shuichiro GODA[1,2], Ryosuke KAMIMURA[1], Moeko KOGA[1], Ryo TOYAMA[1], Hideaki UNNO[1], Tomomitsu HATAKEYAMA[1] ([1]Nagasaki Univ., [2]Soka Univ.)

サンゴの一種であるハイマツミドリイシ(*Acropora millepora*)の発生過程において、2 つの遺伝子(AML36, AML49)の発現レベルが上昇することが報告されている。この遺伝子がコードするタンパク質は、ナマコの一種であるグミ(*Cucumaria echinata*)由来溶血性レクチン CEL-III にアミノ酸配列相同性を示す。CEL-III は、ガラクトース/N-アセチルガラクトサミンに糖特異性を示し、ウサギ赤血球に対し溶血活性を示す。AML36 及び 49 の機能解明のため、大腸菌を宿主に用いて組換えタンパク質として生産し、赤血球との相互作用を解析した。AML36 及び 49 は His-tag 融合タンパク質として生産させところ、大腸菌体内で封入体として得られたため、変性剤による可溶化と巻き戻しを行った。得られたタンパク質をウサギ由来赤血球と混合させたところ、AML36 では赤血球凝集活性が確認され、AML49 では赤血球凝集、溶血ともに活性は確認されなかった。AML36, 49 は CEL-III に対して C 末端領域でアミノ酸鎖の延長が見られることから、C 末端の赤血球に対する活性への影響を解析した。そこで延長した C 末端を切除した変異体を作成し、活性測定を行った。その結果、C 末端を切除した AML36 変異体は、赤血球溶血活性を示した。これらのことから、C 末端部分が AML の機能に大きく影響を与えていると考えられた。

Two genes, AML36 and 49, derived from the coral, *Acropora millepora* have been reported that the expression levels of these genes increase while its development. The proteins show amino acid sequence homology to the hemolytic lectin from sea cucumber, *Cucumaria echinata*, CEL-III. CEL-III shows carbohydrate specificity to the galactose and GalNAc and have hemolytic activity to the rabbit erythrocyte. To elucidate the function of AML36 and 49, these proteins were produced as recombinant protein by using *Escherichia coli* as a host and activity for the rabbit erythrocyte was measured. These proteins were produced as inclusion body. Refolding was done after dissolved in detergent solution. AML36 showed the hemagglutination activity and AML49 showed no activity for the rabbit erythrocyte. Elongation of the amino acid sequence was seen in C-terminal region of AML36 and 49 compared to the amino acid sequence of CEL-III. To elucidate the effect of the C-terminal region of AMLs, deletion mutants were made for the AML36 and 49. C-terminal deletion mutant of AML36 showed the hemolytic activity. These results indicated that the C-terminal region of AML36 play an important role in hemagglutination and hemolytic activity.

lectin, hemagglutination, hemolytic

発表責任者：郷田秀一郎（goda@soka.ac.jp）

講演番号：4D07-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

イネ細胞質翻訳系の部分再構成による eEF1A および eEF2 の GTP 再生機構の解析

Analysis of GTP regeneration in elongation factors by partial reconstitution of the rice cytoplasmic translation system

○鈴木 翔、鈴木 丈瑠、戸澤 譲（埼玉大学院理工）
○Kakeru SUZUKI, Takeru SUZUKI, Yuzuru TOZAWA (Saitama Univ.)

我々は，コムギの無細胞翻訳系のみならずイネカルス由来の無細胞翻訳系においても，GTP 無添加状態で高い翻訳活性が維持されることを確認した．この分子機構解明を目的として，我々はイネカルス細胞質のペプチド伸長反応を再構成し，eEF1A および eEF2 の活性と添加 GTP の関係を調査した．GTP 結合型の翻訳因子である eEF1A と eEF2 は，80S リボソームにおけるアミノ酸 1 分子の伸長に際し，それぞれ 1 分子の GTP を加水分解することで機能を果たす．GDP 型の各因子は，GDP の乖離と遊離 GTP との新たな結合により GTP 型へ再生されると考えられてきたが，解析の結果，再構成系でのペプチド伸長は eEF1A の GDP/GTP 交換因子とされている eEF1B 非依存的に進行することを見い出した．さらに eEF1B 無添加条件下においては，GTP 無添加状態でもペプチド伸長活性を維持することを確認できた．これらの結果より，イネ細胞質翻訳系は遊離 GTP との交換反応によらない GTP 再生機構を有することを確認した. 新奇 GTP 再生のメカニズムについては現在解析を進めており，本講演では最新の解析結果も含めて紹介したい.

We have found that cell-free translation systems of wheat and rice maintain translational activities without supplementation of free GTP. To elucidate the molecular mechanism of this puzzling phenomenon, we reconstituted the rice peptide elongation reaction and investigated the relationship among the functions of eEF1A, eEF2 and GTP. The GTP-binding translation factors, eEF1A and eEF2, are known to hydrolyze one GTP molecule each during the elongation of a single amino acid in the 80S ribosome. It has been believed that each GDP-formed factor is regenerated to the GTP-form by exchanging GDP with free GTP. Here we found that peptide elongation in the reconstituted system undergoes without eEF1B, a GDP/GTP exchange factor of eEF1A.

Furthermore, under the condition of lacking eEF1B, the activity was maintained even without GTP. These results suggest that the rice cytoplasmic translation system has a mechanism of GTP regeneration independent from the exchange reaction with free GTP. We will present the latest results obtained from the ongoing experiments to clarify the mechanism of the unknown GTP regeneration.

protein synthesis, translation elongation factor, GTPase

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4D07-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

Comprehensive analysis of transglutaminase substrate preference by cDNA display

○Jasmina DAMNJANOVIC[1], Moeri Nezu[1], Beixi Jia[1], Nana Odake[1], Kiyotaka Hitomi[1], Takaaki Kojima[1], Naoto Nemoto[2], Hideo Nakano[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Saitama Univ.)

cDNA display is an *in vitro* display technology based on a covalent linkage between a protein and its corresponding mRNA/cDNA, where a stable complex is formed suitable for a wide range of selection conditions. A great advantage of cDNA display is its capacity to handle libraries of great size (10^{12}) in a microtube scale, in a matter of days. To harness its benefits, we previously developed a cDNA display platform coupled with high-throughput and accuracy of next-generation sequencing (NGS) for the selection of preferred substrate peptides of transglutaminase 2, a protein cross-linking enzyme. Screening and selection of four-amino-acid library randomized at positions -1, +1, +2, and +3 from the glutamine residue, followed by bioinformatics analysis of the selected sequences and *in vitro* peptide evaluation revealed the comprehensive amino acid preference of the TG2 at targeted positions of the peptide backbone. In the following, we applied the same platform to study the substrate preference of transglutaminase 1 (TG1) and microbial transglutaminase (MTG). As a template for peptide library generation, we used K5 and M48 peptides, substrates of the two TGs respectively. We prepared libraries with 5 or 6 randomized amino acid residues as well as single mutant libraries, where each residue has been separately randomized. Here, we will report on the current results of the library preparation and screening.

cDNA display, transglutaminase, substrate profiling

発表責任者：Jasmina Damnjanovic（jasmina@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4D07-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

ウミウシの体を彩る新規な水溶性色素タンパク質の同定

Identification of novel aqueous carotenoproteins involve in the body coloration of nudibranchs.

○江口 知輝[1]、志波 優[2]、高市 真一[2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Kazuki Eguchi[1], Yuh Shiwa[2], Shinich Takaich[2], Shinji Kawasaki[1,2] ([1]TUA Bio., [2]TUA microbiol.)

【目的】ウミウシは種ごとに鮮やかな色調を示すが、その体色形成の分子メカニズムは報告例に乏しい。我々は水溶性のカロテノイド結合タンパク質の生物分布を調査しており [1)]、その過程でウミウシの体色形成に本タンパク質の関与が示唆された。本学会では *Chromodoris* 属の 2 種のウミウシについて、その体色形成に関与する新規なタンパク質の同定に成功したので報告する。
【方法】*Chromodoris* 属の 2 種のウミウシについて、個体間で異なる色彩について調査した。ウミウシを色調の異なる部位ごとに分離し、クロマトグラフィーの手法にて色素タンパク質の精製を試みた。結合色素は HPLC, MS により同定した。SDS-PAGE から得られた単一バンドから N 末端アミノ酸配列を取得し、cDNA ライブラリーと照合してタンパク質の一次構造を決定した。
【結果】2 種のウミウシから色調が異なる数種類の水溶性色素タンパク質の精製に成功した。色素タンパク質に結合するカロテノイド分子を同定し、その吸収スペクトルを比較すると、タンパク質との結合に伴う最大 21 nm の長波長シフトが観察された。以上から、ウミウシの多様な体色形成に本タンパク質群の関与が強く示唆された。
[1)]Kawasaki et al. *Plant Cell Physiology* 54:1024-1040 (2013).

Nudibranchs show colorful body colors; however, the molecular mechanisms of coloration remain largely unknown. During our investigation of water-soluble carotenoid binding proteins in organisms, novel proteins were identified in nudibranchs species. In this conference, we report the purification of novel proteins from two species of the genus *Chromodoris*.

The body of the nudibranchs was separated based on the section of body color. We purified proteins of different colors through column chromatographies. Binding pigments were identified by HPLC and MS. The primary structure of the proteins was determined based on the N-terminal amino acid sequences with cDNA library information.

The purified proteins bound carotenoids. These carotenoids showed color shift up to 21 nm by binding proteins. These results suggested the involvement of the carotenoproteins in the body coloration of nudibranchs.

Carotenoid, nudibranch, carotenoid-binding protein

発表責任者：川崎 信治（kawashin@nodai.ac.jp）

講演番号：4D07-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

PD-L1 親和性フィブロネクチンドメイン変異体の創出

Development of fibronectin domain mutant with PD-L1-binding activity

○牧野 祥嗣、伊藤 伸哉、金井 保（富山県大工）
○Yoshihide MAKINO, Nobuya Itoh, Tamotsu Kanai (Toyama Pref. Univ.)

近年、次世代医薬品等に応用可能な、抗体等でないタンパク質骨格をもとにしたリガンド親和性変異体の創出技術開発が進められている。ここで我々は、免疫チェックポイント分子である PD-L1 へ親和性を持つタンパク質変異体の開発について検討したので、報告する。10th ヒトフィブロネクチン Type III ドメイン（10FnIII）の 2 つのループ構造部位をランダムなアミノ酸配列に置換したもの、および他の 4 種類の骨格構造をもとにしたランダムライブラリをそれぞれ合成し、これらの混合遺伝子ライブラリを調製した。その後、リボソームディスプレー法により複数回の PD-L1 親和性選択を行った。選択されたライブラリから骨格構造部分の遺伝子をモノクローン化して、ELISA により親和性アッセイを行ったところ、PD-L1 に対して比較的特異的に結合する活性が認められた。また、遺伝子配列解析の結果、10FnIII の濃縮と、ループ部分の特定アミノ酸配列への収束が確認された。選択手順や観察された活性、配列の詳細と今後の展望について議論する。

Engineered affinity proteins using non-antibody scaffolds are promised as a next-generation biopharmaceutical. We have developed scaffold protein mutants with an affinity for the immune checkpoint molecule PD-L1. A library was constructed in which two loops of the 10th human fibronectin Type III domain (10FnIII) were replaced with random amino acid sequences. Other libraries were also constructed by random amino acid replacement on four distinctive scaffolds. Clones with affinity to PD-L1 were selected by using the ribosome display method from the mixture of the above five libraries. Monoclones were prepared from the selected libraries, and their affinity was evaluated by ELISA, which showed PD-L1 binding activity. Sequence analysis showed the enrichment of 10FnIII sequences and convergence of amino acid sequence at the loop region. The selection procedure, observed activity, sequence details, and future perspectives will be discussed.

PD-L1, protein engineering, ribosome display

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4D07-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム D

マガキ由来マンノース特異的レクチン CGL1 のマンノースオリゴ糖鎖認識機構

Mannose-oligosaccharide recognition mechanism of the mannose-specific lectin CGL1 from the oyster *Crassostrea gigas*

○工藤 瑞希、秋吉 雅弘、増田 一喜、海野 英昭、畠山 智充（長崎大工）
○Mizuki Kudo, Masahiro Akiyoshi, Kazuki Masuda, Hideaki Unno, Tomomitsu Hatakeyama (Nagasaki Univ.)

糖結合タンパク質であるレクチンは，生体内の様々な細胞間相互作用や分子認識などに関与していることが知られている。特に哺乳類血清中に広く存在するマンノース結合レクチンは，外来異物表面のマンノース糖鎖に結合することにより生体防御において重要な役割を果たしていることが知られている。我々はこれまでに二枚貝類のマガキ（*Crassostrea gigas*）からマンノース特異的レクチン CGL1 を見出したが，このレクチンはショウジョウバエを始めさまざまな無脊椎動物における自然免疫に重要な役割を果たす DM9 ドメインタンパク質の一種であることが明らかになった。今回，酵母マンナンを限定加水分解することにより調製したマンノースオリゴ糖と CGL1 との複合体構造を X 線結晶構造解析することにより，CGL1 のマンノースオリゴ糖との結合様式を調べた。その結果，CGL1 の糖結合部位は比較的小さく，マンノースオリゴ糖の非還元末端及び 2 番目のマンノース残基を主に認識することがわかったが，Manα1-2Manα1-2Manα1-6Man という構造をもつマンノース四糖（Man_4）については，非還元末端と還元末端の両方に 2 つの CGL1 分子が結合した架橋構造により強く結合することが明らかになった。このように CGL1 が Man_4 を強く結合することは，マンノース含有デンドリマーを用いた先行研究により得られた結果と一致しており，マガキの外来微生物糖鎖認識に深く関係するものと思われる。

Lectins are involved in various cell-cell interactions and molecular recognition processes in organisms. We have previously purified a mannose-specific lectin CGL1 from the bivalve pacific oyster (*Crassostrea gigas*). This lectin belongs to the DM9 domain protein family that is suggested to play important roles in innate immunity in various invertebrates, including *Drosophila melanogaster*. In this study, we have determined structures of CGL1 complexed with oligomannose chains from yeast mannan by X-ray crystallographic analysis. The results indicated that the sugar-binding sites of CGL1 are relatively small and mainly recognize the non-reducing end and the second mannose residue of the oligomannose chains. Interestingly, the mannose tetrasaccharide (Man_4) with a structure of Manα1-2Manα1-2Manα1-6Man was found to form a crosslinked structure in which two CGL1 molecules are bound to both the non-reducing end and the reducing end. This is consistent with our previous results that indicated Man_4 strongly binds to CGL1, and probably closely related to the recognition mode of foreign microbial sugar chains by CGL1.

lectin, mannose, X-ray crystallographic analysis

講演番号：4D09-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

RNA 発現プロファイルデータと深層学習を用いた老化に関する研究

Research on aging using RNA expression profile data and deep learning

○長谷川 平[1]、金 相完[2]、濱田 浩幸[3]、田代 康介[1,2] ([1]九大院・システム生命、[2]九大院・生物資源環境、[3]九大院・農学研究院)
○Taira Hasegawa[1], Sangwan Kim[2], Hiroyuki Hamada[3], Kosuke Tashiro[1,2] ([1]Kyushu Univ.SLS, [2]Kyushu Univ.Molecular Gene Technics, [3]Kyushu Univ.Synthetic Biology Lab)

運動機能や免疫機能は年齢を重ねるにつれて低下する傾向にある。しかし、全ての人で同様に年齢に比例して身体機能が低下するわけではなく、個人によって加齢スピードは異なる。そのため、時間に付随する年齢と相異なる生理学的年齢の予測は加齢に伴う身体機能の変化の理解や予防に役立つ。しかし、老化のメカニズムは未解明の部分が多く、生理学的年齢を測定する方法もわかっていない。そこで､膨大な蓄積をもつRNAプロファイルを利用し機械学習を通して生理学的年齢の予測を試みた。

Gene Expression Omnibus データベースから、個体週齢が明記されたマウス骨格筋の RNA プロファイルを抽出し、機械学習を試みた。データベース上の RNA 発現プロファイルは、データそれぞれで実験手法や環境や系統が異なることから､それらのデータを統合して使用する例が少なかった｡本研究は、抽出データを共通する遺伝子の情報のみを抜き出すことで統合し、次元圧縮法と畳み込みニューラルネットワークを組み合わせることで、プロファイルから年齢を予測するパイプラインを作成した。

構築したパイプラインは、若年のデータを取り除くことで、高い精度で年齢を予測することができた。この結果は、データベースの統合データが年齢による変化を内包する可能性を示唆した。今後はデータ数を増やすことによって、より高い精度で生理学的年齢を予測できると考えている。

Physical motor function and immune function tend to decline as aging. However, bodily functions do not decline in proportion to age in the same way in all people. Therefore, prediction of physiological age, which is different from age associated with time, is useful for understanding and preventing changes in physical functions associated with aging. In this study, we attempted to predict physiological age through machine learning using a vast amount of accumulated RNA expression profile data.

We extracted RNA profiles of mouse skeletal muscle from the Gene Expression Omnibus database. We integrated the extracted data by extracting only the information of common genes, and created a pipeline for predicting age from profiles by combining the dimension compression method and the convolutional neural network. The pipeline was able to predict age with precision when young age data were removed. This result suggested that the integrated data in the database may contain age related changes. In the future, we are considering an experiment in which the number of data is scaled up.

Transcriptome, senescence, Machine Learning

発表責任者：長谷川平（taiira@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D09-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

コムギ無細胞系を用いた網羅的プロテインアレイの確立

Establishment of a comprehensive protein array using a wheat cell-free system

○中北 智哉[1,2]、竹田 浩之[2] ([1]明大農、[2]愛大 PROS)
○Tomoya NAKAGITA[1,2], Hiroyuki TAKEDA[2] ([1]Meiji Univ., [2]Ehime Univ.)

コムギ無細胞系によるタンパク質合成は省スペース、かつ迅速にタンパク質を合成することが可能であることを特徴とする。我々はこの特徴を生かして 384well プレート各 well に異なるタンパク質を合成させたプロテインアレイを作製し、新たなタンパク質-タンパク質相互作用の検出ツールを確立したため報告する。まず、N 末端に FLAG 配列を付加したタンパク質の遺伝子を無細胞系ベクターpEU に乗せたコンストラクトの作製をかずさ DNA 研究所に依頼した。得られた遺伝子を上流のプロモーター配列から PCR により増幅した後、SP6 RNA transcriptase により転写し、次いでコムギ抽出液 WEPRO7240 によって合成した。最後に、タンパク質の発現は western blotting により確認した。一方、相互作用を探索したいターゲットタンパク質の C 末端に、ビオチン化酵素 BirA を用いることでビオチン化が可能となる配列 Avi-tag を有するコンストラクトを構築し、同様に合成した。プロテインアレイ側の FLAG 配列、ターゲットタンパク質側の biotin を利用して α-screen によりタンパク質-タンパク質相互作用の有無を網羅的に判定した。その結果いくつかの実施例で特異的な相互作用を同定することに成功した（*Nishiyama et al., 2021*）、(Segawa et al., 2021)。

Protein synthesis by wheat cell-free system is characterized by space-saving and rapid synthesis. We report here a new tool for the detection of protein-protein interactions by creating protein arrays in which different proteins are synthesized in each well of the 384-well plates. First, we asked Kazusa DNA Research Institute to prepare a construct in which a protein gene with a FLAG sequence added to its N-terminus was inserted in the cell-free vector pEU. The obtained genes were amplified by PCR from the upstream promoter sequence, transcribed by SP6 RNA transcriptase, and then synthesized by wheat extract WEPRO7240. Finally, protein expression was confirmed by western blotting. On the other hand, the construct with the Avi-tag, which enables biotinylation using the biotinylating enzyme BirA at the C-terminus of the target proteins to be explored for interaction, were constructed and synthesized in the same way. The FLAG sequences on the protein array side and biotins on the target protein side were used to comprehensively determine the presence of protein-protein interaction by α-screen. As a result, we succeeded in identifying specific interactions in some cases (Nishiyama et al., 2021), (Segawa et al., 2021).

wheat cell-free system, protein array, α-screen

発表責任者：中北智哉（t_nakagita@meiji.ac.jp）

講演番号：4D09-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

環境中の希少種の検出を可能とする 16S メタゲノム-DRIP 法

A Simple Method for Detecting Minority Species in the Environment: 16S Metagenome-DRIP

○中島 有登[1]、後藤 愛那[1]、加藤 紀彦[1]、尾島 望美[1]、阪中 幹祥[1]、吉田 圭佑[2]、小田巻 俊孝[2]、片山 高嶺[1]（[1]京都大学 大学院生命科学研究科、[2]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所）
○ Aruto NAKAJIMA[1], Aina GOTOH[1], Toshihiko KATOH[1], Miriam N. OJIMA[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Keisuke YOSHIDA[2], Toshitaka ODAMAKI[2], Takane KATAYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ., [2]Next Generation Science Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

環境中における細菌叢構成の把握のためには 16S rRNA 遺伝子アンプリコンを次世代シーケンサー（NGS）で解析する 16S メタゲノム解析が一般に用いられている。しかしながら、腸内や土壌には 10^{13}/g を超える細菌が存在するため、解析可能なリード数が最大でも 10^{10} リード程度である現在の NGS では、それらの菌叢について存在比が低い希少種を含めて網羅的に解析することは困難であると言える。また、環境によっては特定の細菌が寡占状態として存在しており、そのような場合にも希少種を検出することは困難であると考えられる。しかしながら近年、希少種（キーストーン種）が菌叢形成全体に影響を及ぼすことが報告されており、16S メタゲノム解析において如何に効率良く希少種を検出可能とするかが今後の菌叢解析における重要課題とされてきた。本研究では、菌叢における希少種由来のアンプリコンの検出頻度を上昇させる新たな手法（16S metagenome-DRIP）の開発を試みたので報告する。

16S metagenome sequencing using the next generation sequencer (NGS) has been widely used for analyzing microbiotas in the environment. However, considering that the number of bacterial cells exceeds 10^{13}/g in stool and soil samples, while the maximum number of reads obtained via NGS is about 10^{10} in one run, it is difficult to precisely grasp the whole bacterial community composition. Recent studies show that minority species within a bacterial community can act as keystone species that significantly influence microbiota composition, thereby affecting microbe-microbe interactions and ultimately microbiota function. Therefore, the development of a methodology for detecting minority species has been needed. Here, we report a simple method for detecting minority species in environmental samples: 16S metagenome-DRIP.

metagenomics, minority species

発表責任者：片山高嶺（katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D09-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

mito-base editor システムの確立と酵母ミトコンドリア DNA の機能獲得型変異の同定

Establishment of mito-base editor system and identification of a gain of function mutation in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*

○黒田 浩一、天井 貴光、山本 凌大、滝本 廉、佐藤 源気、饗庭 亘、押村 のどか、植田 充美（京大院・農・応用生命）
○Kouichi KURODA, Takamitsu AMAI, Ryota YAMAMOTO, Ren TAKIMOTO, Genki SATO, Wataru AIBA, Nodoka OSHIMURA, Mitsuyoshi UEDA (Kyoto Univ.)

【背景】ミトコンドリアは真核細胞内のエネルギー生産や代謝において重要な役割を果たし、核とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA)を有する。しかし、mtDNA を網羅的に編集する技術は確立できておらず、mtDNA 上の遺伝子改変や機能解析はゲノム DNA と比べて大きく遅れている。また、mtDNA の突然変異は重篤な疾患を引き起こすため、mtDNA 編集技術の確立は mtDNA の基礎研究だけでなく医療分野での有用性も期待される。我々はこれまでに出芽酵母の mtDNA を特異的に切断し、mtDNA 欠失株を作製してきた [1]。本研究では mtDNA の標的配列に対する設計が容易で、網羅的編集を可能とする「mito-base editor」システムを確立し、機能獲得型変異の同定を試みた。
【方法と結果】ニッカーゼ Cas9 の N 末端にミトコンドリア輸送シグナル、C 末端に *Sea lamprey* 由来のシチジンデアミナーゼ (PmCDA1)を融合させたタンパク質を発現し、ミトコンドリアへの局在を確認した。加えて mtDNA の G-C 塩基対が多く存在する配列を標的とした gRNA を発現させることで実際に mtDNA の塩基編集が検出された。さらに、mtDNA にコードされる 21S rRNA を標的として、57 種の gRNA から構成される gRNA ライブラリーを作製し、様々な部位における塩基編集を行った。gRNA ライブラリーを導入した形質転換体の中から、エリスロマイシン耐性を示す酵母株が得られ、mtDNA の塩基配列を調べたところ、これまでに報告の無い新規の機能獲得型変異を同定した[2]。

Mitochondria play an important role in energy production and metabolism, and has a mitochondrial DNA (mtDNA). The technology for comprehensively editing mtDNA has not been established, leading to little progress in gene modification and functional analysis of mtDNA. We have deleted mtDNA in budding yeast by the cleavage of mtDNA [1]. In this study, we attempted to establish “mito-base editor” system that is easy to design for a target sequence and enables comprehensive editing of mtDNA. Mitochondrial targeting signal and cytidine deaminase from *Sea lamprey* (PmCDA1) were fused to N- and C-terminal of nickase Cas9, respectively. In addition, a gRNA library consisting of 57 kinds of gRNA targeting for 21S rRNA in mtDNA was expressed. As a result, the yeast strains showing improved erythromycin tolerance were acquired. The sequencing of mtDNA in the isolated yeast strains identified a novel gain of function mutation [2].

[1] Amai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85: 895-901 (2021), [2] Amai *et al*. submitted.

Mitochondrial DNA, Base editing, Erythromycin tolerance

発表責任者：黒田浩一（kuroda.kouichi.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D09-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

出芽酵母における donor DNA/gRNA ハイブリッドを用いた効率的なゲノム編集戦略

Efficient genome editing strategy using donor DNA/gRNA hybrid in *Saccharomyces cerevisiae*

○饗庭 亘、天井 貴光、植田 充美、黒田 浩一（京大院農）
○Wataru AIBA, Takamitsu AMAI, Mitsuyoshi UEDA, Kouichi KURODA (Kyoto Univ.)

【背景】CRISPR/Cas9 システムは、多くの真核細胞でゲノム編集を行うためのツールであり、標的配列を特異的に認識する gRNA と、二本鎖切断を誘発する Cas9 タンパク質が用いられる。切断部位の近くに donor DNA が運ばれてくると、相同組換えによる正確なゲノム編集が可能になる。そのため、編集効率を高めるためには、切断部位の近くに donor DNA を効率的に導入することが有効な戦略となる。本研究では、donor DNA と gRNA を 1 つに結合した donor DNA/gRNA ハイブリッドとすることで、*Saccharomyces cerevisiae* における効率的かつ簡便なゲノム編集技術の確立を試みた。
【方法と結果】gRNA の 5'末端を延長し、donor DNA 配列に相補的な 40 塩基の配列が連結したものを *in vitro* 転写により合成した。このユニークな gRNA と donor DNA を混合し、donor DNA/gRNA ハイブリッドの形成を Native-PAGE により評価したところ、80%以上の形成効率を示した。次に Cas9 発現プラスミドを保持した *S. cerevisiae* に donor DNA/gRNA ハイブリッドを導入し、*CAN1* 遺伝子を標的としたゲノム編集を行った。その結果、donor DNA/gRNA ハイブリッドを用いることで、gRNA とドナーDNA を別個に作用させる従来の方法と比べて、約 20%高い効率で編集することに成功した [1]。

The CRISPR/Cas9 system is a tool for eukaryotic genome editing, and consists of a gRNA and a Cas9 protein to induce double-strand breaks in targeted sequences. Recruitment of a donor DNA near the cleavage site enables precise genome editing via homologous recombination. Therefore, efficient recruitment of a donor DNA near the cleavage site is an effective strategy to promote genome editing efficiency. In this study, we attempted to achieve an efficient and convenient genome editing in *Saccharomyces cerevisiae* by combining a donor DNA and a gRNA into a single component. The gRNA, whose 5' end was extended by connecting to a 40-base sequence complementary to the donor DNA, was synthesized by *in vitro* transcription. This unique gRNA was hybridized to the donor DNA and the hybrid formation was evaluated by Native-PAGE, showing the hybridization efficiency of more than 80%. This donor DNA/gRNA hybrid was introduced into *S. cerevisiae* harboring a plasmid expressing Cas9 for editing *CAN1* gene. As a result, we succeeded in editing with about 20% higher efficiency compared to the conventional method in which gRNA and donor DNA work as two separate components by using the donor DNA/gRNA hybrid [1].

[1] Aiba *et al*. submitted.

CRISPR/Cas9, genome editing, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：饗庭亘（aiba.wataru.57w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D09-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

自家蛍光シグネチャーに基づくマウス卵子の評価

Autofluorescence signature based evaluation of mouse egg

○原 克樹[1]、岡野 千草[2]、高部 響介[2]、高島 友弥[3]、福島 彩乃[3]、藤丸 翼[3]、廣木 亜由美[2]、松浦 鈴子[2]、野村 暢彦[2,4]、尾畑 やよい[3]、八幡 穣[2,4] ([1]筑波大・生命環境学群、[2]筑波大・生命環境、[3]東農大・生命科学、[4]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター)

○Katsuki Hara[1], Chigusa Okano[2], Kyosuke Takabe[2], Tomoya Takashima[3], Ayano Hukushima[3], Tsubasa Hujimaru[3], Ayumi Hiroki[2], Reiko Matsuura[2], Nobuhiko Nomura[2,4], Yayoi Obata[3], Yutaka Yawata[2,4] ([1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Faculty of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, [4]Microbiology research Center for Sustainability, University of Tsukuba)

卵子は生殖細胞の一つで、次世代の胚に遺伝情報、細胞小器官、母性因子などを継承する。しかし次世代の個体を算出できる”インテグリティの高い”卵子の特徴の多くは不明である。なぜなら技術的にインテグリティの高い卵子がどれかを特定(予見)することが困難だったためだ。具体的には従来の細胞評価技術の多くは細胞を破壊するため、卵子の中身を調べた後に卵子が発生するかどうかを調べられなかった。そこで本研究は卵子のインテグリティを高い性能で予見することを目指し、様々な条件で育てた卵子やそこから生まれた胚の“自家蛍光シグネチャー”を取得し、機械学習によるインテグリティの予見を試験した。細胞内のタンパク質や代謝産物は様々な種類・強弱の自家蛍光を発しており、それらを総合した自家蛍光シグネチャーは細胞の種類を表現する“指紋”として機能する。我々は近年自家蛍光シグネチャーを取得する CRIF 法 (confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence signature analysis)を開発してきた。CRIF 法は共焦点顕微鏡を用いた 3D スキャンと画像解析からなり、細胞を破壊せずに細胞の生理状態をラベル付けできる。本発表ではこれまで得られたマウスの卵子の自家蛍光シグネチャーの特徴と機械学習によるインテグリティの予見の現状を紹介したい。

Eggs inherit genes, organelle and maternal factors to embryos. An integrity, or the capability of egg to develop, is different for each egg. However, the physiological features of superior eggs still mostly remain elusive due to technical difficulty to predict the superior eggs before developmental stages. Conventional cell evaluations often include breakage of cells. These techniques thus could not track the integrity of eggs. In this study, we obtained the autofluorescence signatures (AF) of eggs and embryos under various growth conditions, and tested prediction of integrity by machine learning of AF. Biomolecules such as proteins and metabolites emit autofluorescence with various wavelength and intensities. The AF thus performs as a fingerprint of physiological state of cells. We recently established the confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence signature analysis (CRIF) which extracts AF. The CRIF consists of two parts: 3D scanning of cells with a confocal microscopy and image analysis. The CRIF thus can label the physiological state of cells in non-invasive manner. We will introduce the features of AFs of eggs and embryos of mouse and current status of prediction of integrity with a machine learning.

autofluorescence, oocyte, non-invasive analysis

発表責任者：八幡 穣（yawata.yutaka.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4D09-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

Aptamer-based Detection of DENV NS1 Protein by Competitive Aptamer Duplex Formation Utilizing 3D-nanoassembly Gold Nanoparticle as Nanocarrier

○Indra Memdi Khoris[1], Nasrin Fahmida[2], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

INTRODUCTION

In recent decades, the development of the aptamer as the biorecognition probe has been put in the spotlight and highly demanded because of highly public concern of virus infection. However, the lack of a signal amplification method hinders the progress of aptamer-based biosensors (aptasensor). Several aptasensor has been developed based on various platforms depending on the signal transducer. Underlying the advantages and drawbacks of the existing approach of virus biosensors, the combination of the signal generation provides complementary information. Hence, colorimetric and electrochemical principles are used in this work to fabricate a highly sensitive and straightforward early-stage diagnostic platform of dengue virus NS1 protein (DENV-NS1). Unlike others, this DENV-NS1 is accumulated in only the early stage of the DENV infection, which is suitable for showcasing the developed biosensor's performance.

METHODS

This work utilized aptamers-conjugated gold nanoparticles (AuNPs) to advance the conventional aptasensor. Simple conjugation of the aptamers to AuNPs is based on the general streptavidin-biotin binding for anti-DENV-NS1 aptamer (NA_1) forming AuNPs-NA_1 and thiol-Au affinity reaction for the complementary NA_1 aptamer (NA_2) forming AuNPs-NA_2. For the DENV-NS1 detection, the target analyte mixed with AuNPs-NA_1. Afterward, AuNPs-NA_2 was added to the mixture. The visual color is observed for colorimetric detection, and the absorbance is measured. The mixture of AuNPs-NA_1/DENV-NS1 or AuNPs-NA_2 is added into methylene blue (MB) solution. AuNPs-aptamer will intercalate the MB, and the complex will be deposited on the NA_2-conjugated disposable gold electrode (DGE). Similarly, the AuNPs-NA_1 will conjugate to the electrode via NA_1-NA_2 complementary sequence, forming captured sandwich formation. The differential pulse voltammetry (DPV) analysis is conducted to measure the MB oxidation peak as the electrochemical detection signal.

RESULT

The developed aptamer-based biosensor showed highly sensitive detection with colorimetric down to 1.83 pg/mL, which is 68-fold amplification compared to the single-aptamer-based biosensor. The electrochemical principle could increase the sensitivity limit to 0.03 pg/mL of DENV-NS1 protein with good selectivity. Further, it is based on the competitive sandwich formation based on the complementary sequence of the viral-specific aptamer. The developed biosensor could be utilized universally in aptamer-based detection.

Aptamer biosensor, Dengue Virus NS1, Colorimetric Electrochemical

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4D09-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

麹菌によるアルカリホスファターゼの高分泌発現

Efficient secretory expression of recombinant alkaline phosphatases in *Aspergillus sojae*

○石川 隼也、一柳 敦、五味 恵子（キッコーマン株式会社）
○Junya Ishikawa, Atsushi Ichiyanagi, Keiko Gomi (Kikkoman Corp.)

標識酵素等に利用されるウシ小腸由来アルカリホスファターゼ（bIAP）は、培養細胞や酵母を宿主とした組換え発現によって生産できることが報告されている。しかし、培養細胞発現系は培養コストが高く、また、酵母発現系ではハイパーグリコシレーションにより N 型糖鎖が過剰に修飾されるという課題があった。これらの課題の解決に向けて、今回我々は麹菌 *Aspergillus sojae* を宿主として組換え bIAP（rbIAP）の分泌発現を行い、得られた麹菌発現 bIAP の酵素特性を評価した。

麹菌で分泌発現させるために bIAP の N 末端分泌シグナル、及び C 末端 GPI アンカー領域を改変・除去し、その遺伝子を麹菌にコドン最適化した。改変された *bIAP* 遺伝子は *pyrG*（オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子）を選択マーカーとした遺伝子導入法により *A. sojae* 株に多コピー導入された。bIAP 発現麹菌株を液体培養して得られた bIAP は天然物由来 bIAP と同等以上の比活性を有し、酵母発現 bIAP よりも糖鎖修飾が少なく、標識酵素として優れた特性を有していることが分かった。

It has been reported that bovine intestine alkaline phosphatases (bIAP) used as a reporter enzyme can be produced by recombinant expression using cultured cells or yeasts as an expression host. However, the cost of the cultured cell expression system is still high, and the yeast expression system has a problem that recombinant proteins are modified with a lot of mannose at the N-linked glycosylation site, a process known as hyperglycosylation. To solve these problems, we have constructed an *Aspergillus sojae* strain expressing recombinant bIAP (rbIAP) and evaluated the resulting protein.

A secretory signal at the N-terminus and a GPI anchor sequence at the C-terminus of the bIAP was modified and removed, respectively, and the constructs of these modified *bIAP* genes were codon-optimized for efficient secretory expression in the *A. sojae*. A rbIAP-expressing *A. sojae* strain was obtained by a method in which multiple copies of recombinant genes can be inserted into the host genome using a selection marker, pyrG (orothidine 5'-phosphate decarboxylase gene). The rbIAP purified from culture supernatant of the rbIAP-expressing *A.sojae* strain has a high specific activity comparative to that of the natural bIAP, less content of N-linked glycosylation than the yeast-expressed bIAP, and preferable properties as a labeling enzyme.

alkaline phosphatase, *Aspergillus*, recombinant expression

講演番号：4D09-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

効率的な In vitro 抗原提示機能を持つウイルス様粒子の開発

Development of virus-like particles with efficient in vitro antigen display function

○関口 智史[1]、徐 剣[2]、加藤 竜也[3]、朴 龍洙[3]([1]静大・総科技院、[2]中国華東師範大学・生命科学府・医学合成生物研究センター、[3]静大グリーン研)
○Tomofumi SEKIGUCHI[1], Jian XU[2], Tatsuya KATO[3], Enoch Y PARK[3] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Biomed. Synth. Biol. Res. Ctr., Sch. of Life Sci., East China Normal Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

ウイルス様粒子（VLP）は、ウイルスの遺伝物質を取り込むことなく、構造タンパク質から自己集合し粒子を組み立てる。さらにウイルス固有の抗原性を保持するため、VLP を用いたワクチンは、感染の危険性がなく、比較的安全である。また、VLP ワクチンは、細胞性免疫を向上させることが知られており、抗原タンパク質を表面に提示することで、さらに特異的抗体の誘導や反応を引き起こすことが期待できる。本研究では，カイコ発現系と SpyTag（ST)/SpyCatcher（SC)のイソペプチド結合反応を組み合わせて、制御可能な抗原提示 VLP プラットフォームを in vitro で構築することを目的とした。VLP マトリックスにはイヌパルボウイルス（CPV）のウイルス構造タンパク質 2（VP2）を、モデル抗原タンパク質には緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いた。さらに、提示量を合理的に向上させるために、VP2 の N-terminal、Loop1（S226-G227)、Loop2（T391-G392）の各領域における ST ドメインの設置部位を調整した。本研究では、すべての ST -VP2 および SC-GFP タンパク質をカイコの脂肪体から発現・精製した。VLP の形状は TEM で確認し、in vitro で VP2 にイソペプチド結合した GFP の提示は SDS-PAGE と immuno-TEM で確認した。これらの結果から、カイコ発現系から抗原提示型 CPV-LP プラットフォームの構築に成功した。今後は提示能と回収効率のさらなる改善を検討していく。

Virus-like particles (VLPs) vaccines assemble without incorporating genetic material. So, they are safe viral particles with no infectious risk. VLPs are also known to increase cellular immunity, and the presentation of another antigen proteins on the surface of VLPs can be expected to induce additional immunity. In this study, we aimed to construct a system that can control the presentation of antigenic proteins on VLP surfaces in vitro. The viral structural protein 2 (VP2) of Canine parvovirus was used as the VLP structure. The presentation of EGFP (antigen model protein) on the surface of CPV-LP; the SpyTag (ST)/SpyCatcher (SC) covalent binding system from the fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes was used. As a ST insertion site, we used the N' end and S226-G227, T391-G392 (CPV-LP surface loops) of VP2. These VP2 were expressed and purified in silkworm fat bodies. And the formation of CPV-LPs were confirmed. Furthermore, we attempted to present EGFP on the surface of CPV-LP by ligation reaction of SC-EGFP fusion protein with CPV-LP. The obtained CPV-LPs were confirmed by SDS-PAGE and immuno TEM, and we found that the antigen-presentation on CPV-LPs surface could be controlled.

Virus like-particle, SpyTag/SpyCatcher covalent bond, Bacmid - silkworm expression

講演番号：4D09-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム D

デジタルファブリケーションによるマイクロ流体デバイスの設計、および、細胞接着制御

Design of microfluidic devices by digital fabrication and control of cell adhesion

○太田 空良[1]、上野 裕太郎[1]、加藤 千寛[1]、鈴木 麻紘[1]、千田 洸弥[1]、二階堂 望[1]、本間 俊将[1]、高橋 泰輔[2]、小此木 孝仁[2]、山下 和彦[3]、戸谷 一英[1]([1]一関高専、[2](株)アイカムス・ラボ、[3]ヤエガキ醗酵技研(株))

○ Sora OHTA[1], Yutaro UENO[1], Chihiro KATO[1], Mahiro SUZUKI[1], Koya CHIDA[1], Nozomi NIKAIDO[1], Toshimasa HOMMA[1], Taisuke TAKAHASHI[2], Atsuhito OKONOGI[2], Kazuhiko YAMASHITA[3], Kazuhide TOTANI[1] ([1]Nation. Inst. Tech., Ichinoseki Coll., [2]ICOMES LAB Co.,Ltd., [3]YAEGAKI Biotechnology, Inc.)

【背景・目的】近年、EUでの動物実験代替法の成立を受け、マイクロ流路とヒト臓器細胞を有する臓器チップ（Organ-on-a-chip）の開発が進められている。一方、戸谷らは地域資源由来の廃棄物であるイカの中骨からβ-キチンナノファイバー（β-キチンNF）を製造する方法を確立し、β-キチンNFの細胞非接着性や、細胞外基質（ECM：コラーゲン、フィブロネクチン等）をβ-キチンNF上に重層することによる細胞接着性の回復を確認している。本研究では、機能性食品の評価を念頭に、地域資源とデジタルファブリケーション技術による独自性の高い臓器チッププラットフォームを作製することを目的とした。
【方法・結果】3D-CAD（Fusion 360）でマイクロ流路を設計し、3Dプリンタ（stratasys社製）で光硬化性樹脂によりマイクロ流路の型を造形した。この型にPDMSなどの樹脂を注型または射出成型し、マイクロ流路の上側を造形した。これを、β-キチンNFやECMを塗布したプラスチックに圧着することでマイクロ流路を作製した。この手法によりオーダーメイドの流路を迅速に造形することができた。流路にHeLa細胞などを灌流培養し、ポリスチレンディッシュでの静置培養と比較した。

Recently, following the passage of the Alternative Methods for Animal Experiments Act in the EU, the development of organ-on-a-chip that possess microfluidic channels and human organ cells has been promoted. On the other hand, β-chitin nanofiber (β-chitin NF) was produced by Totani *et al*. from a local resource as a squid pen and confirmed the cell non-adhesion. The aim of this study was to create a unique Organ-on-a-Chip platform using the local resources and digital fabrication technology to evaluate the immune activity of nanosized functional foods.

Mold of upper side of the microchannel was designed by 3D-CAD (Fusion 360) and formed by light-curing resin using a 3D printer (Stratasys Ltd.). The microchannel was formed by pouring or injection molding of PDMS or other resin into the mold. The microchannel was fabricated by crimping it onto plastic coated with β-chitin NF or ECM. This method allowed us to fabricate custom-made channels rapidly. Perfusion culture in the microchannel was compared with static culture in the polystyrene dish by culturing of HeLa cells and other cells.

organ-on-a-chip, β-chitin nanofiber, digital fabrication

発表責任者：戸谷一英（ktotani@ichinoseki.ac.jp）

講演番号：4E01-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

農薬原材料であるホスゲンの新規合成法開発

Development of a new synthetic method for phosgene, a raw material for pesticides

○森口 舞子[1]、高尾 希美[1]、淺原 時泰[1,2]、大久保 敬[2,3]、井上 豪[1,2]([1]阪大院薬、[2]阪大先導学際研、[3]阪大高等共創研)
○Maiko MORIGUCHI[1], Nozomi Takao[1], Haruyasu Asahara[1,2], Kei Okubo[2,3], Tsuyoshi Inoue[1,2]([1]Osaka Univ., [2]OTRI, Osaka Univ., [3]IACS, Osaka Univ.)

カルバモイルクロリドは様々な医・農薬品、樹脂材料などの出発原料として広く用いられている。アミンとホスゲンを原料とした調製法が簡便で一般的であるものの、ホスゲンは毒性が高いため使用が制限されていることから、トリホスゲンを代替試薬とした手法も用いられる。しかし、トリホスゲン自体の毒性も指摘されていることやコストの問題などから、より安全・安価な合成法の開発が求められている。

一方、最近我々は二酸化塩素（$ClO_2^{\cdot}$）に光照射を行うことによりメタンやポリプロピレンなどの C–H 結合を常温・常圧下にて酸化できる手法を報告している。ここで、クロロホルムに対し本酸化法を用いれば C–H 結合の開裂と酸素の付加が進行し、系中でのホスゲン発生が可能になると考えた。さらに、クロロホルムをホスゲン前駆体および溶媒として用いて、アミン共存下に二酸化塩素光酸化を行うことでカルバモイルクロリドの合成を試みた。アミン誘導体は UV 光照射下において不安定である場合が多いため、405 nm の可視光を用いることで、基質汎用性の拡大も目指した。発表では本反応の詳細と、種々のアミン誘導体との反応について併せて報告する。

Carbamoyl chlorides are an important class of commercially viable chemicals. These are useful intermediates in the preparation of pharmaceuticals, fine chemicals and resins. The most prevalent method for producing carbamoyl chlorides is phosgenation of amines, but the use of phosgene is restricted due to its high toxicity. On the other hand, recently we have reported a novel oxidation method based on photoactivation of chlorine dioxide. By using this method for the oxidation of chloroform, which is a solvent, we attempted the synthesis of carbamoyl chloride without phosgene as starting material.

phosgene, chloroform, photooxidation

講演番号：4E01-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

テトラヒドロフラン中リチウムとエチレンジアミンを用いたアンモニアフリーBirch 還元法の開発

Ammonia-Free Birch Reduction with Lithium and Ethylenediamine in Tetrahydrofuran

○加茂 翔伍[1,2]、Burrows James[1]、小出 和則[1] ([1]ピッツバーグ大、[2]星薬大)
○Shogo Kamo[1,2], James Burrows[1], Kazunori Koide[1] ([1]Univ. of Pittsburgh, [2]Hoshi Univ.)

Birch 還元は、安定なベンゼン環を 1,4-シクロヘキサジエンへと選択的に還元する特殊な反応である (図 1-A)[1]。他に代え難い反応である一方、毒性が高く取り扱いが難しい液体アンモニアを必要とする等の問題点から、有機合成の熟練者でさえも極力使用を避けてきた反応である。また Benkeser 還元は低級アミンを溶媒に用いた反応で、液体アンモニアを必要とせずに脱芳香族化を行えるが、通常、過剰還元が進行する (図 1-B)。その後、アンモニアを用いない還元法が数多く報告されてきたが、高価な試薬や特殊な装置を要する等の問題から、より安全かつ簡便で安価な手法が求められていた。

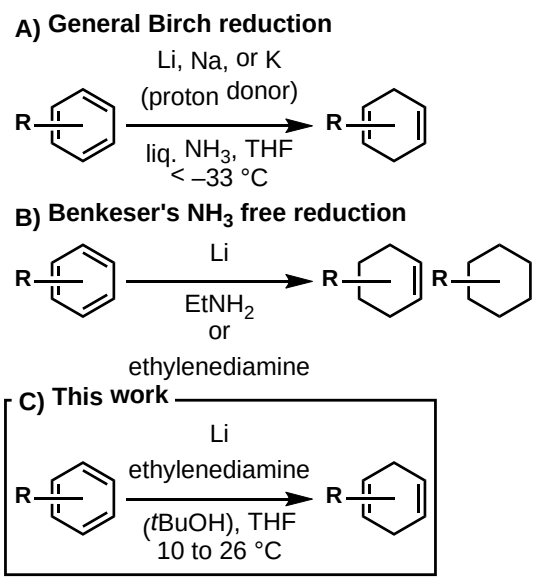


図 1. Birch 還元および関連反応

今回我々は、テトラヒドロフラン (THF) 中、リチウムとエチレンジアミンを用いることで、種々の芳香族化合物を 1,4-シクロヘキサジエン誘導体へと還元できることを見出した (図 3-C)[2]。本手法は、安息香酸などの電子不足な芳香環、アニソール誘導体などの電子豊富な芳香環、いずれに対しても良好な収率で生成物を与えた。またエチレンジアミン誘導体を用い、リガンド構造と反応性の関連性に関しても調査した。本発表では、これらの研究成果について詳細に報告する。

The Birch reduction dearomatizes arenes into 1,4-cyclohexadiene derivatives with alkali metal (Li, Na, or K) and highly toxic liquid ammonia at or below −33 °C, which requires specialized equipment and a lot of caution (Fig. 1-A). Benkeser's method replaces liquid ammonia to neat ethylamine or ethylenediamine, but provides a mixture of over-reduced products (Fig. 1-B). Recently, many improved methods that do not require liquid ammonia have been reported, but these methods still require expensive reagents and/or specialized equipment. Here, we will present concise and scalable Birch reduction using lithium and ethylenediamine in tetrahydrofuran (THF) (Fig. 1-C). This method is effective for both electron-rich and -deficient arenes without toxic ammonia, specialized equipment, or expensive additives.

Ref: 1) Birch, A. J. *J. Chem. Soc.* **1944**, 430. 2) Burrows, J.; Kamo, S.; Koide, K. *Science* **2021**, *374*, 741.

Birch reduction, dearomatization, ethylenediamine

講演番号：4E01-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

バラの重要香気成分である DAMASCENOLIDE の類縁体合成と香気特性（第 3 報）

Analog synthesis of DAMASCENOLIDE, an important aroma component of roses, and their aroma characteristics (Part 3)

○宮澤 和[1]、川口 賢二[1]、勝田 亮[2]、額田 恭郎[2]、石神 健[2]（[1]長谷川香料（株）、[2]東農大・生命）
○ Yamato MIYAZAWA[1], Kenji KAWAGUCHI[1], Ryo KATSUTA[2], Tomoo NUKADA[2], Ken ISHIGAMI[2] ([1]T. Hasegawa Co., Ltd., [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

我々はバラ (*Rosa*×*damascena*) の重要香気成分としてシトラス様香気を有する DAMASCENOLIDE [**1**, 登録商標, 長谷川香料株式会社, 4-(4-methylpent-3-en-1-yl)furan-2(5*H*)-one] を見出したことを報告している。これまでの研究により化合物 **1** は「バラに天然感を付与する効果」などを有する有用な香料化合物であることがわかっているが、より優れた香料化合物の開発を目的とし、化合物 **1** の類縁体に関する研究を行っている[1-4]。

2020 年、2021 年の年度大会にて計 27 種の類縁体の合成および香気特性について発表している[5,6]。今回新たな標的化合物として Figure 1 に示す計 9 種の類縁体を選定した。化合物 **2~4** はシクロプロパン骨格を有する類縁体、化合物 **5~10** は含硫類縁体である。これらはいずれも新規化合物である。本講演ではこれらの合成と香気特性、さらには構造と香気の相関について得られた知見を発表する。

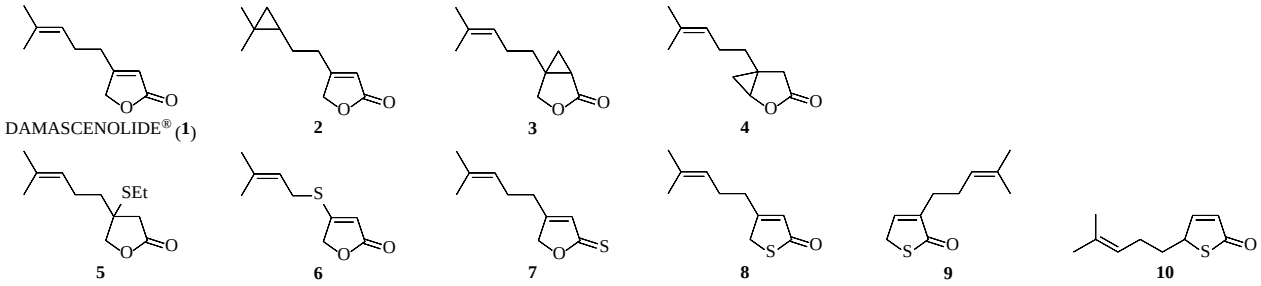


Figure 1.　DAMASCENOLIDE® (**1**) と標的化合物 **2~10** の構造

DAMASCENOLIDE® [**1**, 4-(4-methylpent-3-en-1-yl)furan-2(5*H*)-one], which has a citrus-like odor, is an important aroma component of roses (*Rosa*×*damascena*). For the purpose of developing more useful aroma compounds, we are developing the research on analogs of **1**[1-4].

At the 2020 and 2021 annual meetings, a total of 27 analogs of **1** were reported[5,6]. At this meeting, the synthesis and odor evaluation of nine more analogs (three cyclopropanated analogs and six sulfur-containing analogs) as shown in Figure 1 will be reported. The findings on structure-odor relationships will also be presented.

1) Miyazawa, Y. *et al*. *Flavour Fragr. J*., **35**, 341-349 (2020). 2) Miyazawa, Y. *et al*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **84**, 1560-1569 (2020). 3) Miyazawa, Y. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem*., **85**, 756-764 (2021).4) Miyazawa, Y. *et al*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **85**, 1357-1363 (2021). 5) 宮澤和ら、日本農芸化学会 2020 年度大会講演要旨集 3B11p07. 6) 宮澤和ら、日本農芸化学会 2021 年度大会講演要旨集 3F02-14.

DAMASCENOLIDE, analog synthesis, structure-odor relationships

発表責任者：宮澤　和（yamato_miyazawa@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：4E01-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

ブラリナトガリネズミ由来の神経毒ペプチド BPP 類の合成研究

Synthetic studies on the neurotoxic peptides from the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*

○矢野 佑介、福岡 凌、Maturana Andres D.、北 将樹（名大院生命農）
○Yusuke YANO, Ryo FUKUOKA, Andres D. MATURANA, Masaki KITA (Nagoya Univ.)

Blarina Paralytic Peptide1, 2 (BPP1, 2) は北米に生息する食虫動物、ブラリナトガリネズミ (*Blarina brevicauda*) の顎下腺から単離された神経毒ペプチドである。このうち BPP2 には特徴的な活性として、痛みに関与する N 型 Ca チャネル開口活性が見出されている。BPP1, 2 はそれぞれ 48, 53 残基のアミノ酸から構成され、分子内に 3 組のジスルフィド結合を持つが、このジスルフィド結合の組み合わせについては不明である。BPP 類の一次配列は、ヒト脳内オピオイドペプチド前駆体タンパク質の一部、シンエンケファリン (SYN) と類似している。SYN の構造は既に解明されており、このことから類似の一次配列を持つ BPP 類も SYN と同様のジスルフィド結合様式であると推定した。

これまでに我々は BPP2 について推定構造とその異性体を複数合成したが、いずれも天然品とは HPLC の保持時間が一致しなかった。この結果から BPP2 推定構造の一次配列やジスルフィド結合様式が誤っている可能性を考慮し、推定構造の再検討を行った。天然品の分解物の MS^2 データとブラリナトガリネズミのゲノム情報を再解析した結果、一次配列の一部に誤りがあることが示唆された。また、タンパク質構造予測プログラムを用いて BPP2 の一次配列から立体構造を予測したところ、ジスルフィド結合様式も元の推定構造とは異なることが示唆された。

現在は構造改訂後の一次配列を持つ BPP2 の化学合成を行い、各種スペクトル分析によって天然品の構造決定を進めている。

Blarina paralytic peptides (BPPs) 1 and 2 are neurotoxic peptides isolated from the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*. They are composed of 48 or 53 amino acids, respectively, and have three disulfide bonds. The primary sequences of BPPs are similar to the part of the human opioid precursor protein, synenkephalin (SYN). So we expected that the disulfide bond patterns of BPPs are the same as that of SYN, and synthesized several proposed structures of BPP2 with different disulfide bond patterns, but all of them were not identical to natural one.

Reanalysis of the primary sequence and disulfide bond patterns by MS^2 data, genome data, and the use of structure prediction program revised the primary sequences and the disulfide bond patterns of BPPs.

mammalian venom, neurotoxic peptides, peptide synthesis

発表責任者：北 将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E01-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

アプリシアトキシン・オシラトキシン類縁体の網羅的合成法の開発

Collective synthesis of analogs of Aplysiatoxin and Oscillatoxin

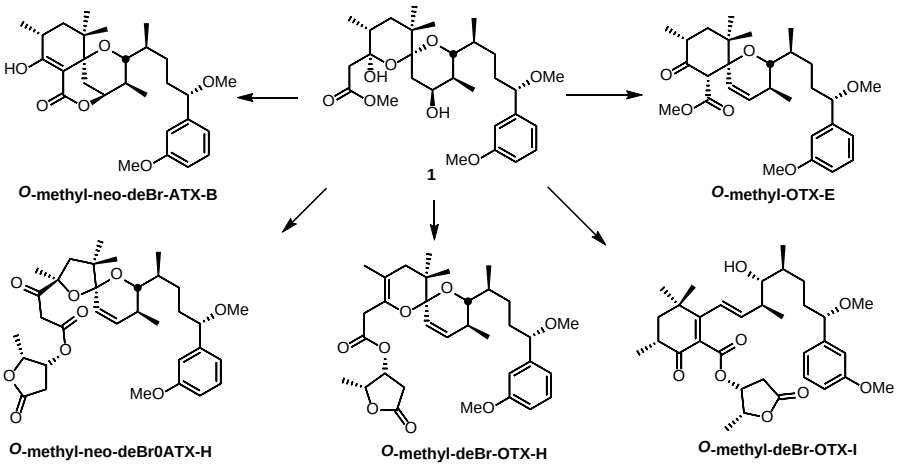
○波田 航平[1]、新木 悠介[1]、野倉 吉彦[1]、花木 祐輔[3]、中崎 敦夫[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]岩手大理工、[3]香川大農)
○Kohei HADA[1], Yusuke ARAKI[1], Yoshihiko NOKURA[1], Yusuke HANAKI[3], Atsuo NAKAZAKI[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Iwate Univ., [3]Kagawa Univ.)

アプリシアトキシン(ATX) とオシラトキシン D(OTX-D)は、1980 年代に単離された海洋シアノバクテリアが生産するポリケチド系天然物である。ATX は強力な炎症作用や発がん促進作用を示すが、副作用を抑えた単純化アナログは抗がん剤のシードとして注目されている。近年、多様な構造を持つ類縁体が多数発見されているが、単離された量の少なさから詳しい生物活性はわかっていない。我々はこれら天然物の生物活性を明らかにすることで創薬や生命科学分野に貢献できると考え、類縁体の網羅的合成法の開発を行っており、これまでに OTX-D, E, F の全合成とその生物活性を報告してきた。

今回、ATX のコア構造を有する中間体 1 が様々なアナログ構造を合成できる反応性を示すことを見出し、5 つの天然類縁体を OMe 体として合成することに成功した。

Aplysiatoxin (ATX) and Oscillatoxin D (OTX-D) are polyketide natural products isolated from marine cyanobacteria in the 1980s. ATX has potent inflammatory and carcinogenic effects, but the simplified analogs are attracting attention as seeds for anticancer drug. Recently, many analogues with diverse structures have been isolated, but details of the biological activities are not known due to the small amount isolated.

We have reported the total synthesis of OTX-D, E, and F and their biological activities. * In the course of our studies toward synthesis of ATX, we found that intermediate **1** exhibited unique reactivities which allowed us to synthesize five naturally occurring analogs as OMe derivative.



*Ref. Y. Nokura. *et al. Org. Lett.* **2017,** *19,* 5992.
Y. Araki. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2021***, 85,* 1371.

Aplysiatoxin, Oscillatoxin, collective synthesis

講演番号：4E01-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

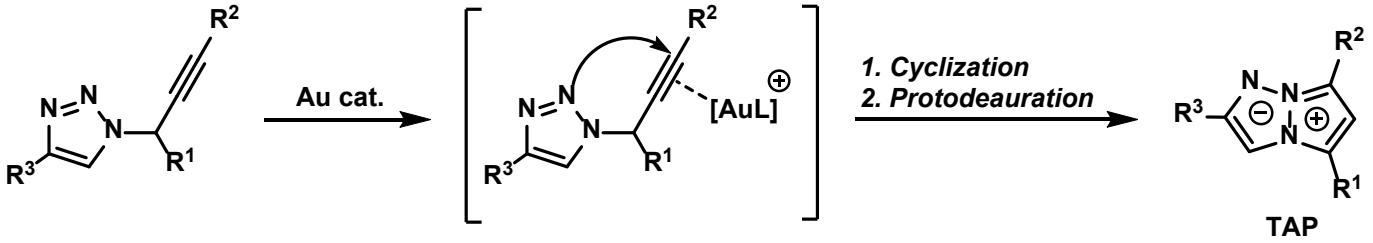
蛍光色素 1,3a,6a-トリアザペンタレンの短段階合成

The short step synthesis of organic fluorophore 1,3a,6a-triazapentalene

○大原 駿也、スー トゥアン、矢島 新、斉藤 竜男（東京農業大学生命科学部）
○Shunya OHARA, Thuc Anh SU, Arata YAJIMA, Tatsuo SAITO (Faculty of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo University of Agriculture)

有機蛍光色素はバイオイメージングなどの基盤として広く使用されており、生物有機化学、農芸化学分野の発展に貢献してきた。1,3a,6a-トリアザペンタレン (TAP) は廣部らによって初めて合成された 10π系芳香族化合物で発見から数十年間、合成や物性について未開拓のままであったが、2011 年難波らが TAP の効率的合成法を見出して以来、新たな蛍光標識剤としての利用が期待されている分子として多くの研究者の注目を集めている。我々はこれまでの課題（基質適用範囲、環境調和性、合成収率）解決と利用拡張の観点から合成戦略を再設計し、アルキンの反応性の差を利用したプロパルギルアジドとアルキンの Huisgen 反応で得られるトリアゾールから金触媒反応により短段階高収率で TAP 合成を達成したので報告する。本講演では計算化学支援による詳細な反応設計と基質適用範囲の調査、および、TAP を用いた合成展開について紹介する。

Organic fluorescent dyes are widely used for bioimaging tools and have contributed to bioorganic and agricultural chemistry development. 1,3a,6a-triazapentalene (TAP) is a 10π electron aromatic compound expected as a new fluorescent labeling agent. However, the synthesis and properties of TAP have remained unexplored for several decades from its discovery. Since Namba et al. developed an efficient synthetic method of TAP in 2011, its applications have been studied by several researchers. We have accomplished the novel synthesis of TAP from triazole by using a gold-catalyzed cyclization reaction. In this presentation, we introduce the reaction optimization, range of substrates, and synthetic applications for TAP.



1) Hirobe, M.; Koga, H.; Okamoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1291-1294.
2) Namba, K.; Osawa, A.; Ishizaka, S.; Kitamura, N.; Tanino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11466- 11469.

organic fluorophore, pentalene, gold catalyst

講演番号：4E01-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

マトリグリカンオリゴ糖の合成と糖鎖－ラミニン間の相互作用

Synthesis of matriglycan oligosaccharide and the interaction between glycan and laminin

○田村 敬裕[1]、伊藤 良汰[2]、真鍋 法義[2]、大野 詩歩[2]、山口 芳樹[2]、田村 純一[1]([1]鳥取大院・連大農、[2]東北医薬大・薬)
○Takahiro TAMURA[1], Ryota ITO[2], Noriyoshi MANABE[2], Shiho OHNO[2], Yoshiki YAMAGUCHI[2], Jun-ichi TAMURA[1] ([1]United Grad. School Agric. Sci., Tottori Univ., [2]Tohoku Med. Pharm. Univ.)

最近、筋繊維を構成する主要な糖鎖構造が明らかになった。筋繊維は細胞外マトリックスの一つであるラミニンと細胞膜を貫通するジストログリカンとが糖鎖を介して結合することで安定化されている。この糖鎖形成に関与する遺伝子の変異および欠損が筋ジストロフィー症発症の一因となっている。我々は筋組織を構成する *O*-マンノシルグリカンの非還元末端に位置するマトリグリカンに着目した。マトリグリカンは-4Xylα（キシロース）1-3 GlcAβ（グルクロン酸）1-からなる二糖の繰返しで構成されており、細胞外マトリックスのラミニンと直接結合している。この糖鎖を効率よく合成して筋組織の再構築ができれば、筋ジストロフィー症やサルコペニアの改善につながると考えた。本発表では、還元末端に機能性官能基を装着したマトリグリカンオリゴマーの合成と、マトリグリカン–ラミニン間の相互作用について報告する。

形成の容易でない 1,2-*cis*-α-グリコシドを持つ二糖（Xylα1-3GlcA）を立体選択的に得るため、種々の縮合条件検討を行った。α 異性体を優勢に得ることに成功したが、シリカゲルカラムやゲルろ過による分離はできなかった。興味深いことに片方のアノマーが溶媒特異的な溶解性を示すことを見出した。これを利用することで目的の 1,2-*cis*-α-グリコシドを選択的に得ることができ、収率向上と工程数の短縮にも成功した。得られた二糖（Xylα1-3GlcA）を共通二糖ユニットへ誘導し、そのオリゴマー合成を行った。合成したマトリグリカンオリゴマーとラミニンとの相互作用を STD-NMR の測定によって確認した。

Recently, the main glycan structures that forms muscle fibers have been clarified. Muscle fibers are stabilized by the binding of laminin and dystroglycan (DG) via glycan. We focused on the matriglycan, a repeating disaccharide part of core M3 *O*-mannosyl glycan (MG) composed of α-xylose (Xyl) and β-glucuronic acid (GlcA), locates at the non-reducing end of the core M3 *O*-MG, and interacts with laminin. Here, we report the synthesis of a matriglycan oligosaccharide having a functional group at the reducing end and the interaction between the matriglycan and laminin.

The desired 1,2-*cis*-α-xyloside could selectively be obtained by the opimized separation method using a specific solvent with improved yield and shortened processes. The obtained disaccharide (Xylα1-3GlcA) was converted to a common disaccharide unit for oligomerization. The interaction between the synthesized matriglycan oligosaccharide and laminin was confirmed by STD-NMR measurement.

O-mannosyl glycan, laminin, dystroglycan

発表責任者：田村純一（jtamura@tottori-u.ac.jp）

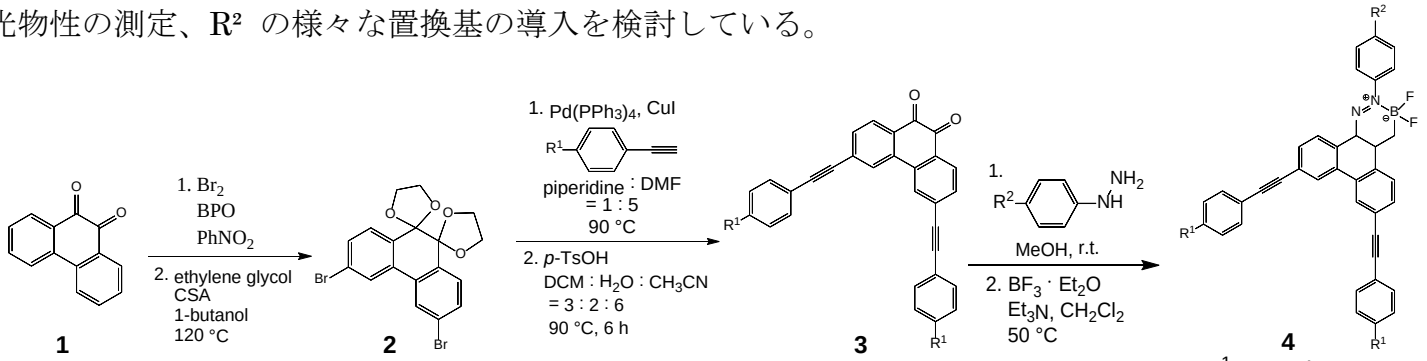
講演番号：4E01-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

フェナントレイン骨格を母核とする新規アゾ－ヒドラゾン系ホウ素錯体の合成と光物性評価

Synthesis and photophysical properties of novel azo-hydrazone boron complexes based on phenanthrene skeleton

○東 達也[1]、園田 素啓[1,2]、谷森 紳治[1,2] ([1]大阪府大、[2]日本農芸化学会)
○Tatsuya HIGASHI[1], Motohiro SONODA[1,2], Shinji TANIMORI[1,2] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry)

新規アゾ—ヒドラゾン系ホウ素錯体を組み込んだ波長返還フィルムは農作物の収穫量の増加や高品質化、栽培の低コスト化等へ繋がることが期待される。我々は新規アゾ—ヒドラゾン系ホウ素錯体合成を目的としてはじめに、phenanthrene-9,10-dione (**1**) を出発原料とし、ブロモ化およびカルボニル基の保護を行ってジブロモアセタール **2** を合成した。この **2** に対し、パラジウム触媒を用いて、フェニルアセチレン誘導体との薗頭カップリング反応を行うことによりジエチニルフェナントレン誘導体を合成し、脱保護して化合物 **3** とし、ヒドラジンとの脱水縮合反応によりヒドラゾン化合物を合成した。最後に、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体と反応させ、新規アゾ—ヒドラゾン系ホウ素錯体 **4** を合成した。現在はそれぞれの置換基が導入されたアゾ—ヒドラゾン系ホウ素錯体 **4** の光物性の測定、R^2 の様々な置換基の導入を検討している。



Wavelength-reflecting films incorporating novel azo-hydrazone boron complexes are expected to increase crop yields, improve crop quality, and lower the cost of cultivation. We first synthesized dibromoacetal **2** by bromination and carbonyl group protection using phenanthrene-9,10-dione (**1**) as a starting material for the synthesis of new azo-hydrazone boron complexes. Palladium-catalyzed Sonogashira coupling reaction with phenylacetylene derivatives was carried out to synthesize diethynylphenanthrene derivatives, which were deprotected to form compound **3**, and hydrazone compounds were synthesized by dehydration-condensation reaction with hydrazine. Finally, a new azo-hydrazone boron complex **4** was synthesized by reaction with boron trifluoride diethyl ether complex.

fluorescent dye, Boron complexation, Phenanthrene

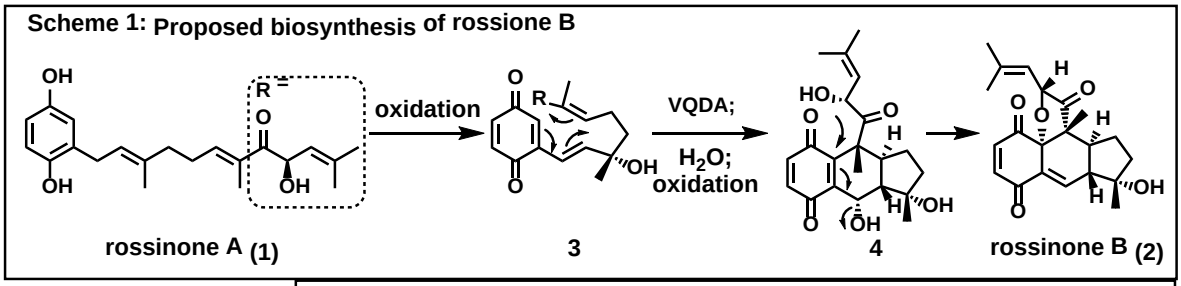
講演番号：4E01-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

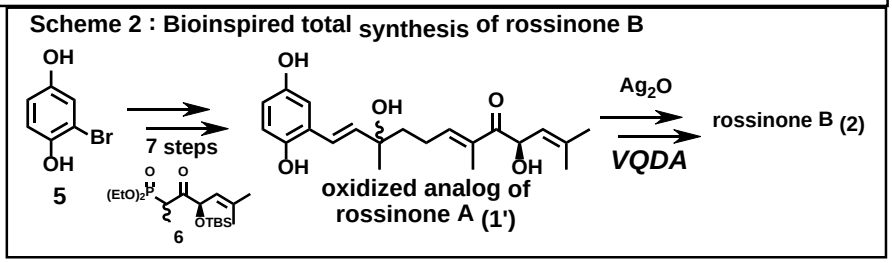
南極産ホヤ由来メロテルペン rossionone B の生合成模倣合成

Bioinspired total synthesis of rossinone B, a bioactive meroterpenoid isolated from an Antarctic ascidian

○齋藤 克哉、倉沢 一輝、滝野 ちあき、桑原 重文、榎本 賢（東北大院農）
○Katsuya SAITO, Kazuki KURASAWA, Chiaki TAKINO, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Tohoku Univ.)

Rossinone A (**1**), B (**2**)は南極のロス海に生息するホヤ (*Aplidium* sp.)より単離・構造決定されたメロテルペノイドであり、抗腫瘍活性をはじめとする様々な生物活性を示すことが報告されている[1)]。Scheme 1 に示すように **2** は **1** から vinyl quinone Diels–Alder (VQDA)反応を含む一連の反応を経て生合成されると提唱されているが[2)]、提唱生合成中間体 **3** のような電子不足二重結合どうしの VQDA は珍しく、合成化学的にも興味深い。今回我々は過去に報告した **1** の骨格構築法を改良して **1** の酸化誘導体である **1'**の合成を行うとともに(Scheme 2)、 **1'**を酸化銀で処理することで VQDA を含む一連の反応が進行し **2** が得られることを見出した。





Rossinones A (**1**) and B (**2**) are meroterpenes exhibiting several pharmacologically important biological properties, such as antiproliferative and antiviral activities. According to their proposed biosynthesis, **2** is proposed to be biosynthesized by a cascade reaction involving a vinyl quinone Diels–Alder reaction (VQDA) from an oxidized analog of rossinone A (**1'**). The synthesis of **1'** has been achieved from 2-bromohydroquinone (**5**) by a seven-step sequence including the Horner–Wadsworth–Emmons reaction of an aldehyde intermediate, obtained via the Lemieux–Johnson oxidation, with chiral phosphonate **6** prepared via a highly diastereoselective Davis oxidation of a known oxazolidinone derivative. Treatment of **1'** with Ag_2O brought about a reaction cascade that involves oxidation of the hydroquinone moiety of **1'** and the intramolecular Diels–Alder reaction of the resulting vinyl quinone intermediate, furnishing **2** in a biomimetic manner.

1) Copp, B. R. *et al., J. Org. Chem.,* **2009**, *74,* 9195. 2) Trauner, D. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49,* 6199.

total synthesis, biosynthesis

発表責任者：榎本賢（masaru.enomoto.a2@tohoku.ac.jp）

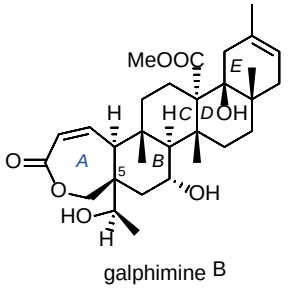
講演番号：4E01-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

生合成を模倣したノル-3,4-セコトリテルペノイドの A 環部分の構築

Biomimetic construction of the A-ring of nor-3,4-secotriterpenoids

○多湖 光佑[1]、西川 俊夫[1]、中崎 敦夫[2] ([1]名大院生命農、[2]岩手大理工)
○ Kosuke Tago[1], Toshio Nishikawa[1], Atsuo Nakazaki[2] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Faculty of Science and Engineering, Iwate University)

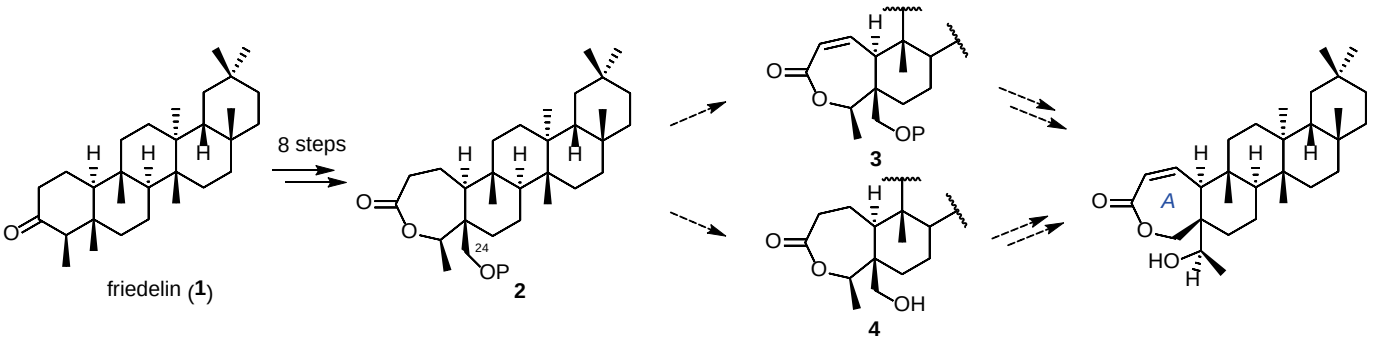
トリテルペノイドには重要な医薬品の資源となる化合物が多数報告されている。その一つである galphimine B は抗不安活性を示す化合物であり、抗うつ剤や精神安定剤のリード化合物として期待されている。その構造的特徴として、核間の 5 位に置換したヒドロキシエチル基と 7 員環のα,β-不飽和ラクトンが挙げられるが、本骨格の構築法は報告されていない。そこで本研究では、friedelin (**1**) をモデル基質として用いて核間位の置換基も含めた A 環の構築を目指し研究を開始した。



galphimine B

我々はこれまでに、friedelin (**1**) から 24 位が酸化されたラクトン **2** への変換に成功している (Scheme 1)[1]。そこで本発表では、その後の不飽和ラクトン **3** またはアルコール **4** を経由した A 環の構築法をそれぞれ検討したので報告する。

Triterpenoids are known as large families for the important source of therapeutic agents. For example, galphimine B, a nor-3,4-secotriterpenoid, shows anxiolytic activity and expected to be a lead compound for the treatment of depression and anxiety disorder. It's A-ring system comprises an α,β-unsaturated 7-membered lactone bearing an angular hydroxyethyl group at C5 position. To date, methods for the construction of the A-ring system have not been reported. We therefore planned to construct the A-ring system using friedelin (**1**) as a model substrate. We have already reported the synthesis of lactone **2** from **1** (Scheme 1)[1]. In this presentation, details of the following reactions to obtain the desired A-ring system via **3** or **4** will be disclosed.



Scheme 1

[1] 多湖光佑、西川俊夫、中崎敦夫　日本農芸化学会 2021 年度大会, 3F02-13.

nor-3,4-secotriterpenoid, 7-membered lactone, intramolecular transesterification

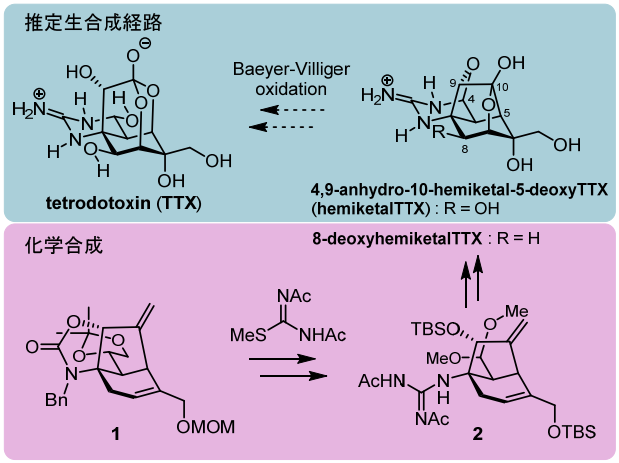
発表責任者：多湖光佑（sb.60m.9139@s.thers.ac.jp）

講演番号：4E01-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

テトロドトキシン推定生合成中間体 4,9-アンヒドロ-10-ヘミケタール-5-デオキシテトロドトキシンの 8-デオキシアナログの合成

Synthesis of the 8-deoxy analogue of 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxy-tetrodotoxin, a proposed biosynthetic precursor of tetrodotoxin

○宮坂 忠親[1]、安立 昌篤[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○Tadachika MIYASAKA[1], Masaatsu ADACHI[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ.)



テトロドトキシン（TTX）は、フグ毒中毒の原因物質として有名だが、フグ以外のタコやイモリ、カエルなどの生物にも分布している。これらの生物は自身で TTX を生産せず、餌から TTX を摂取・蓄積していると考えられている。一方、TTX の生合成は TTX 生産菌の報告から 30 年以上の歳月が経つが未だ未解明である。2014 年に東北大の山下・工藤らは、TTX を保有するオキナワシリケンイモリから、4,9-アンヒドロ-10-ヘミケタール-5-デオキシテトロドトキシン（ヘミケタール TTX）を単離・構造決定し、この化合物が Baeyer-Villiger 型の酸化により TTX に変換されうる TTX の生合成中間体であると提唱した。我々はヘミケタール TTX の構造的特徴と Baeyer-Villiger 酸化に興味を持ち、ヘミケタール TTX の合成を開始した。前年度に合成を報告した化合物 **1** から、グアニジンの導入などにより **2** を合成し、立体選択的な水酸基導入や環状グアニジンの形成などによりヘミケタール TTX の 8-デオキシアナログの合成を達成した。

Tetrodotoxin (TTX), a toxic principle of puffer fish intoxication, is found from various marine and terrestrial animals. Pufferfish and newts do not synthesize TTX by themselves, but instead obtain it from their diet. Although many TTX-producing marine microorganisms have been reported, its biosynthesis remains mysterious. In 2014, Yotsu-Yamashita and coworkers isolated 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxytetrodotoxin (hemiketalTTX) from Japanese toxic newts, which could be a direct precursor of TTX by Baeyer-Villiger type oxidation. We were interested in the unique structure of hemiketalTTX and the Baeyer-Villiger oxidation, and started the synthesis of hemiketalTTX. Transformation of previously synthesized **1** into **2** by introduction of guanidine moiety was followed by stereoselective hydroxylation. Removal of the protecting group and formation of cyclic guanidine provided 8-deoxy analogue of hemiketalTTX.

Miyasaka, T.; Adachi, M.; Nishikawa, T. *Org. Lett.* ASAP.

tetrodotoxin, biosynthesis, chemical synthesis

発表責任者：西川俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

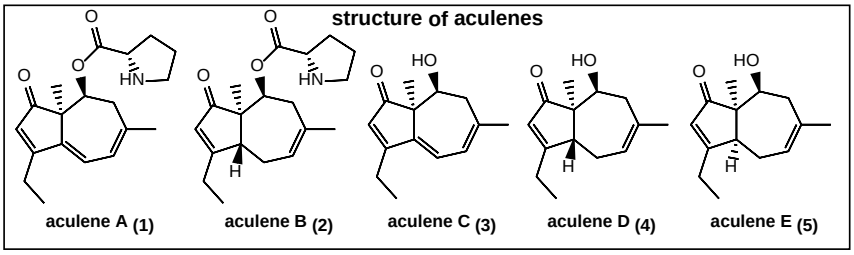
講演番号：4E01-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム E

Quorumsensing 阻害物質 aculene 類の全合成研究

Total synthesis of aculenes, norsesquiterpenes showing quorum sensing inhibitory activity

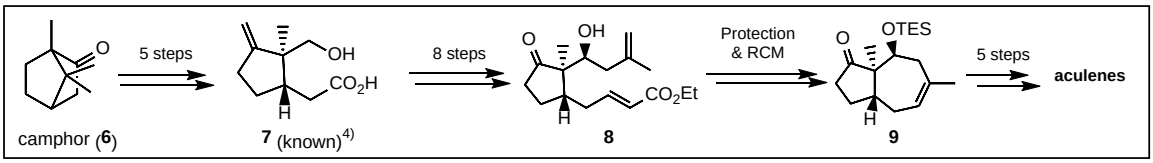
○横川 陽向[1]、石澤 誠也[2]、齋藤 克哉[1]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大学院農、[2]東北大学農)
○Hinata Yokokawa[1], Seiya Ishizawa[2], Katsuya Saito[1], Shigefumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Faculty of Agriculture, Tohoku UniversityFaculty of Agriculture, Tohoku University)

【背景・目的】Aculene 類は，*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の真菌から単離・構造決定された新規化合物群であり[1-3]，**3–5** については *Chromobaterium violaceum* CV026 に対して quorum sensing (QS) 阻害活性を示すことが報告されている[3]。



QS 阻害物質は新規抗菌剤のリード化合物として着目されていることから，我々は構造活性相関研究への展開も視野に入れ，aculene 類の網羅的合成を目指して本研究に着手した。

【方法・結果】前回の大会では、(-)-camphor (**6**)を出発原料として既知の方法に従ってカルボン酸 **7**[4] へと導いた後，キレーションを利用した立体選択的な methallyl 化、閉環メタセシス反応 (RCM)を含む計 15 工程の変換を行い、aculene D (**4**)の初の全合成を達成したことを報告した[5]。本発表では、収率の改善と一部短工程化、aculene B (**2**)の初の全合成を含む類縁体の合成に関して報告する。



1) T. O. Larsen, *et al*. *Molecules*, **2014**, *19*, 10898. 2) J.-M. Gao, *et al*. *Molecules*, **2015**, *20*, 325. 3) Y. X. Zhao, *et al*. *Arch. Pharm. Res.* **2017**, *40*, 25. 4) H. Hutchinson, *et al*. *Can. J. Chem*. **1986**, *64*, 854. 5) 日本農芸化学会 2021 年度大会講演要旨集（講演番号 3G01-16）.

Aculenes are norsesquiterpenes first isolated from the culture broth of *Aspergillus* sp. and later from *Penicillium* sp. [1–3] Although no biological activity for aculenes A (**1**) and B (**2**) has been reported to date, aculenes C–E (**3–5**) exhibit QS inhibitory activity against *Chromobacterium violaceum* CV026.[3] Since QS inhibitors control the production of virulence factors, they are being investigated as promising lead compounds for a new type of antibacterial agents. In this general lecture, we report synthetic study of aculenes.

At the previous JSBBA annual meeting, we reported the first total synthesis of (+)-**4** from known carboxylic acid **7**[4], which included stereoselective introduction of methallyl group and ring-closing metathesis (RCM) as the key steps[5]. In this presentation, an improved synthesis of (+)-**4**, the first total synthesis of (+)-**2**, and approaches to other aculenes will be disclosed.

total synthesis, quorum sensing, aculenes

講演番号：4E03-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

糸状菌のα-マンノシド β-(1→6)-ガラクトフラノース転移酵素の同定と機能解析

Identification and functional analysis of α-mannoside β-(1→6)-galactofuranosyltransferase in filamentous fungi

○岡 拓二[1]、門岡 千尋[1]、田中 大[2] ([1]崇城大・生物生命、[2]東北医薬大・薬)
○Takuji OKA[1], Chihiro KADOOKA[1], Yutaka TANAKA[2] ([1]Sojo Univ., [2]Tohoku Med. Pharm. Univ.)

【目的】ヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の産する真菌型ガラクトマンナン(FTGM)や O-マンノース型ガラクトマンナン(OMGM)は、ゴルジ体で生合成された後、細胞表層に運ばれて細胞壁の架橋構造を形成する。我々は、これまでにいくつかの FTGM および OMGM の生合成酵素を明らかにしてきた。しかし、α-マンノース(Man)残基にガラクトフラノース(Galf)残基を転移する酵素(Mgf)については明らかにすることができていなかった。本発表では、「Mgf がゴルジ体に局在する機能未知な II 型膜タンパク質の中にある」という仮説を検証することで Mgf を同定したので報告する。
【方法・結果】モデル糸状菌 *A. nidulans* の全タンパク質配列(10776 個)より、膜貫通領域予測ツールおよび細胞内局在予測ツールを用いることで 17 個の機能未知ゴルジ体局在 II 型膜タンパク質を選抜した。17 個の遺伝子破壊株を構築したところ 1 つの遺伝子破壊株でコロニー形態の異常を示した。そこで、その責任遺伝子に MgfA と名付けて解析を進めた。MgfA の組換え酵素を取得し、Man-α-4-Methylumbelliferyl (4MU)に対する Galf 転移酵素活性を検出したところ強い活性が認められた。その酵素反応産物の構造は Galf-β-(1→6)-Man-α-4MU であった。以上のことから、MgfA は α-マンノシド β-(1→6)-Galf 転移酵素であることを明らかにした。MgfA は、既知のタンパク質とは全く相同性を持たない新規な酵素であった。

Fungal-type galactomannan (FTGM) and O-mannose-type galactomannan (OMGM) produced by the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* is biosynthesized in the Golgi apparatus and then transported to the cell surface to form the cross-linked structure of the cell wall. We had previously identified some of the biosynthetic enzymes of FTGM and OMGM. However, the galactofuranosyltransferase that transfers galactofuranose (Galf) residue to α-mannose (Man) residue, termed MgfA, has not been clarified. We hypothesized that MgfA is a protein in an unidentified type II membrane protein localized in the Golgi apparatus. In this study, we report the discovery of MgfA through testing the hypothesis. We constructed the disruptants of the 17 selected genes based on the hypothesis. We found that one of them showed abnormal colony morphology. A recombinant protein of MgfA was obtained and its galactofuranosyltransferase activity to Man-α-4-Methylumbelliferyl (4MU) was detected. As a result, MgfA strongly showed the activity. The enzymatic product was identified as Galf-β-(1→6)-Man-α-4MU. These results indicate that MgfA is an α-mannoside β-(1→6)-galactofunosyltransferase, which is a novel enzyme with no homology with all identified proteins.

glycosyltransferase, galactomannan, cell wall

発表責任者：岡拓二（oka@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4E03-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

Aspergillus fumigatus の AfAnp1 は 真菌型ガラクトマンナンのマンナン主鎖生合成に関わるα-(1-6)-マンノース転移酵素である

Identification of α-(1→6)-mannosyltransferase responsible for the biosynthesis of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*.

○門岡 千尋[1]、田中 大[2]、岡 拓二[1] ([1]崇城大・生物生命、[2]東北医薬大・薬)
○Chihiro KADOOKA[1], Yutaka TANAKA[2], Takuji OKA[1] ([1]Sojo Univ., [2]Tohoku Med. Pharm. Univ.)

ヒト病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞表層に局在する真菌型ガラクトマンナン（FTGM）は、本菌の感染・毒性発揮機構に関与する因子であることが指摘されている。FTGM は 9 から 10 個の α-(1→2)-テトラマンノシドユニットが α-(1→6)-結合したマンナン主鎖にガラクトフラン側鎖が β-(1→2)-、β-(1→3)-、もしくは β-(1→6)-結合した巨大な糖鎖である。これまでにマンナン主鎖の生合成に関与する α-(1→2)-マンノース（Man）転移酵素 CmsA および CmsB が同定されているが、α-(1→6)-Man 転移酵素は同定されていない。本研究は、*A. fumigatus* が産生する FTGM のマンナン主鎖生合成を担う α-(1→6)-Man 転移酵素の同定を目的として行った。
まず、出芽酵母において同定されている α-(1→6)-Man 転移酵素群の *Aspergillus* 属糸状菌のホモログを抽出し、系統解析を行った。その結果、出芽酵母の N-グリカンにおける糖外鎖 α-(1→6)-Man 主鎖の伸長に関与する Mnn9/Van1/Anp1 のうち、Mnn9 および、Van1 のホモログ（AfMnn9/AfVan1）は出芽酵母と同一のクラスターを形成したのに対し、Anp1 ホモログ（AfAnp1）は出芽酵母 Anp1 とは独立したクラスターを形成した。そこで、*Afmnn9*、*Afvan1*、*Afanp1* の単独破壊株を構築し、表現型を解析した結果、*Afanp1* 破壊株は菌糸伸長が顕著に遅延した。次に野生株および各破壊株から FTGM を抽出し、^{1}H-NMR 解析に供した結果、*Afanp1* 破壊株ではマンナン主鎖の存在を示す固有のケミカルシフトが消失することが明らかとなった。さらに、AfAnp1 の組換え酵素を調整し、活性測定および、各種マンノシダーゼ処理により、AfAnp1 は α-(1→6)-Man 転移酵素であることが示された。以上の結果より、AfAnp1 は FTGM のマンナン主鎖生合成を担う α-(1→6)-Man 転移酵素であることが明らかとなった。

Fungal-type galactomannan (FTGM), which is localized in the cell surface of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*, has been pointed out to be a factor involved in the mechanism of infection and virulence. The purpose of this study was to identify the α-(1→6)-mannosyltransferase responsible for the biosynthesis of the core-mannan of FTGM. There are three genes, *Afmnn9*, *Afvan1* and *Afanp1*, encoding putative α-(1→6)-mannosyltransferases in *A. fumigatus*. Disruptants of these genes were constructed. As a result, Δ*Afanp1* strain showed significantly delayed hyphal growth. In ^{1}H-NMR analysis of FTGM, the chemical shifts of core-mannan were disappeared in the Δ*Afanp1* strain. Moreover, the recombinant of AfAnp1 showed α-(1→6)-mannosyltransferase activity. These results indicate thhat AfAnp1 is α-(1→6)-mannosyltransferase responsible for the biosynthesis of the core-mannan of FTGM in *A. fumigatus*.

Aspergillus fumigatus, Fungal-type galactomannan, mannosyltransferase

発表責任者：岡拓二（oka@bio.sojo-u.ac.jp）

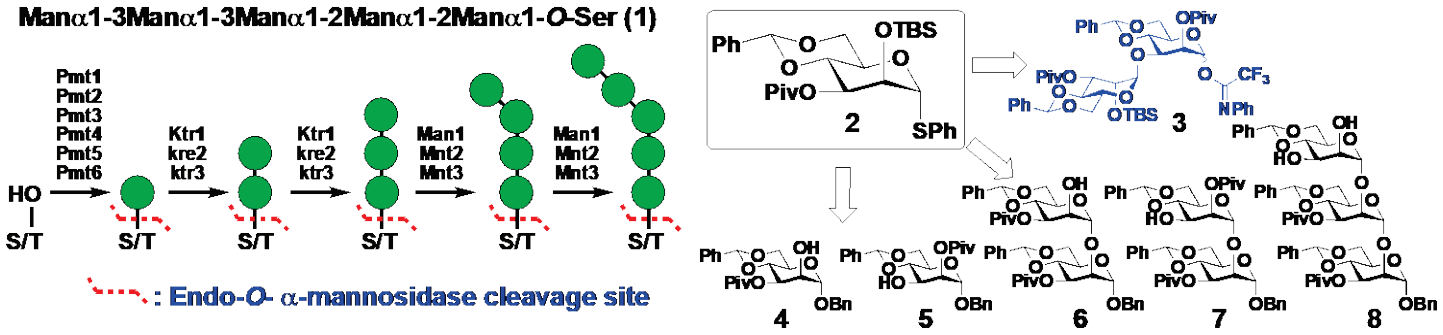
講演番号：4E03-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

酵母 O－結合型糖鎖由来マンノオリゴ糖の系統的合成

Synthesis of mannooligosaccharides derived from O-linked glycoproteins in yeast

○松尾 一郎、佐藤 有花、石井 希実、佐野 加苗、佐藤 美咲（群馬大院理工）
○Ichiro Matsuo, Yuka Sato, Nozomi Ishii, Kanae Sano, Misaki Sato (Gunma Univ.)

不要糖タンパク質から切断された細胞内遊離糖鎖が生物機能に関与することが示唆され[1]、細胞内糖代謝経路の解明は糖鎖生物学のトピックスとなっている。出芽酵母の細胞内には、タンパク質上のセリン/スレオニン残基に結合している *O*-結合型糖鎖と同様の構造の遊離糖鎖が見出されることから、これら糖鎖をタンパク質から切断するエンド-*O*-α-マンノシダーゼ（EOM）の存在が示唆されている[2]。我々は、細胞内遊離糖鎖の機能解明と新規 EOM の同定に向けて、*O*-結合型糖鎖 5 糖アミノ酸（Manα1-3Manα1-3Manα1-2Manα1-2Manα-Ser(**1**)）および、EOM によって代謝されると考えられる細胞内遊離糖鎖の系統的合成を行った。目的としたマンノオリゴ糖はα1-3 結合したマンノース残基とα1-2 結合したマンノース残基からなることから、マンノース誘導体 **2**[3]を用いてα1-3 結合を有する糖供与体 **3**，単糖受容体 **4** および **5**，α1-2 結合を有する糖受容体 **6**～**8** をそれぞれ合成、得られたオリゴ糖ブロックを組み合わせることで２～５糖骨格を有するマンノオリゴ糖を合成した。得られた５糖誘導体の還元末端部分に対してセリン残基を導入することで５糖セリン誘導体へと導いた。



Protein O-mannosylation is commonly found in yeast. Recent investigations have suggested the existence of a novel endo-*O*-α-mannosidase (EOM) that cleaves mannooligosaccharides from proteins. To investigate the EOM activity, we synthesized mannopentaose derivative **1** (Manα1-3Manα1-3Manα1-2Manα1-2Manα-Ser:**1**) having serin residue at reducing end. In addition, we systematically synthesized mannooligosaccharide samples necessary for the analysis of intracellular free mannooligosaccharides (fOS).

[1] C. S. Fermaintt *et al.*, *Nat. Commun.*, **2019**, 10, 2377 (2019). [2] H. Hirayama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2019**, 294, 15900. [3] K. Sano *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **2020**, 494, 108072.

Synthesis, *O*-glycan, Endo-*O*-α-mannosidase

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4E03-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

二環性シアル酸を用いたα(2,9)ポリシアル酸の合成

Synthesis of α(2,9) polysialic acid by using bicyclic sialic acid

○加藤 雅大[1]、河村 奈緒子[2]、田中 秀則[2]、今村 彰浩[1,2]、石田 秀治[1,2,3]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・iGCORE、[3]岐阜大・G-CHAIN）

○Masahiro KATO[1], Naoko KOMURA[2], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hiromune ANDO[2] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ., [3]G-CHAIN, Gifu Univ.)

【目的】α(2,9)ポリシアル酸を有する糖タンパク質は髄膜炎の原因菌の莢膜に発現し、感染との深い関連性が注目されている。しかしながら、構造均一なポリシアル酸を天然から取得することは困難であるため、ポリシアル酸のかかわる感染機序の解明は進んでない。本研究は、その問題をポリシアル酸の化学合成によって解決することを目的としている。

【方法・結果】ポリシアル酸の化学合成の課題は、シアル酸のグリコシド化 (シアリル化) の立体制御と鎖長伸長に伴う合成中間体の難溶化である。この問題に対して、完全なα選択的シアリル化法[1]と糖鎖の有機溶媒への溶解性を高めることができる保護基（*p-tert*-Butylbenzoyl 基等）[2]を組み合わせる戦略を立案した。加えて、脱離基をオルソゴナルな組み合わせとすることで、倍加伸長による効率的な多量化を目指した。昨年度までに、[8+8]のシアリル化までは高収率にて糖鎖伸長が可能であることを報告した。しかし、[16+16]の 32 糖合成で収率が 53%へ大幅に低下したことから、これまでの結果をもとに最適な鎖長での糖鎖を伸長する新たな合成法を試みた。これらの結果に加えて、シアル酸多量体の脱保護反応の検討についても報告する。

The purpose of this study is to synthesize α(2,9) polysialic acid in a chemical manner. We employed a convergent synthetic strategy using bicyclic sialic acid donors and acceptors to achieve stereoselective and efficient glycosylation between sialic acids. To double the chain length, we envisioned an approach based on an orthogonal combination of phenylsulfenyl group and phosphate group as the leaving groups. In addition, to improve the solubility of sialic acid polymers in organic solvents, we used *p-tert*-butylbenzoyl group [2] as protecting group of hydroxyl groups. As a result, we constructed 16mer by [8+8] sialylation in high yield. However, [16+16] sialylation afforded a 32mer in only 53% yield. Following this result, we examined other possible approaches using oligomeric sialic acid donors. Here, we report the results obtained in the examination as well as those in global deprotections of sialic acid polymers.

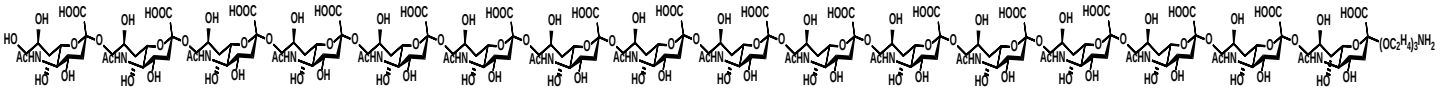


Figure 1. The structure of α(2,9) polysialic acid

[1] N. Komura *et al. Science* **2019**, *364*, 677–680. [2] S. Asano *et al. Org. Lett.* **2019**, *21*, 4197–4200.

polysialic acid, α-sialylation, block synthesis

発表責任者：安藤弘宗（hando@@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4E03-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

CMP-シアル酸合成酵素の構造と機能における C ドメインの役割解明

Elucidation of the role of the C-domain in the structure and function of CMP-sialic acid synthetase

○戸田 さくら[1,2]、呉 迪[1,2]、羽根 正弥[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2]、北島 健[1,2]（[1]名大院・生命農学、[2]名大・生物機能セ）
○Sakura Toda[1,2], Di Wu[1,2], Masaya Hane[1,2], Chihiro Sato[1,2], Ken Kitajima[1,2] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ., [2]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ.)

シアル酸は，細胞表面の糖鎖の非還元末端を修飾する糖の一種であり，細胞間相互作用などにおいて重要な役割を果たしている．シアル酸残基が糖鎖末端上に付加される時に用いられる活性化糖が CMP-シアル酸であり，これを CTP とシアル酸から合成するのが CMP-シアル酸合成酵素（CSS）である． また，シアル酸はその炭素 5 位の修飾によって Neu5Ac，Neu5Gc，KDN の 3 分子種に分けられ，CSS は生物種間でその基質とするシアル酸分子種に対する特異性が異なる．脊椎動物 CSS は，酵素活性部位を含む N-ドメインと，酵素活性を持たない C-ドメインで構成されており， C-ドメインの機能は明らかにされていなかった．今回我々は，C-ドメインの役割の解明を目的として，上記 3 分子種すべてを基質とすることができるニジマス CSS（rtCSS）を用いて，C-ドメインの存在が酵素活性および多量体形成に及ぼす効果を調べた．まず，全長 CSS, N-ドメイン, C-ドメインを調製して, CMP-Neu5Ac 合成に対する CMP-KDN の活性阻害実験を行った結果，CSS の C-ドメインの存在により CMP-KDN 特異的な生成物阻害が促進されることがわかった．次に，全長 CSS，N-ドメイン，C-ドメインの多量体形成をゲル濾過法によって調べた結果，N-ドメインよりも C-ドメインが多価多量体で存在することを見出した．以上の結果から、C-ドメインは脊椎動物 CSS において，その高次構造に影響を与え，CSS の活性を制御していることが示唆される．

Sialic acids (Sias) are a class of sugars that modify the ends of cell surface glycans and play an important role in cell-cell interactions. CMP-sialic acid synthetase (CSS) synthesizes CMP-Sia from CTP and Sia, and CMP-Sia is thus an activated Sia used for the addition of Sia residues to the terminal end of glycans. Sias are classified into three species, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN, according to the modification at the C-5 position, and the specificity of CSS to the Sia species differs depending on organism species. The vertebrate CSS consists of an N-domain containing the catalytic site and a C-domain, which has no enzymatic activity. The function of the C-domain has remained unclarified. In this study, to clarify roles of the C-domain with respect to the activity, we investigated the catalytic and oligomerizing properties using the full-length CSS, N-domain, and C-domain of rainbow trout CSS (rtCSS), which can use all of the three molecular species as the substrate. We found that (1) the presence of the C-domain enhances CMP-KDN-specific product inhibition, and that (2) the multimeric structures of full-length CSS, N-domain, and C-domain differently change. These results suggest that the C-domain affects the higher-order structure of vertebrate CSS to regulate the activity of CSS.

CMP-sialic acid synthetase, sialic acid, enzymology

講演番号：4E03-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

An impairment of the C-domain of CMP-sialic acid synthetase causes lethality of medaka due to protein insolubility

○Di Wu[1,2,3], Chihiro Sato[2,3], Ken Kitajima[1,2,3] ([1]Biosci. Biotech. Center, [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., [3]Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya Univ.)

Sialic acid (Sia) residues are expressed on glycan chains of vertebrate glycoproteins and glycolipids in a developmental stage-specific and an organ-specific manner. The CMP-Sia synthetase (CSS) is prerequisite for the expression of Sia-glycoconjugates, because free Sia cannot be transferred onto the glycan chains until it is activated to CMP-Sia by this enzyme. The vertebrate CSS, which catalyzes the synthesis of CMP-Sia, consists of a 28 kDa-N-domain and a 20 kDa-C-domain. Although the N-domain is a catalytic domain that exerts activity without a non-catalytic C-domain, the significance of the C-domain remains unknown. To understand the biological significance of the C-domain of vertebrate CSS at the organism level, we chose to use medaka (*Oryzias latipes*) as a vertebrate model. We screened the TILLING library with 5,760 medaka mutants and obtained a medaka strain with a non-synonymous mutation (t911a), or a single amino acid substitution of CSS, L304Q, in the C-domain. After L304Q medaka was generated, the life span of homozygous L304Q medaka was studied. Surprisingly, most L304Q medaka were lethal within 19 days post-fertilization (dpf). The L304Q young fry displayed free Sia accumulation, and impairment of sialylation, up to 14 dpf. At 7 dpf, a prominent abnormality in ventricular contraction was observed.

To gain insight into a mechanism of the L304Q-induced abnormalities, L304Q was biochemically characterized. Based on the V_{max}/K_m values of bacterially expressed soluble enzymes, L304Q and WT displayed a similar activity to each other. However, the thermostability of CSS greatly decreased, when Leu-304 was changed to polar amino acids (Gln, Asn, and Ser). When expressed in CHO cells, L304Q was not detected in the soluble fraction of the cell lysate in sharp contrast to the WT. These results suggest that L304 is important for the stability of CSS through an intramolecular hydrophobic interaction, and that an appropriate expression level of soluble CSS is significant for the animal survival.

CMP-Sialic acid synthetase, proteostasis, medaka

講演番号：4E03-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

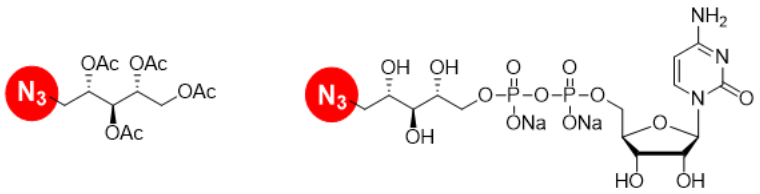
O-マンノース型糖鎖を可視化する代謝ラベルプローブの開発研究

Study on development of a metabolic labeling probe for visualization of *O*-mannosyl glycans

○梅村 悠太[1]、田中 秀則[2]、マドウカル ビブーテ アモル[2]、河村 奈緒子[2]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2,3]、矢木 宏和[4]、安藤 弘宗[2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・iGCORE、[3]岐阜大・G-CHAIN、[4]名市大・院薬)

○Yuta UMEMURA[1], Hide-Nori TANAKA[2], Amol MADHUKAR VIBHUTE[2], Naoko KOMURA[2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hirokazu YAGI[4], Hiromune ANDO[2] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ., [3]G-CHAIN, Gifu Univ., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ.)

【背景・目的】細胞表層の α ジストログリカン上に広く発現している *O*-マンノース型（*O*-Man）糖鎖はラミニン結合活性を有し、糖鎖の長さを調節することで様々な生命機能を担っている。例えば、ラミニン結合活性が欠損した *O*-Man 糖鎖は筋ジストロフィー症を引き起こすことが知られている。本糖鎖は、リン酸化コア M3 糖鎖（GalNAcβ(1-3)GlcNAcβ(1-4)Man6P）の先にタンデムに連結した 2 つのリビトールリン酸（RboP）、更にその先に伸長したラミニン結合性マトリグリカンから構成される。しかしながら、本糖鎖の機能に関しては未だ解明されていない点が多い。本研究では、他の糖鎖には含まれず、*O*-Man 糖鎖に特異的に存在する RboP に着目し、本糖鎖を可視化する代謝ラベルプローブの開発を目的とした。



AC_4RboN_3 **CDP-$RboN_3$**

【方法・結果】RboP 転移酵素 FKTN は CDP-Rbo だけでなく、CDP-グリセロールも基質として認識する（Imae, R. *et al. J. Biol. Chem.* **2018**）。我々は FKTN の緩い基質認識に注目し、クリック反応によるラベル化のために Rbo の一級水酸基をアジド基で置換したアセチル化アジドリビトール（Ac_4RboN_3）を設計・合成した。また、代謝産物が FKTN の基質になるかを確認するため、CDP-$RboN_3$ も合成した。本発表では、合成基質を用いた生化学実験の結果を併せて報告する。

O-Mannosyl (*O*-Man) glycans of α-dystroglycan with laminin-binding activity are widely expressed on cell-surface and play pivotal roles in various biological functions by regulating their glycan length. For instance, it is well-known that *O*-Man glycan without laminin-binding activity causes muscular dystrophy. The glycan consists of phosphorylated core M3 glycan (GalNAcβ(1-3)GlcNAcβ(1-4)Man6P) linked to tandem ribitol phosphates (RboP-RboP), which are elongated with laminin-binding matriglycan. However, the functions of the glycan remain poorly understood. By paying attention to the *O*-Man glycan-specific RboP that does not exist in other glycans, the aim of this study is to develop a metabolic labeling probe to visualize *O*-Man glycans.

FKTN, a RboP transferase, recognizes not only CDP-Rbo but also CDP-glycerol as substrate (Imae, R. *et al. J. Biol. Chem.* **2018**). Inspired by this loose substrate recognition of FKTN, we designed and synthesized an acetylated azide ribitol in which a primary hydroxyl group is replaced with an azido group for labeling by the click reaction. To confirm whether its metabolite can be recognized as a substrate by FKTN, CDP-$RboN_3$ was also synthesized. Herein, we report the results of biological experiments using the synthetic substrates.

O-mannosyl glycans, ribitol phosphate, metabolic labeling probe

発表責任者：田中秀則（htanaka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4E03-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

ハイマンノース型および植物複合型 *N*-グリカンを結合させたアフィニティーカラムによるレクチン様レセプターキナーゼの探索

Screening of lectin-like receptor kinases by affinity columns carrying high-mannose-type and plant complex-type *N*-glycans

○田中 創平、木村 吉伸、前田 恵（岡大院・環境生命）
○Sohei TANAKA, Yoshinobu KIMURA, Megumi MAEDA (Okayama Univ.)

【目的】分化・生長中の植物細胞には，ハイマンノース型と植物複合型の遊離 *N*-グリカン（FNGs）が遍在している[1]。これらは植物の分化・生長に伴い産生量が増加していることから，分化・生長に関わるシグナル分子として機能する可能性が推定されるが，その生理的機能は未だ不明である。一方，高等植物にはレクチン様レセプターキナーゼ（LLRKs）と呼ばれる特徴的なタンパク質ファミリーが存在することが知られており，植物の分化・生長や病原体・害虫に対する防御応答におけるシグナル伝達にとって重要な役割を担っていると考えられている[2]。そこで本研究では，FNGs がリガンドとして LLRKs を活性化する可能性を考え，未同定の FNGs 結合型 LLRKs の検索と同定を開始した。
【方法・結果】リガンド糖鎖として，トラマメ由来タンパク質（43 g）からハイマンノース型糖ペプチド（200 mg）を，オオカナダモ (2 kg) からルイス a 抗原含糖鎖を含む植物複合型糖ペプチド（72 mg）をプロテアーゼ消化，ゲルろ過，逆相クロマト，親水性クロマトを組み合わせることにより調製・精製し，その構造は糖鎖構造解析（RP-，SF-HPLC および MS 分析）により確認した。次いで，それらの糖ペプチドをセファロース担体に結合させたアフィニティー樹脂を CNBr 活性化法により調製し，ペプチドのカップリング効率は 90%程度であることを確認した。エンドウおよびカボチャ実生胚軸を使用し，胚軸破砕物から超遠心分離法により膜画分を粗分画した。得られた膜画分から界面活性剤により膜タンパク質を抽出後，アフィニティークロマトにより LLRKs の精製を試みた。アフィニティークロマトで得られたタンパク質の機能特性について報告する。

It has been reported that free *N*-glycans (FNGs), both high-mannose and plant complex types, ubiquitously occurs in differentiating or developing plants[1]. The amount of these FNGs increases with plant differentiation and growth, suggesting that they may function as signaling molecules involved in differentiation and growth, but their physiological functions are still obscure. On the other hand, a distinctive family of proteins called lectin-like receptor kinases (LLRKs), which are postulated to play an important role in signaling for plant differentiation, growth, and defense responses [2]. In this study, we speculated on the possibility that FNGs may activate LLRKs as ligands, and started purification and identification of these FNGs-associated LLRKs.

[1] Maeda M, Kimura Y. *Front Plant Sci.*, **5**, 429 (2014); [2] NehaVaid.,*et al*. *Molecular Plant*., **6**, 1405–1418 (2013)

Free *N*-glycans, Lectin-like receptor kinases, Hormonal response

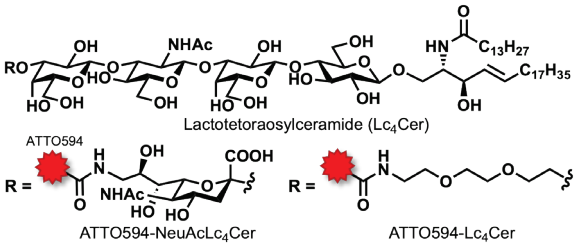
講演番号：4E03-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

新規合成法を用いたラクト系スフィンゴ糖脂質プローブの創製と挙動解析

Development of lacto-series glycosphingolipid probes using a novel synthetic method and behavior analysis

○高橋 舞菜[1]、河村 奈緒子[2]、鈴木 健一[2]、田中 秀則[1,2]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2,3]、安藤 弘宗[1,2]（[1]岐阜大院・連合農学、[2]岐阜大・iGCORE、[3]岐阜大・G-CHAIN）
○Maina TAKAHASHI[1], Naoko KOMURA[2], Kenichi SUZUKI[2], Hidenori TANAKA[1,2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hiromune ANDO[1,2] ([1]United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ., [3]G-CHAIN, Gifu Univ.)

我々は、脂質ラフト（細胞膜上ドメイン）の形成機構や機能の詳細解明を目的に、主要な構成分子であるスフィンゴ糖脂質の蛍光プローブの開発と 1 分子観察をこれまで行ってきた[1]。その結果、ラフト形成に重要な糖脂質間の相互作用に糖鎖の構造が影響を与える可能性を見出してきた。本研究では、これまでに知見のないラクト系糖脂質を標的とし、蛍光プローブの化学合成と挙動観察を行った。目的化合物はLc_4Cerと$NeuAcLc_4Cer$の蛍光プローブとした。$NeuAcLc_4Cer$プローブの合成では、二環性シアル酸供与体[2]を用いて糖脂質をα選択的にグリコシド化する新たな手法[3]を試みた。始めに、蛍光標識位置をTFAcアミド化した二環性シアル酸供与体と、TBBz基[4]により低温条件下の溶解性を確保したLc_4Cer受容体を合成した。これをCH_2Cl_2中、−70℃でシアリル化し、収率82%にて$NeuLc_4Cer$骨格を得た。その後保護基の除去、蛍光導入を行い$NeuAcLc_4Cer$プローブの合成を達成し、昨年度の大会にてこの結果を報告した。本発表では、合成効率の最適化に向けた検討実験の結果と合成プローブのラフト親和性検証、膜挙動解析について報告する。$NeuAcLc_4Cer$プローブと同様のユニットを用いて合成したLc_4Cerプローブに対し、DRM分配試験とLo/Ld分配試験を行い、天然の糖脂質と同様のラフト親和性を示すことを確認した。その後、生細胞膜でのGPI型タンパク質受容体であるCD59との共局在、ホモダイマー形成について 1 分子観察による解析を行った。



To elucidate the function and formation mechanism of lipid rafts, single-molecule imaging of fluorescent glycosphingolipids is a powerful method. In this study, we have developed $NeuAcLc_4Cer$ and Lc_4Cer probes in which the terminal sugar was labeled with a dye. In the last annual meeting, we reported the synthesis of fluorescent $NeuAcLc_4Cer$ probe based on the late-stage sialylation strategy. Herein, we update the results in the examination of direct sialylation. Furthermore, we evaluated the properties of the synthesized probes, which showed the similar properties to those of natural glycosphingolipids. We also discuss the colocalization with the GPI-anchored protein CD59 and the homodimer formation of lacto-series glycosphingolipids in the cell membrane, which were revealed by single molecule imaging.

[1] N. Komura *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402. [2] N. Komura *et al.*, *Science* **2019**, *364*, 677.
[3] M. Takahashi *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2902. [4] S. Asano *et al.*, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 4197.

lacto-series glycosphingolipid, lipid raft, sialic acid

講演番号：4E03-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

生薬半夏の有効多糖アラバンを認識するモノクローナル抗体のエピトープ探索

Search for an Epitope of the Monoclonal Antibody that Recognizes the Effective Polysaccharide Araban in Crude Drug Hange

○佐藤 春菜[1]、栗木 淳寛[2]、田中 宏幸[3,4]、江口 壽彦[5]、松岡 健[1,2,5,6]([1]九大農、[2]九大生資環、[3]山口東京理科大薬、[4]九大院薬、[5]九大実生環セ、[6]九大院農)
○HARUNA SATO[1], ATSUHIRO KURIKI[2], HIROYUKI TANAKA[3,4], TOSHIHIKO EGUCHI[5], KEN MATSUOKA[1,2,5,6] ([1]Sch. Agr. Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Bio-Environ. Sci. Kyushu Univ., [3]Fac. Pharm. Sanyo-Onoda City Univ., [4]Fac. Pharm. Kyushu Univ., [5]Env. Cont. Ctr. Exp. Biol. Kyushu Univ., [6]Fac. Agr. Kyushu Univ.)

宿根草カラスビシャクの塊茎から製造される半夏は、その制吐性から 23%程度の漢方処方に用いられる重要な生薬である。半夏の制吐能はアラバンと呼ばれる多糖に起因している。アラバンは５種の単糖を構成要素とし１４種の糖-糖結合を有すると推定されているが、この多糖の生合成機構と、制吐性に関与する構造は明らかになっていない。我々はこれまでに、アラバンに対するモノクローナル抗体（αA-mAb）を作成し、アラバンの定量と漢方製剤中の半夏の存在確認のために利用してきた。今回、この抗体を利用してアラバン合成遺伝子の探索を進める第一歩として、αA-mAb の糖鎖認識特性を検討した。

アラバンが含まれる半夏由来の水溶性多糖（PTP）をコートした ELISA 法によるアラバン定量系を用いて、アラバン構成糖を含む１７種の単糖、自然界に多量に存在する計５種の２糖および３糖、並びに１４種の多糖の、αA-mAb のアラバン認識に対する阻害効果を検討した。これらの糖とαA-mAb を混合後直ちに ELISA に用いた場合には顕著な阻害を示すものは認められなかったが、糖とαA-mAb を混合し 1 晩静置後 ELISA を行うと、ペクチンの部分構造であるラムノガラクツロナン I （RG-I）存在下に反応の低下が認められた。この条件下における PTP と RG-I の IC_{50} 値はそれぞれ 60 μg/ml と 600 μg/ml と見積もられた。これらの結果は、RG-I の部分構造がαA-mAb に対するアラバンのエピトープと共通性を有する可能性を示している。

Hange, which is produced from the tubers of *Pinellia ternata*, is an important crude drug used in about 23% of Kanpo prescriptions with its antiemetic property. The antiemetic component in Hange is a polysaccharide called Araban. Araban is consisted with 5 monosaccharides with 14 different sugar-sugar linkages, but the biosynthetic mechanism of this polysaccharide has not been clarified. We generated a monoclonal antibody against Araban (αA-mAb). As the first step to identify Araban synthetic genes using this antibody, we investigated the characteristics of sugar chain recognition of αA-mAb. We found that rhamnogalacturonan I, which is a substructure of pectin, specifically inhibit the interaction between Araban and αA-mAb.

antiemetic glycan, monoclonal antibody, glycan epitope

講演番号：4E03-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム E

らっきょうフルクタンの正常ヒト皮膚線維芽細胞中の細胞外マトリックス生成に対する影響

Effect of Rakkyo Fructan on extracellular matrix in normal human dermal fibroblasts

○津久井 慶[1]、上沖 和己[2]、堂籠 究[3]、徳留 嘉寛[1,4,5]([1]城西大薬、[2]上沖産業、[3]宮崎工技セ、[4]佐賀大、[5]ジャパン・コスメティックセンター)
○Kei TSUKUI[1], Kazumi KAMIOKI[2], Kiwamu DOHGOMORI[3], Yoshihiro TOKUDOME[1,4,5] ([1]Josai Univ., [2]Kamioki Sangyo Co., Ltd., [3]Miyazaki Pref. Indus. Tech. Center, [4]Saga Univ., [5]Japan Cosmetic Center)

【目的】紫外線曝露や加齢に伴い、皮膚のシワや弾力低下などが生じる。これらの変化は真皮中のコラーゲンなど細胞外マトリックス（ECM）の減少が寄与しているとされる。したがって、ECM の産生を促進し、ECM 量を維持することは、皮膚のシワ・たるみなどの予防や改善につながることが考えられる。フルクタンはフルクトースが重合した水溶性食物繊維の一種である。近年、機能性オリゴ糖・多糖は様々な生理機能への効果が明らかになっているが、皮膚への作用はほとんど報告されていない。本発表ではらっきょう由来フルクタン（RF）が皮膚線維芽細胞の細胞外マトリックス生成に与える影響を検討した。【方法】正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDFs）を RF 含有培地で培養した。RF 適用後の NHDFs をシリウスレッドにより染色し、細胞結合型のコラーゲンを定量した。培養液中のコラーゲン、ヒアルロン酸を ELISA により測定した。mRNA を抽出し、ECM 生成代謝に関連する遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量した。【結果・考察】RF 適用 NHDFs において、コントロールと比較して細胞結合型コラーゲン、培養液中コラーゲンが共に増加した。また、コラーゲンの生成に関わる *Collagen*, *typeI*, *alpha1*（*COL1A1*）の遺伝子発現量が増加した。RF はコラーゲンの生成代謝遺伝子に作用することで、NHDFs においてコラーゲンの産生を促進することが示された。

[Purpose] UV exposure and aging cause wrinkles and loss of elasticity in the skin. These changes are related to the decrease of extracellular matrix (ECM) such as collagen in the dermis. Therefore, promoting the production of ECM and maintaining the amount of ECM leads to the prevention and improvement of wrinkles and loss of elasticity of the skin. Fructan is a fiber in which fructose is polymerized. In this study, we investigated the effects of fructan from rakkyo (RF) on the ECM production of skin fibroblasts. [Methods] Normal human dermal fibroblasts (NHDFs) were cultured in RF containing medium. After RF application NHDFs were stained with sirius red to quantify the cell-bound collagen. Collagen and hyaluronan in the culture supernatant were quantified by ELISA. The expression of genes related to ECM production and metabolism was quantified by real-time PCR. [Results and discussion] Cell-bound collagen and collagen in culture supernatant were increased in NHDFs after RF application compared to control (no RF present). Increased gene expression of *Collagen*, *typeI*, *alpha1* (*COL1A1*). It has been shown that RF promotes collagen production in NHDFs by acting on genes involved in collagen metabolism.

Rakkyo Fructan, dermis, extracellular matrix

発表責任者：徳留 嘉寛（domedome@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：4E05-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

異性化反応を利用するナイセリア LOS コア三糖の合成

Synthesis of a neisserial core trisaccharide via the anomerization of pyranoside with 2,3-*trans* carbamate

○一柳 剛[1]、冨樫 佳祐[2]、後久保 春花[1]、大谷 直輝[2]、眞鍋 史乃[3,4] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大院持続性社会創成科学、[3]星薬科大薬、[4]東北大薬)
○Tsuyoshi Ichiyanagi[1], Keisuke Togashi[2], Haruka Sedokubo[1], Naoki Ohtani[2], Shino Manabe[3,4] ([1]Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Tottori Univ., [3]Hoshi Univ., [4]Tohoku Univ.)

N-アセチル-2,3-*trans*-カーバメート基を有するグルコサミン誘導体を供与体とするグリコシル化は、反応条件によって生成するグリコシド結合の立体化学を制御可能で、生成した β-グリコシドは Lewis 酸処理で、α-グリコシドへと容易に変換可能であると報告されている[1]。本研究ではこの反応を利用して、Neisseria 属細菌が産生するリポオリゴ糖の中性コア糖鎖合成を検討した。

2 位に遊離水酸基を持つヘプトビオース誘導体に対して、上記グルコサミン供与体を用いるグリコシル化を行ったところ、活性化剤に TMSOTf/NIS を用いた場合 β 体を，AgOTf /NIS を使用した場合に α 体を選択的に得ることができた。収率の改善を目指して反応時に副生する化合物について調査を行った。その結果、アセチル化処理後に 3 種類の副生物を単離することができた。これらの構造解析を行ったところ、副生物の 1 つは、グリコシル化後にグルコサミン部位のピラノース環が開環した三糖であること、残りの 2 種類は、開環した三糖にグルコサミン供与体が付加した四糖誘導体のジアステレオマーであることがわかった。これらの結果より、グルコサミン誘導体の異性化が環内開裂反応を経由して進行することが確認できた。

In glycosylation using a glucosamine derivative with an *N*-acetyl-2,3-*trans*-carbamate group as a donor, the stereochemistry of the anomeric carbon can be controlled by setting the reaction conditions appropriately [1]. The resulting β-glycosides can be converted to α-glycosides by Lewis acid treatment [2]. In this study, we used this methodology to synthesize the neutral core trisaccharide of Neisserial lipooligosaccharide.

Glycosidation at the 2-OH group of the heptobiose derivative with the above glucosaminyl donor yielded the β-form when TMSOTf/NIS was used as the activator and gave the α-form when AgOTf/NIS was used selectively. In order to improve the yield of the trisaccharide, side products of the reaction were investigated. As a result, three kinds of byproducts were isolated after the acetylation process, and their structural analysis showed that one of the side products was a trisaccharide in which the pyranose ring of the glucosamine moiety was opened. The other two byproducts were diastereomers of tetrasaccharide derivatives in which a glucosamine donor was further added to the ring-opened trisaccharide. These results confirm that the isomerization of glucosamine derivatives proceeds via endocyclic cleavage reaction.

[1] S. Manabe, Y. Ito, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 2440-2446. [2] S. Manabe, H. Satoh, J. Hutter, H. P. Lüthi, T. Laino, Y. Ito, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 124–132.

lipoologosaccharide, 1,2−cis glycoside, isomerization

発表責任者：一柳剛（yanagi@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4E05-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

チオエーテル基を導入した糖供与体を用いた立体選択的グリコシル化

Stereoselective glycosylation using thioether-carried glycosyl donors

○久保田 直也[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大分子キラリティーセンター)
○Naoya KUBOTA[1], Yosihiro NISIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]MCRC)

近年のグリコシル化法の発展によりさまざまなグリコシド結合が形成可能となったが、1,2-*cis* 型グリコシドの形成は依然として困難を伴う。特に一級水酸基に対する 1,2-*cis* 型グリコシドの形成は難しく、糖鎖合成において解決しなければならない課題の一つとなっている。以前我々はチオエーテルを持つ糖受容体が糖供与体由来のカルボカチオン中間体と相互作用することで高い 1,2-*cis* 選択性が発現することを見出した。糖供与体にチオエーテル型保護基を導入する新たな 1,2-*cis* 選択的グリコシル化法を見出したので報告する。

ガラクトースの *O*-4 位に *o*-メチルベンゾイル（2-MTBz）基およびベンゾイル基を導入したフェニルチオ型糖供与体をそれぞれ調製し、6 位水酸基を持つグルコース型糖受容体とグリコシル化を行った。その結果、ベンゾイル基を導入した糖供与体に比べ（α:β＝3.3:1）、2-MTBz 基を導入したものではα選択性が飛躍的に向上した（α:β＝>19:1）。この結果から、糖供与体のアキシャル水酸基に導入したチオエーテル型保護基がカルボカチオンと相互作用することで高い 1,2-*cis* 選択性を誘発することが示唆された。様々な糖型糖受容体や *p*-ニトロフェノールやコレスタノールなどの非糖型アルコールとのグリコシル化においても同様に高い 1,2-*cis* 選択性を示した。

Even recent developments in glycosylation methods enabled us to form various glycosidic linkages, formation of 1,2-*cis* glycosides still remains difficulty. Particularly, 1,2-*cis* selective glycosylation with primary alcohols is one of the major issue in oligosaccharide synthesis. We previously developed 1,2-*cis* selective glycosylation method using thioether group-carried glycosyl acceptors on the basis of an interaction between the thioether group and carbocation from glycosyl donor. Here, we report alternative 1,2-*cis* selective glycosylation using thioether group-carried glycosyl donor. *o*-Methylbenzoyl (2-MTBz) and benzoyl groups were respectively introduced to *O*-4 position of phenylthio-type galactosyl donors, and their stereoselectivity in glycosylation with primary alcohol was evaluated. Glycosyl donor with 2-MTBz group obviously showed much higher 1,2-*cis* selectivity (α:β=>19:1) compared to that of glycosyl donor with benzoyl group (α:β=3.3:1). This result suggested that thioether group in axial position of the glycosyl donor promotes high 1,2-*cis* selectivity by interacting with a carbocation intermediate. Similarly, 1,2-*cis* selectivity was significantly enhanced in glycosylation with not only various sugar acceptors but also non-sugar alcohols such as *p*-nitrophenol and cholestanol.

glycosylation, carbohydrates, chemical synthesis

発表責任者：土肥 博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4E05-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

マンノシルエリスリトールリピッドの界面活性における構造依存性の解明

Elucidation of structural dependence of mannosyl erythritol lipids for the surfactant activity

○渡邉 恵[1]、佐々木 リサ[1]、仁科 宏美[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大分子キラリティーセンター)

○Megumi WATANABE[1], Risa SASAKI[1], Hiromi NISHINA[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]MCRC)

マンノシルエリスリトールリピッド（MEL）は、D-マンノースと D-エリスリトールとが β 結合し、マンノース部位の *O*-2, *O*-3 位に脂質が結合したユニークな構造を有する糖脂質である。現在まで *O*-4, *O*-6 位のアセチル基の有無により MEL-A, B, C の三種が発見されており、これらは高い界面活性や抗菌活性等を持つことから医薬品などへの応用が期待されている。過去に MEL-A の全合成が達成され[1]、鎖長が整った MEL ライブラリーを化学合成することで脂質長が抗菌活性に重要であることが見出されるなど[2]、化学的アプローチによる MEL の構造活性相関に関する研究が報告されてきた。本研究では MEL-A の抗菌活性に重要であると考えられる界面活性効果に着目し、グリコシド結合の立体構造や糖構造が異なる MEL-A 異性体ライブラリーを設計した。これらを合成し最小ミセル濃度(CMC)を評価することで界面活性における糖鎖部分の構造依存性の解明を目的とした。

D-Gal、D-Glc、および D-Man の *O*-2, *O*-3 位がラウリル化、*O*-4, *O*-6 位がアセチル化されたイミデート体をそれぞれ合成した。これらを糖供与体として別途調製したエリスリトール型糖受容体とグリコシル化を行い、得られたグリコシドを脱保護することで β-Gal 型、β-Glc 型および α-Man 型 MEL-A 異性体を得ることに成功した。これらの CMC を測定した結果、β-Gal 型と β-Glc 型は水溶性を示さなかったが、α-Man 型は水溶性であり MEL-A と同等の CMC を示した。この結果から、MEL-A の二本の脂肪鎖が 1,2-*cis* 型に配向することによって水中で安定なミセル構造を形成することが示唆された。

[1] Crich D., et al. *Tetrahedron* 58, 35 (2002); [2] Takahashi D., Toshima K., et al. *J. Org. Chem.* 83, 7281 (2018).

Mannosyl erythritol lipids (MELs) are glycolipids having β-mannosyl erythritol structure with two lipid chains at *O*-2 and *O*-3 positions of mannose. Three types of MELs, MEL-A, B, and C, have been found and they have attracted much attentions due to their high surfactant and antibacterial activities. To clarify the structure-activity correlation of MEL-A for the surfactant activity, we designed and synthesized a series of MEL-A isomers with different anomeric configuration and sugar structure and evaluated their surfactant activity by critical micelle concentration (CMC). β-Gal, β-Glc and α-Man type MEL-A isomers were obtained by regioselective functionalization and stereoselective glycosylation. The α-Man type isomer was soluble in water and showed the similar CMC to the natural MEL-A whereas β-Gal and β-Glc type isomers were insoluble in water. These results suggested that the 1,2-*cis* oriented fatty chains are required to form a stable micelle structure in water.

glycosylation, chemical synthesis, glycolipid

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4E05-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

生死をコントロールできる病原細菌を用いた高効率・高安全性生ワクチンの構築

Development of highly efficient and safe live vaccines using pathogenic bacteria with controlled viability

○加藤 祐輔[1]、長澤 裕哉[2]、中山 ももこ[2]、小川 洋介[2]、アリバム スワミシャ・デビ[2]、杉山 碧[2]、江口 正浩[2]、林 智人[2] ([1]農研機構・生物研、[2]農研機構・動衛研)
○Yusuke KATO[1], Yuuya NAGASAWA[2], Momoko NAKAYAMA[2], Yousuke OGAWA[2], Swarmistha Devi ARIBAM[2], Aoi SUGIYAMA[2], Masahiro EGUCHI[2], Tomohito HAYASHI[2] ([1]NARO, NIAS, [2]NARO, NIAH)

病原細菌に、生死をコントロールする遺伝回路を組み込んだプラスミドを導入して、生ワクチン株を作出する新しい技術の開発を進めている。生死のコントロールは、プラスミド上に毒素－抗毒素遺伝子および非天然アミノ酸 Z-Lys[1] による標的遺伝子特異的な翻訳スイッチ [2,3] を座乗させ、非天然アミノ酸依存的に抗毒素遺伝子産物の翻訳をオン／オフすることにより実現した [4]。この方法は、(1)単純に疾病の原因となる病原体にプラスミドを導入すれば作出できる、(2)自然界に存在しない非天然アミノ酸が生存に必須となるため、他個体や環境への拡散が確実に防げる、(3)非天然アミノ酸の供給・遮断により接種個体内におけるワクチン株の生存時間を調節できるので、免疫誘導に最適な条件を設定しやすい、など、従来法に対する優位が見込まれる。家畜感染症である大腸菌性ウシ乳房炎および家畜サルモネラ症の病原菌について、本法を適用してワクチン株を作成した。現在、免疫誘導能について研究を進めている。

We are developing a new technology to produce live vaccine strains using pathogenic bacteria that have been introduced with a plasmid that incorporates a genetic circuit to control life and death. The control of viability is achieved by using toxin-antitoxin genes and the target gene-specific translational switch [2,3] controlled by the unnatural amino acid Z-Lys [1] introduced on the plasmid to turn on and off the translation of the antitoxin gene product in Z-Lys dependent manner [4]. The advantages of this method over conventional methods are expected to be: (1) the vaccine can be produced by simply introducing a plasmid into a pathogen; (2) the spread of the vaccine to other individuals and the environment can be completely prevented since unnatural amino acids, which do not exist in nature, are essential for survival; and (3) the optimal conditions for inducing immunity can be easily set since the survival time of the vaccine strain in the inoculated individual can be adjusted by supplying or depleting Z-Lys. Vaccine strains for *E. coli* bovine mastitis and livestock salmonellosis were prepared by applying this method. We are currently studying the immunity induction ability of the vaccine.

[1] Yanagisawa T *et al. Chem Biol* 2008, *15*, 1187; [2] Minaba M & Kato Y *Appl. Environ. Microbiol.* 2014*, 80*, 1718; [3] Kato Y *ACS Synth. Biol.* 2018, *7, 8,* 1956; [4] Kato Y *PeerJ* 2015, *3*, e1247.

bacterial live-vaccine, biological containment, livestock infectious disease

発表責任者：加藤祐輔（kato@affrc.go.jp）

講演番号：4E05-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

機械学習による高度好熱菌由来タンパク質遺伝子の大腸菌発現情報から得た可溶性発現予測法の開発

Prediction of soluble expression of protein genes from highly thermophilic bacteria based on Escherichia coli expression information by machine learning

○松井 大亮[1,2]、山村 義弥[1]、鈴木 皓大[1]、北條 佑斗[1]、篠田 優[1]、中村 正樹[1]、榊原 一紀[1]、浅野 泰久[1] ([1]富山県大工、[2]立命館大生命)
○Daisuke MATSUI[1,2], Yoshiya Yamamura[1], Kodai Suzuki[1], Yuto Hojo[1], Suguru Shinoda[1], Masaki Nakamura[1], Kazutoshi Sakakibara[1], Yasuhisa Asano[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体を形成し、活性を示さないことが多く、このことは異種宿主による酵素の大量発現における大きな問題点である。これまでに大腸菌で不溶性画分に発現する植物由来酵素遺伝子への変異導入による可溶性発現[1]や、二次構造やアミノ酸配列の保存性、疎水性度に着目した変異導入法による可溶性発現手法を研究してきた[2]。本研究では、可溶性と不溶性画分に発現するそれぞれ 255 種類と 159 種類の高度好熱菌由来タンパク質のアミノ酸配列と大腸菌における各々の発現情報を機械学習に入力し、得られた計算機を用いて可溶性確率が高い置換部位を選抜、変異導入による可溶性発現への効果を検討した。およそ 75%の精度で可溶性確立を予測することができ、その計算機を用いて数種の酵素配列に対し、一残基ずつ他のアミノ酸に置換した酵素の可溶性確率を算出し、可溶性確率が高い置換部位を見出した。その部位への変異導入し、大腸菌で発現した結果、Arginine decarboxylase で 18 変異体中 8 変異体（44%）、Catechol 2,3-dioxygenase で 20 変異体中 14 変異体（70%）、Glutamate dehydrogenase で 20 変異体中 16 変異体（80%）、Lactate dehydrogenase で 19 変異体中 7 変異体（37%）に、可溶性画分の活性の検出や増加が見られた。この新たな取り組みを、化学工業および医療産業などに有効に利用することが大いに期待できる。

Recombinant gene expression is one of the key technologies to achieve large-scale production of enzymes. However, low protein expression caused by refolding problems is a challenge, even though it has many advantages. We have created several variants expressible with high activity and *in vivo* solubility by directed evolution based on successful structure-guided mutagenesis[1,2]. In order to facilitate the *in vivo* experiments for searching the soluble variants, we newly introduce a machine learning methodology which predicts the probability of soluble expression of target genes for various kinds of enzymes. We have examined the numerical experiments by using 414 protein data which includes 255 soluble proteins and 159 insoluble ones from *Thermus thermophilus* HB8 [2]. These data are used for training the neural network. Our acquired network could predict the soluble expression with about 75% accuracy. As a result, 8 out of 18 mutants (44%) of arginine decarboxylase, 14 out of 20 mutants (70%) of catechol 2,3-dioxygenase, 16 out of 20 mutants (80%) of glutamate dehydrogenase, and 7 out of 19 mutants (37%) of lactate dehydrogenase showed increased activity in the soluble fraction. It is highly expected that this new approach will be used effectively in the chemical and medical industries.

[1] Y. Asano et. al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 24, 607-616 (2011), [2]D. Matsui et. al., *Sci. Rep.*, 7, 9558 (2017)

soluble expression, machine learning, mutagenesis

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4E05-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

転写制御因子 XylS をバイオセンサーとして用いたトルエン分解酵素の基質特異性改変

Engineering of the substrate specificity of a toluene degrading enzyme using the transcriptional regulator XylS as a biosensor

○小川 友希[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構 CRIIM）
○Yuki OGAWA[1], Yohei Katsuyama[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

Pseudomonas putida 由来の XylMABC はトルエンやキシレンを安息香酸や *m*-トルイル酸に変換する酸化酵素群である。本研究ではこの経路の律速である XylM の基質特異性の拡張による、2,6-xylenol 変換能の向上を目指す。2,6-xylenol は、XylMA による芳香環側鎖メチル基の水酸化および XylBC によるヒドロキシメチル基の 2 段階酸化反応により、僅かに 3-メチルサリチル酸 (3MSA) に変換される。*P. putida* 由来の転写活性化因子 XylS は 3MSA と結合すると、Pm プロモーター下流遺伝子の転写を活性化する。Pm プロモーター下流に配置したアンピシリン耐性遺伝子と *xylS* をプラスミド上に保持する大腸菌（センサー株）は、3MSA 濃度依存的にアンピシリン耐性となるため、センサー株の生育により 3MSA 生産量を評価することができる。まず、XylMの推定基質結合部位周辺の 14 残基についてアラニンスキャニングを行い、活性に影響を与えるが、活性を消失させない 5 カ所を変異導入部位として選抜した。次に、これらに同時に飽和変異を導入して構築した *xylM* ライブラリーと *xylABC* を持つ大腸菌を 2,6-xylenol 存在下で培養し、その培養上清にアンピシリンを添加してセンサー株を培養した。その結果、センサー株の生育を指標として、5 個の変異 XylM を得ることができた。そのうち、XylM-F243L-N244S と XylM-D140V-V144C-L149R-N244S を持つ株は野生型の約 5~10 倍の 3MSA 生産能を示した。さらに、これらが有するシングルアミノ酸置換変異 XylM を用いた時の 3MSA 生産能を解析し、XylM-N244S を持つ株が野生型の約 7~14 倍の 3MSA を生産することを示した。

XylMABC in *Pseudomonas putida* oxidize toluene and xylene into benzoate and *m*-toluic acid, respectively. The purpose of this study is to improve the oxidation rate of 2,6-xylenol by engineering the substrate specificity of rate-determining XylM. XylMA slightly hydroxylates one of the two methyl groups of 2,6-xylenol. Subsequent oxidations of the hydroxymethyl group catalyzed by XylBC yield 3-methyl salicylate (3MSA). XylS in *P. putida* binds 3MSA to activate transcription from Pm promoter. *Escherichia coli* with plasmids harboring *xylS* and an ampicillin-resistance gene under the control of Pm promoter (sensor strain) showed 3MSA-dependent ampicillin resistance. We performed alanine scanning around the putative substrate binding site of XylM and selected five residues for saturation mutagenesis. The *xylM* library and *xylABC* were introduced into *E. coli* and the cells were cultured in the presence of 2,6-xylenol. Then, the culture supernatant was used for cultivating the sensor strain after ampicillin addition. By screening for well-grown strains, we obtained a strain producing XylM-N244S, which showed 7~14 times higher 3MSA production than that producing wild-type XylM.

enzyme engineering, biosensor, XylS

講演番号：4E05-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

簡便なシトルリン定量を目指した酵素の開発

Development of an enzyme for simple determination of citrulline

○鉞 陽介、山本 圭、荒木 康子、一柳 敦（キッコーマン研開本部）
○Yosuke MASAKARI, Kei YAMAMOTO, Yasuko ARAKI, Atsushi ICHIYANAGI (Kikkoman Corp. R&D Div.)

L-シトルリンは尿素サイクルを構成するアミノ酸の 1 つであり、一酸化窒素の合成に関与している。また、シトルリン血症などの尿素サイクル障害において、血中 L-シトルリン濃度は病態の指標として用いられ、簡便で迅速に L-シトルリンを測定する方法が求められている。L-シトルリンを測定する方法として HPLC 法や酵素法が開発されているが、HPLC 法では高価な装置を必要とし、酵素法では 4 種類の酵素が必要で手順が煩雑である。そこで本研究では、L-シトルリンを直接酸化し、1 種類の酵素のみで測定可能な酵素法の開発を目指した。

まず、L-シトルリンと構造が類似している L-アルギニンと特異的に反応する *Pseudomonas* 属由来アルギニン酸化酵素(ArgOX)に着目した。正電荷を帯びるアルギニン側鎖と相互作用している ArgOX の酸性アミノ酸を中性アミノ酸に変異させることで Cit に作用する酵素に改変できないか検討した。次に、ArgOX 変異体を大腸菌で発現させ、熱処理とクロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、ArgOX/E62Q 変異体や ArgOX/E486Q 変異体は、Cit に対する反応性が向上した。

L-citrulline (Cit) is one of the amino acids that make up the urea cycle and is involved in the synthesis of nitric oxide. Since blood L-citrulline concentration is used as a biomarker of urea cycle disorders such as citrullinemia, there is a need for a simple and rapid method to measure Cit. Although high performance liquid chromatography (HPLC) and enzymatic method have been developed to measure Cit, the HPLC method requires expensive instruments and the enzymatic method requires four different enzymes, which makes the measurement complicated. In this study, we aimed to develop a novel enzymatic method for the direct oxidation and detection of Cit using only one enzyme.

First, we focused on L-arginine (Arg) oxidase (ArgOX) from *Pseudomonas* sp. capable of acting specifically on Arg which is structurally similar to Cit. Since ArgOX is estimated to recognize a cationic sidechain of Arg with the acidic amino acids, mutating them with neutral ones has potential to convert ArgOX to an oxidase capable of acting on Cit. The ArgOX mutants were expressed in *E. coli* and purified by heat treatment and chromatography. ArgOX/E62Q and ArgOX/E486Q showed enhanced reactivity with Cit.

citrulline, arginine oxidase, enzymatic measurement

発表責任者：鉞　陽介（ymasakari@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：4E05-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

合理的変異導入法によるヤンバルトサカヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの凝集ホットスポットの解析

Analysis of aggregation hotspots in hydroxynitrile lyase from *Chamberlinus hualienensis* using rational mutagenesis

○篠田 優、浅野 泰久（富山県大・生工研セ）
○Suguru SHINODA, Yasuhisa ASANO (Toyama Pref. Univ.)

【目的】ヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）は、シアノヒドリン化合物の合成と分解反応を触媒する酵素であり、マンデロニトリル等のシアノヒドリン化合物の工業生産において有用な酵素である。これまでに当研究室では、ヤンバルトサカヤスデ由来 HNL（ChuaHNL）を発見し、その酵素特性解析や X 線結晶構造解析を行ってきた [1, 2)]。ChuaHNL は、報告されている HNL と比較しても非常に比活性が高く、産業用酵素として優れた特徴を持っている [1)]。しかし、本酵素は大腸菌で不溶性発現し、可溶性・活性型で得られないことが、タンパク質工学や大量生産を検討する際の問題点となっていた。本研究では、ChuaHNL の一次構造と大腸菌で可溶性発現する他のヤスデ由来 HNL のそれらとを比較し、保存性が低いアミノ酸残基を置換することで、不溶性発現に関わるアミノ酸残基の解析を行った。
【方法・結果】本研究では、大腸菌で可溶性発現する 3 種類のヤスデ由来 HNL（OgraHNL、NttHNL、NtmHNL、相同性 70%程度）[3)] と ChuaHNL の一次構造を用いてシーケンスアラインメントを行った。その結果、ChuaHNL の N 末端部分に保存性が低い領域が検出された。次に ChuaHNL の保存性が低い N 末端領域を OgraHNL の N 末端配列と置換した変異体を作製し、大腸菌にて発現したところ、酵素活性測定により可溶性・活性型での発現が確認された。さらに置換した N 末端領域を細分化していくと、4 つのアミノ酸残基からなる領域が大腸菌での可溶性発現に重要であることが分かった。

1) M. Dadashipour, *et. al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112 (34), 10605-10610 (2015).
2) F. Motojima, *et. al.*, *FEBS J.*, 288 (5), 1679-1695 (2020).
3) T. Yamaguchi, *et al.*, *Sci Rep.*, 8 (1), 3051 (2018).

Hydroxynitrile lyase (HNL) is an enzyme that catalyzes the synthesis reaction and decomposition reaction of cyanohydrin compounds, and is a useful enzyme in the industrial production of cyanohydrin compounds. In previous research, our laboratory has discovered HNL from *Chamberlinius hualienensis* (ChuaHNL), characterized the enzyme properties, and analyzed the three-dimensional structure[1,2)]. ChuaHNL is an attractive biocatalyst showing high specific activity and high enantioselectivity[1)]. However, insoluble expression in *Escherichia coli* has been a problem in protein engineering and large-scale production of the enzyme. In this study, we introduced a rational mutation into ChuaHNL using the sequence alignment based on the primary structure of ChuaHNL and soluble expressed millipede HNLs to improve the soluble expression.

hydroxynitrile lyase, aggregation, *Chamberlinus hualienensis*

講演番号：4E05-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

麹菌における C 源代謝に関連する転写因子の制御機構の網羅的解析

Comprehensive analysis of regulatory mechanisms of transcription factors related to C source metabolism in Aspergillus oryzae.

○小笠原 菜々子、水谷 友香、岡 大椰、兒島 孝明、中野 秀雄 (名古屋大学農)
○Nanako OGASAWARA, Tomoka MIZUTANI, Hiroya OKA, Takaaki KOJIMA, Hideo NAKANO (Nagoya Univ.)

転写因子は DNA と相互作用することで下流遺伝子の発現を制御するタンパク質の総称である。この転写因子は、転写制御ネットワークの中枢を担っており、その機能は極めて重要である。当研究グループではこれまでに、ゲノム DNA より作製したゲノムライブラリーから標的タンパク質に結合する DNA 領域を選択的に濃縮する方法 gSELEX-Seq を駆使し、様々な転写因子の機能解析を行ってきた。本研究では、産業微生物 *A. oryzae* の C 源の資化能に着目し、上記解析システムによって取得した転写制御機構の知見をベースとした改変型 *A. oryzae* の育種技術の基盤構築を目的としている。

A. oryzae 由来の C 源代謝に関与する転写因子をコードする遺伝子の N 末端に MBP 配列を付加した発現コンストラクトを用いて、無細胞タンパク質合成系によって目的転写因子を調製する手法の確立を試みた。この手法によって調製された発現タンパク質を蛍光標識し、SDS-PAGE に供したところ、今回用いた 4 種の転写因子すべてにおいて可溶性画分への発現を確認した。そこで、これらの各転写因子と *A. oryzae* ゲノムライブラリーを用いた gSELEX を実施し、各転写因子が結合する DNA を選択的に濃縮した。現在、ナノポアシーケンサーを用いた選択 DNA プールの解析を行っている。

Transcription factors are a general term for proteins that regulate the expression of downstream genes by interacting with DNA. These proteins play a central role in the transcriptional regulatory network, thus, their functions are extremely important. In this study, we focused on the ability of the industrial microorganism *A. oryzae* to utilize C sources and attempted to construct the basis for breeding technology of an improved *A. oryzae* based on the knowledge of the transcriptional regulation mechanism obtained by gSELEX-Seq.

In this study, we attempted to establish a method for the rapid and simple preparation of target transcription factors by using cell-free protein synthesis system using expression constructs with MBP sequences attached to the N-terminal of a transcription factor involved in C-source metabolism in *A. oryzae*, without using living cells. When the expressed proteins prepared by this method were fluorescently labeled and subjected to SDS-PAGE, the expression of all four transcription factors used in this study was confirmed in the soluble fraction. Then we performed gSELEX using these transcription factors and an *A. oryzae* genomic library to selectively enrich for DNA bound by each transcription factor. Currently, we are analyzing the selected DNA pools using a Nanopore sequencer.

transcription factors, A. oryzae, gSELEX

講演番号：4E05-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム E

細胞内糖化計測法の開発及び糖化の細胞影響解析への応用

Development of intracellular glycation monitoring system and its application for analysis of glycation effect on cells

○三上 あかね[1,2]、アリ ヤニファオザニ[2,3]、小島 祥也[1]、杉本 千実[1]、加柴 美里[2] ([1]東京工科大医療、[2]東京工科大院バイオ、[3]オイルガス技術開発研究センター)
○Akane MIKAMI[1,2], Yani Faozani Alli[2,3], Shoya Kojima[1], Yukimi Sugimoto[1], Misato Kasiba[2] ([1]School of Health Sciences, Tokyo Univ. of Tech., [2]Graduate School of Bionices, Computer and Media sciences, Tokyo Univ. of Tech., [3]Research and Development Centre for Oil and Gas Technology)

非酵素的糖化反応は生体内及び細胞内において普遍的に起こる．細胞内においては，タンパク質やDNA，脂質がグルコース及びその誘導体によって糖化される一方，fructosamine-3-phosphate kinase (FN3K)等の脱糖化酵素によって糖化が制御されることが明らかとなっている[1)]．また細胞内の糖化と脱糖化のバランスが細胞機能及びエピジェネティック制御に影響し，がんや加齢関連疾患の進行などの発症・進行に関与することが示唆されている[2)]が，詳細な細胞内糖化機構及び疾患進行への関与機構は解明されていない．細胞内糖化計測法は細胞内糖化解析に寄与するとして期待される．そこで本研究では，新規の糖化反応産物に特異的に応答する細菌由来転写調節因子を用いてヒト細胞内糖化計測法を構築した．また本技術を数種類の疾患モデル細胞に導入し細胞内糖化及び糖化に関与する因子の解析を試みた結果，細胞内糖化レベルの挙動は各細胞種によって顕著に異なり，及び細胞内糖化制御に関与する因子は細胞種毎に異なることが示唆された．今後，本技術を用いた各細胞における細胞内糖化亢進の責任因子の解明は細胞内糖化の疾患進行関与機構解明へ寄与するとともに，本技術の新規バイオマーカー開発及び薬剤スクリーニング法としての応用が期待される．

Intracellular glycation (IG) affects cellular functions including differentiation, proliferation, and epigenetic regulation[1)]. IG is implicated in the development of several diseases, such as cancers and age-related diseases[2)], detail IG mechanisms and its effect on pathogenesis of these diseases are however still unrevealed. In this paper, we demonstrated the construction of a novel monitoring system for IG employing a glycation product responsible transcriptional regulator, which is expected to be a useful tool for IG studies. The system was then applied to investigate the IG and IG controlling factors on cancer cells as well as antioxidant deficient cells as aging cell models. The results showed that the IG level was clearly different among the cell types, and the controlling factors might to be also different for each cell type. The IG monitoring system developed in this study is thus expected to contribute to the elucidation of responsible factors for IG level and IG involvement mechanism on the disease progression, as well as to the screening of novel biomarkers and antiglycation agents.

1) O. Zheng, et al., *Nat. Commun.*, 2019, 10, 1289.
2) S. Rowan, et al., *BBA-Mol. Basis Dis.*, 2018, 1864:3631-3643

intracellular glycation, intracellular monitoring system, age-related disease

発表責任者：三上あかね（amikami@stf.teu.ac.jp）

講演番号：4E06-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

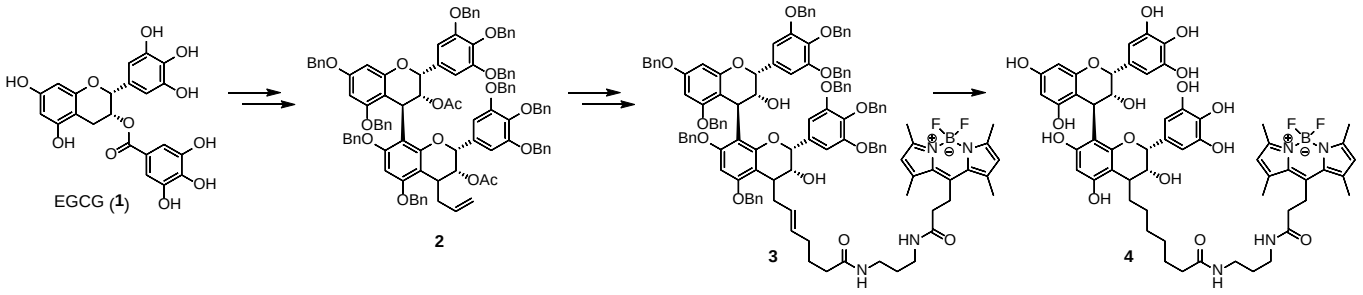
プロアントシアニジン類蛍光プローブの合成研究

Synthetic studies on proanthocyanidin fluorescent probe

○小林 周平[1]、河村 篤[2]、真壁 秀文[2] ([1]信大総合理工農、[2]信大バイオメディカル研)
○Shuhei KOBAYASHI[1], Atsushi KAWAMURA[2], Hidefumi MAKABE[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. Biomedical)

生活習慣病が大きな問題となっている現代社会において、ブドウやリンゴ等に含まれるプロアントシアニジン類(PAs)が有するガンや心疾患等への効果が期待されているが, その作用機序は明らかにさていない. そこで, PAs 蛍光プローブを合成し, 細胞内動態を確認することとした.

まず, PAs の一種であるエピガロカテキン二量体(EGC2)に対する蛍光基の導入を試みた. 出発物質として, EGCG (**1**)を用いて, 4 段階の反応を経て末端オレフィン **2** を合成した. 得られた **3** に対して, クロスメタセシスによるカルボン酸の導入, アセチル基の脱保護, 蛍光基(BODIPY)部位との縮合反応によってアミド **3** を得た. 最後に, **3** のベンジル基を脱保護することで EGC2 蛍光プローブ **4** を得た. 現在, 収率の改善を行っている. 今後, 細胞増殖抑制活性の作用機序解明を行う予定である.



Proanthocyanidins are polyphenolic products of the secondary metabolism of plants. These compounds are reported to show a wide variety of biological activities such as inhibition of cancer cell growth.

We have reported the synthesis of procyanidin B2 which has (–)-epicatechin as a constitutional unit and prodelphinidin B2 whcih has (–)-epigallocatechin. As to the inhibition of cancer cell growth, prodelphinidin B2 has significant activity, however, procyanidin B2 has not. To clarify the mechanism of antitumoral activity, identification of targeted protein is necessary. Thus, we launched the synthesis of fluorescent probe of prodelphinidin B2.

EGCG was used for the starting material. EGCG was transformed in to compound **2** via self condensation using Lewis acid. Chain elongation using Grubbs cross-metathesis gave carboxylic acid. Amidation between carboxylic acid and BODIPY unit gave **3** followed by deprotection of the benzyl group and saturation of the double bond afforded **4**. Improvement of the yield of the deprotection step is now under way.

fluorescent probe, synthesis, proantocyanidin

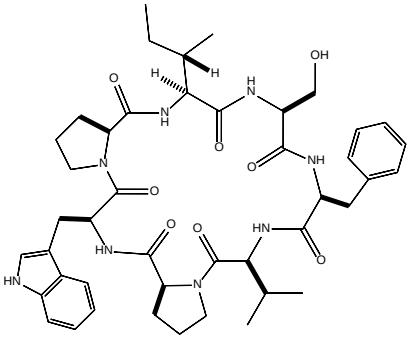
講演番号：4E06-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

アミノ基の可逆的検出技術 ReD-A 法： Stylissamide H 固相合成への適用

Reversible detection method for amino groups, ReD-A Method: Appliction to solid phase synthesis of Stylissamide H

○長内 肖廉、高松 啓吾、今野 博行（山形大工）
○Seren OSANAI, Keigo TAKAMATSU, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ)

ペプチド固相合成法における N 末端アミノ基検出法であるカイザーテストは、プロリンなどの 2 級や 3 級のアミノ基を検出できず、さらに使用した樹脂を使い捨てる。我々は *N*-Hydroxyphthalimide を用いた新しい可逆的アミノ基検出法「ReD-A 法」を開発した。本方法は樹脂を次の反応に利用でき、加熱不要で、2 級や 3 級のアミノ基も検出できる。本研究では、海綿由来のプロリン含有環状ペプチド Stylissamide H の合成の追跡から ReD-A 法の有用性を示すことを目的とした。


Stylissamide H

Stylissamide H 前駆体鎖状ペプチドは 2-CT 樹脂上で Fmoc-SPPS で調製した。各カップリング反応をカイザーテスト及び ReD-A 法で追跡し、比較した。カイザーテストではプロリン N 末端アミノ基の検出が困難であったが、ReD-A 法では検出できた。その後得られた鎖状ペプチド PWPISFV を DMF 中 DIPCI/HOBt/DIPEA で 24 時間、室温で処理したところ目的物である Stylissamide H が得られた。Stylissamide H の初の合成法を提案することができた。

The Kaiser test, a method for detecting N-terminal amino groups in the solid phase peptide synthesis, cannot detect secondary or tertiary amino groups such as proline. In addition, the resin used must be discarded. We have developed a new reversible detection method for amino groups, the ReD-A method, using NHPI. This method allows the resin to be used for the next reaction, does not require heating, and can detect secondary and tertiary amino groups. In this study, we aimed to demonstrate the utility of the ReD-A method by tracing the synthesis of a proline-rich cyclic peptide, Stylissamide H, isolated from marine sponges.

Precursor linear peptide of Stylissamide H was prepared by Fmoc-SPPS on 2-CT resin. Each coupling reaction and deprotection was traced and compared by Kaiser test and ReD-A method.

The N-terminal amino group of proline residue could not be detected by the Kaiser test but could be detected by the ReD-A method. The obtained linear peptide PWPISFV was then treated with DIPCI/HOBt/DIPEA in DMF for 24 h at room temperature to give the desired peptide, Stylissamide H. We succeeded in proposing the first synthetic method for Stylissamide H.

ReD-A method, proline-rich peptide, Stylissamide H

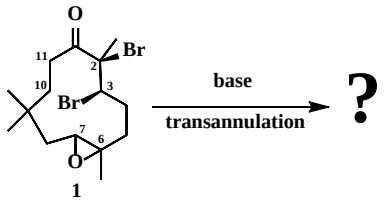
講演番号：4E06-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

ジブロモゼルンボン誘導体の反応性を利用した新規多環式化合物の構築

Synthesis of complex and structurally diverse scaffolds using reactivity of dibromozerumbone

○西澤 拓未[1]、柏崎 玄伍[1]、吉川 知美[1]、河合 靖[2]、北山 隆[1] ([1]近畿大院農、[2]長浜バイオ)
○ Takumi Nishizawa[1], Gengo KASHIWAZAKI[1], Tomomi YOSHIKAWA[1], Yasushi KAWAI[2], Takashi KITAYAMA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Nagahama Inst.)

多様な反応性を有する天然物を利用した多様性指向型合成（NMRDOS）[1-3]の重要な出発物質となるゼルンボンに 2 つの臭素を付加させた 2,3-ジブロモゼルンボンは，様々な求核剤との反応で渡環反応が進行し，三員環や四員環骨格を形成する[1]。興味深いことに，これらの中には高いがん細胞増殖抑制効果を示す誘導体も存在する。そこで，本反応の汎用性を高めるために， 2,3 位に臭素を有し，6,7 位にエポキシ基を導入し，10,11 位のオレフィンを還元したゼルンボン誘導体（**1**）の合成を試みた。ゼルンボンの 10,11 位のオレフィン還元後，臭素化すると 7 位まで臭素付加してしまうため，エポキシ基で保護し，**1** を合成した。2,3-ジブロモゼルンボンにエポキシ基を導入した誘導体において渡環反応が進行することは既に報告されているが[4]，本研究においては**1** の 11 位の水素の引き抜きからも渡環反応が進行するか検討を行った。



Zerumbone, is a successful example of the important starting materials in “Natural Material-Related Diversity-Oriented Synthesis (NMRDOS)”[1-3] 2,3-dibromozerumbone, which is easily prepared from zerumbone, produces novel polycyclic compounds having a three- or four-membered ring substructure via transannulation triggered by the various nucleophiles.[1] It is interesting that some of them show a high antiproliferative activity toward a cancer cell line. Inspired by these results, we tried to synthesize a zerumbone derivative (**1**) by bromination at C2 and C3, epoxidation between C6 and C7, and hydrogenation at C10 and C11. This epoxy group was introduced to prevent bromination at C7 during the bromination of C2 and C3. It has already been reported that 2,3-dibromo-6,7-epoxyerumbone undergoes the transannulation,[4] but in this study, we explored transannulation starting from abstraction of the proton at C11 with various bases.

1. Utaka, Y. *et al. J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 8371–8386.
2. Kitayama, T., Utaka, Y. *In Future Directions in Biocatalysis*, 2nd ed.; Matsuda, T., Ed.; Elsevier Bioscience: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp 297–312.
3. Kitayama, T. *et al. Tetrahedron* **2006**, 62, 10859–10864.
4. Kitayama, T. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2193–2199.

zerumbone, nmrdos, transannulation

発表責任者：柏埼玄伍（kashigen@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4E06-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

抗菌活性環状デプシペプチド hypeptin に含まれる β-ヒドロキシアミノ酸の合成

Synthesis of β-hydroxy amino acids constituting hypeptin, an antimicrobial cyclodepsipeptide

○橋詰 和記、稲垣 穣、増田 裕一（三重大院生物資源）
○Kazuki HASHIZUME, Minoru Inagaki, Yuichi Masuda (Graduate School of Bioresources, Mie Univ.)

hypeptin (Fig.1) は、土壌中の微生物 *Pseudomonas* PB-6269 株 [1] と *Lysobacter* K5869 株 [2] が生産する環状デプシペプチドであり、様々なグラム陽性菌に対して強い抗菌性を示す。本研究グループでは、hypeptin に含まれるβ-ヒドロキシアミノ酸の機能解明を目的とし、本化合物の全合成研究を行っている。hypeptin の合成は Fmoc 固相合成法によりアミノ酸を伸長した後、マクロラクタム化により行うことを計画した（Fig. 1)。本研究では、hypeptin の合成に用いる、β-OH-Asn 誘導体 **1**, **2** とβ-OH-Leu 誘導体 **3**, β-OH-Tyr 誘導体 **4** の合成を行った。

β-OH-Asn 誘導体 **1**, **2** は *trans*-, *cis*-エポキシコハク酸をそれぞれの出発物質とし、ジアステレオマー塩晶出法によって光学分割してβ-OH-Asp を得た後、官能基の変換と保護を行って **1**, **2** の合成を達成した。β-OH-Leu 誘導体 **3** は、Garner's aldehyde を出発物質とし立体選択的なアルキル基の導入を行うことで合成した。現在、β-OH-Tyr 誘導体 **4** の合成を進めている。

Hypeptin (Fig. 1) is produced by *Pseudomonas* sp. PB-6269 [1] and *Lysobacter* sp. K5869 [2]. It is a cyclodepsipeptide containing β-hydroxy amino acid and exhibits potent antimicrobial activity against a variety of gram-positive bacteria. We planned to synthesize hypeptin by Fmoc solid-phase peptide synthesis and subsequent macrolactamization (Fig. 1). We embarked on the synthesis of β-OH-Asn, β-OH-Leu and β-OH-Tyr derivatives **1**–**4**, which are needed for total synthesis of hypeptin.

β-OH-Asn derivatives **1** and **2** were synthesized from *trans*- and *cis*-epoxysuccinic acids, respectively. Racemic mixtures of epoxysuccinic acids or β-OH-Asp were separated by optical resolution *via* diastereomeric salt formation. β-OH-Leu derivative **3** was synthesized stereoselectivealkylation to Garner's aldehyde. We are synthesizing β-OH-Tyr derivative **4**.

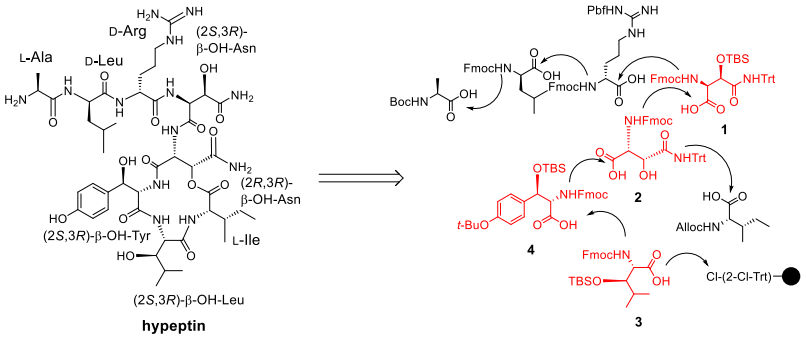


Fig. 1 Retrosynthesis of hypeptin

【参考文献】
[1] Shoji, J., *et al.* (1989) *J. Antibiot. (Tokyo)*,**42**, 1460–1464.
[2] Crüsemann, M., *et al.* (2021) *Angew. Chem Int. Ed.*, **60**, 1357.

antibiotics, β-hydroxy amino acid, cyclodepsipeptide

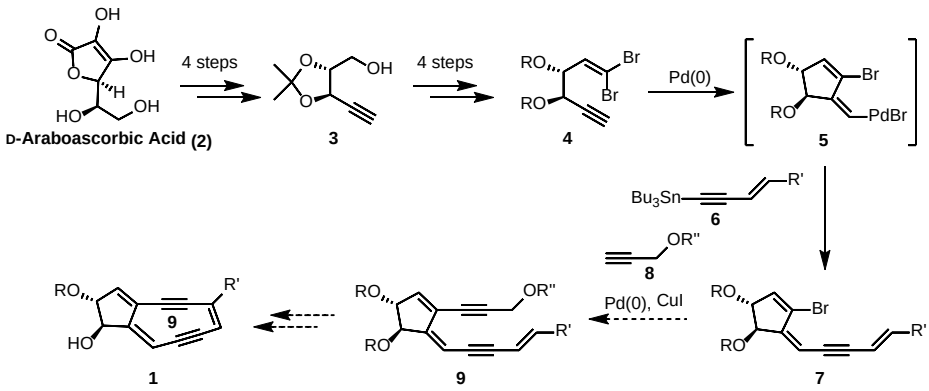
発表責任者：増田　裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4E06-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

９員環エンジイン構造の新規合成法の開発

Development of a new synthetic method for 9-membered enediyne structure

○浅野 耕太、二木 美咲、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Kota ASANO, Misaki NIKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)



ネオカルチノスタチンや C-1027 などの抗生物質は、9 員環エンジイン構造から生じるフェニルビラジカル種が二重鎖 DNA を切断することで強力な抗腫瘍活性を示す。近年、この構造がガン治療薬における抗体薬物複合体（ADC）のペイロードとして期待されている。我々は、従来とは異なる 9 員環エンジイン構造の新しい合成法の開発を目的として研究を開始した。

市販の D-アラボアスコルビン酸(2)から文献既知の方法で 3 を得た。次いで、3 の水酸基を酸化・Corey-Fuchs 法の条件に付し、ジブロモオレフィン 4 を合成した。続いて、スズアセチレン 6 存在下で 4 に Pd 触媒を作用させると、分子内カルボパラデーションと 6 との Stille カップリング反応が連続的に進行して 7 が得られた。現在、7 と 8 のカップリング反応による 9 の合成を検討中である。本講演では、これらの結果について報告する。

Antibiotics with a 9-membered enediyne structure such as Neocarzinostatin and C-1027 generate phenyl biradical species, which cleavage double-stranded DNA resulting in potent antitumor activity. Recently, this structure is expected to be a payload for an antibody-drug conjugate (ADC) in cancer therapeutics. We have investigated a new synthetic method for the 9-membered enediyne structure which is different from conventional methods.

Compound **3** was synthesized from commercially available D-araboascorbic acid (**2**) by known methods. Hydroxy group of **3** was oxidized, and dibromoolefination by Corey-Fuchs method gave **4.** Pd-catalyzed tandem coupling reaction of **4** in the presence of tin acetylene **6** gave **7** through intramolecular carbopalladation followed by Stille coupling reaction. Currently, synthesis of **9** by the coupling reaction of **7** with **8** is under investigation.

cyclic enediyne, antitumor antibiotic, Pd-catalyzed cyclization

発表責任者：西川俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E06-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

ピクロトキシニンの合成研究

Synthetic studies on picrotoxinin

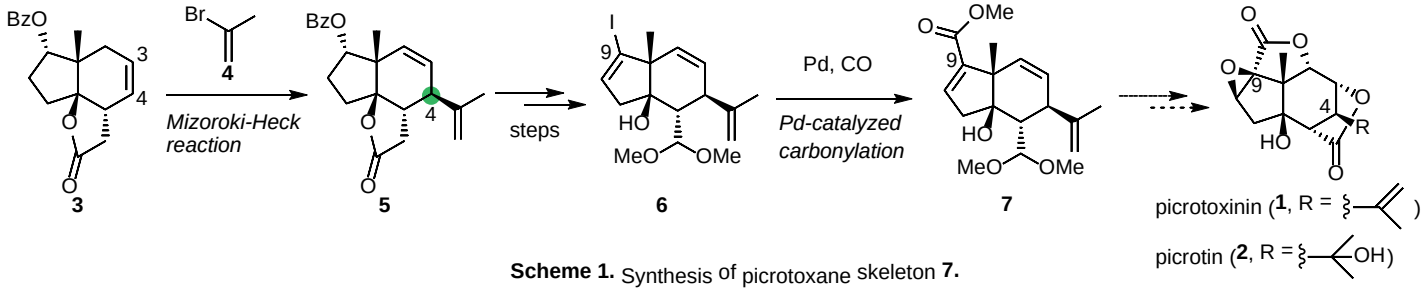
○松村 泰志[1]、西川 俊夫[1]、中崎 敦夫[2] ([1]名大院生命農、[2]岩手大理工)
○Taishi MATSUMURA[1], Toshio NISHIKAWA[1], Atsuo NAKAZAKI[2] ([1]Nagoya University, [2]Iwate University)

ピクロトキシニン(**1**)とピクロチン(**2**)は、コウモリカズラ属植物から単離された、GABA 受容体の阻害活性を示すセスキテルペンである。**1** と **2** の混合物は、ダウン症モデルマウスの記憶力を改善する活性が近年報告されており、ダウン症の治療薬として期待されている。そこで、我々は、**1** を合成し、神経科学分野へ供給することで、その作用機序の解明と新たな治療薬の開発に貢献できると考え、合成研究を開始した。本研究では、当研究室で強心ステロイド系天然物の共通中間体として開発された三環性ラクトン **3**[1] を用いて **1** の合成を検討した。

三環性ラクトン **3** とイソプロペニルブロマイド **4** との溝呂木-Heck 反応を種々検討したところ、4 位選択的なカップリングが進行し、目的のジエン **5** を得ることができた。その後、数工程の変換によりヨウ化アルケン **6** へ変換し、Pd 触媒を用いたカルボニル化によって、**1** の全炭素骨格を持つピクロトキサン骨格 **7** の合成に成功した。本発表では、その後の検討についても報告する。

Picrotoxinin (**1**) and picrotin (**2**), isolated from plant menispermun cocculus, are inhibitors of GABA receptor to stun fish and mammals. A mixture of **1** and **2** exhibits useful therapeutic properties such as normalization of the memory performance of Down's syndrome model mice. In order to supply **1** to neuroscientific field, we started the synthesis of **1** from tricycle **3**, which has been used as a common intermediate to obtain cardiotonic steroids in our laboratory.[1]

Mizoroki-Heck reaction of **3** and isopropenyl bromide **4** proceeded site-selectively to afford desired diene **5** in good yield. Pd-catalyzed carbonylation of alkenyl iodide **6** provided picrotoxane skeleton **7**, which contains all the requisite carbons for the synthesis of **1**. In this presentation, further examinations toward total synthesis of **1** will also be disclosed.



Scheme 1. Synthesis of picrotoxane skeleton **7.**

[1] Watanabe, S.; Nishikawa, T.; Nakazaki, A. *J. Org. Chem*. **2021**. *86*, 3605.

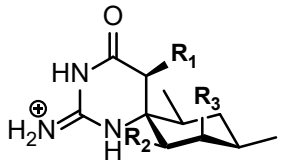
total synthesis, picrotoxinin, Mizoroki-Heck reaction

講演番号：4E06-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

テトロドトキシンの推定生合成中間体 Tb-210B、Tb-226、Tb-242C、Tb-258 の全合成

Total synthesis of Tb-210B, Tb-226, Tb-242C, and Tb-258, proposed biosynthetic intermediates of Tetrodotoxin

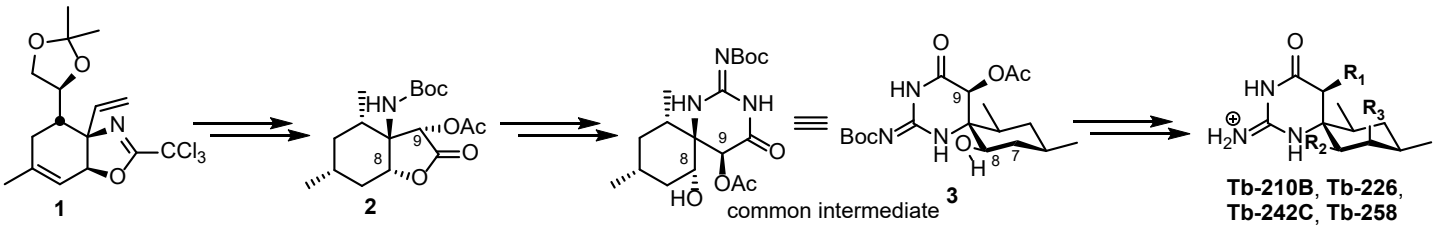
○西海 眞史[1]、安立 昌篤[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○Masafumi NISHIUMI[1], Masaatsu ADACHI[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ.)



	R_1	R_2	R_3
Tb-210B	H	H	H
Tb-226	OH	H	H
Tb-242C	OH	OH	H
Tb-258	OH	OH	OH

フグ毒として有名なテトロドトキシン(TTX)は、海洋細菌が生産し食物連鎖によってフグに生物濃縮されていると考えられている。多数の TTX 生産菌が報告されているにも関わらず、その生合成経路や生合成遺伝子は未解明である。東北大学の山下らは、フグから **Tb-210B**, **Tb-226**, **Tb-242C**, **Tb-258** などを単離し、その構造的特徴から、これらを TTX の生合成中間体と推定した[1]。本研究は、これら推定生合成中間体の合成と構造確認、また、その安定同位体標識化体を合成し、生物への取り込み実験を通して、TTX の生合成システムを解明することを目的とした。今回我々は、当研究室で用いられてきた TTX 類の中間体 **1**[2]から共通中間体 **3** を合成し、その C7、C8、C9 位の酸化段階を整えることで **Tb-210B**, **Tb-226**, **Tb-242C**, **Tb-258** の全合成を達成し、それぞれの構造を確認した。

Tetrodotoxin (TTX) is well-known as a pufferfish poison. Although many TTX-producing bacteria have been identified, the biosynthetic pathway and the enzyme of genes have not yet been elucidated. Recently, Yotsu-Yamashita and co-workers isolated Tb-compounds from a pufferfish and speculated that they are biosynthetic intermediates of TTX. This study aims to synthesize these Tb-compounds to confirm their structures and to synthesize their stable isotope-labeled compounds for feeding experiments. Currently, we succeeded in total synthesis of **Tb-210B**, **Tb-226**, **242C** and **Tb-258** from common intermediate **3** prepared from intermediate **1**[2].



References

1) Yotsu-Yamashita, M. *et al*. *Chem. Eur. J*. **2018**, *24*, 7250.

2) Nishikawa, T. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1999**, *38*, 3081.

Total synthesis, Tetrodotoxin

講演番号：4E06-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

天然・生物活性物質合成を志向した、メトキシベンゼン類の合成研究

Synthetic studies on polymethoxybenzenes toward natural and bioactive compound syntheses

○須貝 威、斉 子煜、本田 桂子、橋本 理一、小林 俊文、花屋 賢悟、東林 修平 (慶應大薬)
○Takeshi SUGAI, Ziyu Qi, Keiko Honda, Riichi Hashimoto, Toshifumi Kobayashi, Kengo Hanaya, Shuhei Higashibayashi (Keio Univ.)

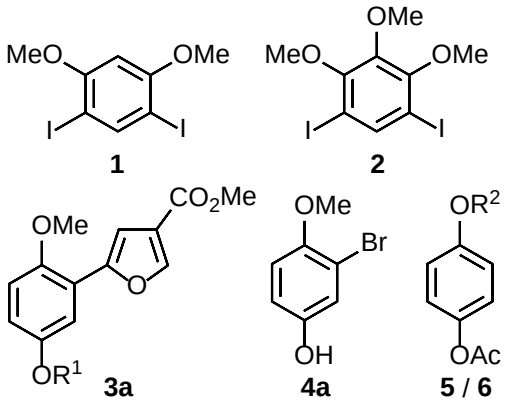
芳香環を有する生物活性物質の代表例としてフラボノイドやプレニルフェノール類が挙げられ、その合成前駆体調製には、容易かつ大量に得られる原料から出発し、正しい位置でフェノール・メチルエーテルを導入する手法が求められる。それには中間化合物の反応性や安定性にとって大切な「酸化段階や芳香環の電子密度」の設計と制御、それを実現する保護基の導入や反応条件が重要である。今回、芳香環のハロゲン化、および酵素触媒による位置選択的・温和な条件下変換反応を検討した例を紹介する。

1,3-dimethoxybenzene を I_2-H_2O_2 の条件で 2 ヨウ化物(**1**)とし、銅触媒存在下メトキシル化によりアレルギー炎症抑制作用を持つ 1,2,4,5-tetramethoxybenzene を合成した。同様の手法は、ノビレチンの合成前駆体である pentamethoxybenzene の合成にも有用で、1,2,3-trimethoxybenzene から出発しメトキシル化の前駆体となる 2 ヨウ化物(**2**)の調製には、折戸らの HgO-I_2 が最も有効であった。対応する臭化物および構造の異なるヨウ化物の調製、メトキシル化の結果の比較も併せ報告する。

一方、tournefolin B (**3a**)の合成前駆体となるモノメチルエーテル(**4a**)の調製に際し、ヒドロキノンの *Burkholderia cepadia* 由来のリパーゼ（Amano PS）[1]を用いたモノアセチル化が有効で、**5** が高い収率で得られた。選択的臭素化には **5** より **6** が優れていた。**3a** および **4a** の調製では、保護基として用いた酢酸エステル(**3b**, **4b**)の除去に *Candida antarctica* リパーゼ B (Nozozyme 435) [1]を活用した。

Toward natural and bioactive methoxybenzenes and methoxyphenols, the control of oxidoreductive status, position of substituents and reaction conditions in the transformations of synthetic intermediates are important. In this presentation, examination in halogenation on aromatic rings as well as lipase-catalyzed transesterification in site-selective manner and/or under mild reaction conditions are discussed.

1) Hashimoto, R., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2021,** *85*, 476-480.



a: R = H; **b**: R^1 = Ac　**5**: R = H; **6**: R^2 = Me

phenol, halogenation, lipase-catalyzed transesterification

発表責任者：須貝 威（sugai-tk@pha.keio.ac.jp）

講演番号：4E06-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

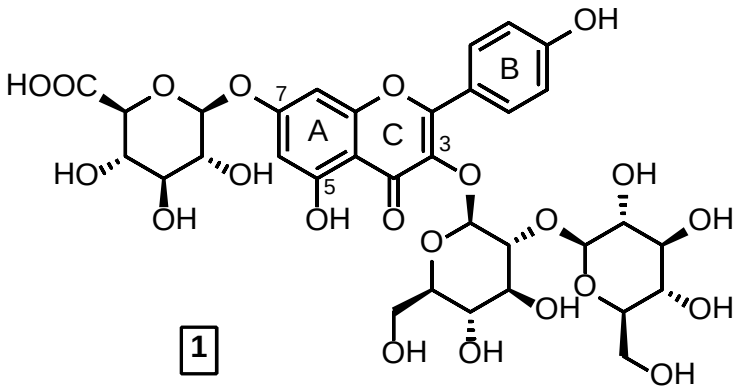
タマネギに含まれる蛍光性フラボノイド配糖体の全合成

Total synthesis of fluorescent flavonoid glycoside isolated from *Allium cepa*

○西條 祐輝、堀 優希、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Yuki Nishijo, Yuki Hori, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

カンフェロール配糖体 **1** は 1992 年，タマネギ(*Allium cepa*)の萌芽から単離された蛍光性天然物である．本研究では，アセチル基の選択的な除去，相間移動触媒(PTC)を用いたグリコシル化および光反応による脱保護などを経由し，**1** の全合成を行った．

B 環の水酸基がベンジル化されたトリアセチルカンフェロール誘導体を出発物質として，そのイミダゾール処理により，7 位のアセチル基を選択的に除去した．その水酸基に *o*-ニトロベンジル(ONB)基を導入した後，すべてのアセチル基を除去した．PTC を用いた二相系反応により，グルコースから別途調製したソフォロースドナーを 3 位に連結した．次に，光照射下で ONB 基を除去し，二相系反応により，グルクロン酸ドナーを導入した．最後に，すべての保護基を除去することで，出発物質から 7 段階，収率 13%で **1** の全合成を初めて達成した．



1

Kaempferol glycoside **1** is a fluorescent natural product, which was isolated from the buds of *Allium cepa* in 1992. In this study, we have performed the total synthesis of **1** including the steps *via* the selective removal of an acetyl group, glycosylation in the presence of phase-transfer catalyst (PTC), and the removal of a protective group by photoreaction.

The starting material, triacetyl kaempferol having a benzyl ether on the B-ring, was selectively converted to a 3,5-diacetyl derivative by the treatment of imidazole. *o*-Nitrobenzyl (ONB) group was introduced on the 7-OH and, then, all the acetyl groups were removed. Glycosylation using a sophorose donor that was prepared from glucose was succeeded by the two-layer reaction with PTC. Next, the ONB group was removed under a light irradiation and the resultant phenol was glycosylated by a glucuronic acid donor using PTC. Finally, the first total synthesis of **1** was completed by the removal of the protective groups (13 % of total yield over 7 steps).

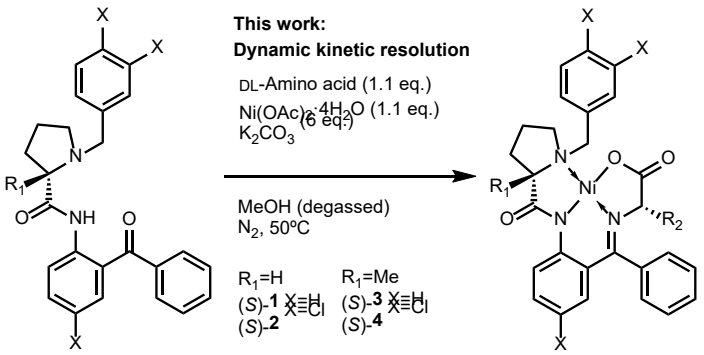
total synthesis, fluorescent flavonoid glycoside, *Allium cepa*

講演番号：4E06-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

Ni(II)キラルシッフ塩基を用いたアミノ酸のキラル化に関する研究

Comparative study of the reactivity of various amino acids using Ni(II) chiral schiff bases

○中野 有那[1]、長岡 敬太[1]、酒本 翼[2]、森脇 浩樹[2]、阿部 秀範[2]、井澤 邦輔[2]、今野 博行[1]([1]山形大工、[2]浜理薬品株式会社)
○Arina NAKANO[1], Keita NAGAOKA[1], Tsubasa SAKAMOTO[2], Hiroki MORIWAKI[2], Hidenori ABE[2], Kunisuke IZAWA[2], Hiroyuki KONNO[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Hamari Chemicals Ltd.)



Ni キラルシッフ塩基を用いるアミノ酸の動的速度論的光学分割（DKR）は，光学活性アミノ酸を入手する最も簡便で効率的な方法の一つである。注目すべきことに、X の位置に塩素原子を導入することで，R_2 周辺の環境が立体的に制御され，高ジアステレオ選択的に反応が進行する。また，R_1 にメチル基を導入することで，プロリン部分のラセミ化が抑制される。

本研究では、4 種類の異なるリガンド **1-4** と 6 種類の非極性アミノ酸を用いて合成性能の比較検討を行った。その結果、Cl 置換したリガンド **2**, **4** は、高選択性（>95%de）で望むアミノ酸が得られることがわかった。その理由は，選択的に塩素化された *o*-アミノ−ベンゾフェノンと Pro-*N*-*m*-,*p*-ジクロロ−ベンジル環の間に芳香環同士の相互作用を示す結晶データの広範な分析から推論された。さらに、**2**, **4** に対して、活性官能基を持つ 9 種類のアミノ酸の DKR を行い、反応性を調査した。その結果、Asp では反応が進行せず、Asn では低ジアステレオ選択性（～10%de）であった。Spartan を用いた簡単な計算により、芳香環同士の相互作用を示さないことが原因であると考察している。

Dynamic kinetic resolution (DKR) of amino acids (AAs) using Ni chiral Schiff bases is one of the most convenient and efficient methods for the preparation of enantio-pure AAs. The introduction of Cl atoms at the X positions sterically controls and the reaction proceeds in a highly diastereoselective manner. In addition, the introduction of a methyl group at R_1 position suppresses racemization of the proline moiety.

In the present study, four different ligands **1-4** and six non-polar AAs were used to compare the synthetic performance. The results showed that the Cl-substituted ligands (**2** and **4**) showed high stereoselectivity. Furthermore, DKR of nine AAs with active functional groups was performed on **2** and **4** to investigate their reactivity and diastereoselectivity. The results showed low reactivity for Asp and low diastereoselectivity for Asn, which was attributed to the absence of aromatic-aromatic interactions as shown by a simple calculation using Spartan.

dynamic kinetic resolution, Schiff bases, Tailor-Made Amino Acids

発表責任者：中野有那（tcf73287@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4E06-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム E

ヤエヤマサソリの毒液に含まれる K^+ channel toxin 類似ペプチドの合成及びジスルフィド結合架橋様式の決定

Synthesis of K^+ channel toxin-like peptides from the venom of *Liocheles australasiae* and determination of their disulfide bonding patterns

○岸本 拓実、廣田 光希、宮下 正弘、宮川 恒（京大農）
○Takumi KISHIMOTO, Mitsuki HIROTA, Masahiro MIYASHITA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液には多様なペプチド成分が含まれており、それらの多くがイオンチャネルに作用する。当研究グループではこれまでにヤエヤマサソリ(Liocheles australasiae)の毒液に含まれる生理活性ペプチドについて構造研究を進めてきた。その結果、ヤエヤマサソリ毒液には、K+チャネルに作用するペプチド（αKTx）と類似した配列をもつ成分が多く含まれることが明らかとなった。そこで本研究では、4 種の αKTx 類似ペプチド（La-αKTx1、La-αKTx2、La-αKTx4、La-αKTx7）について、その化学合成ならびにジスルフィド結合の架橋様式の決定をおこなった。
【方法・結果】直鎖状ペプチドの合成は Fmoc 固相法を用いておこなった。得られた直鎖状ペプチドを、酸化型および還元型グルタチオンを含む緩衝液中でのジスルフィド結合の架橋反応に供することで目的のペプチドを得た。逆相 HPLC によってそれぞれのペプチドを精製した。合成したペプチドのうち、La-αKTx1、La-αKTx2、La-αKTx7 については、そのジスルフィド結合を保ったまま酵素消化をおこなった。この際、一組の断片ペプチドが 1 つのジスルフィド結合で架橋された消化断片が得られるように酵素を選択した。得られた消化断片ペプチドを LC/MS 分析に供し、それらの質量をもとにジスルフィド結合の架橋様式を決定した。酵素による消化だけでは 1 つジスルフィド結合を含む一組の消化断片ペプチドが得られない場合は、これを MS/MS 分析に供し、そのフラグメントパターンから架橋様式を決定した。その結果、これらのペプチドはいずれも既知の αKTx ペプチドと同じ架橋様式を持つことが確認できた。

Scorpion venom contains various peptides that act on ion channels. Recently, we found that the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* contains many peptides have a sequence similar to that of a peptide acting on K^+ channels (αKTx). In this study, we synthesized four peptides, La-αKTx1, La-αKTx2, La-αKTx4, and La-αKTx7, and determined their disulfide bonding patterns. The Fmoc solid-phase method was used for the synthesis. The synthesized linear peptides were then subjected to disulfide bond forming reaction using a buffer solution containing oxidized and reduced glutathione. The synthesized samples were digested by enzymes to obtain pairs of fragment peptides cross-linked with a single disulfide bond. The digested fragment peptides were subjected to LC/MS analysis, and the disulfide bonding pattern was determined based on their molecular masses. The results showed that all of these peptides had the same bonding pattern as the known αKTx peptides.

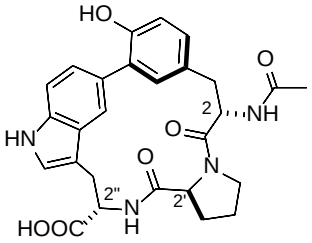
scorpion venom, peptide, disulfide bond

講演番号：4E08-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

Pseudosporamide の合成研究

Synthetic study of pseudosporamide

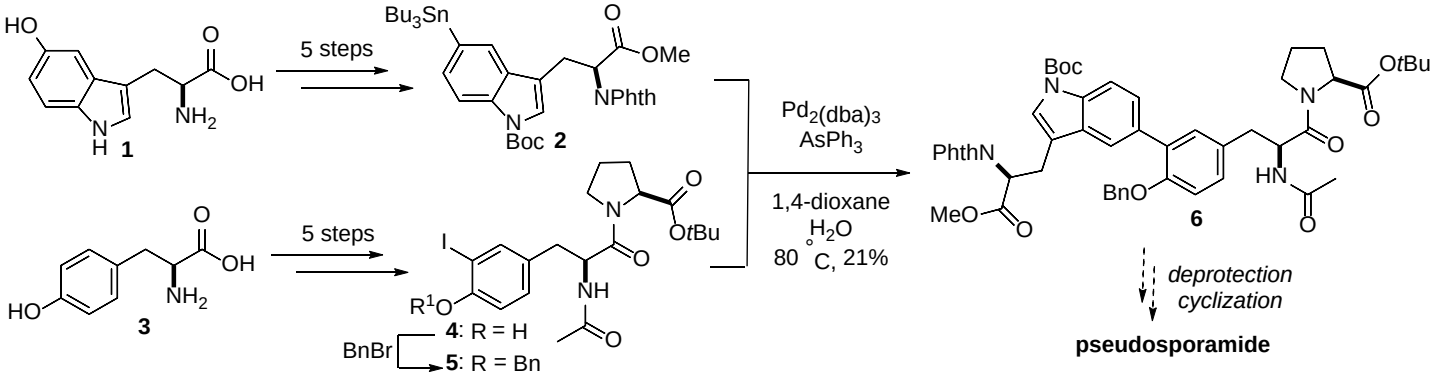
○桂川 美咲[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○ Misaki KATSURAGAWA[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Cent. Toyama Pref. Univ)



pseudosporamide

Pseudosporamide は放線菌 *Pseudosporangium* 属より単離された環状ペプチドであり、マウス白血病細胞 P388 に弱い細胞毒性を示す[1)]。構造決定には質量分析、各種 2 次元 NMR 解析が利用され、立体化学は改良 Marfey 法、PGME 法および DFT に基づく NMR 計算と ECD シミュレーションにより決定された。興味深いことに C2 位の立体化学の違いはビアリール結合の軸不斉に影響を与えることが計算化学的に示唆された。本研究では、C2 位のエピマー合成も視野に入れ、pseudosporamide の全合成による構造確認を目指した。

ヒドロキシトリプトファン **1** を出発原料として 5 工程で有機スズ **2** を合成した。さらに、L-チロシン **3** より 4 工程で合成したヨウ化チロシンと *t*-ブチル L-プロリンを HBTU 存在下で縮合し、得られた **4** のヒドロキシ基をベンジル基で保護し **5** とした。次いで **2** と **5** の Stille カップリングにより、環化前駆体となる鎖状トリペプチド **6** を得た。現在、**6** の収率向上およびマクロラクタム化による骨格構築を検討している。



Pseudosporamide is a novel cyclic peptide isolated from the *Pseudosporangium* sp. Toward a total synthesis of pseudoaporamide, a possible intermediate tripeptide **6** was synthesized by Stille coupling of **2** and **5**.

1) Saito, S.; Atsumi, K.; Zhou, T.; Fukaya, K.; Urabe, D.; Oku, N.; Karim, Md. R. U.; Komaki, H.; Igarashi, Y. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2020,** 16, 1100-1110.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

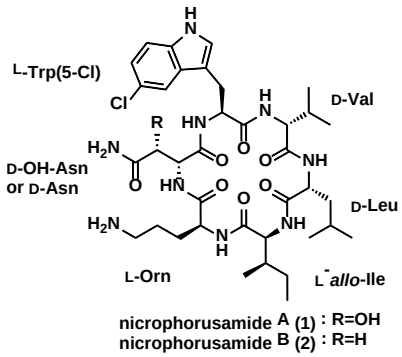
講演番号：4E08-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

抗菌環状ペプチド nicrophorusamide A と B の全合成と三次元構造解析

Total synthesis and 3D structural analysis of nicrophorusamide A and B, antibacterial cyclic peptides

○片山 雄登、稲垣 穣、増田 裕一（三重大生物資源）
○Yuto Katayama, Minoru Inagaki, Yuichi Masuda (Mie Univ.)

Nicrophorusamide A (**1**) と B (**2**) は、マイクロバクテリウム属放線菌 UTG9 株が生産する環状ペプチドである。**1** と **2** は L-Trp(5-Cl)、D-*threo*-β-OH-Asn、L-*allo*-Ile などの希少なアミノ酸を含む。**1** と **2** はグラム陽性菌の増殖を抑制し、β-OH-Asn を持つ **1** の抗菌活性は、Asn を持つ **2** よりも強いことが報告されている。本研究では、生物活性における希少アミノ酸の役割を調べるため、**1** と **2** の全合成を行った。



Fmoc-L-Trp(5-Cl)-OH の合成は、L-Ser と 5-クロロインドールから調製した D,L-Trp(5-Cl)の動的速度論的光学分割により行った。Fmoc-D-*threo*-β-OTBS-Asn(Trt)-OH の合成は、Cardillo らの立体選択的なβ位への酸素原子の導入を介して行った。**1** と **2** の全合成は、固相で合成したペプチド鎖を液相で環化し、側鎖の保護基を除去して達成した。**1** と **2** は、黄色ブドウ球菌の生育をそれぞれ MIC 8 と 16 μg/mL で阻害した。現在、Asn 側鎖のβ位水酸基の機能を調べるため、**1** と **2** の NMR による三次元構造解析を行っている。

Nicrophorusamide A (**1**) and B (**2**) were cyclic hexapeptides produced by an actinomycete strain UTG9 belonging to the genus *Microbacterium*. Peptides **1** and **2** consist of rare amino acids such as L-Trp(5-Cl), D-*threo*-β-OH-Asn and L-*allo*-Ile. It has been reported that **1** and **2** inhibit the growth of Gram-positive bacteria, and the antibacterial activity of **1**, bearing β-OH-Asn, is stronger than that of **2**, bearing Asn. To investigate role of the rare amino acids in the biological activity, we conducted total synthesis of **1** and **2**.

Fmoc-L-Trp(5-Cl)-OH was synthesized by addition of 5-chloroindole to L-Ser followed by dynamic kinetic resolution using the chiral tridentate ligand. Fmoc-D-*threo*-β-OTBS-Asn(Trt)-OH was stereoselectively synthesized *via* introducing oxygen atom at the β position using the Cardillo's methods. Total synthesis of **1** and **2** was achieved by solid-phase peptide elongation and solution phase macrolactamization followed by removal of protecting groups. Peptides **1** and **2** were found to inhibit the growth of *S. aureus* with MIC value of 8 and 16 μg/mL, respectively. To investigate function of hydroxy group in β-OH-Asn, we are analyzing 3D structure of **1** and **2** using NMR.

cyclic peptide, 3D structural analysis, total synthesis

発表責任者：増田裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4E08-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

ホスファチジルセリンの収束型類縁体合成

Convergent synthesis of phosphatidylserines

○多田 大輝[1]、阿部 一啓[2]、馬場 直道[3]、三澤 嘉久[3]、安部 真人[1]([1]愛媛大院農、[2]名大院創薬基盤創薬、[3]備前化成株式会社)
○Daiki TADA[1], Kazuhiro Abe[2], Naomichi Baba[3], Yoshihisa Misawa[3], Masato Abe[1] ([1]Ehime Univ., [2]Nagoya Univ., [3]Bizen Chemical Co.LTD)

【背景と目的】ホスファチジルセリンは、主に動物細胞の細胞膜内層に偏在する陰性リン脂質である。ホスファチジルセリンの生理的機能として、細胞膜外層への露出によってアポトーシスの誘導に関与することが知られている。しかし、こうした現象を引き起こすホスファチジルセリンの化学構造因子はいまだに明らかになっていない。そこで本研究では、ホスファチジルセリンの系統的な化学合成を確立し、構造活性相関研究を展開することを目的とした。
【方法】ホスファチジルセリンの合成経路には、所属研究室で確立したリン脂質合成の手法を改良して用いた。すなわち、(*S*)-ソルケタールを初発物質として対応するジアシルグリセロールへと誘導したのちに、ホスホロアミダイト法によってリン酸エステルとする経路である。これまでに、天然型の L-セリンに代えて D-セリンを導入するエナンチオマーの合成や、側鎖部に高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（DHA）を導入した類縁体の合成を完了した。
【結果と考察】合成して得られたホスファチジルセリン誘導体に関して、細胞膜におけるホスファチジルセリンの選択的膜内輸送を担う ATP13C による基質認識を評価した。その結果、驚くべきことに D-セリンの導入は基質認識にほとんど影響がないことが初めて明らかになった。

[Background and purpose] Phosphatidylserine is a phospholipid that is ubiquitous in the inner layer of the cell membrane. It is known that it is involved in the induction of apoptosis by exposure to the outer layer of the cell membrane. However, the chemical structural factors of phosphatidylserine that cause these phenomena have not yet been clarified. Therefore, the purpose of this study was to establish a systematic chemical synthesis of phosphatidylserine and to develop a structure-activity relationship study that investigates changes in physiological functions due to differences in fine structure.
[Methods] The synthesis was started with (*S*) -solketal to be induced as the initial substance to the corresponding diacylglycerol and then converted into a phosphate ester by the phosphoramidite method. We have completed the synthesis of enantiomers in which D-serine is introduced instead of the natural L-serine, and the synthesis of analogs in which the highly unsaturated fatty acid docosahexaenoic acid is introduced in the side chain.
[Results and discussion] The substrate recognition by ATP13C, which is responsible for the selective intramembrane transport of phosphatidylserine, was evaluated. As a result, it was surprisingly revealed for the first time that the introduction of D-serine had almost no effect on substrate recognition.

Phospholipid, Organic synthesis, Phosphatidylserine

発表責任者：安部真人（abe.masato.si@ehime-u.ac.jp）

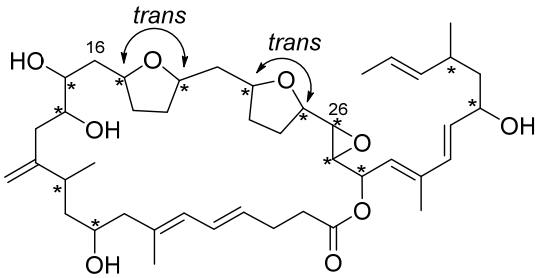
講演番号：4E08-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

アンフィジノリド M の C16-C26 フラグメントの合成研究

Synthetic Studies on the C16-C26 Fragment of Amphidinolide M

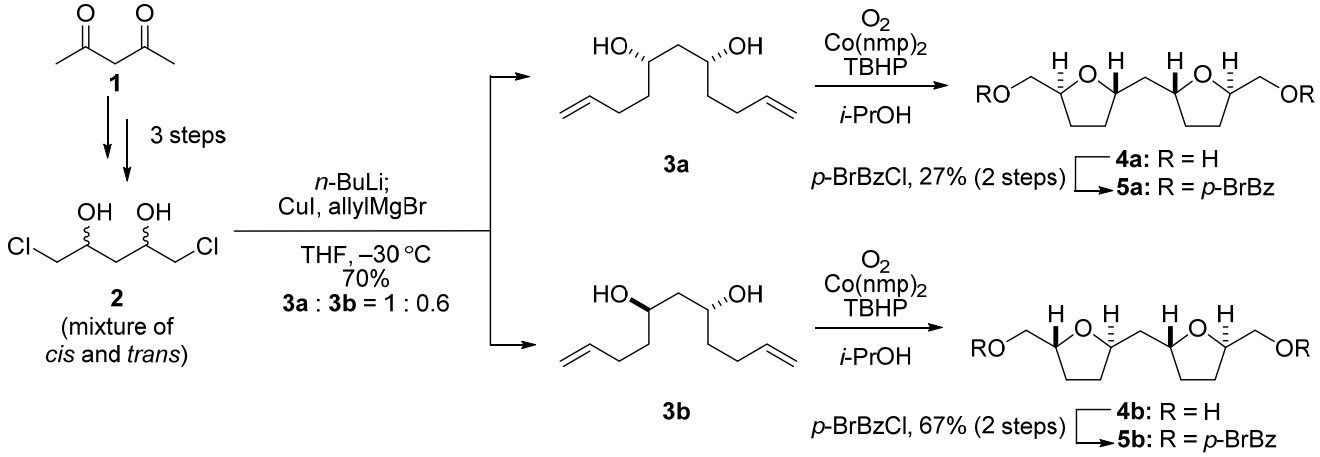
○渡辺 颯太[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Sota Watanabe[1], Keisuke Fukaya[1,2], Daisuke Urabe[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Cent. Toyama. Pref. Univ.)

アンフィジノリド M は海洋性渦鞭毛藻 *Amphidinium sp.*から単離された 29 員環マクロライドであり、マウスリンパ腫 L1210 及びヒト類表皮癌細胞に対して細胞毒性を示す[1)]。アンフィジノリド M の 13 ヶ所の立体化学についてはテトラヒドロフラン環がトランス配置であること以外は決定されていない。そのため全合成による構造決定が望まれている。本研究では連続する 2 つのテトラヒドロフラン環構造(C16-C26)に着目し、可能な立体異性体についての網羅的合成を検討した。



amphidinolide M

まず、2,4-ペンタンジオン **1** から 3 工程で *cis/trans* ジオールの混合物としてジクロリド **2** を合成した。**2** に対して、*n*-BuLi を加えて系中でエポキシドを生成した後、ワンポットでアリル化し、ジアリルジオール **3a** 及び **3b** を得た。**3a** 及び **3b** にそれぞれ Co(nmp)$_2$ [2)]を作用させると一挙に 2 か所のテトラヒドロフラン環が構築された。これにより目的とする *meso*-**4a** 及び C_2 対称-**4b** の合成に成功した。現在、リパーゼを用いた光学分割により、**4a** と **4b** の両エナンチオマーの合成を試みている。



Amphidinolide M is a cytotoxic 29-membered macrolide. Aiming at the structure determination by total synthesis, we developed the route to both meso and C_2-symmetric C16-C26 fragments by Co-catalyzed Mukaiyama cyclization as a key step.

参考文献: 1) Kobayashi, J. *et al. J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3734. 2) Pagenkopf, B. L. *et al*. *Org. Lett*. **2009**, *11*, 5614.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

講演番号：4E08-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

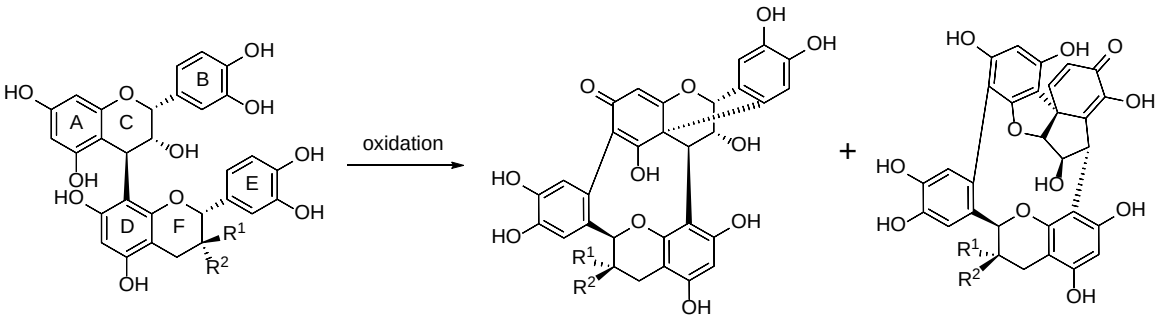
プロシアニジン B2 酸化生成物の構造決定と反応機構の解明

Structure determination and reaction mechanism of procyanidin B2 oxidative products

○諏訪 雄大[1]、柳瀬 笑子[1,2] ([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生)
○Yudai SUWA[1], Emiko YANASE[1,2] ([1]Graduate School of Natural Science and Technology Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences Gifu Univ.)

プロシアニジン類は、カテキンやエピカテキンが重合した構造を有している。本化合物は多くの植物性食品に含まれており、加工工程で変化することが報告されている。当研究室では、procyanidin B3 の酸化反応により、スピロ環を有する化合物の構造決定について報告している。本研究では、procyanidin B2 (**1**) 及び procyanidin B1 (**2**) の酸化反応を行い、構造の変化、メカニズム及び立体の違いによる反応性の違いを明らかにすることを目的とした。**1** を酸化して HPLC で分析したところ、新たな２つのピークの生成がみられた。いずれも、-４Da の疑似イオンピークをもち、分子内結合が新たに生成していた。NMR 及び誘導化反応の結果、2 つの化合物 (**3**, **4**) を構造決定した。同様にして **2** の酸化反応により、**1** と同様の構造変化が生じた 2 つの化合物 (**7**, **8**) を構造決定した。本研究で決定した酸化生成物は植物や食品中に存在している可能性が示唆される。

Procyanidins are condensed tannins comprising flavan-3-ols such as catechin and epicatechin. They are widely distributed in plants and have been reported to be oxidized during processing. We previously have reported the identification of a compound that oxidizes procyanidin B3 and has a spiro ring. The aims of this study were to synthesize procyanidin B2 (**1**) and procyanidin B1 (**2**) and to elucidate the structural change and mechanism of the oxidation reaction and the differences in reactivity depending on the different conformations. When **1** was oxidized and analyzed by HPLC, two new peaks were generated. Both peaks had a pseudo-ionic peak at -4 Da, indicating the formation of new intramolecular bonds. Two compounds (**3, 4**) were structurally determined by NMR and derivatization reactions. we determined the structures of two compounds (**7**, **8**) that showed the same structural changes as in **1** by the oxidation of **2**.



1 : R^1 = H, R^2 = OH
2 : R^1 = OH, R^2 = H

3 : R^1 = H, R^2 = OH
7 : R^1 = OH, R^2 = H

4 : R^1 = H, R^2 = OH
8 : R^1 = OH, R^2 = H

procyanidin, mechanistic study, oxidation

発表責任者：諏訪雄大（z4521045@edu.gifu-u.ac.jp）

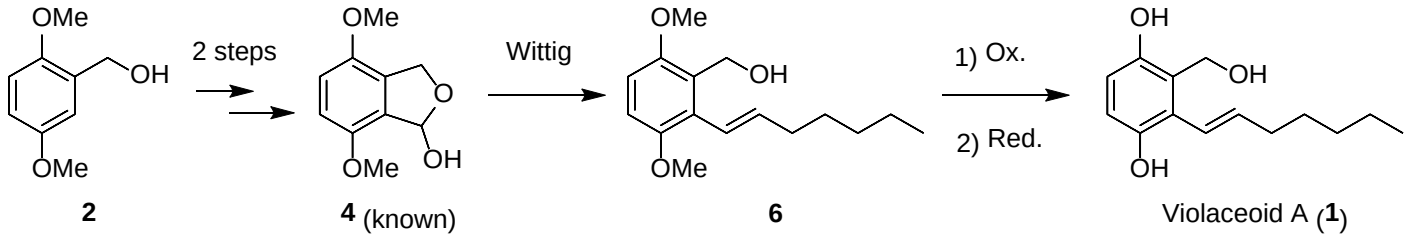
講演番号：4E08-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

インスリンシグナルを制御する violaceoid A (SF231) の合成研究

Synthetic studies of violaceoid A, an insulin signal regulator.

○吉岡 晴香、砂田 直哉、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）
○Haruka YOSHIOKA, Naoya SUNADA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Agricultural Chemistry)

【背景・目的】Violaceoid A (SF231) (**1**) は、京都嵐山のコケに寄生するカビの培養液から 2014 年に単離された、新規のアルキル化されたヒドロキノン化合物である [1)]。本学栄養生化学研究室において、この化合物がインスリンシグナルに対して強い阻害活性を有するということが発見されたが、その作用機序の解明は完全には解明されていない [2)]。本研究では、さらなる作用機序解明の研究に寄与するために violaceoid A (**1**) の効率的な合成ルートの確立とその誘導体合成を目的とする。
【方法・結果】安価に入手可能なアルコール **2** を出発物質とし、増炭反応、DIBAL 還元により既知のラクトール **4** へと変換した。その後、ラクトール **4** に対して Wittig 反応を用いてオレフィン側鎖を構築した。最後に、酸化還元による脱メチル化により violaceoid A (**1**) の合成を達成した。反応の詳細について報告する。



Violaceoid A (**1**) (SF231) was isolated in 2014 from a culture of mold that parasitizes moss in Arashiyama, Kyoto.[1)] It was discovered that violaseoid A inhibits insulin signals, however, its mechanism of action has not been completely elucidated.[2)] In order to contribute to further elucidation, we started synthetic studies for establishing an efficient synthetic route of **1** and their derivatives. The known lactol **4** was obtained from commercially available alcohol **2** by ortho lithiation, DIBAL reduction. After that, we achieved the synthesis of violaceoid A (**1**) by Wittig reaction and redox reaction.

1) Y. Myobatake, K. Takemoto, S. Kamisuki, N. Inoue, A. Takasaki, T. Takeuchi, Y. Mizushina, F. Sugawara, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1236-1240.
2) 山本佳明、鈴木司、井上順、山本祐司　日本農芸化学会　2019 年度大会　3E4p12

violaceoid A, synthesis, insulin signal

発表責任者：松島芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

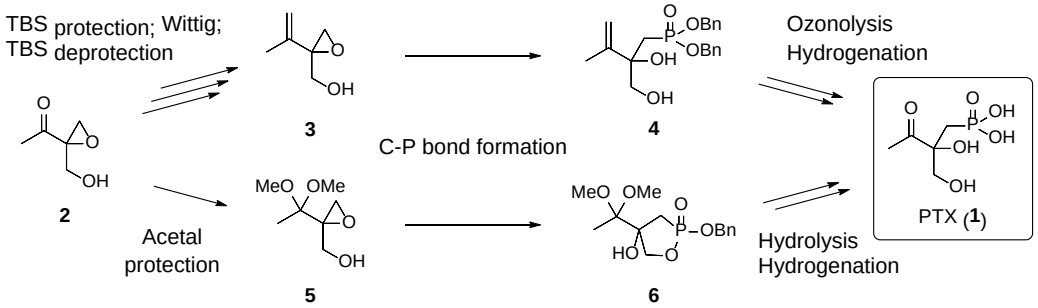
講演番号：4E08-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの光学活性体合成

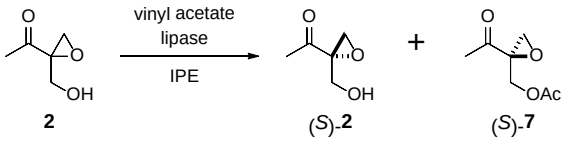
Synthesis of optically active phosphonothrixin, a herbicidal antibiotic

○中村 皓毅、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）
○ Kouki NAKAMURA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Aguricultural Chemistry)

Phosphonothrixin (PTX) (**1**)は、放線菌 *Saccharothrix* sp. ST-888 から単離・構造決定された除草活性を有する C-P 化合物である。葉面投与を行った場合にのみ葉にクロロシスを誘発するが、詳細なメカニズムは未だ解明されていない。そこで、その解明のための継続的な化合物供給のため、PTX (**1**)の簡潔かつ大量合成にも適応可能な新規光学活性体合成法の開発を行ってきた。効率的なラセミ体合成 [1)]に関しては 2018 年度大会（2A16p10）、2020 年度大会（2B11a3）にて報告している。



本合成経路を光学活性体合成へ応用するため、高い光学純度でのエポキシアルコール **2** の調製を行った。検討の結果、リパーゼを用いたアセチル化反応による速度論的光学分割が最も効果的であることが分かった。



Phosphonothrixin (PTX) (**1**), herbicidal antibiotic, is a kind of C-P compound isolated from fermentation broth of *Saccharothrix* sp. ST-888. It induces chlorosis by foliar application, however the mechanism of action has not been elucidated. To reveal it, sustainable and scalable synthesis is necessary. Therefore, we intended to establish an efficient asymmetric synthetic route to PTX (**1**). Racemic synthesis of **1** has been accomplished[1)], and presented at the annual meeting (JSBBA, **2018**, 2A16p10; **2020**, 2B11a13). To apply this route to asymmetric synthesis, preparation of the enantiomeric pure epoxy alcohol **2** was planned. As a result, kinetic resolution by acetylation using lipase was found to be efficient.

1) Y. Matsushima, K. Nakamura, *Result in Chemistry*, **2021**, *3*, 100251.

phosphonothrixin, herbicidal antibiotic, C-P bond formation

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

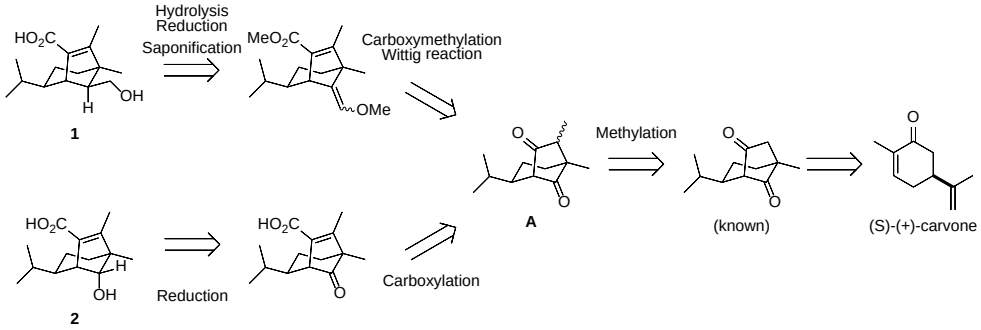
講演番号：4E08-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

ジベレリン様活性を有する化合物 helminthosporic acid の合成研究

Synthetic study of helminthosporic acid, a gibberellin-like bioactive compound

○春原 大亮、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）
○ Daisuke HARUHARA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Agricultural Chemistry)

【背景・目的】 Helminthosporic acid (**1**)は、植物伸長作用を持つ helminthosporol から誘導された化合物であり、ジベレリン様活性を有する生物活性物質として知られている。近年ジベレリン受容体のアゴニストとしてはたらくことが明らかにされ[1)]、またごく最近、真菌 *Cochliobolus sativus* より単離されている[2)]。しかしながら helminthosporol やその類縁体の合成例は少なく、活性や作用機序のさらなる解明のため大量合成法が求められている。本研究では **1** の効率的な合成方法の確立を目的とする。
【方法・結果】Helminthosporic acid (**1**)の逆合成解析を示した。**1** は加水分解、還元、Wittig 反応、カルボキシメチル基導入などを経て中間体 **A** から合成可能であると考えた。またこの中間体 **A** は、(*S*)-(+)-carvone から合成可能な既知のジケトンをメチル化することによって得られると考えた。現在は **1** のメチルエステル体の合成に成功している。今後はケン化によって **1** の合成を完了する予定である。また、共通の中間体 **A** から **1** の類縁体である **2** の合成も行った。反応の詳細について報告する。



Helminthosporic acid (**1**) was derivated from helminthosporol. **1** is known as a gibberellin-like bioactive compound, acts as an agonist of GA receptor.[1)] It also isolated from the fungus *Cochliobolus sativus*.[2)] However, the mode of action of these compounds has not been clarified. Therefore, we planned an efficient synthetic route through common intermediate diketone **A** towards both of **1** and its analogue **2**. Methyl ester of **1** has been accomplished starting from (*S*)-(+)-carvone. Further transformation toward **1** is currently ongoing.

1) S. Miyazaki, K. Jiang, M. Kobayashi, T. Asami, M. Nakajima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2017**, *81*, 2152-2159.
2) Y. Y. Li, X. M. Tan, J. Yang, L. P. Guo, G. Ding, *J. Nat. Prod.*, **2020**, *83*, 1488-1494.

Synthesis, Helminthosporic acid, Gibberellin-like bioactivity

発表責任者：松島芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

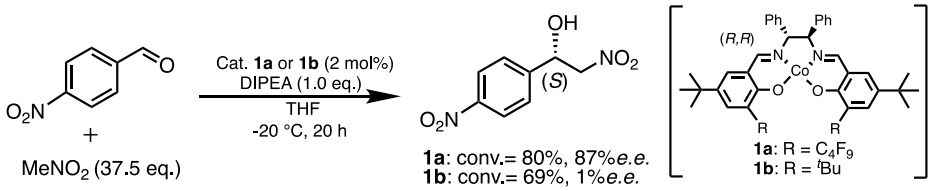
講演番号：4E08-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

フルオラスコバルトサレン錯体を用いる高立体選択的不斉 Henry 反応

A highly stereoselective Henry reaction using fluorous cobalt salen complex

○廣田 宗士、藤野 旭、石原 一輝、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大院農)
○Soushi HIROTA, Asahi FUJINO, Kazuki ISHIHARA, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

これまでに当研究室では、鉄 (Ⅲ) サレン錯体にフルオラスタグを二点導入することで、孤立オレフィンの不斉エポキシ化が鉄で達成できることを報告している。[1] 今回演者は、中心金属を鉄からコバルトに置き換えたフルオラスコバルトサレン錯体 **1a** を合成すると共に、本錯体を用いた高立体選択的な不斉 Henry 反応の達成を目的とし、研究を遂行した。まず、5-*tert*-butylsalicylaldehyde を出発原料とし、3 段階反応を経て **1a** を合成した。続いて、**1a** 及び、既知の Jacobsen 型コバルトサレン錯体 **1b** を用いて不斉 Henry 反応をおこない、両錯体の反応性、立体選択性を比較した。*p*-ニトロベンズアルデヒド及びニトロメタンを基質とし、サレン錯体及び DIPEA 存在下、THF 中、-20 ℃ で反応をおこなった。錯体 **1b** を用いた反応では、ほぼラセミの付加体が得られ、その収量も中程度に留まった (conv. = 69%, 1%*e.e.*) 。一方、錯体 **1a** を用いた同反応では、錯体 **1b** 使用時と比べて立体選択性の大幅な向上が確認され、87%*e.e.*の立体選択性、80% の変換率で目的物が得られた。



We have previously reported that asymmetric epoxidation of isolated carbon-carbon double bonds can be achieved with iron by a double fluorous tagged iron (Ⅲ) salen complex.[1] In this study, we prepared a fluorous cobalt salen complex **1a**, in which the central metal has been replaced by cobalt, and used this complex to achieve a highly stereoselective asymmetric Henry reaction.

First, the complex **1a** was prepared from 5-*tert*-butylsalicylaldehyde through three steps reactions. Next, asymmetric Henry reaction was performed using **1a** and the known Jacobsen-type cobalt salen complex **1b** to compare the reactivity and stereoselectivity between the two complexes. These reactions were carried out in THF using *p*-nitrobenzaldehyde and nitromethane in the presence of salen complexes, and DIPEA at -20 ℃.

The reaction using complex **1b** afforded almost racemic adduct in moderate yield (conv. = 69%, 1%*e.e.*). On the other hand, the reaction using complex **1a** showed a significant improvement in stereoselectivity compared to the reaction using complex **1b**, and afforded the desired product with 87%*e.e.* in 80% yield.

1) Matsugi, M. *et.al. Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 2401.

Henry reaction, Cobalt salen complex, Fluorous

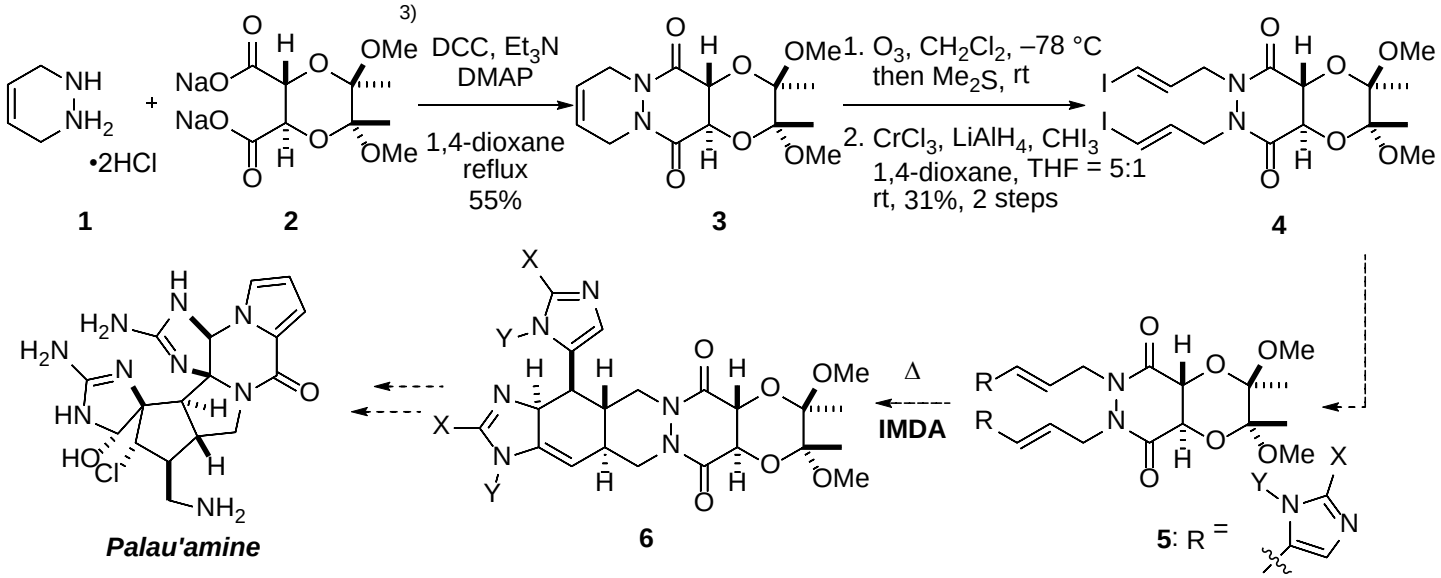
講演番号：4E08-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

Palau'amine の合成研究

Synthetic Study of Palau'amine

○藤野 雄大[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Yudai FUJINO[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ, [2]Biotech. Res. Cent. Toyama Pref. Univ)

パラウアミンは海綿 *Stylotella agminata* から単離された免疫抑制作用を有する海洋性アルカロイドである[1,2]。構造上の特徴として、高反応性の官能基がトランス縮環型のシクロペンタンコアに高密度に集積していることが挙げられる。本研究では、分子内 Diels–Alder 反応による鍵中間体 **6** の構築を鍵としたパラウアミンの全合成を目指した。まず、ジアミン **1** と L-酒石酸ジメチルから誘導したカルボン酸 **2** を高温条件下、DCC を用いて縮合し、収率 55%でアミド **3** を合成した。その後、オゾン酸化と高井・内本オレフィン化を経て、2 段階収率 31%で **3** をヨウ化ビニル **4** へ変換した。現在は、ヨウ化ビニル **4** に対して、イミダゾール等価体をカップリングして、**5** を得ることを試みている。



Palau'amine is an immunosuppressive alkaloid isolated from *Stylotella agminate*. Toward a total synthesis of palau'amine, we planned to employ an intramolecular Diels-Alder reaction of **5**. Diamine **1** and carboxylic acid **2** were condensed by using DCC under high temperature conditions to synthesize amide **3**. Then, ozonolysis and Takai olefination converted amide **3** to vinyl iodide **4** in a two-step yield of 31%.

1) Scheuer, P. J. *et al*. *J. Am. Chem. Soc*., **1993**, *115*, 3376. 2) Tepe, J. J. *et al*. *J. Nat. Prod*., **2012**, *75*, 980.
3) Schmalz, H.-G. *et al*. *Eur. J. Org. Chem*. **2014**, 4315.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

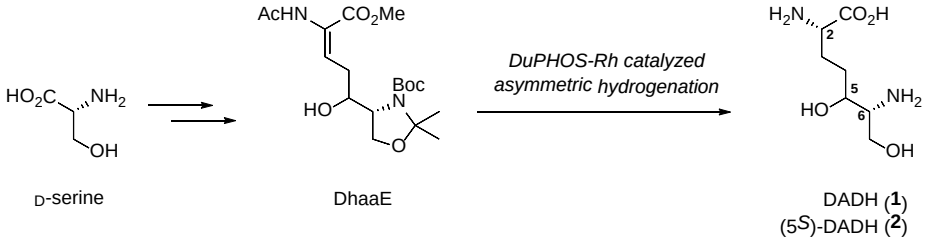
講演番号：4E08-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム E

非天然型アミノ酸 DADH の全異性体の合成研究

Synthetic study of non-proteinogenic amino acid DADH and its isomers

○岡村 仁則[1]、保野 陽子[2]、中山 淳[2]、品田 哲郎[2]、滝川 浩郷[2] ([1]東大院農生科、[2]阪市大院理)
○Hironori OKAMURA[1], Yoko YASUNO[2], Atsushi NAKAYAMA[2], Tetsuro SHINADA[2], Hirosato TAKIKAWA[2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Osaka City Univ.)

(2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) (**1**)は、放線菌 *Streptomyces* sp. SANK60404 株より単離された非タンパク質構成アミノ酸である[1)]。本化合物はアミノキャリアタンパク質(AmCP)を介した生合成経路にて合成されており、より複雑な構造を有する含窒素天然物へと更に変換される。また、DADH 自身にも免疫抑制活性やイネ科植物の生育阻害活性などの生物活性が認められている[2)]。我々は、DADH が関与する二次代謝経路及びその生物学的意義の解明を目的として、本化合物の合成研究に着手した。前年度大会において、我々はデヒドロアミノ酸エステル(DhaaE)に対するキラルロジウム触媒を用いた高圧水素添加反応を鍵反応として、DADH (**1**)及びその C5 位異性体である(5*S*)-DADH (**2**)の合成を報告した[3)]。本大会では、DADH の各異性体の合成に向けたその後の進展について報告する。



(2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) (**1**) is a non-proteinogenic amino acid isolated from *Streptomyces* sp. SANK60404. This compound is biosynthesized via amino group carrier protein (AmCP)-mediated biosynthetic pathway and further converted into unique nitrogen-containing natural products. In addition, DADH also possesses biological activities including immunosuppressive activity and hypocotyl elongation inhibition. In the last JSBBA annual meeting we reported stereoselective synthesis of DADH (**1**) and (5*S*)-DADH (**2**) via chiral rhodium-catalyzed asymmetric hydrogenation of dehydroamino acid ester (DhaaE). In this presentation, we would like to report the recent progress, including other DADH isomers.

1) F. Hasebe et al. *Nature Chemical Biology*, **2016**, *12*, 967-972
2) M. J. Burk et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4345-4353
3) H. Okamura et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 1396-1401

non-proteinogenic amino acid, stereoselective synthesis, amino group carrier protein

講演番号：4F02-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

黒穂菌(Ustilago esculenta)由来新規脂質の全合成研究
Total synthesis of novel lipids from Ustilago esculenta

○小澤 明穂[1]、江川 貴斗[1]、河岸 洋和[2]、安部 真人[1] ([1]愛媛大農、[2]静岡大農)
○ Akiho OZAWA[1], Takato EGAWA[1], Hirokazu KAWAGISHI[2], Masato ABE[1] ([1]Ehime Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【背景と目的】複合脂質は、糖やリン酸基を有する極性頭部と、長鎖アルキル基を含む疎水性尾部から構成される。複合脂質の化学構造は代謝や生育環境の影響により誘導を受ける。特に植物への寄生菌などによってもたらされる複合代謝系では、未同定の生理活性脂質が期待される。マコモタケは、イネ科植物マコモへの黒穂菌の寄生によって植物組織が肥大化したものであり、植物ホルモン様物質の作用が推定された。2018 年に、マコモタケから得られたオーキシン様作用を持つ新規脂質の平面構造が明らかになった。そこで本研究では、その新規脂質の全合成による立体化学の決定を目的とした。
【方法】新規脂質の推定構造では、一級水酸基がアセチル化した D-グルコースを極性頭部に持ち、炭素長 13 個から成るカルボン酸を疎水性尾部に有する。本研究では、D-グルコースのアノマー位をトリクロロアセトイミデートとしたビルディングブロックによるシュミット法を採用した。対応するカルボン酸は、総工程 8 ステップにて立体選択的に合成し、エチルエステルとして準備した。
【結果と考察】シュミット法によるグリコシル化では、三フッ化ホウ素エーテル錯体が最良の酸触媒であることが分かった。糖結合部位の β 位に位置する水酸基は反応選択性に影響し、マイナーな成分として α-結合を有する化合物も得られることが分かった。これまでに前駆体までの合成を達成した。

[Background and purpose] The complex lipid is composed of a polar head having a sugar or a phosphate group and a hydrophobic tail containing a long-chain alkyl group. “Makomotake” is an enlarged plant tissue caused by the infection of a kind of smut fungi to the grass family *Zizania latifolia*, and the action of some plant hormone-like substance is presumed. In 2018, the planar structure of a novel lipid from Makomotake with auxin-like activity was determined. The purpose of this study was to carry out total synthesis to determine stereochemistry of the compound.
[Methods] In this study, the Schmidt’s glycosidation using a building block having trichloroacetoimidate at the anomeric position of D-glucose was adopted. The corresponding carboxylic acid was stereoselectively synthesized in a total of 8 steps and prepared as an ethyl ester.
[Results and discussion] In Schmidt’s glycosylation, it was found that BF_3-Et_2O was the best acid catalyst. In particular, it was found that the hydroxyl group located at the β-position of the sugar binding site greatly affects the reaction selectivity, and a compound having a α-bond as a minor component can also be obtained. So far, synthesis up to the precursor has been achieved.

glycolipid, Zizania latifolia, total synthesis

発表責任者：安部真人（abe.masato.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：4F02-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

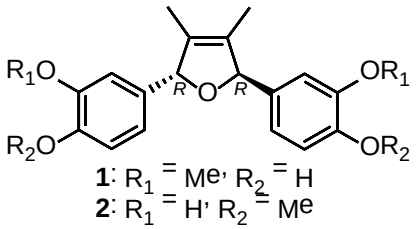
リベシン B の不斉全合成

Asymmetric total synthesis of ribesin B

○堀尾 嘉恵、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Kae Horio, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

リベシン B (**1**)はカシス(*Ribes nigrum*)の葉から単離された対称ジヒドロフランリグナンである．先に当研究室では R_1 がメチル化された **1** と R_2 がメチル化された **2** を合成し，リベシン B の真の構造は **1** ではなく **2** であることを明らかにした．本研究ではさらにリパーゼを用いた光学分割を鍵段階とする **2** の不斉全合成を行った．

イソバニリン誘導体を出発物質として，Grignard 反応によりプロパルギルアルコールを合成した．このアルコールをリパーゼで処理し，エステルの *R* 体(収率 45%，92% ee)とアルコールの *S* 体(収率 35%，99% ee)を得た．*S* 体のアルコールと別途調製したエノンを連続的 Michael 付加−環化により連結し，非対称テトラヒドロフランに導いた．その後，脱炭酸やヒドリド還元などを経て，対称ジヒドロフランを合成した．最後に，ベンジル基を除去して **2** を得た(総収率 7%，9 段階)．その比旋光度は-131.2 (c 0.25，25°C)を示し，天然物の比旋光度[-45.2 (c 0.25，25°C)]と符号が同じであった．また，^{13}C NMR データは天然物のものと一致した．したがって，リベシン B の初めての不斉全合成が達成された．



1: R_1 = Me, R_2 = H
2: R_1 = H, R_2 = Me

Ribesin B (**1**) is a symmetric dihydrofuran lignan isolated from the leaves of *Ribes nigrum*. The chemical synthesis of **1** (R_1 = Me) and **2** (R_2 = Me) was previously clarified that the true structure of ribesin B should be **2**. In this study, we have demonstrated the asymmetric total synthesis of **2** through optical resolution by using lipase as the key step.

Isovanillin derivative as the starting material was transformed into propargyl alcohol by a Grignard reaction. The lipase treatment of this alcohol furnished a (*R*)-ester (92% ee) in 45% yield and a (*S*)-alcohol (99% ee) in 35% yield. The (*S*)-alcohol and prepared enone were coupled by a continuous Michael addition-cyclization to lead an asymmetric tetrahydrofuran. After that, a symmetric dihydrofuran was obtained *via* several steps such as decarboxylation and hydride reduction. Finally, the removal of benzyl groups gave **2** (7% of total yield over 9 steps). The sign of the specific rotation [-131.2 (c 0.25, 25 °C)] and the ^{13}C NMR assignments of **2** were consistent with the data as previously reported [-45.2 (c 0.25, 25 °C)]. Therefore, the asymmetric total synthesis of **2** was accomplished herein for the first time.

asymmetric total synthesis, ribesin B, lipase

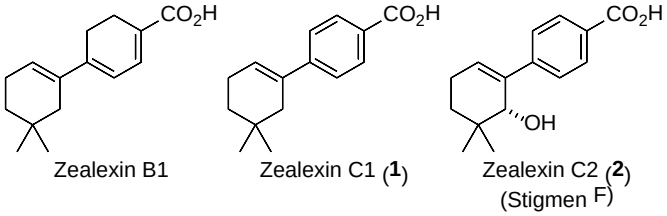
講演番号：4F02-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

トウモロコシが産生するファイトアレキシン zealexin 類の合成研究

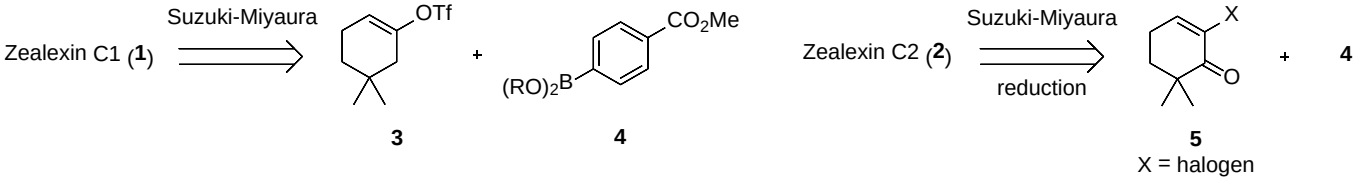
Synthetic studies of zealexins, maize sesquiterpenoid phytoalexins

○石井 航平、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）
○Kohei ISHII, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Agricultural Chemistry)

【背景･目的】トウモロコシから単離された zealexin 類は、*Aspergillus flavus* などの真菌に対する抗菌活性を持つ新規のファイトアレキシンである[1)]。これらはトウモロコシから極微量しか得られず、その活性など詳細な研究のためには合成による物質供給が鍵となる。本研究では zealexin 類の合成を目的とする。



【方法･結果】Zealexin 類の基本骨格である二つの六員環構造を結合させる戦略による合成を検討し、これまで当研究室では、Suzuki-Miyaura カップリングを鍵反応とした zealexin B1 の効率的な合成を達成した[2)]。さらに、zealexin C1 (**1**)と zealexin C2 (**2**)に対しても同様の戦略を適用できると考え、その合成を実行した。本講演では、これらの化合物の合成について詳細を報告する。



Zealexins, novel sesquiterpenoid phytoalexins, were discovered from maize have antifungal activity against fungus such as *Aspergillus flavus*.[1)] Most zealexins can be isolated from maize only in trace amounts, therefore it is desirable to supply them by organic synthesis for investigating biological activities and biosynthetic studies.

We have designed a synthetic strategy for the two six-membered ring structures, the basic frameworks of zealexins using Suzuki-Miyaura coupling. According to this strategy, we have accomplished with an efficient synthesis of zealexin B1.[2)] We envisaged that zealexin C1 (**1**) and zealexin C2 (**2**) could be constructed by the similar strategy. The details of the synthesis of these compounds will be described.

1) A. Huffaker, F. Kaplan, M. M. Vaughan, N. J. Dafoe, X. Ni, J. R. Rocca, H. T. Alborn, P. E. A. Teal, E. A. Schmelz, *Plant Physiol*. **2011**, *156*, 2082-2097.
2a) 石井航平, 松島芳隆 日本農芸化学会関東支部 2020 年度大会 1E-4
2b) Y. Matsushima, K. Ishii, A. Huffaker, E. A. Schmelz, submitted.

zealexins, phytoalexin, synthesis

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：4F02-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

リゾカルジオリピンおよび過酸化カルジオリピンの全合成

Total synthesis of lyso cardiolipin and cardiolipin peroxide

○廣角 道信、安部 真人（愛大院農）
○MICHINOBU HIROSUMI, MASATO ABE (Ehime Univ.)

【背景と目的】カルジオリピンは、ミトコンドリア内膜に局在する陰性リン脂質であり、疎水性尾部は生物種や器官によって特異的な組成に揃えられ、哺乳類ではリノール酸などの不飽和脂肪酸が主である。この不飽和脂肪酸が酸化ストレスによって過酸化されると、アポトーシスの諸現象が開始される。しかし、カルジオリピンの生合成中間体であるリゾカルジオリピンおよび過酸化カルジオリピンは、全合成が達成されておらず、詳細な分子機構が不明である。そこで本研究では、リゾカルジオリピンと過酸化カルジオリピンの全合成を目的とした。
【方法】リゾカルジオリピンの合成経路は、所属研究室で確立したリン脂質の合成方法を基に幾つかの改良を施して確立した。別途導入する過酸化脂肪酸にはリノール酸を基質としてリポキシゲナーゼを用いた酵素法により 13 位を立体選択的に調製した。合成して得られたリゾカルジオリピンの前駆体に対して DCC 縮合によって過酸化脂肪酸を導入し、過酸化カルジオリピンへ誘導した。
【結果と考察】リゾ化を誘導するグリセロールの *sn*-2 位はメトキシプロペニル基（MxP）が最適であり、合成の最終段階での脱保護が可能となった。これまでに、2-リゾカルジオリピンの合成を完了し、同様に 2'-リゾカルジオリピンの合成を進めている。一方、過酸化カルジオリピンの合成も最終段階を実験したものの低収率かつ精製純度に課題が残り、最適化を進めている。

[Background and purpose] Cardiolipin is a negative phospholipid localized in the inner mitochondrial membrane. When the unsaturated fatty acyl chain of cardiolipin is peroxidized by oxidative stress, various phenomena of apoptosis are initiated. However, total synthesis of lyso-cardiolipin and cardiolipin peroxide has not been achieved, and the detailed molecular mechanism has not been clarified. Therefore, the purpose of this study was to establish a regioselective chemical synthesis pathway for lyso-cardiolipin and to total synthesize cardiolipin peroxide by introducing lipid peroxide into the lysolated site.
[Methods] The synthetic route of lyso-cardiolipin was established by making some improvements based on the phospholipid synthesis method reported by our laboratory. A fatty acid peroxide was introduced into the synthetically obtained precursor of lysocardiolipin by DCC condensation and induced to cardiolipin peroxide.
[Results and discussion] MxP was optimal for the *sn*-2 position of glycerol that induces lysolation, enabling deprotection at the final stage of synthesis. So far, the synthesis of 2-lyso-cardiolipin has been completed. On the other hand, although the final stage of the synthesis of cardiolipin peroxide was experimented, there are still problems with low yield and purification purity, and optimization is underway.

Phospholipid, Cardiolipin, Total synthesis

発表責任者：安部真人（abe.masato.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：4F02-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

新規グリオキシル脂質の全合成研究

Total synthesis of novel glyoxyl lipids

○安部 真人[1]、田中 遼太郎[1]、石橋 洋平[2]、伊東 信[2] ([1]愛媛大農、[2]九大農)
○ Masato ABE[1], Ryotarou TANAKA[1], YOUHEI ISHIBASHI[2], Makoto ITO[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kyushu Univ.)

【背景と目的】複合脂質は、リン酸基または糖を親水性頭部構造に、アシル化グリセロールまたはセラミドを疎水性尾部に有する化学構造が一般的である。複合脂質の生理機能は、その親水性頭部に大きく影響を受ける。このため、新奇の頭部構造を見出すことができれば新たな脂質クラスターの発見に繋がると考えられる。本研究では 2019 年に推定構造が提唱されたラビリンチュラ由来の新奇脂質の構造決定を目的として、化学構造が類似するモデル化合物を合成した。
【方法】合成目標となる新奇脂質では、親水性頭部と疎水性尾部がグリオキシル酸から生成するミックスドアセタール構造で結合していることが推定された。そこで本研究では、エタノールアミンを頭部構造に、ヘキサデカノールを疎水性尾部に見立て、2ーヒドロキシアセトアルデヒドに対する酸触媒下でのアセタール化反応を検討した。さらに、より新奇脂質に近いモデル化合物を目指して飽和炭化水素で構成されるスフィンガニンのオレイン酸アミドとしたセラミドによる反応検討を実施した。
【結果と考察】これまでに、ヘキサデカノールによるモデル化合物の合成を完了した。得られた、NMR スペクトルは、推定構造であるミックスドアセタールを支持する結果となった。一方、セラミドによるミックスドアセタールの合成も低収率ながら進行し、前駆体までの合成を完了した。

[Background and purpose] The complex lipid generally has a chemical structure having a phosphate group or sugar in a hydrophilic head structure and acylated glycerol or ceramide in a hydrophobic tail. The physiological function of complex lipids is greatly influenced by their hydrophilic head. In this study, we synthesized model compounds with similar chemical structures for the purpose of determining the structure of the novel lipid derived from labyrinthula, whose estimated structure was proposed in 2019.
[Methods] In the novel lipids targeted for synthesis, it was presumed that the hydrophilic head and the hydrophobic tail were bound by a mixed acetal structure generated from glyoxylic acid. Therefore, in this study, ethanolamine and hexadecanol were acetalizationed with 2-hydroxyacetaldehyde under an acid catalyst. Furthermore, with the aim of creating a model compound that is closer to a novel lipid, a reaction study was carried out using ceramide as an oleic acid amide of sphinganine composed of saturated hydrocarbons.
[Results and discussion] The synthesis of the model compound by starting with hexadecanol has been completed. The obtained NMR spectrum resulted in support for the estimated structure, the mixed acetal. The synthesis of mixed acetals with ceramide also proceeded with a low yield, and the synthesis up to the precursor was completed.

total synthesis, lipid, mixed acetal

発表責任者：安部真人（abe.masto.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：4F02-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

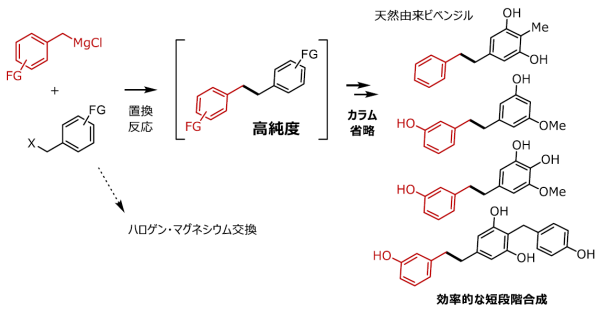
有機マグネシウム種の置換反応を介した生物活性ビベンジルの迅速供給

Rapid Access to Bibenzyl Natural Products Enabled by Organomagnesium Substitution Reaction

姜 法雄[1]、○山田 朱莉[2]、丈達 唯花[1]、森田 康明[1]、中尾 風貴[1]、大江 拓人[1]([1]神戸大院農、[2]神戸大農)

BUBWOONG KANG[1], ○AKARI YAMADA[2], YUIKA JOTATSU[1], YASUAKI MORITA[1], FUKI NAKAO[1], TAKUTO OE[1] ([1]Graduate School of Agricultural Sciences, Kobe Univ., [2]Faculty of Agriculture, Kobe Univ.)

ビベンジルは天然物に広く見られる骨格であり、抗がん活性や抗MRSA活性をはじめとする多様で魅力的な生物活性を持つ。ビベンジルは生命科学や創薬における重要な研究資源であることから、その化学合成は無数に報告されている。ほとんど全てのビベンジル型天然物の合成は、Wittig反応を用いて達成されてきた。しかしながら同手法は、①Wittig試薬の調整、②有機リン廃棄物のクロマトによる除去、③貴金属や爆発性の水素ガスを要する。我々はこうした問題のない代替法として、ベンジルマグネシウム種とベンジルハライドの置換反応に着目した。この反応の有用性は驚いたことにほとんど明らかにされていたかったため、我々は本法の適用範囲および適用限界を明らかにするとともに、生物活性ビベンジル類の迅速合成へと応用した。すなわち、4種のビベンジル型天然物（stilbostemine B、aloifol I、bletistrin C、およびbatatasin III）の迅速供給法を確立することができた（初の化学合成：2例、最短工程合成：2例、初のカラムフリー合成：1例）。本合成は定石よりも工程数、カラム精製数、および総収率の面で優れている手法であることが実証できた。本法の特筆すべき特徴は、工程数の大幅な削減だけでなく、工業規模での合成プロセスにおいて極力避けるべきカラム精製が、既存法では4～6回となっているところが、最大でも1工程に抑えられている点である。



Bibenzyls are widely found structures in natural products, and they are known to exhibit a variety of attractive biological activities. Since they are important resources in drug discovery and life sciences, an innumerable number of bibenzyl syntheses have been reported. The vast majority of bibenzyl synthesis have been accomplished through Wittig(-type) reactions. However this strategy requires (i) preparation of Wittig(-type) reagents, (ii) chromatographic separation of organophosphorus wastes, and (iii) precious metal and explosive hydrogen gas. We took attention to “substitution reaction between benzylic magnesium species and benzylic halides” as an alternative method free from such issues. We uncovered the scope and limitation of this substitution reaction for the first time, and applied it to rapid access to four naturally occurring bibenyls, stilbostemine B, aloifol I, blestistrin C and batatasin III (two first syntheses, two shortest step syntheses, one first column-free synthesis). It is notable that our approach enabled us to minimized the number of chromatographic separation processes to just up to one.

Bibenzyl, Biological activity, Natural Products

発表責任者：姜法雄（kangb@pegasus.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4F02-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

ホスファチジルコリンの効率的アナログ合成の確立
Establishment of efficient analog synthesis of phosphatidylcholine
○藤原 朋哉[1]、渡辺 麻友美[1]、三澤 嘉久[2]、馬場 直道[2]、阿部 一啓[3]、安部 真人[1]([1]愛大農、[2]備前化成株式会社、[3]名古屋大院・創薬)
○Tomoya FUJIWARA[1], Mayumi WATANABE[1], Yoshihisa MISAWA[2], Naomichi BABA[2], Kazuhiro ABE[3], Masato ABE[1] ([1]Ehime Univ., [2]Bizen chemical Co. LTD, [3]Nagoya Univ.)

【背景と目的】ホスファチジルコリンは、種々の生体膜の主成分であり、細胞などの生命活動に欠くことのできないリン脂質である。同様に、ホスファチジルエタノールアミンも細胞膜の構成成分として知られており、わずかに極性頭部の窒素原子のメチル化の度合いが異なるのみである。しかし、細胞膜においては外層にホスファチジルコリンが、内層にホスファチジルエタノールアミンが局在して非対称性を形成している。これは、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンをそれぞれ選択的に相関輸送するタンパクが作用するためだと考えられている。そこで本研究では、ホスファチジルコリンの網羅的な類縁体合成を展開し、生化学的な解析に資する有用なバイオロジカルツールの創出を目的とした。
【方法】ホスファチジルコリン類の合成には、所属研究室で確立したリン脂質合成の手法を応用した。この中で、鍵反応となるホスホロアミダイト法において、トシル酸コリンなど多様な極性頭部ユニットを用いることで類縁体合成を展開した。
【結果と考察】これまでに極性頭部の窒素原子に対して順次メチル化数が異なる類縁体の他、D 化メチルを導入した同位体プローブの合成を完了した。
[Background and purpose] Phosphatidylcholine is a main component of various biological membranes and is a phospholipid indispensable for vital activities such as cells. Similarly, phosphatidylethanolamine is also known as a constituent of cell membranes, with only a slight difference in the degree of methylation of the nitrogen atom in the polar head. However, in the cell membrane, phosphatidylcholine is localized in the outer layer and phosphatidylethanolamine is localized in the inner layer to form asymmetry. It is believed that this is due to the action of proteins that selectively correlate phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. Therefore, in this study, we developed comprehensive analog synthesis of phosphatidylcholine and aimed to create useful biological tools that contribute to biochemical analysis.
[Methods] For the synthesis of phosphatidylcholines, the method of phospholipid synthesis established in the laboratory to which we belong was applied. Among them, in the phosphoramidite method, which is a key reaction, analog synthesis was developed by using various polar head units such as choline tosylate.
[Results and discussion] So far, we have completed the synthesis of isotope probes into which methyl D has been introduced, as well as analogs with different numbers of methylation for nitrogen atoms in the polar head.

phospholipid, phosphatidylcholine, total synthesis

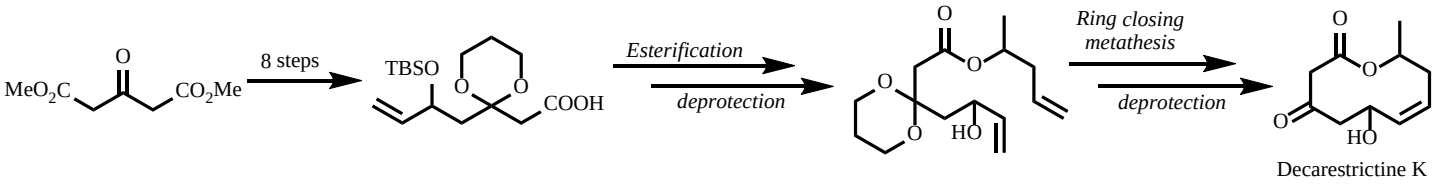
発表責任者：安部真人（abe.masato.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：4F02-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

Decarestrictine K の合成
The synthesis of decarestrictine K

○鈴木 隆之介[1]、勝田 亮[2]、上羽 隼平[2]、若森 晋之介[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2]、石神 健[2] ([1]東農大院・応生、[2]東農大・生命)
○Ryunosuke SUZUKI[1], Ryo KATSUTA[2], Shumpei UEBA[2], Shinnosuke WAKAMORI[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2], Ken ISHIGAMI[2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agric.)

当研究グループでは decarestrictine 類の合成と立体化学の解明を行っている。
Decarestrictine K はアオカビの一種である *Penicillium simplicissimum* より単離された 10 員環ラクトンであり、コレステロール生合成阻害活性を有することが報告されている。本化合物は立体化学が未決定であることから、筆者は立体化学の決定を目的として合成研究に着手した。この結果 3-オキソグルタル酸の非対称化および閉環メタセシスでの 10 員環ラクトン構築を鍵反応として 12 段階での(±)-decarestrictine K の合成に成功したので報告する。



Decarestrictine K is a ten-membered lactone, which has been isolated from *Penicillium simplicissimum* and reported to regulate the biosynthesis of cholesterol. Since the stereochemistry of the compound has not yet been determined, the synthetic study was conducted for the sake of determining the stereochemistry. As a result, the first synthesis of the (±)-decarestrictine K was achieved in 12 steps from dimethyl 3-oxoglutarate using ring closing metathesis as a key step.

Decarestrictine, lactone, synthesis

発表責任者：勝田　亮（r3katsut@nodai.ac.jp）

講演番号：4F02-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

比較機能解析によるテルペン合成酵素の生成物特性制御機構の解明

Elucidation of molecular mechanisms for product specificity of terpene synthases by comparative functional analyses

○天野 博之[1]、栗栖 尚嗣[2]、山家 史大[2]、廣森 美樹[2]、和氣 駿之[2]、中山 亨[2]、高橋 征司[2]([1]東北大工、[2]東北大院工)
○Hiroyuki AMANO[1], Naotugu KURISU[2], Humihiro YANBE[2], Miki HIROMORI[2], Toshiyuki WAKI[2], Toru NAKAYAMA[2], Seiji TAKAHASHI[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Grad. Tohoku Univ.)

植物の特化代謝産物の一つであるテルペノイドは，非常に構造多様性に富む産業的に有用な化合物であり，その基本骨格はテルペン合成酵素（TPS）と総称される酵素によって合成される．高等植物のゲノム上には生成物特性が異なる複数の TPS 遺伝子がコードされているが，生成物構造制御の分子機構については未解明な部分が多い．多様な特性の TPS パラログは各植物種の進化の過程で遺伝子重複に伴い獲得されたと考えられているため，同一種由来の TPS の構造-機能相関の比較解析により，進化の過程でどのように生成物特異性が決定されてきたかを明らかにできると考えた．本研究では，網羅的に機能同定されてきたセイヨウトウキ（*Angelica archangelica*）由来 TPS ファミリー（AaTPS）について，一次配列同一性が高く，かつ生成物特異性の異なる酵素間の比較機能解析を行った．AaTPS4 と AaTPS4’はアミノ酸配列が 94%同一であるが，AaTPS4 は非環式の β-ミルセンのみを生成するのに対し，AaTPS4’は環式の α-ピネンと β-ピネンを生成する．そこで，構造モデルから予測された基質結合ポケット形成残基のうち，両者で異なる残基をそれぞれ置換した変異酵素を作製し，機能解析を行った．それにより特定された生成物特性決定に重要な残基のポケット内部における配置から，ポケット内部の形状が導入される基質の立体配置を矯正し，結果として環式，非環式の生成物特性が生じていることが示唆された．

Terpenoids, one of the specialized metabolites of plants, are industrially useful compounds with great structural diversity, and their basic skeletons are synthesized by enzymes termed terpene synthases (TPSs). Higher plants have plural kinds of TPSs with different product properties on their genomes. However, precise molecular mechanisms for regulation of product structures remain to be elucidated. Since TPS paralogs are considered to be acquired through gene duplication and mutation during evolution of each plant species, comparative analysis of structure-function relationship of TPS paralogs from same plant species is a promising approach for identification of important residues that determine the product structure. In this study, we performed comparative analyses of TPSs from Garden Angelica (*Angelica archangelica*) (AaTPS). AaTPS4 and AaTPS4’ are highly homologous protein sharing 94% sequence identity, whereas their major products are an acyclic terpenoid (β-myrcene) and cyclic terpenoids (α-pinene and β-pinene), respectively. Substitutions of different residues, predicted to be located in the vicinity of a substrate, revealed key residues in the product specificities, which might determine the conformation of the substrate and/or the carbocation intermediate in the catalytic pocket.

Terpene synthases, Terpenoids, Angelica archangelica

発表責任者：高橋征司（seiji.takahashi.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4F02-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

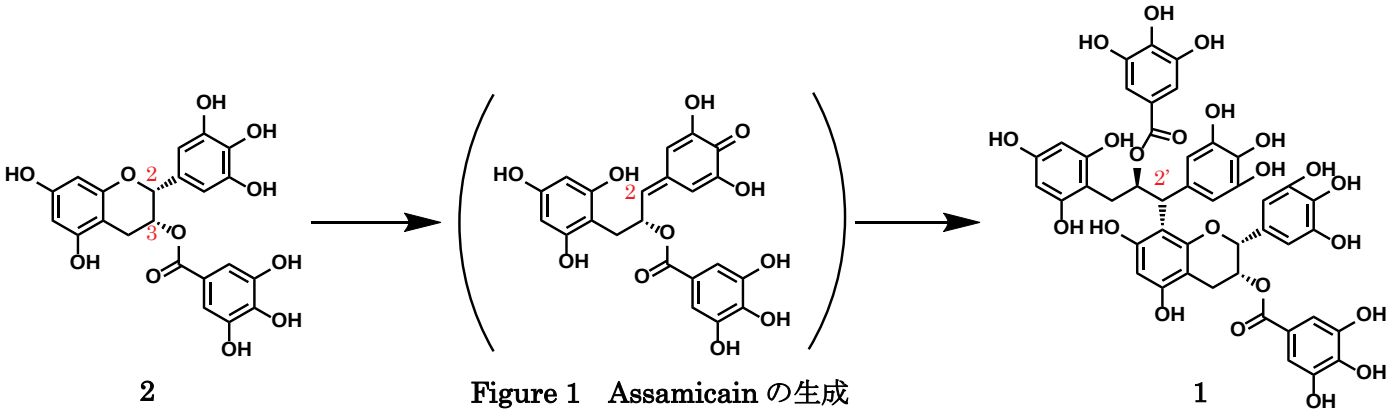
Assamicain 類生成の推定

Estimated production of Assamicains

○林 辰尭、柳瀬 笑子 (岐阜大院自然科技)
○Tatsuaki HAYASHI, Emiko YANASE (Graduate School of Natural Science and Technology Gifu Univ.)

紅茶は世界中で広く消費されている飲料である。紅茶の製造工程には萎凋、揉捻、発酵、乾燥が存在する。発酵は紅茶の風味を決定する重要な工程であり、この間にカテキンが酸化酵素によってテアフラビンやテアルビジンなどの赤色化合物に変化する。一方、発酵の後に行われる乾燥工程では茶葉の色調変化や香気成分の形成などが確認できる。本研究では、乾燥工程での成分変化を調査するため、この工程を模した条件でモデル反応を行った。カテキン類の一つである(-)-EGCG(**2**)を固体条件で加熱を行い HPLC によりその変化を確認したところ複数の化合物の形成が確認できた。NMR、LC-MS 分析より、これらは Assamicain 類(**1**)であると判明した。**1** は **2** の C 環の開裂を伴いキノンメチド中間体を形成し、2 位の sp2 炭素へもう一方のカテキン分子が求核攻撃を行うことで生成すると推測された。この時、sp2 炭素への求核攻撃は Re 面からと Si 面からの二通りが考えられ、どちらの立体であるかを J-HMBC を用いて炭素-水素カップリングを測定することで決定した。

Assamicain(**1**) was isolated from the fresh leaves of *Camellia sinensis* var. *Assamica* by Hashimoto *et al.* In 1989. However, the formation of compound **1** has not been studied since then. Therefore, compound **1** was prepared, its absolute configuration was determined, and the reaction mechanism was proposed. Since there is a possibility that C-2’ of compound **1** has two conformations of R and S, J-HMBC was used to determine this. As a result, the absolute conformation of C-2’ was determined to be R. This suggests that the nucleophilic attack on the sp2 carbon of the quinone methide intermediate is obstructed by the C-3 gallate group of catechins.



2 **Figure 1　Assamicain の生成** **1**

Assamicain, EGCG, Black tea

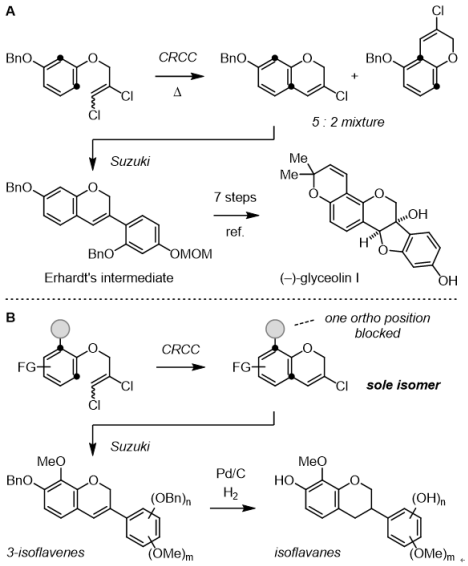
講演番号：4F02-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム F

Claisen 転位環化連続反応を介したイソフラベン誘導体およびイソフラバン天然物の分岐合成

Divergent Synthesis of Isoflavenes and Isoflavan Natural Products Through Claisen Rearrangement Cyclization Cascade

○姜 法雄[1]、大江 拓人[1]、清水 夕稀[1]、滝川 浩郷[2] ([1]神戸大院農、[2]東大院農)
○ Bubwoong Kang[1], Takuto Oe[1], Yuki Shimizu[1], Hirosato Takikawa[2] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Kobe Univ., [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. of Tokyo)

イソフラベンは数多く天然から見出されるだけでなく、化学変換によってイソフラバン類をはじめとする天然物へと変換できる有用な合成素子である。それゆえイソフラベン合成は無数に報告されているものの、既存法には、有毒な水銀や不安定な基質、多段階を要する、あるいは低収率であるなどの問題がある。我々はこうした問題のないイソフラベン合成法として、フェノール由来のジクロロアリルエーテルのクライゼン転位-環化連続反応（CRCC）に着目し、これを用いてglyceollin Iの形式全合成を達成している（右図**A**）［Takikawa, H. *et al. Tetrahedron Lett.* **2014**, *55,* 1826］。我々は本手法の更なる応用例として、複数のイソフラバン天然物の効率的な分岐的全合成を行った。CRCCにおける位置異性体の生成は、アリルエーテル基質にあるオルト位炭素の一方に置換基を導入することで、完全に抑制できることが明らかになった（右図**B**）。生成する3-クロロ-2*H*-クロメンを共通中間体とし、鈴木カップリングを経て3つのイソフラベン誘導体および3つのイソフラバン天然物（duartin, 7-hydroxy-2′,3′,4′,5′,8-pentamethoxyisoflavan, 8-methoxyvestitol）の分岐的な迅速合成に成功した（内2つが初の化学合成）。



Isoflavenes are not only found from nature, but are also useful synthetic building blocks which be converted to isoflavans and other natural products by chemical. Therefore numerous isoflavene syntheses have been reported, while the existing methods suffer from the use of toxic mercury, unstable substrates, or multiple steps, or low yields. As another method free from these issues, we took an attention to the Claisen rearrangement-cyclization-consecutive reaction (CRCC) of phenol-derived dichloroallyl ethers, and previously applied this CRCC to the formal synthesis of glyceoillin I［*TL* **2014**］(Figure A). To show further application of this CRCC, we tested the substrate with its one ortho-carbon blocked by substitution. It turned out that the formation of regioisomers in CRCC was completely suppressed by substittion at one *ortho*-carbon in the allyl ether substrate (Figure B). Through Suzuki coupling using the generated 3-chloro-2*H*-chromene as a common intermediate, three isoflavene derivatives and three isoflavan natural products (duartin, an anti-tumor 7-hydroxy-2′,3′,4′,5′,8-pentamethoxyisoflavan, 8- methoxyvestitol) have been successfully branched and synthesized.

isoflavan, isoflavene, Claisen rearrangement

発表責任者：姜法雄（kangb@pegasus.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4F04-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

キイロショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体機能発現における RIC3 の関与

Contributions of RIC3 on the functional expression of nicotinic acetylcholine recptors from *Drosophila melanogaster*

○伊原 誠、高山 浩一、小森 勇磨、神谷 昌輝、西浦 凜、松田 一彦（近畿大農）
○Makoto IHARA, Koichi TAKAYAMA, Yuma KOMORI, Masaki KAMIYA, RIN NISHIURA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は、ネオニコチノイド系殺虫剤を初めとする様々な生理活性物質の分子標的として知られる。長年にわたり、昆虫の nAChR は様々な発現系で組み換えタンパク質として機能発現させることが困難とされてきたが、近年、演者らは RIC3, TMX3, UNC50 が、ショウジョウバエやハナバチの nAChR をアフリカツメガエルの卵母細胞に機能的発現する際の補助タンパク質として重要であることを報告した(Ihara et al 2020)。これら補助タンパク質のなかで、RIC3 には多くのバリアントが存在するが、RIC3 のバリアントが nAChR の発現制御にどのように関与しているのか、また RIC3 バリアントがどのような割合で発現しているのか不明であった。

そこで、本研究では、キイロショウジョウバエの成虫と幼虫における、RIC3 バリアントの発現頻度を解析するとともに、共存させた RIC3 バリアントによって、nAChR サブタイプの発現効率間や薬理学的特性に影響があるかどうかを明らかにすることを目的に解析を進めている。

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) from insect species are targeted by several classes of bioactive ligands, including neonicotinoid insecticides. It has long been considered difficult to functionally express insect nAChR using any heterologous expression systems. However, recently, we have found that cofactor proteins, RIC3, TMX3, and UNC50, help the functional expression of nAChRs from fruit fly and honeybees (Ihara et al., 2020). Among these cofactors, RIC3 has been known to have multiple variants, whereas the detail of expression patterns of RIC3 has been unknown to date. Thus, we analyze the frequency of RIC3 variants expressed in adults and larvae of a fruit fly. Furthermore, we analyze whether the RIC3 variants affect the frequency of expressed nAChR subtypes and the pharmacology of expressed nAChRs. In this presentation, we will show the recent progress in the functional expression of insect nAChRs.

Ihara et al., Cofactor-enabled functional expression of fruit fly, honeybee, and bumblebee nicotinic receptors reveals picomolar neonicotinoid actions. PNAS, 2020 117 (28) 16283-16291

nicotinic acetylcholine receptor, RIC3, cofactor

講演番号：4F04-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

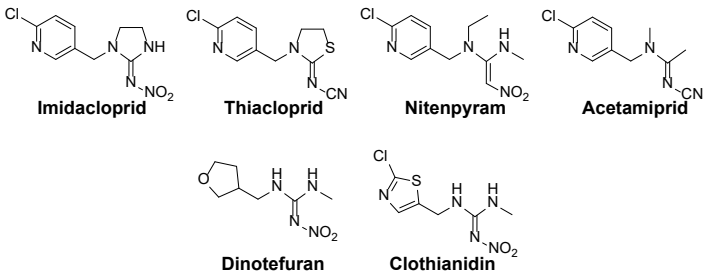
ショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体の薬理学的特性

Pharamocology of Drosophila melanogaster nicotinic acetylcholine receptors

○高山 浩一、小森 勇磨、神谷 昌輝、小泉 航、伊原 誠、松田 一彦（近大農）
○Kouichi TAKAYAMA, Yuma KOMORI, Masaki KAMIYA, Wataru KOIZUMI, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に選択的に作用することが知られていたが、昆虫の nAChR の異所発現が困難であったために、その分子機構や天然毒に対する感受性についても深く理解されていなかった。我々は、昆虫の nAChR の異所発現に成功し、一部のネオニコチノイドについてショウジョウバエやミツバチの nAChR に対する活性を測定した。今回、ショウジョウバエの nAChR を用いて全種のネオニコチノイドの活性を求め比較するとともに、天然の nAChR 作用物質の活性も評価したので報告する。

Dα1/Dα2/Dβ1/Dβ2 nAChR 等の nAChR をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、6 種のネオニコチノイドのアゴニスト活性を測定したところ、ニテンピラム、ジノテフラン、クロチアニジン、アセタミプリドはイミダクロプリドやチアクロプリドより大きな活性化作用を示した。蛇毒であるα-ブンガロトキシンに対する nAChR の感受性を調べたところ、本感受性は nAChR のサブユニットに応じて顕著に変化し、ネオニコチノイド感受性の変化と相関することが明らかとなった。



Actions of neonicotinoids and α-bungarotoxin on *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) were investigated. Nitenpyram, acetamiprid, clothianidin and dinotefuran showed higher agonist efficacy than imidacloprid and thiacloprid on the nAChRs tested. α-Bungarotoxin exhibited variable blocking actions of the nAChRs with potency changing with subunit composition of the nAChRs. The neonicotinoid-sensitivity of the nAChRs was similar to that to the α-bungarotoxin sensitivity.

Neonicotinoid, Alpha Bungarotoxin, Nicotinic Acetylcholine Receptor

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

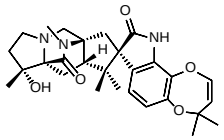
講演番号：4F04-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

パラヘルクアミド A の線虫ニコチン性アセチルコリン受容体阻害活性の分子基盤

Structural basis of the selective inhibitory actions of paraherquamide A on nematode nicotinic acetylcholine receptors.

○大坪 柊也、小泉 航、前川 貴信、伊原 誠、松田 一彦（近大農）
○ Shuya OTSUBO, Wataru KOIZUMI, Takanobu MAEKAWA, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

スピロスクシイミド骨格を中心にもつパラヘルクアミド A は線虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）を阻害し、殺線虫活性を発揮する。これまでの研究で、パラヘルクアミド A は線虫 *Caenorhabditis elegans* の L 型 nAChR に対して選択的に作用することを見出し、報告している。今回、その機構を、まずサブユニットレベルで、次いでアミノ酸のレベルで検討したので報告する。

Paraherquamide A 

UNC-63/UNC-38/ UNC-29/ LEV-8/LEV-1、ACR-16 をはじめとする nAChR はアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた。nAChR のアセチルコリンに対する応答とそれに対するパラヘルクアミド A の阻害活性は膜電位固定法で測定した。

パラヘルクアミド A は ACR-16 nAChR より UNC-63/UNC-38/UNC-29/LEV-8/LEV-1 nAChR に対して高い阻害活性を示し、この選択性は UNC-63/UNC-38/UNC-29/LEV-8/LEV-1 nAChR の LEV-8 サブユニットを ACR-8 サブユニットに置換、あるいは LEV-1 サブユニットを欠損させても維持されたことから、UNC-63、UNC-38 または UNC-29 サブユニットがパラヘルクアミド A の選択的阻害活性に関与していることが示唆された。アセチルコリン結合蛋白質とパラヘルクアミドが作る複合体の X 線結晶構造と部位特異的アミノ酸置換実験の結果から、UNC-63 および UNC-38 サブユニットの loop C との相互作用のみならず UNC-38 の loop E との相互作用がパラヘルクアミド A の UNC-63/UNC-38/ UNC-29/ LEV-8/LEV-1 nAChR に対する選択的阻害作用に関与することが明らかとなった。

In this study, the mechanism of selective inhibitory activity of paraherquamide A on *C. elegans* nicotinic acetylcholine nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) was investigated. UNC-63/UNC-38/UNC-29/ACR-8/LEV-1 and UNC-63/UNC-38/UNC-29/LEV-8 nAChRs as well as UNC-63/UNC-38/UNC-29/LEV-8/LEV-1 nAChR were more paraherquamide A sensitive and ACR-16 nAChR, suggesting that UNC-38, UNC-63 or UNC-29 subunits are involved in the selective action of the compound. The X-ray crystallography of the acetylcholine binding protein in complex with paraherquamide A and results of site-directed mutagenesis revealed that loop C and loop E contribute to the selective paraherquamide A action of the nematode nAChRs.

paraherquamide A, C. elegans, nicotinic acetylcholine receptor

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

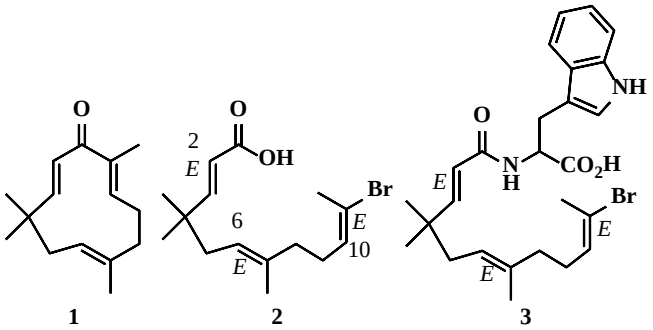
講演番号：4F04-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

抗菌活性を示すゼルンボン誘導体(2*E*,6*E*,10*E*)-11-bromo-4,4,7-trimethylundeca-2,6,10-troienoic acid の合成

Total synthetic of (2*E*,6*E*,10*E*)-11-bromo-4,4,7-trimethyldodeca-2,6,10-trienoic acid showing antibacterial activity

○福本 章太、谷口 朱音、森 美穂、柏崎 玄伍、北山 隆（近畿大院農）
○ Shota FUKUMOTO, Akane TANIGUCHI, Miho MORI, Gengo KASHIWAZAKI, Takashi KITAYAMA (Kindai Univ)

Zerumbone（**1**）のジブロモ化と水酸化カリウム処理により生成する (2*E*,6*E*,10*E*)-11-Bromo-4,4,7-trimethylundeca-2,6,10-trienoic acid（**2**）は，細菌の情報伝達機構である二成分制御系（TCS）のヒスチジンキナーゼ（WalK）の自己リン酸化を阻害する[1]。TCS はさまざまな病原菌の病原性や増殖制御に遺伝子発現の段階で関わっており，タンパクを標的とした抗生物質とは異なる機構での感染治療効果が期待できる。実際，**2** とトリプトファンのコンジュゲートである化合物 **3** が枯草菌に対して **2** より高い抗菌活性を示し，さらに **2** では見られなかったメチシリン耐性黄色ブドウ球菌とバンコマイシン耐性腸球菌に対する抗菌活性も有することが明らかになっている[2]。このような潜在性を有する **2** の構造活性相関を解析するため、全合成ルートを設計し、**2** へ至る中間体や異性体の合成ならびに評価を行った。



(2*E*,6*E*,10*E*)-11-Bromo-4,4,7-trimethylundeca-2,6,10-trienoic acid (**2**) can be synthesized from zerumbone (**1**) by bromination and the subsequent treatment with potassium hydroxide.[1] It was revealed that **2** inhibits the autophosphorylation of the histidine kinase (WalK) in the two-component system (TCS)[1]. As this system controls gene expressions related to pathogenicity and proliferation of bacteria, TCS inhibitors can be expected to provide a new methodology against infection, which is distinct from what the conventional antibiotics could not propose. In fact, the tryptophan conjugate **3** was found to show not only a higher activity against *Bacillus subtilis*, but also antibacterial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*.[2] The potential of **2** encouraged us to develop its total synthetic route to prepare the relevant isomers as well as the intermediates, and their antibacterial activities were examined.

1. Kitayama, T. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5943−5946.
2. Kitayama, T. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1098−1101.

zerumbone, antibacterial activity, structure-activity relationship

発表責任者：柏崎玄伍（kashigen@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4F04-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

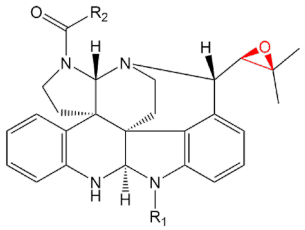
ターゲット活性化作用における昆虫活性物質コムネシンの構造活性相関

Structure activity relationship of target site activity of communesins

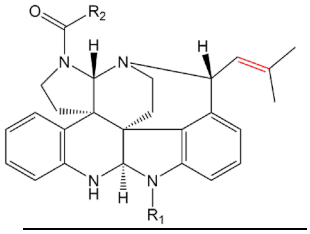
○矢野 雄大[1]、加藤 直樹[3]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1]([1]近畿大、[2]大阪府大、[3]摂南大)

○Yudai Yano[1], Naoki Kato[3], Kenji Kai[2], Hideo Hayashi[2], Makoto Ihara[1], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kinki Univ., [2]Osaka Prefec. Univ., [3]Setsunan Univ.)

Communesin 類は糸状菌 *Penicillium expansum* MK-57 株により生産される殺虫活性をもつインドールアルカロイドである。我々はこれまでに Communesin 類が昆虫の抑制性グルタミン酸受容体(GluCl)を活性化することを見出している。Communesin 類は A から K の異なる構造を持つ 11 種類の類縁体からなり，主にアシル基，エポキシ基，メチル基のこの 3 つの置換基の有無によってグループ分けをすることができる。こうしたグループ分けの指標となる構造が本化合物の GluCl に対する活性においてどの程度寄与しているのか不明である。そこで本研究では、生産菌をオカラ培地で培養し、構造活性相関研究で鍵となる Communesin 類を単離し、カイコガの幼虫に対する殺虫活性と GluCl に対する活性を測定した。その結果 Communesin B が最も高い活性を示し，そのアシル基をペンタジエニル基に置換すると活性が低下したことから、活性向上に Pentadienyl 基が寄与していることが示唆された。また、Communesin B に比べてエポキシ基をもたない Communesin J はやや低い GluCl 活性化作用を示したことから、エポキシ基も活性発現に寄与していることが示唆された。これらの結果と、殺虫活性との関係をもとに、Communesin 類の構造活性相関について議論する。



	R_1	R_2
A	CH_3	CH_3
B	CH_3	Pentadienyl



	R_1	R_2
F	CH_3	CH_3
J	CH_3	Pentadienyl

Communesins are potent insecticidal indole alkaloids that produced by Penicillium expansum MK-57. Communesins activate glutamate-gated chloride channels (GluCls) and exhibit neurotoxicity. Communesins have 11 congeners with different structures from A to K and can be grouped by the presence or absence of three functional groups, an acyl group, an epoxy group and a methyl group. In comparison of Communesin A and B in terms of the activity to GluCl, the pentadienyl group was found to play an important role in the activity. Also, communesin B showed more potent activity to GluCl than Communesin J, suggesting that the epoxy group is involved in the activity. With these results and the correlation with the insecticidal activity, the structure-activity relationship of communesins will be discussed.

Communesins, Glutamate-gated chloride channel, Structure activity relationship

発表責任者：松田　一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4F04-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

様々な品種のアズキ種皮に含まれる色素の分析

Chemical analysis of pigments in seed-coat of various adzuki beans

○吉田 久美[1]、高山 陽子[1]、浅野 友世[1]、萩原 星児[1]、佐藤 綾人[2]（[1]名大情報、[2]名大 ITbM）
○Kumi YOSHIDA[1], Yoko TAKAYAMA[1], Tomoyo ASANO[1], Seiji HAGIHARA[1], Ayato Sato[2] ([1]Grad. Sch. Informatics, Nagoya Univ., [2]ITbM, Nagoya Univ.)

【目的】赤アズキ（*Vigna angularis*）の種皮には、アントシアニンはほとんど存在せず、紫色色素のカテキノピラノシアニジンが含まれる[1]。カテキノピラノシアニジンは、シアニジンとカテキンが縮環した構造を持ち、水にほとんど溶けない。酸性から中性のメタノール緩衝液中で紫色を示すが、光に不安定で速やかに分解する。アズキ餡の紫色はこの色素による。我々は昨年度の本大会で、乾燥アズキからの種皮色素の抽出と定量法について報告した [2]。今回、この方法を用いて様々な品種のアズキ種皮に含まれるカテキノピラノシアニジンの分析を行った。

【方法および結果】

アズキは北海道立十勝農業試験場からの分譲、または、農研機構遺伝子源研究センター ジーンバンクから分譲されたアズキを名古屋大学内の圃場で栽培して得た。赤アズキの乾豆を吸水させた後凍結し、酢酸エチルを加えて抽出した。抽出液を濃縮乾固してからメタノールに再溶解し、逆相カラムを用いた HPLC により分析した。操作は全て暗所で行った。カテキノピラノシアニジン類の含有量は、品種や栽培地によって 5～12 μg/g dry bean と変動があり、これが餡色にも影響すると推測される。さらに、外国産アズキでは、カテキノピラノシアニジン以外の紫色色素が含まれることがわかった。現在、それらの構造について検討中である。

The seed-coat of small red-bean (*Vigna angularis*) contains purple pigments, catechinopyranocyanidins, which has a ring-fused structure of cyanidin and catechin, and is insoluble in water [1]. The pigments show a purple color in an acidic to neutral methanol buffer solutions. In addition they are labile to light and quickly decomposed. The purple color of azuki bean paste is due to this pigment. We reported the extraction and quantitative determination of the seed coat pigment from dried azuki bean at the last year's meetings [2]. In this study, we analyzed the purple pigments in seed coat of various adzuki cultivars using the method. Dried beans were soaked in water, then frozen. The frozen beans were extracted with ethyl acetate, then the extracts were dried up, then analyzed by using HPLC with reversed-phase column.

[1] K. Yoshida et al., *Sci. Rep.*, **9**, 1484 (2019). [2] Y. Takayama et al., The 2021 Annual Meetings of JSBBA (2021).

Vigna ungularis, seed-coat pigment, catechinopyranocyanidin

発表責任者：吉田久美（yoshidak@i.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4F04-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

γ-オリザノール高含有コメ胚芽油を配合した化粧料による塗布美容効果

Cosmetics containing γ-oryzanol-rich rice germ oil bring beauty effects by application.

○小黒 友輝、神足 悟史、中村 紀夫、簗野 卓夫 (簗野ライスファインケミカルズ株式会社)
○Tomoki OGURO, Satoshi KOTARI, Toshio NAKAMURA, Takuo TSUNO (TSUNO RICE FINE CHEMICALS Co., Ltd)

【背景】γ-オリザノールはトリテルペンアルコールや各種植物ステロールのフェルラ酸エステルの総称で米糠特有の栄養成分である。その幅広い有効性から、食品添加剤、化粧品素材、医薬品素材、サプリメント、試料など種々な分野で利用されている。化粧品原料としては、抗酸化、皮脂分泌促進、紫外線防御、皮膚温上昇作用などが知られている。本件では米胚芽油「GX-N」(簗野食品工業株式会社製）を試験対象とした。米胚芽油 GX-N は米糠から米油を抽出した残渣を原料に、独自の製法で製造された素材であり、γ-オリザノールを 30%以上含有している。ここから、化粧品素材としての名称はコメ胚芽油でありながら、γ-オリザノールの機能を強く発揮する可能性が期待できた。よって本研究では該素材を配合した化粧料を調製し、塗布による美容効果について検討した。
【方法】１%GX-N 含有コンディショナーを毛髪に塗布し、UV を約 4.6 J/cm²照射した毛髪から溶出したタンパク質量を測定した。また、静動摩擦測定機で毛髪の動摩擦係数を測定した。一方、GX-N 配合美容クリームを調製し前腕部に塗布し、冷却負荷をかけた後にサーモグラフィーで皮膚温の変化を測定した。
【結果・考察】コンディショナー塗布試験より、紫外線防御効果及び毛髪の摩擦の低減効果が明らかとなった。また、美容クリームの前腕塗布試験では、冷却負荷後、皮膚温が早期に上昇し、皮膚温上昇効果を有することが明らかになった。

Gamma-oryzanol is a functional component specifically contained in rice bran. Rice Germ Oil “GX-N” (Tsuno Food Industrial Co., Ltd.) was manufactured from the residue of rice oil extract by using unique method, and contains 30% or more of γ-oryzanol. We examined beauty effects of the cosmetics containing GX-N, because it was expected that γ-oryzanol shows great functions. One percent GX-N containing conditioner prevented elution of hair proteins caused by UV irradiation. GX-N protects UV hair damage. Moreover, the conditioner decreased friction of hair. Also, 1% GX-N containing cream increased skin temperature after cooling the forearm.

γ-oryzanol, rice germ oil

講演番号：4F04-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

γ-オリザノール高含有米胚芽油の経口摂取による美容効果

Beauty effect of oral intake of γ-oryzanol-rich rice germ oil

○神足 悟史、小林 瑞佳、中村 紀夫、林 千恵子、簗野 卓夫 (簗野ライスファインケミカルズ株式会社)
○ Satoshi KOUTARI, Mizuka KOBAYASHI, Toshio NAKAMURA, Chieko HAYASHI, Takuo TSUNO (TSUNO RICE FINE CHEMICALS Co., Ltd.)

米胚芽油 GX-N(以下 GX-N)は、γ-オリザノールを高含有している米糠由来の植物油である。γ-オリザノールは、医薬品や化粧品用途に利用され、抗酸化作用、抗炎症作用、コレステロール吸収阻害作用などを有している。また、美容効果としては、皮脂腺賦活作用、美白作用、角質水分量の増加作用が報告されているが、その他の肌への効果は十分に明らかになっていない。

本研究では、被験者 28 名(男性 15 名、女性 13 名)を二群に割付し、各群はそれぞれ GX-N 100mg 含有カプセルあるいはプラセボカプセルを 1 日 1 粒、3 ヶ月間摂取した。測定は摂取前、摂取 1 週間目、及び 1、2、3 ヶ月目に実施し、VISIA Evolution による画像解析、Corneometer による角質水分量、Sebumeter による皮脂分泌量測定を行った。角質水分量は GX-N 群、プラセボ群の両群で経時的に有意に増加しており、その増加量は GX-N 群のほうが大きかった。皮脂分泌量は GX-N 群で経時的に有意に減少し、摂取後 1 ヶ月で群間有意差が得られた。また、測定時に実施した VAS アンケートの結果、油っぽさについて GX-N 群が有意に改善していたことから、皮脂分泌量抑制効果は体感が得られる程強いと考えられた。GX-N の経口摂取により、角質水分量の増加及び皮脂分泌量の調整効果が期待される。

The aim of this study was to clarify the influence of oral intake of rice germ oil GX-N (GX-N). GX-N was extracted from rice bran, and contains large amounts of γ-oryzanol, which has great effects to human skin. Human clinical study was designed as single-blind and placebo-controlled test. Twenty-eight subjects were divided into a GX-N group (n=14) and a placebo group (n=14). The subjects were daily administrated GX-N (100 mg) soft capsule or a placebo soft capsule for 3 months. Face measurements (water content value, sebum value and VISIA analysis) were performed one week after of the test started, and also once in a month. As a result, water content values were increased significantly in both groups, but the value of GX-N group showed a larger increase than that of placebo group. Sebum value was significantly reduced in GX-N group. And compared with the placebo group, the GX-N group had a significantly lower sebum value at one month. In Visual Analogue Scale (VAS) questionnaire, GX-N group was significantly improved in terms of oiliness. These results indicated that ingestion of GX-N increases water content and controls sebum secretion.

γ-Oryzanol, Rice germ oil, Sebum

講演番号：4F04-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

フロフラボノイド類の合成に関する研究

Studies on the synthesis of furoflavonoids

○佐藤 謙光[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学、[2]秋田県立大学)
○Yoshiaki SATO[1], Satoru KAWAI[1], Tetuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo denki Univ., [2]Akita kenritu Univ.)

【目的】マメ科植物 *Pongamia glabra* が生産する glabone や同 *Lonchocarpus montanus* に含まれる lanceolatine B など、フラボン A 環にフラン環が縮合したフロフラボン類には、抗がん作用や抗菌作用など興味深い生理活性を有することが報告されている。フラン環縮合により単純フラボンよりも拡張したπ電子系をもつことが、生物活性にどのような影響を及ぼすか興味がもたれたため、発表者らはフロフラボン類の系統的合成法について検討を行っている。これまでに、フラン環にアルキル基／アリール基が置換したフロフラボン B 環にさまざまな酸素官能基を導入した化合物について系統的合成を行い、得られた化合物の生理活性を検討したところ、フラン環が縮合することで対応する単純フラボンよりも生物活性が増強したので、その結果について本会で発表している。

しかし、無置換フラン環が縮合したフロフラボン B 環への置換基導入については十分な量の化合物が得られなかったため、アルキル基／アリール基置換フラン環縮合による生物活性の増強が、フラン環のみに起因するものなのか、それともフラン環に置換したアルキル基／アリール基によるものなのかは明らかにできていない。さらに天然資源由来のフロフラボンのフラン環には置換基が存在しないことから、本研究では、無置換フラン環を導入したフロフラボンの B 環に種々の置換基を導入した化合物の合成と生物活性について検討することとした。

【方法】Williamson エーテル合成反応によりヒドロキシアセトフェノン類と bromoacetaldehyde diethyl acetal または α-ハロケトン類とのエーテルを合成し、これを Bischer インドール合成の変法により環化して ortho-ヒドロキシアセチルベンゾフラン類を合成した。次にベンズアルデヒド類との Claisen-Schmidt 縮合によりヒドロキシフロカルコン類とし、ヨウ素存在下での環化によりフロフラボン、また AcONa 存在下での環化によりフロフラバノンを合成した。合成したフロフラボノイド類の生物活性は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性により判定した。

【結果】本発表では、無置換フラン環が縮合したフロフラボンとフロフラバノンそれぞれについて、B 環に種々の酸素官能基を導入した化合物の合成について報告する。これらの生物活性については、現在検討中である。

A systematic synthesis of the furan ring fused flavone and flavanone were achieved. The biological activities of these compounds are currently under investigation.

Furan, Flavonoids, aldol condensation

講演番号：4F04-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

クマリン類のホルミル化の検討

Investigation of formylation of coumarins

○及川 夏澄[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学、[2]秋田県立大学)
○Kasumi OIKAWA[1], Satoru KAWAI[1], Tetuo TOKIWANO[2], Yuko YOSIZAWA[2] ([1]Tokyo denki Univ, [2]Akita kenritu Univ)

【目的】多くの天然資源由来化合物は複雑な構造を有しており、これらを薬らしい分子とするために、生理活性発現に必要な最小限度の構造を明らかにし、構造を単純化して合成容易なリード化合物とすることが一般的である。このような創薬における基本的アプローチが合成標的化合物減少を促進しているとも考えられている。そこで、従来生理活性発現部位が一つのものをリード化合物としていたところを、複数の生理活性発現部位をもつ複合分子を合成標的化合物とする研究が注目されている。

発表者らは、クマリン骨格とスチルベン骨格の複合分子の系統的合成について検討している。これまでに、7 位にメチル基を導入したクマリンについて、そのメチル基をトリフェニルホスホニウム化し、これとベンズアルデヒド類との Wittig 反応を行うことにより一連の 7-スチリルクマリン類の系統的合成について報告した。この合成経路では、Wittig 反応においてより複雑なメチルクマリン側をホスホニウム塩としているため、ラジカルハロゲン化における副反応やホスホニウム塩自体の不安定性による収率低下の問題を抱えていた。

そこで、メチルクマリンのラジカルハロゲン化・ホスホニウム塩化を経由しないスチリルクマリン合成経路として、ホルミル基を導入したクマリンとホスホニウム塩との Wittig 反応によるスチリルクマリン類の系統的合成を目的に、本発表ではクマリン類のホルミル化について検討したので報告する。また、数種のスチリルクマリン類の全骨髄性白血病細胞 HL60 に対する増殖抑制活性についてもあわせて報告する。

【方法】クマリン類は、フェノール類を出発物質として、濃硫酸存在下でβ-ケトエステル類との Pechmann 縮合により合成した。4-ヒドロキシクマリン類は、フェノール類とメルドラム酸の Pechmann 縮合により合成した。クマリンのホルミル化については、芳香環のホルミル化反応である Vilsmeier-Haack 反応、Duff 反応、Rieche 反応について検討した。

【結果】数種のクマリン類について Duff 反応によりホルミル化を行ったところ、ホルミルクマリン類を得ることができた（収率:5.2～27%）。

For the purpose of the systematic synthesis of styryl coumarins by the Wittig reaction of coumarins and phosphonium salts with formyl groups, the formylation of coumarins was investigated by the Vilsmeier-Haack, Duff, and Rieche reactions. We also report on the growth inhibitory activity of several styrylcoumarins against HL60 all myeloid leukemia cells.

coumarins, formylation, styrylcoumarins

講演番号：4F04-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

3-スチリルフラボン類の合成及び HL-60 に対する増殖抑制活性の研究

Synthesis of 3-Styrylflavones and their biological activities.

○堤 ありさ[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学、[2]秋田県立大学)
○Arisa TSUTSUMI[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】これまでに、生理活性発現部位を一つだけ持つ天然資源由来化合物をリード化合物として精力的な研究が行われてきたが、天然資源中からの新規構造化合物の発見の頻度は低下しており、合成標的構造の枯渇が問題化している。そこで生理活性発現部位を複数組み合わせた複合分子を合成することで、新たな生物活性の発現や活性増強をはかる研究が注目されている。当研究室では、クマリン骨格やクロメン骨格にスチリル基を導入した複合分子の系統的合成について、2018 年度および 2020 年度の本会にて報告している。また、フラボンとスチルベンの複合分子であるスチリルフラボン類の合成について検討している。スチリル基導入によりクマリンやクロメンで活性増強が認められたので、同様にフラボン C 環へスチリル基を導入した 3-スチリルフラボン類の合成について報告する。
【方法】3-スチリルフラボンのスチリル基における E 体と Z 体の生物活性の差についても興味が持たれたので、両者が著量生成する Wittig 反応によるスチリル基導入を行うこととした。Wittig 反応において、フラボン側をホスホニウム塩、ベンジル基側をアルデヒドとする経路と逆にフラボン側をアルデヒドとし、ベンジル基側をホスホニウム塩とする経路があるが、フラボン骨格へのホルミル基導入は、芳香環である A 環と B 環で優先的に起こり、C 環 3 位のホルミル化は困難であることが予想された。そこで、フラボン側をホスホニウム塩側にするため、2’-ヒドロキシプロピオフェノン類を出発物質とし、THF 溶媒下で安息香酸類との Yamaguchi エステル化を行い 2-プロピオフェニルベンゾアート類を合成した。これを塩基性条件下で Baker-Venkataraman 転位, 分子内環化を経て数種の 3-メチルフラボン類を合成した。その 3 位のメチル基を Wohl-Ziegler 反応により臭素化した後、PPh3 と反応させてホスホニウム塩とし、ベンズアルデヒド類と Wittig 反応させて、3-(E)-スチリルフラボン類を合成した。
【結果】3-メチルフラボン類と 3-(E)-スチリルフラボン類を合成した。合成した化合物の前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標とした生物活性は現在検討中です。

Since the introdution of the styryl group at the C-3 of flavone is expected to enhance the biological activities, a systematic synthesis of 3-styrylflavone via 3-methylflavone were achieved. Their biological activities are currently under investigation.

Flavone, HL-60, biological activitie

講演番号：4F04-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム F

6-スチリルフラボン類の合成及び生物活性相関に関する研究

Synthesis of 6-styrylflavones and their biological activity relationship

○松下 剛大[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲夫[2]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学、[2]秋田県立大学)
○Takehiro MATSUSHITA[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo denki Univ, [2]Akita prefectural Univ)

【目的】天然資源から新規化合物が発見される頻度は低下しており、天然資源由来化合物をリード化合物とする創薬研究では、合成標的の減少が問題化している。天然資源由来化合物をリード化合物とする創薬研究では、複雑な構造を有する天然資源由来化合物を薬らしい分子にするため、生理活性発現に必要な最小限度の構造を明らかし、構造を単純化して合成容易なリード化合物とすることが一般的である。このような創薬における基本的アプローチが合成標的化合物減少を促進していると考えられている。そこで、従来生理活性発現部位が一つのものをリード化合物としていたところを、複数の生理活性発現部位をもつ複合分子を合成標的とする研究に注目が集まっている。演者らは、これまでにクマリンースチルベン複合分子やクロメンースチルベン複合分子の系統的合成とその生物活性について報告している。

本研究では、抗酸化作用、抗炎症作用などの多様な生物活性を示すフラボンとがん抑制効果が報告されているスチルベンの複合分子であるフラボンースチルベン複合分子の系統的合成とその生物活性について検討したので報告する。

【方法】フラボン A 環にスチリル基を導入したフラボンースチルベン複合分子は、2’-ヒドロキシ-5’-メチルアセトフェノンを安息香酸類でエステル化して 2-ヒドロキシ-4-メチルフェニルベンゾアートとした。これを塩基性条件化で Baker-Venkataraman 転位させて 1,3-ジオン中間体とし、酸性条件下で環化することで合成した。得られた6-メチルフラボン類はWohl-Ziegler反応による臭素化、続く PPh_3 との反応によりホスホニウム塩とし、これをベンズアルデヒド類と Wittig 反応させ、6-スチリルフラボン類を E 体と Z 体の混合物として得た。両者を分離して以後の実験に使用した。

【結果】6-メチルフラボンを経由した 6-スチリルフラボン類の系統的合成を行った。これらの生物活性については、現在検討中である。

A systematic synthesis of 6-styrylflavone via 6-methylflavone were achieved. Their biological activities are currently under investigation. We are also attempting to introduce styryl groups at other positions.

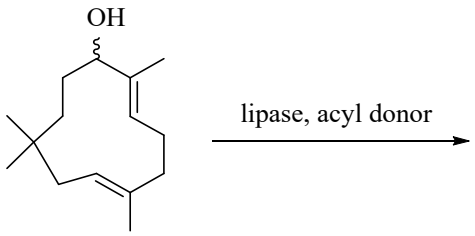
flavones, HL-60, growth-inhibitory activity

講演番号：4F07-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

リパーゼによる 10,11-ジヒドロゼルンボールの立体選択的トランスエステル化

Stereoselective transesterification of 10,11-dihydrozerumbol by lipase

○寺田 百合香、柏崎 玄伍、北山 隆 (近畿大院農)
○Yurika TERADA, Gengo KASHIWAZAKI, Takashi KITAYAMA (Kindai Univ.)



10,11-dihydrozerumbol

多くの有機化合物の中でも光学活性体は医薬や材料分野において重要な役割を果たしており，それぞれのエナンチオマーは生体内で目的とする作用とは全く異なる性質をもつことがあるため，光学活性体を選択的につくり分けることは非常に重要である。リパーゼを触媒とし，二級アルコールを有機溶媒中でアシルドナーと反応させると，Kazlauskas の経験則にしたがった立体選択性を示す。ところがハナショウガの根茎部から得られるゼルンボンの誘導体の多くが，Kazlauskas の経験則に反する立体選択性を示し，その中には *cis* 体と *trans* 体で全く逆の選択性を示すものが存在することを当研究室で明らかとした。しかし，その規則性を解明するための情報はまだ十分とは言えない。

そこで我々は， 10,11-ジヒドロゼルンボールの合成法を開発し，これを基質としてリパーゼを触媒に用いた立体選択的トランスエステル化について検討し，興味深い知見を得たので報告する。

Among many organic compounds, optically active ones have played an important role in the medicine and material fields, and chemists have struggled to selectively synthesize enantiomerically pure molecules because some enantiomers may have totally undesirable properties in vivo. One of these methods is transesterification of a secondary alcohol with an acyl donor by lipase in an organic solvent, and the empirical Kazlauskas rule is known to predict its stereoselectivities. However, we have found several exceptions. However, many derivatives of zerumbone obtained from the rhizome of *Zingiber zerumbet* Smith showed stereoselectivity contrary to Kazlauskas' rule. A more surprising result is that *cis*- and *trans*-tetrahydrozerumbol showed completely opposite stereoselectivity. These observations indicated that the comprehensive understanding of this complicated rule is not yet achieved though it is an attractive challenge to synthesize various useful compounds by controlling these stereoselectivities. In order to gain a broader knowledge into this issue, we have recently developed a synthetic method for 10,11-dihydrozerumbol, and investigated the lipase-catalyzed transesterification of this new substrate.

zerumbone, lipase, transesterification

発表責任者：柏崎玄伍（kashigen@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4F07-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

計算化学的手法による NFAT-133 の配座解析と相対立体配置の予測

The conformational analysis and relative stereochemistry prediction of NFAT-133 by computational chemistry

○茂田 巧、滝川 浩郷、小倉 由資（東大院農生科）
○Takumi Shigeta, Hirosato Takikawa, Yusuke Ogura (UTokyo)

NFAT-133 は 1995 年に初めて放線菌の培養液から単離されたポリケチドであり、多様な生物活性が報告されている。当初はその平面構造のみ報告されたが、2016 年、改良モッシャー法や二次元 NOE 測定、*J*-based 配座解析により、その絶対立体配置は 10*R*,11*R*,12*S* と提唱された。しかしその後の全合成研究により、正しい絶対立体配置は 10*S*,11*R*,12*S* と訂正された。本研究は計算化学的手法による天然物と提唱構造の配座解析を通して、NFAT-133 の相対立体配置予測の正確性を追求するものである。

相対立体配置の異なる 4 種の立体異性体に対し DP4+法を適用することで、天然物の相対立体配置は正しく推測できたが、ポテンシャルエネルギーを用いてボルツマン平均を取ると、DP4+確率が 89.03%と不十分であった。そこで各種配座を精査したところ、1 位 OH 基と 13 位カルボニル酸素が水素結合した配座の寄与が大きくなっていた。それを減じるため、ギブズの自由エネルギーを用いてボルツマン平均を取ると、DP4+確率が 99.98%にまで向上した。本ボルツマン平均に従った配座解析を通して *J* 値を計算すると、実測値と非常に良い一致を示した。本ボルツマン平均に基づくと天然物は主に 4 つの配座を有しており、この配座多型性が *J* 値による配座解析を難しくしていたと考えられる。

NFAT-133 is a polyketide isolated from *Streptomyces* sp., which exhibits various biological activities. While planer structure of NFAT-133 was reported in 1995, its absolute stereochemistry was proposed in 2016 as 10*R*,11*R*,12*S* via modified Mosher's method, 2D-NOE measurement, and *J*-based conformational analysis. However, the absolute configuration of the natural NFAT-133 was corrected to 10*S*,11*R*,12*S* through its total synthesis. We pursued the prediction of its relative stereochemistry by computational conformational analysis.

We were able to correctly predict relative stereochemistry of natural NFAT-133 by standard DP4+ method. However, the probability by Boltzmann average based on potential energies was remained to be 89.03% due to the overestimated contributions of hydrogen bond between C1-OH and C13-carbonyl oxygen. To reduce these inappropriate contributions, Boltzmann average was revised to be based on Gibbs free energies, by which DP4+ probability was increased to be 99.98%. Four major conformers of natural NFAT-133 were observed in the revised Boltzmann average, which makes the conformational analysis based on *J*-values difficult.

NFAT-133, computational chemistry, conformational analysis

発表責任者：小倉 由資（ayskogura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4F07-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

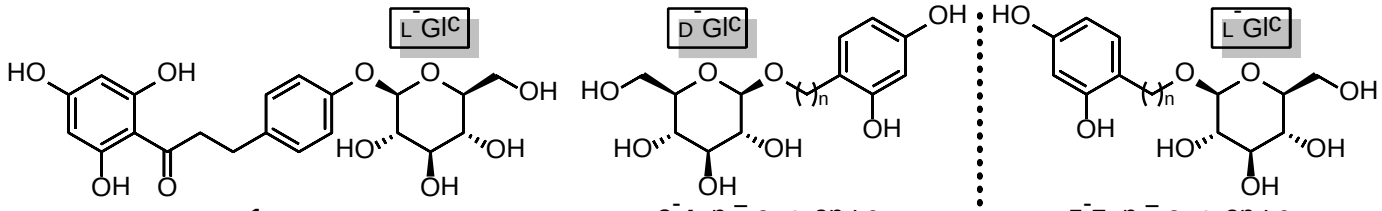
レゾルシノールアルキル L-グルコシドの化学合成とチロシナーゼ阻害活性

Chemical synthesis of resorcinol alkyl L-glucosides and their tyrosinase inhibitory activity

○井川 奏乃、石岡 和佳奈、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Sono Igawa, Wakana Ishioka, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

天然チロシナーゼ阻害剤のフロレチン-4-*O*-β-L-グルコピラノシド(**1**)は，そのエナンチオマーである D-グルコシドよりも 1.4 倍ほど強力な活性を示す．このような L-グルコシド型チロシナーゼ阻害剤の有効性を明らかにするため，本研究では既存のレゾルシノールアルキル D-グルコシド **2**-**4** の糖部分を L-グルコシドに置き換えた誘導体 **5**-**7** の化学合成と阻害活性の評価を行った．

アルデヒド誘導体から，Wittig 反応および選択的水素添加などを経由し，アグリコン部分を合成した．L-グルコース供与体との Koenigs-Knorr 反応により，保護 L-グルコシドを得た．最後に保護基を除去し，**5**-**7** を化学合成した．阻害活性を評価した結果，炭素鎖数 2 の L-グルコシド **5** (IC_{50} = 19.7 μM)は D-グルコシド **2** (IC_{50} = 35.9 μM)の 2 倍の活性を持つことが分かった．一方，炭素鎖数 6 の **7** (IC_{50} = 0.93 μM)は **4** (IC_{50} = 0.63 μM)よりも弱い活性を示した．したがって，L-グルコシドの阻害剤としての有効性は，レゾルシノール環との距離により変化することが明らかになった．



The natural tyrosinase inhibitor, phloretin-4-*O*-β-L-glucopyranoside (**1**), is 1.4-times more potent than its enantiomer of the D-glucoside analogue. To clarify the effectiveness of L-glucoside-type tyrosinase inhibitor, we have conducted the investigation of the synthesis and evaluation of L-glucosides **5**-**7**, which were analogous to the known resorcinol alkyl D-glucosides **2**-**4**.

Aglycones were synthesized from an aldehyde derivative through Wittig reaction and selective hydrogenation as the key steps. Koenigs-Knorr reaction between the aglycones and L-glucose donor afforded protected analogues, which were further transformed into desired L-glucosides **5**-**7**. As a result of the evaluation of tyrosinase inhibitor, L-glucoside **5** (IC_{50} = 19.7 μM) having C_2 spacer was 2-times more potent than D-glucoside **2** (IC_{50} = 35.9 μM). In contrast, **7** (IC_{50} = 0.93 μM) having C_6 spacer was weaker than **4** (IC_{50} = 0.63 μM), indicating that the effectiveness of L-glucoside-type inhibitor is variable depending on the distance between the resorcinol ring and the sugar moiety.

chemical synthesis, resorcinol alkyl L-glucoside, tyrosinase inhibitory activity

講演番号：4F07-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

ハスモンヨトウにおける FACs の生理的意義の解明
Search for active role of FACs with CRISPR-Cas9

○丸岡 毅、白井 雄、大門 高明、森 直樹、吉永 直子 (京大農)
○Tsuyoshi MARUOKA, Yu SHIRAI, Takaaki DAIMON, Naoki MORI, Naoko YOSHINAGA (Kyoto Univ.)

ある種の植物と昆虫間には化学物質を介した高度な生存戦略が見られ，有名な事例に，鱗翅目幼虫-植物-寄生蜂の三者間相互作用がある．幼虫が植物を食害すると，植物は食害に応答して特異的な揮発成分を放出し，寄生蜂はこの揮発成分を察知して幼虫へのアプローチと寄生を達成する．これは植物の間接防御と位置付けられている．植物に誘導抵抗性を引き起こすエリシターとして，鱗翅目幼虫の吐き出し液中から FACs, Fatty acid-Amino acid Conjugates が同定された (Fig.1)．FACs は不飽和脂肪酸とグルタミンがアミド結合で縮合した化合物である．幼虫が FACs を生合成することは，植物の防御応答を誘導する点で生態的に不利となる．しかしながら，幼虫が積極的に FACs を合成することから，FACs は幼虫にとって生理的に重要な役割を持つと考えられる．そこで我々は，ゲノム編集技術の CRISPR-Cas9 を用いて鱗翅目ヤガ科ハスモンヨトウ *Spodoptera litula* における FACs の生理的役割の解明を目指した．本講演では，CRISPR-Cas9 により FACs 分解酵素を欠損したハスモンヨトウ幼虫の代謝，並びに FACs の生理的役割の考察について発表する．

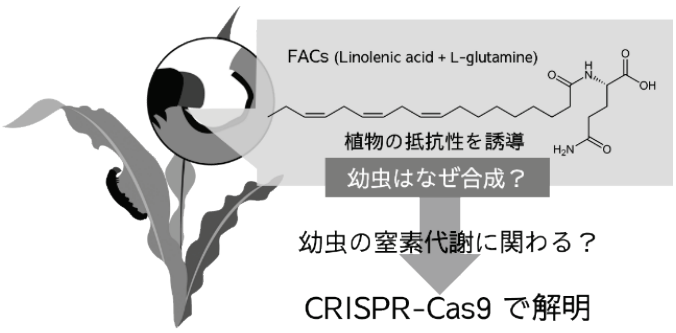


Fig.1 幼虫の吐き出し液中より単離された FACs．植物は FACs を感知し，防御応答として揮発成分を放出する．

Organisms live in diverse interactions and often form complex relationships. Chemical-mediated survival strategies have found between certain plants and insects. When the caterpillar eats the plant, the plant recognizes FACs (Fatty acid-Amino acid Conjugates) in the saliva of the caterpillar, and release volatile organic compounds (VOCs). Relying on VOCs, the parasitoid wasp, which is the natural enemy of the caterpillar, locates and parasitize. This is called the indirect plant defense. Since caterpillars have FACs making them easy to be found by natural enemies, the biosynthesis of FACs is ecologically disadvantageous. Why do caterpillars have FACs? Here is an example of the structure of FACs (Fig.1). FACs is conjugates of such unsaturated fatty acids and glutamine. Fatty acid components have various analogs, but glutamine is common. Despite the fitness cost due to the induction of indirect plant defense, FACs must play essential and important roles in insect. To elucidate the physiological role of FACs in the *Spodoptera litula* (Lepidoptera: Noctuidae), we knocked out FACs-hydrolase with genome editing technology, CRISPR-Cas9. In this talk, we will present the metabolism of *S. litura* larvae deficient in FACs-hydrolase and the consideration of the physiological role of FACs.

Fatty acid Amino acid Conjugates, CRISPR-Cas9, Nitrogen metabolism

発表責任者：丸岡毅（maruoka.tsuyoshi.82n@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4F07-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

ツルマメの登熟過程における種皮成分の変化の分析

Changes in seed-coat components of wild soybean (*Glycine soja*) during maturation

○仁瓶 栞里[1]、杉田 千恵子[1]、吉野 奈津子[2]、近藤 忠雄[1]、吉田 久美[1] ([1]名大院情、[2]名大全技セ)
○Shiori NIHEI[1], Chieko SUGITA[1], Natsuko YOSHINO[2], Tadao KONDO[1], Kumi YOSHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]TCNU, Nagoya Univ.)

【目的】我々の研究室では、黒ダイズ(*Glycine max*)種皮色素であるシアニジン 3-グルコシド（Cy3G）の生合成経路の研究を行っており、緑色の未熟種皮に従来の生合成経路には無い前駆体の 5,7,3',4'-テトラヒドロキシフラブ-2-エン-3-オール-3-*O*-グルコシド(2F3G)が含まれることを明らかにした[1)]。ツルマメ(*Glycine soja*)は、ダイズの原種とされ、莢長はおよそ 2-4 cm、種子は 0.5 cm 程度とダイズよりもかなり小さいが、黒ダイズと同様に未熟種皮は緑色で登熟に伴い黒色に変化する。今回、ツルマメの登熟に伴う種皮成分の変化を分析したので報告する。
【方法および結果】ツルマメは、名古屋大学博物館野外観察園で栽培した。収穫した莢から豆を取り出し、種皮の着色の程度により、緑色を S1、わずかに赤色を帯びた S2、全体が褐色の S3、黒色の S4 の 4 段階に分けた。まず、黒色の S4 の種子を液体窒素で凍結後、3% TFA-50% CH_3CN aq. で抽出し、HPLC で分析した。主色素は Cy3G で、10%程度デルフィニジン 3-グルコシド（Dp3G）が含まれることが分かった[2)]。次に、S1 から S4 の種子を同様に凍結後 50% CH_3CN aq. で抽出して前駆体の分析を行った。抽出液に 2F3G が検出され、その量は、S2 で最も高く、ステージが進むにつれ減少した。このことから、ツルマメにおいても黒ダイズと同様に 2F3G から Cy3G になる生合成経路が存在することが示唆された。次に、Dp3G の前駆体の探索を行った。Dp3G をシアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元して、5,7,3',4',5'-ペンタヒドロキシフラブ-2-エン-3-オール-3- *O* グルコシドを調製した。現在この標品を用いて、ツルマメ種皮中にこの前駆体が存在するか探索中である。

We has been studying the biosynthetic pathway of cyanidin 3-glucoside (Cy3G) in the seed-coat of black soybean (*Glycine max*). In the immature green-colored seed coat, a precursor of Cy3G, 5,7,3',4'-tetrahydroxyflav-2-en-3-ol 3-*O*-glucoside (2F3G), which is not found in the previously reported biosynthetic pathway, is contained[1)]. Wild soybean (*Glycine soja*) is considered as an ancestor of soybean and shows the same color change from green to black during maturation. Thus, we analyzed the seed-coat components in the wild soybean along with its color change. The seed of wild soybeans were divided into four stages according to the seed-coat color: green (S1), slightly red (S2), brown (S3) and black (S4). At the first seeds at S4 were extracted with 3%TFA-50% CH_3CN aq. and analyzed by HPLC. The major anthocyanin was Cy3G and delphinidin 3-glucoside (Dp3G) was also contained with approximately 10%[2)]. 2F3G was detected in the extract of all stages and the content at S2 was the highest. Search of the precursor of Dp3G is in progress.

1) K.Yoshida et al., *Sci Rep.,* **10**, 17184 (2020)　2) K.Yoshida et al., *BBB.,* **60**, 589-593 (1996)

Glycine soja, anthocyanin, seed-coat component

発表責任者：吉田久美（yoshidak@i.nagoya-u.ac.jp）

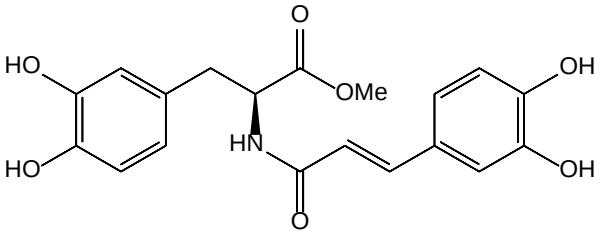
講演番号：4F07-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

Synthesis and evaluation of catechol derivatives as an amyloid-beta aggregation inhibitor

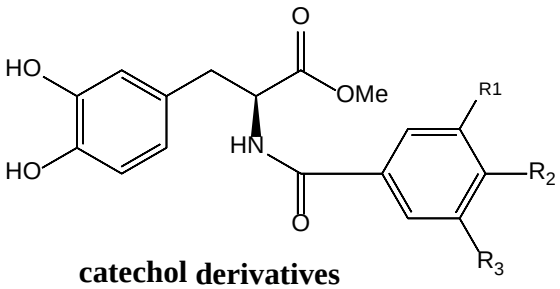
○ Fusheng XU, Keima Osawa, Misato Tajiri, Ryusei Endo, Koki Makabe, Hiroyuki Konno (Yamagata Univ.)

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease with insidious onset. Although the etiology of AD is not yet clear, the currently widely accepted hypothesis is the amyloid hypothesis that inhibiting amyloid-beta aggregation can effectively treat AD. Through previous research by our group, we found that polyphenol compounds, especially catechol derivatives, have good effects in hindering the aggregation of amyloid-beta, water solubility, and no cytotoxicity. For the reason, we focus on L-dopa transported across the blood-brain-barrier as the small size inhibitors with amyloid-beta aggregation.

we successfully synthesized a total of 8 catechol derivatives, including clovamide and these 5 compounds(10μM) have an inhibition rate of over 80% for inhibiting amyloid-β aggregation by using 25μM amyloid-β monomer. In addition, these compounds shew no cytotoxicity. In the presentation, synthesis and structure activity relationship study of a natural polyphenol clovamide and its analogues are described.



Clovamide



catechol derivatives

amyloid-beta, catechol derivatives, Alzheimer's disease

講演番号：4F07-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

SARS-CoV2 増殖必須蛋白質 3CL protease の作製と基質認識能の探究

Preparation of SARS-CoV2 growth essential protein 3CL protease and exploration of substrate recognition ability

○遠藤 龍生、及川 慧人、大沼 拓巳、真壁 幸樹、矢野 成和、今野 博行 (山大工)
○Ryusei Endo, Keito Oikawa, Takumi Onuma, Koki Makabe, Shigekazu Yano, Hiroyuki Konno (Yamagata Univ.)

[目的]
SARS-CoV2 3CL protease は新型コロナウイルス SARS-CoV2 増殖必須蛋白質であり、2002 年に発生した SARS コロナウイルスの増殖必須蛋白質 SARS-CoV 3CL protease との相同性は 97%である。一方で、SARS-CoV2 ゲノムから発現される蛋白質 pp1ab には 3CL protease 認識部位が 11 か所存在し、一部で配列が異なる。そこで本研究では SARS-CoV2 3CL protease の作製と基質認識能について調査することにした。
[方法と結果]
まず、SARS-CoV2 3CL protease とその R188I mutant を作製した。His タグ、FLAG、目的 protease の DNA 配列が含まれたプラスミドを用いて大腸菌で発現し、その後大腸菌を破砕した。次に得られた粗抽出液を Ni-NTA カラムで精製し望む protease とその mutant の作製に成功した。一方、3CL protease 認識配列断片ペプチド、変異点近辺断片ペプチドの計 20 種を化学合成し、それらのプロテアーゼ認識能を評価した。その結果、SARS 3CL protease 生成切断部位を含む基質を優先的に切断することが分かった。さらに変異点近辺断片ペプチドの１つで高い切断活性が見られた。現在、詳細な解析を行っている。

[Aim] SARS-CoV2 3CL protease is a key enzyme in the processing of pp1ab and has 97% homology with SARS-CoV 3CL protease. These proteins have 11 recognition sites on pp1ab. In this study, we prepared a SARS-CoV2 3CL protease and investigated the cleavage activities for the peptide substrates.
[Method and Result] SARS-CoV2 3CL protease and its R188I mutant were expressed using E. coli and purified by Ni-NTA column. Next, 20 peptide substrates with 3CL protease recognition sequence and its mutant sequences were prepared by Fmoc-SPPS and evaluated by these proteases. As a result, the SO1 and SO2 substrates yielded the SARS 3CL protease were preferentially cleaved. In addition, high cleavage activity was observed on MO5 peptide near the mutation point. We are currently conducting the analysis of these phenomenons in detail.

SARS-CoV2, 3CL protease, Substrate recognition ability

発表責任者：遠藤龍生（twr68460@st.yamagata-u.ac.jp）

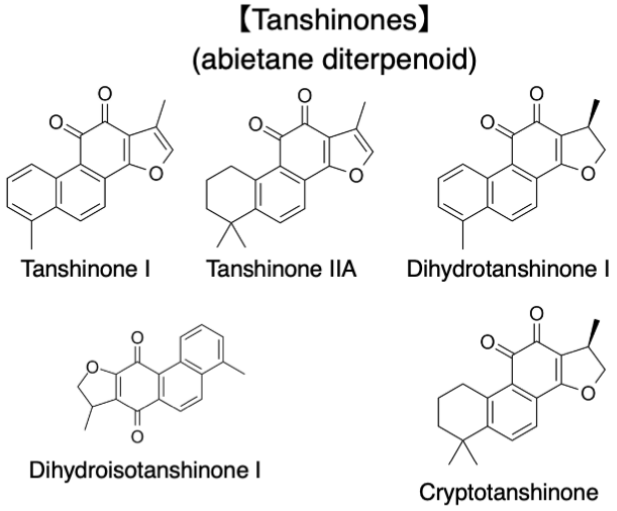
講演番号：4F07-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

丹参由来天然化合物の tanshinones が示す抗結核菌活性

Anti-mycobacterial activities of tanshinones, natural compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen)

○森 茂太郎[1]、田村 敏生[2]、前田 百美[2]、阿戸 学[2]、見理 剛[1] ([1]感染研細菌第二部、[2]感染研ハンセン病研究センター)
○Shigetarou Mori[1], Toshiki Tamura[2], Yumi Maeda[2], Manabu Ato[2], Tsuyoshi Kenri[1] ([1]NIID, Dpt. Bacteriology II, [2]NIID, Leprosy Research Center)

抗結核薬に耐性を示す結核菌が世界的に蔓延しており，大きな問題となっている。そのため，既存の薬剤とは作用機構が異なる新規抗菌薬の開発が強く望まれている。本研究では，生薬である丹参からの単離精製された天然化合物のうち，abietane diterpenoid に分類される tanshinones (tanshinone I, tanshinone IIA, dihydrotanshinone I, dihydroisotanshinone I, および cryptotanshinone; 図参照) が強い抗結核菌活性を示すことを明らかにした。また，tanshinoes はマクロファージ内の結核菌や既存の抗結核薬に耐性を示す結核菌にも抗菌活性を示した。さらに，tanshinones は結核治療のキードラッグであるリファンピシンと相加効果を示すことも確認した。これらの結果から，tanshinones は薬剤耐性結核菌にも有効な新規抗結核薬のリード化合物であると考えられた。



Mycobacterium tuberculosis resistant to anti-tuberculosis drugs is spreading worldwide and has become a major problem. Therefore, the development of novel antimicrobial agents with different mechanisms of action from those of existing drugs is strongly desired. In this study, we found that tanshinones (tanshinone I, tanshinone IIA, dihydrotanshinone I, dihydroisotanshinone I, and cryptotanshinone; see figure), which are isolated and purified natural compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) and classified as abietane diterpenoid, showed strong antituberculosis activity. In addition, tanshinoes showed antibacterial activity against *M. tuberculosis* in macrophages and against *M. tuberculosis* resistant to existing anti-tuberculosis drugs. Furthermore, tanshinones showed an additive effect with rifampicin, a key drug in the treatment of tuberculosis. These results suggest that tanshinones may be a lead compound for new anti-tuberculosis drugs that are effective against drug-resistant *M. tuberculosis*.

Tuberculosis, drug resistance, diterpenoid

発表責任者：森 茂太郎（mshige@niid.go.jp）

講演番号：4F07-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

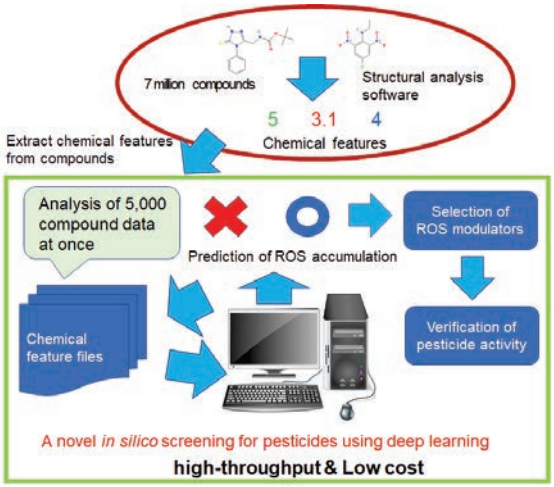
活性酸素制御剤の深層学習による in silico スクリーニング系の構築

Establishment of a novel in silico screening system for pesticides by deep learning-based prediction of ROS accumulation

○小越 将行[1,2]、高橋 弘盟[1]、北畑 信隆[3]、朽津 和幸[4]、大和田 勇人[4]、水野 秀之[1]、来須 孝光[1]([1]公立諏訪理大・工、[2]農研機構、[3]東大院・農生科、[4]東京理科大・理工)
○Masayuki KOGOSHI[1,2], Komei TAKAHASHI[1], Nobutaka KITAHATA[3], Kazuyuki KUCHITSU[4], Hayato OHWADA[4], Hideyuki MIZUNO[1], Takamitsu KURUSU[1] ([1]Suwa Univ. Sci., [2]NARO, [3]Univ. Tokyo, [4]Tokyo Univ. Sci.)

現在，農薬の開発頻度は極端に低下しており，従来の選抜とは異なる新規探索手法の開発が望まれている。強い環境ストレスは，細胞内に活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)を過剰生産させ，酸化障害を引き起こす。一方，適切な ROS 生成はシグナル分子として機能し，抵抗性を誘導することから，ROS 制御剤は多様な農薬候補としての機能が期待される。本研究では，複数の外部刺激由来の植物細胞の ROS 生成量と化合物の化学的特徴量を用いて， ROS 制御剤の深層学習による *in silico* スクリーニング系の構築を進めた。

モデルの構築として，タバコおよびシロイヌナズナ培養細胞から得られた 9,991 点の化合物由来の ROS 実測データと，薬剤特性，芳香環系の結合を含めた 219 項目の化合物の化学的特徴量をディープニューラルネットワーク(DNN)で解析し，ROS 推論モデルを構築した。構築モデルは，学習に用いた化合物の類縁体群に対して，高い精度を示した。次に，このモデルを用いて，700 万点の大規模化合物群から特徴量データベースを構築した。本発表では，*in silico* スクリーニングの成果および，選抜化合物群の植物細胞における ROS 実測評価から，構築モデルの有用性について議論したい。



The frequency of pesticide development is decreasing year after year, and it is expected to develop a new search method that is different from the conventional method. Reactive oxygen species (ROS) play multiple beneficial roles as signaling molecules at low concentrations, whereas at high concentration ROS and related redox-active compounds cause cellular damage, indicating that ROS modulators have the potential to function as a variety of pesticides. We here established a novel *in silico* screening system for pesticides using deep learning-based prediction of ROS accumulation in combination with the chemical properties of the compounds as explanatory variables. The effectiveness of our system as a primary screening of ROS modulators will also be discussed.

Pesticides, Deep learning, Reactive oxygen species

発表責任者：来須 孝光（kurusu@rs.sus.ac.jp）

講演番号：4F07-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

希少糖デオキシ誘導体 1-deoxy-D-allulose の線虫成長阻害活性

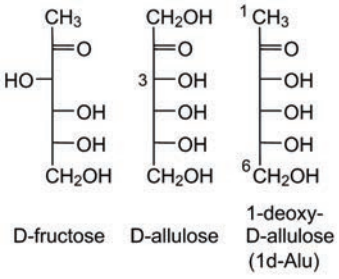
Growth inhibitory activity of 1-deoxy-D-allulose, a rare sugar deoxy derivative, in *C. elegans*

○佐藤 正資[1]、吉原 明秀[2]、砂古口 博文[3]、新谷 知也[4]、George W.J. Fleet[5]、何森 健[2] ([1]香川大農、[2]香川大希少糖機構、[3]香川県環保研、[4]愛媛大院連合農、[5]オックスフォード大)
○Masashi Sato[1], Akihide Yoshihara[2], Hirofumi Sakoguchi[3], Tomoya Shitani[4], George W.J. Fleet[5], Ken Izumori[2] ([1]Kagawa Univ., [2]IIRSRE, Kagawa Univ., [3]Kagawa Pref., [4]Ehime Univ., [5]Univ. of Oxford)

人や家畜の寄生線虫症治療薬（抗線虫薬）に対する薬剤耐性虫の出現が深刻な問題となっている。そのため，従来の抗線虫薬とは異なる作用メカニズムを持つ薬剤の開発が望まれている。

我々はモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫を用いて希少糖(天然に存在量の少ない単糖異性体)の成長阻害活性を調査し，抗線虫薬候補の探索を行なってきた。その結果，D-fructose の C-3 epimer である D-allulose (D-Alu)や D-ribose の C-2 epimer である D-arabinose が成長阻害活性を示すことを報告している。今回，酵素的に合成した 1-deoxy-ketohexose 立体異性体全 8 種の線虫成長阻害活性について報告する。

阻害活性の強さは，線虫の成長を 50%阻害する濃度(GI_{50}値)として表した。その結果，試験した異性体のうち 1-deoxy-D-allulose (1d-D-Alu) のみに強い成長阻害活性が認められ，GI_{50}値は 5.4 mM と計算された。D-Alu の GI_{50}値は 53 mM であり，D-Alu は 1 位のデオキシ化により約 10 倍，活性が上昇した。1d-D-Alu による線虫成長阻害は，D-ribose あるいは D-fructose を培養培地に添加することにより，打ち消すことが出来た。このことから，1d-D-Alu は D-リボースと D-フルクトースの代謝を阻害していると考えられた。糖代謝経路をターゲットとする抗線虫薬は今までになく，1d-D-Alu は，新規な作用メカニズムをもつ抗線虫薬のリード化合物となる可能性がある。



The biological activities of deoxy sugars (deoxy monosaccharides) have remained largely unstudied until recently. We compared the growth inhibition by all 1-deoxyketohexoses using the animal model *Caenorhabditis elegans*. Among the eight stereoisomers, 1-deoxy-D-allulose (1d-D-Alu) showed particularly strong growth inhibition. The 50% inhibition of growth (GI_{50}) concentration by 1d-D-Alu was estimated to be 5.4 mM, which is approximately 10 times lower than that of D-allulose (53 mM). The inhibition by 1d-D-Alu was alleviated by the addition of D-ribose or D-fructose. Our findings suggest that 1d-D-Alu-mediated growth inhibition could be induced by the imbalance in D-ribose and/or D-fructose metabolism. 1d-D-Alu may be a lead compound for anti-nematode drugs with a novel mechanism of action.

rare sugar, *Caenorhabditis elegans*, growth inhibitory activity

発表責任者：佐藤正資（sato.masashi@kagawa-u.ac.jp）

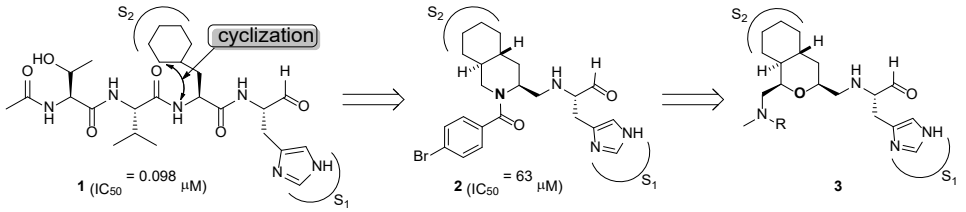
講演番号：4F07-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

オキサ-デカリン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の設計と合成、阻害活性評価ならびに立体化学
Design, synthesis, and evaluation of oxa-dacalin type inhibitors for SARS 3CL protease and their stereochemistry

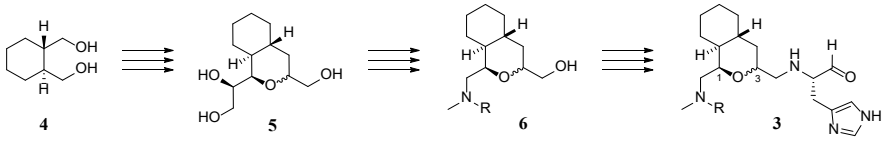
○服部 恭尚、吉澤 慎一郎、小林 数也、赤路 健一（京都薬大薬）
○Yasunao Hattori, Shin-ichiro Yoshizawa, Kazuya Kobayashi, Kenichi Akaji (Kyoto Pharm. Univ.)

【目的】重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome、SARS) の発症原因である SARS コロナウイルス (SARS-CoV-1) は、2019 年末より流行を繰り返している COVID-19 の原因ウイルスの SARS-CoV-2 と同種のコロナウイルスである。SARS-CoV の増殖には SARS 3CL プロテアーゼ (SARS 3CL^{pro}) が必須であり、その配列および立体構造は両ウイルスで酷似している。SARS 3CL^{pro} を標的とした抗 SARS 薬の開発も進められており、本酵素は創薬の有望な標的分子である。

我々は、基質配列に基づくペプチド型阻害剤 **1** の S2 ポケットでの疎水性相互作用に着目した低分子型阻害剤 **2** を報告している。本発表では、ヘテロ原子を酸素としたオキサ–デカリン型阻害剤 **3** の合成と阻害活性評価結果を報告する。



【方法・結果】Sharpless AD と香月–Sharpless 酸化によって立体化学を構築し **5** を得た。その後、還元的アミノ化により種々の置換基 R を導入して **3** の合成を行い、阻害活性評価に供した。評価した中では高活性を示した **3** (R = *n*-Bu) について、1 位と 3 位の立体化学が活性に及ぼす影響についての検討も行ったので併せて報告する。



Severe acute respiratory syndrome (SARS) is caused by a coronavirus (SARS-CoV-1). The related corona-virus, SARS-CoV-2, was identified as causative virus of Covid-19. Chymotrypsin-like protease (SARS 3CL^{pro}) is the key enzyme in the proliferation of the viruses. Because of its functional importance in the viral life cycle, SARS 3CL^{pro} is considered as an attractive target molecule for the drugs against SARS and Covid-19.

Based on our previous studies on small molecule inhibitor **2** derived from a peptide type inhibitor **1**, we switched the nitrogen to oxygen to investigate the effects of the heteroatom. To synthesis of newly designed oxa-decalin type inhibitor **3**, we choose commercially available diol **4** as a starting material. In this presentation, we wish to discuss about design, synthesis, and evaluation of oxa-decalin type SARS 3CL^{pro} inhibitors.

SARS 3CL protease, inhibitor, oxa-decalin

講演番号：4F07-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム F

ニコチアナベンサミアナ発現系によるアクチビン A の製造法開発

Development of bioactive human activin A production in *Nicotiana benthamiana*

○渡邉 理紗[1]、竹本 浩[1]、田中 裕之[1]、吉中 喬慈[2]、宮内 美穂[1]、三沢 悟[1]、川端 潤[1]([1]三菱ケミカル株式会社、[2]株式会社 UniBio)
○Risa WATANABE[1], Yutaka TAKEMOTO[1], Hiroyuki TANAKA[1], Kyoji YOSHINAKA[2], Miho MIYAUCHI[1], Satoru MISAWA[1], Hiroshi KAWABATA[1] ([1]Mitsubishi Chemical Corporation, [2]UniBio Corporation)

再生医療等製品の開発分野において幹細胞の分化・増殖に利用される重要な細胞増殖因子の１つであるアクチビン A について、ニコチアナベンサミアナ一過性発現系における生産の可能性を検討した。

成熟型アクチビン A の発現を試みたところ、栽培中に発現葉が壊死した。一方、プロアクチビン A（成熟型アクチビン A 前駆体）を発現させたところ、壊死は見られず、プロアクチビン A を得ることができた。このプロアクチビン A から得られた成熟アクチビン A は生物活性を示した。発現プロアクチビン A は発現宿主内で部分的に分解されていたため、分解部位を特定し、分解部位に位置するループ領域を欠損させたプロアクチビン A 変異体を作製した。その結果、宿主プロテアーゼによる分解を回避し、かつ収率を向上させることができた。また、より効率的な製造を目的として、プロアクチビン A の前駆体切断部位のアミノ酸配列を HRV 3C プロテアーゼ認識配列に改変した。このようにして得られた変異体は、市販の大腸菌や CHO 由来のアクチビン A と同等の生理活性を有していた。

現在はこのアクチビン A の GMP 製造を目指し、工業化に向けての準備を進めている。

Activin A, one of the most important cell growth factors in the development of regenerative medicine products. We investigated the possibility of producing activin A in the *Nicotiana benthamiana* transient expression system.

When we tried to express the mature activin A, the expressing leaves were necrotic during cultivation. On the other hand, when expressed as pro-activin A (precursor of mature activin A), no necrosis was observed. Furthermore, mature activin A obtained from this pro-activin A showed biological activity. Since the expressed pro-activin A was partially degraded in the expression host, we identified the degradation site and created a pro-activin A lacking the loop region located at the degradation site. As a result, we were able to avoid degradation by host proteases and improve the yield. In addition, the precursor cleavage site of pro-activin A was modified to the HRV 3C protease recognition sequence for the purpose of more efficient production. The mutant obtained in this way had the same biological activity as the commercially available E. coli or CHO derived activin A.

We are now preparing for the industrialization of this activin A for GMP production.

activin A, *Nicotiana benthamiana*, modified pro-activin A

発表責任者：渡邉理紗（watanabe.risa.mx@m-chemical.co.jp）

講演番号：4F09-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

コエンザイム Q10/R-α-リポ酸/γ-シクロデキストリン三成分包接体の調製と評価

Preparation and evaluation of coenzyme Q10/R-α-lipoic acid/γ-cyclodextrin ternary complex

○上梶 友記子、石田 善行、中田 大介、寺尾 啓二（シクロケムバイオ）
○Yukiko UEKAJI, Yoshiyuki ISHIDA, Daisuke NAKATA, Keiji TERAO (CycloChem Bio)

エネルギー産生やアポトーシスにおいて重要な役割を担うミトコンドリアは、その機能を正常に保つためにコエンザイム Q10 (CoQ10)、R-α-リポ酸 (RALA) などの成分が必要不可欠である。これらは食品原料として幅広く利用されている化合物であるが、CoQ10 は難水溶性であること、RALA は熱や酸に対する安定性が低いことから、経口摂取時の吸収性が問題とされている。これまでに、我々は多機能性の環状オリゴ糖である γ-シクロデキストリン (γ-CD) で各々の化合物を包接することによって、吸収性が飛躍的に改善することを見出している。一方、2 種類の化合物に対し 1 種類の CD を用いた 3 成分包接体の調製方法が幾つか報告されている。そこで、更なる溶解性の向上や γ-CD 使用量の最適化を目的として、CoQ10 と RALA の双方を γ-CD で包接した CoQ10/RALA/γ-CD 包接体の調製を試みた。その結果、予め RALA を γ-CD で包接した後に CoQ10 を添加する手法を用いると、効率良く優れた物性の 3 成分包接体を作製できることが明らかとなった。得られた 3 成分包接体を用いて、模擬人工胃液 (pH1.2) に対する RALA の安定性を評価したところ、RALA 単独ではその含有量が著しく低下したのに対し、CoQ10/RALA/γ-CD 包接体ではほぼ 100%に近い残存率を示した。また、生体吸収性予測の試験に用いられる模擬人工腸液 (pH5.0) に対する CoQ10 の溶解性を評価したところ、CoQ10/γ-CD 包接体と RALA/γ-CD 包接体を足した場合と比較して、CoQ10/RALA/γ-CD 包接体では顕著に高い CoQ10 濃度が認められた。

Mitochondria which play important roles in energy production and apoptosis, require components such as coenzyme Q10 (CoQ10) and R-α-lipoic acid (RALA) to maintain its normal functions. However, the absorbability of these compounds when taken orally has been problems, since CoQ10 is poorly water-soluble, and RALA is unstable under heating and acidic conditions. Therefore, we have found that the absorbability of both compounds is dramatically improved by complexation with γ-cyclodextrin (γ-CD). On the other hand, some preparation methods for a ternary complex using one CD for two compounds have been reported. Therefore, a CoQ10/RALA/γ-CD ternary complex was prepared in which both CoQ10 and RALA were complexed with γ-CD, for the purpose of further improving the solubility and optimizing the amount of γ-CD. As results, the stability of RALA in simulated artificial gastric fluid of the CoQ10/RALA/γ-CD ternary complex showed a high residual rate ca.100%, and the solubility of CoQ10 in simulated artificial intestinal fluid of the ternary complex showed significantly high CoQ10 concentration.

γ-cyclodextrin, coenzyme Q10, R-α-lipoic acid

発表責任者：上梶 友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

講演番号：4F09-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

豆蜂（トーファン）：豆乳とハチミツから作られた新しいスイーツの開発

Tofun: Development of a new sweet confection made from soymilk and honey

○有井 康博[1,2]、西脇 章[3]、獅子原 里実[1]、西澤 果穂[1,4]、佐野 由倫[1] ([1]武庫女大・食物栄養・食創造科学、[2]武庫女大・栄養科学研究所、[3]ハートスフードクリエーツ株式会社、[4]（現）龍谷大・農・食品栄養)

○Yasuhiro ARII[1,2], Akira NISHIWAKI[3], Satomi SHISHIHARA[1], Kaho NISHIZAWA[1,4], Yoshinori Sano[1] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]MWU RINS, [3]Heartoss Food Creates Co., Ltd., [4]Ryukoku University)

我々はハチミツが豆乳を凝固させることを明らかにしている [1]。高グルコン酸含量のハチミツほど、凝固能が高い。これまでに、高いグルコン酸を含むハチミツで試作品を加工したが、硬さと甘さのバランスなどを初めとするいくつかの問題から実用化には至っていない。本研究では、新たなハチミツを探索し、試作品を加工し、物性を評価後に実用化した。

19 種類のハチミツについて、グルコン酸量と全糖量を分析し、淡路島で集蜜した百花蜜が、分析したハチミツの中で最も高いグルコン酸量かつ低い全糖量であることを示した。興味深いことに、グルコン酸量と全糖量に負の相関性 ($r = -0.788$) が示された。淡路島産ハチミツを用いて試作品を加工し、テクスチャー解析をした結果、本試作品は消費者庁えん下困難者用食品の基準 II を満たす可能性が示された。我々は、本スイーツを豆蜂 (トーファン) と名付け、商品化した。

Our previous report indicate that honey can coagulate soymilk [1]. A honey with higher gluconic acid content shows a higher coagulating ability. Although we processed some trial products using some honey with high gluconic acid content, it has not been commercialized due to some problems such the balance between the hardness and the sweetness. In this study, we explored a new honey with a higher gluconic acid, processed a new trial product, evaluated the texture, and commercialized it.

From the results for the analysis for gluconic acid and total sugar contents of 19 honeys, it was cleared that a polyfloral honey harvested in Awaji Island (Hyogo, Japan) had a highest gluconic acid content and a lowest total sugar content in tested honeys. Interestingly, the gluconic acid content was shown to be negatively correlated with the total sugar content ($r = -0.788$). Trial products were processed by adding honey from Awaji Island to soymilk. The hardness, adhesiveness, and cohesiveness of the products were examined according to the Consumer Affairs permissible criteria for foods for people with dysphagia. The product evaluation was consistent with Licensing Standard II. The sweet was named "Tofun" and commercialized.

This work was supported by the JSBBA Academic Industrial R&D Support for Small to Medium Enterprises, Tokyo, Japan.

1. Arii Y. & Nishizawa K. (2020). Heliyon, 6, e03673.

Tofun, honey, soymilk

発表責任者：有井康博（arii@mukogawa-u.ac.jp）

講演番号：4F09-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

リパーゼ添加がパンケーキの冷蔵保存中の物性変化に与える影響

Effects of lipase addition on textural changes of pancakes during refrigerated storage

○西垣 里桜[1]、松宮 健太郎[1]、田中 昭宏[2]、松村 康生[3]([1]京大院・農、[2](株)日清製粉グループ本社・基礎研究所、[3]京大・生存研)
○Rio NISHIGAKI[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Akihiro TANAKA[2], Yasuki MATSUMURA[3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Center for Basic Science, Nisshin Seifun Group Inc., [3]RISH, Kyoto Univ.)

【背景と目的】パンケーキは、最近ではクリームやフルーツをトッピングしたデザートとして冷蔵条件下で貯蔵・流通・販売されることが多いが、冷蔵保存により物性が変化する。一般的に小麦粉焼成品の冷蔵によって生じる物性変化の主要因は澱粉の老化であり、その抑制には澱粉-脂質複合体の形成が有効だとされている。リパーゼは内在脂質を加水分解して様々な分子形態の脂質を生成するために物性変化の抑制が期待されるが、現在のところは主にパンでの使用に限られる。本研究では冷蔵保存によるパンケーキの物性変化にリパーゼ添加が与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】様々な基質特異性を有するリパーゼを添加したパンケーキを作成し、TPA 試験により焼成直後および 1 日保存後の物性を評価した。加えて DSC による澱粉の老化度と、ヨウ素呈色比色法による澱粉-脂質複合体形成度の測定を行なった。さらに物性変化の抑制に関与する脂質分子を解明するため、TLC と GC により複合体を形成する脂質分子種を調べた。
【結果と考察】主として、トリアシルグリセロールを基質とするリパーゼの添加によってパンケーキの硬化は抑制され、その程度は澱粉-脂質複合体形成度の増加および澱粉老化度の減少の程度と相関することが確認された。主に澱粉と複合体を形成している脂質は、リパーゼによって生成された脂肪酸であることが明らかになった。またその脂肪酸の種類および存在比から、澱粉と複合体を形成する脂質の生成には、基質となる脂質の存在位置および分散状態が影響する可能性が示唆された。

Nowadays, pancakes are often stored and sold under refrigerated conditions as a dessert, but the refrigerated storage causes changes in textural properties. It is well known that the main factor of changes is the starch retrogradation, which is efficiently prevented by the formation of starch-lipid complex. If lipases are added into pancake mix, they can hydrolyze substrate lipids to produce various lipid molecules, which would form the complex. In this study, our aim is to clarify the effects of lipase addition on textural changes of pancakes during refrigerated storage.

The addition of lipases prevented the hardening of pancakes, which was accompanied with the reduced retrogradation of starch and the increased formation of starch-lipid complex. Lipids forming the complex with starch were revealed to be fatty acids liberated by lipase reaction. The compositional analyses of those fatty acids suggested that the location and dispersion of lipid substrates play an important role in the formation of starch-lipid complex.

pancake, lipase, starch-lipid complex

発表責任者：松宮健太郎（matsumiya.kentaro.6w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4F09-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

添加する油脂の種類と凝固条件が豆乳エマルションゲルの物性に与える効果

Effects of added oil types and coagulation conditions on the physical properties of soymilk-based emulsion gels

○金城 史奈[1]、松宮 健太郎[1]、石井 統也[2]、北湊 咲葵[3]、木下 満里代[1]、重本 絢音[1]、西村 公雄[3]、谷 史人[1]、松村 康生[4]（[1]京大院農、[2]香大農、[3]同女大、[4]京大生存研）

○Fumina KANESHIRO[1], Kentaro MATSUMIYA[1], TOYA ISHII[2], Saki KITAMINATO[3], Mariyo KINOSHITA[1], Ayane SHIGEMOTO[1], Kimio NISHIMURA[3], Fumito TANI[1], Yasuki MATSUMURA[4] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Agric., Kagawa Univ., [3]DWCLA, [4]RISH, Kyoto univ.)

ゲルやカードなどの半固形状食品は乳や卵などの動物性素材を用いて製造されることが多いが、植物性素材を用いて製造した食品では、多様な物性は、必ずしも実現できていない。本研究では、大豆加工品である豆乳を対象として、油脂を添加した後、凝固させることによって、いわゆるエマルションゲルを調製した。そして、添加する油脂の種類および凝固条件が作製したエマルションゲルの物性に与える効果を検討することを目的とした。油脂には融点が−7℃である大豆油と 67℃である大豆油由来の極度硬化油を用い、凝固剤には酸凝固剤のグルコノデルタラクトンと塩凝固剤の塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムを用いた。豆乳に油脂を 6:4 の重量比で混合して均質化することにより作製したエマルションに 0.04 または 0.20 M の濃度で凝固剤を加えて加熱することによりエマルションゲルを得た。これを 4℃で一晩保存後に貫入試験を行い、初期弾性率や破断強度、破断歪を算出した。その結果、大豆油と比較して、硬化油を用いた場合には弾性率が高かった一方で、破断点を観察できないものもあった。凝固剤として酸を用いた場合、塩を用いた場合より弾性率は小さい値を示すことが分かった。以上の結果より、油脂の種類や凝固条件によって豆乳エマルションゲルの物性を大きく変化させられる可能性のあることが示された。

Whereas animal-based materials including bovine milk and eggs are widely applied for producing semi-solid foods such as gels and curds, eco-friendly plant-based materials are not successfully utilized for imparting a wide variety of physical properties to semi-solid foods. In this study, emulsions gels were prepared by adding oil to soymilk, followed by coagulant-induced gelation, and effects of added oil types and coagulation conditions on the physical properties of emulsion gels were investigated. Soybean oil (SO) and fully hydrogenated soybean oil (HO) were used as added oils. An acid and two salts were used as coagulants. Soymilk was homogenized with the oil at a weight ratio of 6:4, followed by mixing with 0.04 or 0.20 M of the coagulant and heating in a water bath to prepare emulsion gels. The gels were stored overnight at 4°C and subjected to penetration tests to calculate the elasticity, and breaking strength and strain. The elasticity of HO gels was higher than that of SO ones, but the breaking point was not clearly observed for HO gels in some formulations. The elasticity was significantly lower for the acid coagulant-induced gel compared to the salt-induced ones. These results suggest the possibility that physical properties of soymilk-based emulsion gels can be modified depending on the added oil types and the coagulation conditions.

emulsion gel, soymilk, physical property

発表責任者：松宮健太郎（matsumiya.kentaro.6w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4F09-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

モデル舌を用いたやわらかいゲル、ペーストの力学特性評価

Evaluation of mechanical properties of soft gels and pastes with artificial tongues

○神山 かおる、日下部 裕子（農研機構食品研）
○Kaoru KOHYAMA, Yuko KUSAKABE (Inst. Food Res. NARO)

【目的】最近、乳頭状の突起のあるモデル舌表面を用いた食品テクスチャー研究が活発に行われるようになった（1, 2)。我々は、舌でつぶせる程度のやわらかい食品を、人間の舌に近い力学特性をもった透明なモデル舌を用いた圧縮試験で評価してきた(3–5)。ここでは表面形状の異なるモデル舌を用いて、やわらかい食品の圧縮試験を行い、表面の影響を検討したので報告する。
【方法】食品試料として、やわらかいゲルおよびマッシュポテトを、直径 20 ㎜×厚さ 10 ㎜に成型した。モデル舌として、硬度の異なるウレタンゲル（エクシール社人肌のゲル透明タイプ）を用い、厚さ 10 ㎜で、50 ㎜角の片側をフラット、もう片側をエンボス加工あるいは半球状の突起をつけて作製した。室温 20℃において、食品試料をモデル舌の上に置き、平板で等速（10 ㎜/s）圧縮した。
【結果及び考察】モデル舌を用いると食品ゲルの破壊荷重は平板と比較してほとんど変わらず、破壊までの変形が平板＜硬いモデル舌＜やわらかいモデル舌の順に大きくなった。破壊点が現れないペースト状試料でも一定荷重における変形順は同じであった。圧縮曲線はモデル舌表面の形状には依存しなかった。舌のようなやわらかい材料で圧縮する場合、舌の変形が表面の凸凹を吸収するため、表面形状の影響がほとんど認められないことが示唆された。
【References】1) Andablo-Reyes E. *et al.* (2020) *ACS Appl. Mat. Interfac.* 12(44):49371–85. 2) Wang Q. *et al.* (2021) *Food Hydrocoll.* 120: 106991. 3) Kohyama K. *et al.* (2021) *Food Hydrocoll.* 112:106283. 4) Kohyama K. (2020) *J. Texture Stud.* 51(4):612–21. 5) Kohyama K. *et al.* (2019) *Foods* 8(6):182.

Recently, there has been growing interests in food texture studies using a model tongue that mimics human tongue surface (1, 2). Transparent urethane gels whose stiffness are similar to the tongue have been used in compression test of soft foods (3–5). In this study, effects of surface geometry of the artificial tongues on mechanical characteristics of soft gels and paste (mashed potato) are presented. A cylindrical food sample (φ20 × 10 mm) was placed on an artificial tongue (50 × 50 × 10 mm) and then compressed by a flat plate at a constant rate of 10 mm/s at 20 ºC. Greater displacement until fracture of the gel sample was required for soft artificial tongue than for hard plate, but fracture force was similar. Paste (mashed potato) sample did not show fracture peak, and displacement at a fixed force was greater for softer tongue. The compression curve did not depend on the artificial tongue surface, as deformation of the tongue assimilated the surface roughness.

texture, artificial tongue, gel

発表責任者：神山かおる（kaoruk@affrc.go.jp）

講演番号：4F09-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

光造形式 SLA フード 3D プリンター開発

Development of SLA food 3D printer

○古屋 佳叡、武政 誠（東京電機大学理工学部生命科学系）
○Kaei FURUYA, Makoto TAKEMASA (Tokyo Denki Univ.)

食品を立体的に設計、製造可能なフード 3D プリンタは新しい食品製造技術として注目されている。食材をフードインクとして、平面形状を造形し、異なる形状の積層を重ねる工程により、複雑な立体形状の造形も可能である。現在は、食材をペースト状のレオロジー特性に調整して、フードインクとして利用する方法が一般的である。一方、この方法では造形速度に限界があり、金属材料やプラスチック材料における 3D プリンタでは、高精度化、また高速化のために SLA(Stereo-Lithography Apparatus)方式の造形法が開発され、一部分野では主流となっている。フードプリンタにおいても、レーザーを利用した SLA プリントを可能にできれば、より複雑かつ精密な立体造形を、従来法である FFF(Fused Filament Fabrication, or FDM)と比較して、高速に造形可能になると期待される。

市販の FFF(Fused Filament Fabrication)式熱可塑性樹脂用の 3D プリンタを改造することで開発した SLA-フード 3D プリンタを、本研究では使用した。青紫半導体レーザーを利用し、フォーカス位置での局所的な加熱により、PC 上で行った設計通りに平面形状を自動制御で造形し、それらの層を、積層することにより食品の立体造形を可能にした。従来の積層式フード 3D プリンタでは液体（低粘度インク）を利用した立体造形は不可能であったが、本研究で開発した SLA 方式により、低粘度インクによる造形に成功した。造形精度は、条件検討の初期段階であっても従来の FFF 式フード 3D プリンタと同等以上の精度で造形が可能であった。

Three D printer has been attracting attention as new food manufacturing technology, since we can design and make food more freely under the condition of less restriction from the viewpoint of appearance, internal structure, and so on. In the case of most common 3D printing, especially food printing, food ink, having paste-like rheological properties, will be automatically placed in the designed manner in 3D-space, known as FFF style 3D printer. However, the printing speed is quite low and limited based on this FFF method. For thermoplastic resin or metal 3D printing, SLA (Stereo-Lithography Apparatus) principle is employed for much faster and precise printing. We made custom-build Food 3D printer based on SLA, and succeeded to print the food at higher resolutions, using edible ink (food ink). In this study, both the developments of the 3D printing instruments and the food ink were performed.

food 3D printer, SLA, food ink

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

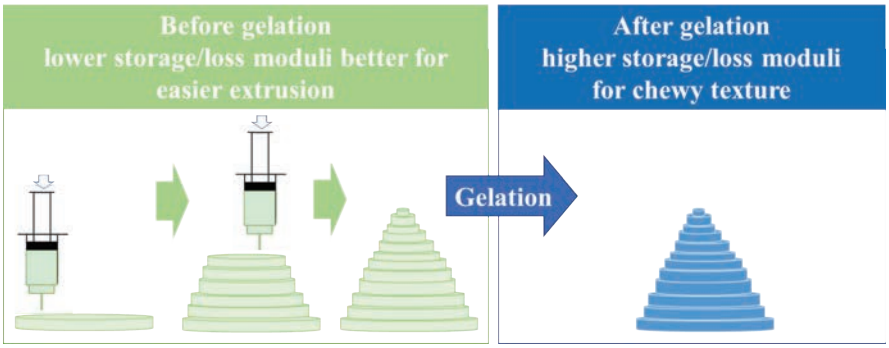
講演番号：4F09-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

３Ｄプリント食品の食感造形可能領域を拡大するフードインク開発

Development of food ink capable to expand the food texture of 3D printed foods

○渡邊 健太、武政 誠（東京電機大学）
○Kenta WATANABE, Makoto Takemasa (Tokyo denki Univ)

フード 3D プリンタは、新しい食品製造技術として注目されている。自動制御による精密な立体形状の造形、個人の健康状態に適した栄養を含む食品の自動提供など、様々な利用方法が模索されている。現時点での課題の一つとして、プリント可能な食感に大きな制約がある点が挙げられる。3D プリントは積層造形法によってなされ、細径ノズルから食品を XY 平面上に吐出し、Z 軸方向に積層する形式である。ノズル径はプリント分解能に直結するが、利用可能なフードインクのレオロジー特性と、装置の小型化という相反する要請から、卓上型の小型プリンタで噛み応えのある食品のプリントをプリントすることは、特にハードルが高い。介護食などをターゲットにせざるを得ない事情は、この制約に起因するといわれている。本研究では、我々が開発したタンパク質フードインクをベースに改良することで、3D プリント中は流動しやすく、プリント後に酵素反応により噛み応えが向上する食品を 3D プリントし、3D プリント可能な食品の食感領域を拡大させた。



Food 3D printing is attracting attentions as one of the next generation food manufacturing technologies. Precise fabrication of the food based on automated control as designed in PC, essentially the same as the way employed for the engineering technologies during the past decades, such as CAD/CAM (Computer Aided Design and Manufacturing). We are focusing on the food texture design and manufacturing using 3D printing. One big challenge of current food 3D printing is the expansion of the printable food texture range. Most common method of the current food printing is based on the FFF(Fused Filament Fabrication) using food ink having paste-like rheological properties. The final texture of the printed food is restricted to the rheological properties of the food ink, even if using post-printed crosslinking. In this study, we applied enzymatic crosslinking among protein molecules in the food ink we developed, in combination with the customized printing condition, and succeeded to achieve the hardness, comparable to the meat. This demonstrates that both improvements, 3D printing machine/control and food ink, are quite important and essential to expand the printable area of the food 3D printing.

food 3D printing, food ink, rheology

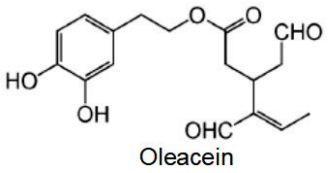
発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：4F09-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

オリーブ葉ポリフェノール oleacein が卵白ゲルの物性に及ぼす影響

Effect of an olive leaf polyphenol oleacein on physical properties of egg white gel

○赤澤 隆志[1]、伊丹 ひかる[2]、小川 雅廣[2]、庄子 真樹[1] ([1]宮城大食産業、[2]香川大農)
○Takashi Akazawa[1], Hikaru Itami[2], Masahiro Ogawa[2], Naoki Shouji[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Kagawa Univ.)



Oleacein

タンパク質ゲル状食品の物性改良剤としてポリフェノール(PP)の利用が期待されている。我々はこれまでにオリーブ葉(*Olea europaea*)の水抽出物(OLEx)が、卵白ゲル及びソーセージの物性を劇的に改変することを見出した。物性改変効果には、OLEx の主要 PP である oleacein が関与していることが考えられるが、oleacein がタンパク質ゲルの物性に及ぼす影響は明らかとなっていない。本研究では、精製 oleacein が卵白ゲルの機械強度及び弾性に及ぼす影響を調べた。Oleacein は OLEx からシリカゲルカラムを用いて精製し、アンビエント質量分析(DART-MS, JEOL. Ltd)によって同定した。各濃度の oleacein を含む 9%卵白ゲル(pH 8)の破断強度及び弾性をレオメーター(Yamaden Co. Ltd)で解析した。破断応力は 5 mM oleacein 添加ゲル(5mM oleacein-gel)で、未添加ゲル(Ct-gel)の 3.8 倍となった(7.1×10^4 Pa)。弾性は BST 式を適用し計算した結果、5mM oleacein-gel は Ct-gel の 1.7 倍となった(5.9×10^3 Pa)。卵白ゲルから抽出したタンパク質の SDS-PAGE の結果、oleacein の添加によって 100 kDa 以上の架橋タンパク質が出現することが示された。よって oleacein はゲル中のタンパク質を架橋することで、緻密なゲルネットワークに変化させ、破断特性と弾性を向上させることが示された。オリーブ葉由来の oleacein は、タンパク質ゲルの食感を改変する天然架橋剤として有用であることが考えられる。

We have found that a water extract (OLEx) of olive leaves (*Olea europaea*) can be a texture-improving agent for egg white gel and sausage. Oleacein, the main polyphenol of OLEx, might be involved in the texture-improving activity, but the details have not been clarified. In this study, we investigated the effects of purified oleacein on the mechanical strength and elasticity of egg white gel. Oleacein was purified from OLEx by silica gel chromatography and identified by mass spectrometry. The breaking strength and elasticity of 9% egg white gel (pH 8) containing each concentration of oleacein were analyzed using a rheometer. The addition of 5 mM oleacein caused a 3.8-fold increase in breaking stress (7.1×10^4 Pa). Elasticity calculated using the BST equation was 1.7-fold higher in 5mM oleacein-gel (5.9×10^3 Pa) than in Ct-gel. SDS-PAGE analysis of egg white proteins extracted from the gels showed cross-linked protein polymers that were formed by the addition of oleacein. Thus, it is suggested that oleacein changes protein gels into a dense network by its protein cross-linking activity, which results in improving mechanical strength and elasticity of the gels. This study proposes that an olive polyphenol oleacein is a natural cross-linking agent that can improve the textural properties of protein gels.

olive leaf, polyphenol, egg white gel

発表責任者：赤澤隆志（akazawat@myu.ac.jp）

講演番号：4F09-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

Simultaneous Milling and Extraction (SME) - a new simple method for extraction of hard plant materials

○Thi Bao Chau BUI, Thu Tra TRAN, Mito KOKAWA, Yutaka KITAMURA (Univ. Tsukuba)

【Introduction】

Extraction of plant materials, especially ones with hard coat, has been a problem in studies on plant-derived natural bioactive compounds and their applications. In this study, Simultaneous Milling and Extraction, or SME, was investigated as a simple method of extracting hard-to-crush plant materials by wet-milling them in a solvent medium.

【Materials and methods】

Anise seed, dill seed, fennel seed and star anise were used as representatives of dry, hard-to-crush materials. Ethanol solutions at 30%, 70% and 99.5% were investigated as extraction solvents for SME. Briefly, materials were soaked in an extraction solvent (1:20 w/v) and fed to the stone mill for milling and extraction at fixed conditions. Clear extracts were obtained by centrifugation and paper filtration. Using the most compatible ethanol solution as extraction solvent, SME was compared with other conventional and advanced extraction methods using both whole and pre-ground materials. In addition, an investigation was conducted on the input amount and extract yield relationship. Total polyphenolic concentrations (TPC) and relative antioxidant capacities (RAC) by DPPH-scavenging assay and ferric reducing assay (FRAP) were determined for all extracts as main screening analyses.

【Results】

Ethanol solution at 70% was shown to be the most suitable for extraction of all materials using SME method. Extracts prepared by SME method showed significantly higher TPC and RAC compared to extracts prepared by conventional methods including maceration (1 h or 24 h), heat-assisted extraction (50 ℃) and even the ultrasound bath-assisted extraction. SME extracts had comparable quality to extracts prepared by ultrasound crusher-assisted extraction. Especially, SME showed comparable extraction ability with exhaust maceration (48 h × 3 times) in significantly shorter time. By increasing the input amount, both the extract yield and total polyphenolic content obtained by SME were increased to higher than or comparable to other methods.

【Conclusion】

SME, which combines milling and extraction in one, can be the new simple extraction method for materials that are originally hard to crush and extract, in significantly short time and minimal preparation.

extraction, wet-milling, plant materials

発表責任者：Bui Thi Bao Chau（s2030249@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4F09-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

食後血糖値上昇抑制作用を有するソバアルブミンの食品加工への利用に向けた機能特性の評価

Evaluation of functional properties of buckwheat albumin with suppressive effect on postprandial hyperglycaemia for its industrial use

○小川 里桜[1]、二宮 和美[2]、山口 勇将[1]、熊谷 仁[2]、熊谷 日登美[1] ([1]日大・生資科、[2]共立女子大学・家政)

○Rio Ogawa[1], Kazumi Ninomiya[2], Yusuke Yamaguchi[1], Hitoshi Kumagai[2], Hitomi Kumagai[1] ([1]College of Bioresource Sciences, Nihon University, [2]Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's University)

糖尿病の予防には、食後の血糖値上昇を抑制する食品の摂取が有効とされている。我々は、ソバアルブミンがα-アミラーゼインヒビターを含有し、消化酵素で加水分解後も高いα-アミラーゼ阻害活性を保持し、デンプン摂取時に食後血糖値の上昇を抑制することを明らかにしている。しかし、ソバアルブミンを工業利用するために必要な機能特性についての詳細な報告はない。そこで、本研究では、ソバアルブミンの熱安定性、加水分解前後の乳化性、起泡性について評価した。熱安定性は、ソバアルブミンを、100℃で 10～120 分間加熱後のα-アミラーゼの残存活性により評価した。乳化性と起泡性は、プロテアーゼによる加水分解前後のソバアルブミンを、pH 3～6 のクエン酸リン酸 buffer に溶解し、測定した。乳化性は、各溶液にコーン油を添加後、ホモジナイズし、0～30 分後のエマルションの濁度から、起泡性は、各溶液をクリーマーにて泡立て、0～30 分後の体積から評価した。その結果、ソバアルブミンは、100℃で 120 分加熱後も高いアミラーゼ阻害活性を保持していた。また、未分解のソバアルブミンは、卵アルブミンよりも高い乳化性と起泡性を示し、加水分解により乳化性は低下したものの、起泡性は高い値のままであった。

For the prevention of diabetes mellitus, it is effective to control postprandial blood glucose level. We have already shown that buckwheat α-amylase inhibitor suppresses postprandial hyperglycaemia even after the hydrolysis by digestive enzymes. However, there is no detailed report on the functional properties of buckwheat albumin for its industrial use. In this study, we evaluated emulsifying and foaming properties of buckwheat albumin before and after proteolytic hydrolysis in addition to the thermal stability. Thermal stability of buckwheat albumin was measured as the residual α-amylase inhibitory activity after heating at 100℃ for 10–120 min. For the evaluation of emulsifying and foaming properties, buckwheat albumin and its hydrolysates were dissolved in phosphate citrate buffer at pH 3–6. Emulsifying property was evaluated as the turbidity of emulsion 0–30 min after homogenization of the sample solution with corn oil. Foaming property was measured as foam volume of the sample solution 0–30 min after whipping with a creamer. As a result, buckwheat albumin showed high thermal stability even after boiling for 120 min. Buckwheat albumin showed higher emulsifying and foaming properties than egg albumin. Although proteolytic hydrolysis reduced emulsifying property of buckwheat albumin, it retained high foaming property even after the hydrolysis.

buckwheat albumin, emulsifying and foaming properties, thermal stability

講演番号：4F09-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム F

ハッカ精油に含まれる微量重要香気成分の解析

Isolation and identification of trace amount of an important aroma compound in mint oil.

○河野 蛍子[1]、妙田 貴夫[1]、金嶋 泰[1]、服部 和幸[2]、野島 聡[1] ([1]東京農業大学、[2]北見工業大学)
○Keiko KAWANO[1], Takao MYODA[1], Tai KANESHIMA[1], Kazuyuki HATTORI[2], Satoshi NOJIMA[1]
([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Kitami Institute of Technology)

精油は香気成分の複合体として全体の香調を形成しているが、各香気成分の嗅覚閾値はそれぞれ異なり、微量でも香調への寄与度が高い成分が存在する。本研究では、ハッカ精油（北斗）を用いて、香気成分の再確認と微量重要香気成分の探索を試みた。まず、HPLC にて粗分けしたホクト精油の分画物をオミッション試験にて官能評価を行なった。その結果、炭化水素類、エステル類もハッカ精油の香調に寄与していることが確認され、ℓ-menthol や menthone 以外にも重要香気が存在することが示唆された。次に、個別の香気成分を確認するために、GC を用い Aroma Extract Dilution Analysis(AEDA)法によって精油の分析を行った。その結果、寄与度の高い香気として、ミント様の piperitone、フローラル様の β-ionone など 18 成分を確認した。これらの中に、寄与度は極めて高いが、通常の分析ではピークが確認できない微量香気成分があることを確認した。そこで、この微量成分を解明すべく、オープンカラム、HPLC、大量注入（～0.7 ml）と精密分取が可能な分取 GC 装置によって精製を行い、化合物の解明を試みた。その結果を報告する。

The aroma profiles of essential oils are constituted by various aromatic compounds. Of those, there are a few compounds that remarkably contribute to the profiles even at extremely minute amounts. In this study, we reinvestigated the aroma profile of mint essential oil (Hokuto) to explore such important but minute aromatic compounds. First, the oil was roughly fractionated to each functional group of compounds by HPLC, and then the fractions were subjected to a sensory omission test. The results showed that hydrocarbon, ester, ketone, and aldehyde fractions also contributed to the aroma description of the mint oil, suggesting there were some other important aromatic compounds other than l-menthol, and menthone. Then, the oil was subjected to Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) using a GC-olfactometry. Eighteen intense aromatic compounds were specified, such as piperitone, and ß-ionone. Of those, we found a significantly intense aromatic compound at extremely minute amount. In order to identify the compound, the mint oil was fractionated with regular methods, and then the compound was isolated with a highly efficient preparative GC with a large volume injection system (~ 0.7 ml/inj.) for higher instrumental analyses such as NMR. Here we reported the results.

aroma, mint, trace amount

発表責任者：河野　蛍子（kawano.k1996@gmail.com）

講演番号：4G01-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

GPR55 活性化物質としてのクルクミンの同定とインクレチン分泌における役割
Identification of curcumin as a GPR55 activator and its role in the secretion of incretin
○原田 直樹[1]、奥山 真衣[1]、寺岡 佳晃[1]、荒堀 有美[1]、新森 耀[1]、北風 智也[1]、乾 隆[1]、乾 博[1,2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大生命環境、[2]大手前大健康栄養)
○Naoki HARADA[1], Mai OKUYAMA[1], Yoshiaki TERAOKA[1], Yumi ARAHORI[1], Yoh SHINMORI[1], Tomoya KITAKAZE[1], Takashi INUI[1], Hiroshi INUI[1,2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Otemae Univ.)

【背景・目的】食品成分の作用機序を明らかにする上で、標的となる分子を同定することは重要な課題である。これまでに幾つかの食品成分が G タンパク質共役型受容体（GPCR）を活性化することが報告されている。本研究ではスクリーニングを行って見出したクルクミンによる GPR55 の活性化の詳細および GPR55 を介した生理作用について検討を行った。
【方法・結果】HEK293FT 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、クルクミンは GPR55 を介して $G_{12/13}$ シグナルを活性化した。この活性化は、GPR55 のアンタゴニストによって阻害された。クルクミン関連化合物を用いて構造活性相関を検討したところ、クルクミンのメトキシ基とヘプタジエン構造が活性化作用に重要であった。ドッキングシミュレーションによって推定した結合に関係する hot spot に変異を導入した GPR55 を用い、F190 がクルクミンによる活性化に必要な残基であることを明らかにした。腸管内分泌細胞株 GLUTag 細胞を用いた検討により、クルクミンは細胞内カルシウム濃度を増加させてインクレチンホルモンである GLP-1 の分泌を促進すること、これらの作用は GPR55 のアンタゴニストによって減弱することが判明した。以上の結果から、クルクミンの生理作用の一端が GPR55 を介して生じることを見出した。

【Background and Objectives】The identification of target molecules is an important issue in clarifying the mechanism of action of food ingredients. Several food ingredients are reported to activate G-protein-coupled receptors (GPCRs). In this study, we characterized the activation of GPR55 by curcumin, which had been found by screening, and investigated the physiological effects of curcumin mediated by GPR55.
【Methods and Results】Luciferase reporter assay using HEK293FT cells showed that curcumin activates $G_{12/13}$ signaling via GPR55 and GPR55 antagonist attenuated this effect. A structure-activity relationship study using curcumin-related compounds revealed that the methoxy group and heptadiene structure of curcumin are important for GPR55 activation. Docking simulation and GPR55 with mutations in the hot spots indicated that F190 has an important role in activation by curcumin. Curcumin increased intracellular calcium concentrations and induced the secretion of GLP-1, an incretin hormone, and that these effects are attenuated by antagonists of GPR55 in GLUTag enteroendocrine L-cells. These results showed that the physiological action of curcumin occurs, at least in part, via GPR55.
These results suggest that GPR55 may be involved in some of the physiological effects of curcumin.

curcumin, GPR55, GLP-1

発表責任者：原田　直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4G01-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

イソリクイリチゲニンによる腸内細菌叢の変動を介したメタボリックシンドロームの改善

Effect of isoliquiritigenin on gut bacteria, adipose tissue inflammation, and metabolic syndrome

○石橋 璃子[1]、古澤 之裕[1]、本田 裕恵[2]、渡邉 康春[2]、藤坂 志帆[3]、戸邉 一之[3]、高津 聖志[2]、栗原 新[4]、田渕 圭章[5]、長井 良憲[1] ([1]富県大工、[2]富薬総研、[3]富大医一内、[4]近大理工、[5]富大生命)
○Riko ISHIBASHI[1], Yukihiro Furusawa[1], Hiroe Honda[2], Yasuharu Watanabe[2], Shiho Fujisaka[3], Kazuyuki Tobe[3], Kiyoshi Takatsu[2], Arata Kurihara[4], Yoshiaki Tabuchi[5], Yoshinori Nagai[1] ([1]Toyama pref. univ., [2]Toyama Inst. Pharm.Res., [3]First Internal med. Toyama Univ., [4]Kindai Univ., [5]Life Sci. Res. Center, Toyama Univ.)

近年、ポリフェノールが抗炎症作用や代謝調節改善作用を示す機序の 1 つとして、腸内細菌叢の変動が注目を集めている。これまで我々は、甘草由来ポリフェノールであるイソリクイリチゲニン(Isoliquiritigenin: ILG)が、抗炎症・抗メタボリックシンドローム作用を示すことを明らかにしたが、ILG の作用メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、ILG が腸内細菌叢の変化を介して抗メタボリックシンドローム効果を示すか検証した。

野生型 C57BL/6 マウスに高脂肪食（HFD）および 0.5% ILG を混餌させた高脂肪食（HFD+ILG）を摂餌させたところ、ILG 混餌群では HFD 摂餌により誘導される肥満、耐糖能およびインスリン抵抗性が改善した。ILG 摂餌により内臓脂肪組織における炎症マーカーの発現が減少し、また大腸組織では腸管バリア機能関連遺伝子の発現増加が認められた。16s rRNA シークエンスによる腸内細菌叢解析では、ILG により腸管バリア機能向上や抗肥満・抗糖尿病効果を示す *P. goldsteinii* と *A. muciniphila* の増加が確認された。ILG による抗肥満・抗糖尿病効果が腸内細菌叢の変化によるものか調べるため、HFD 群および HFD+ILG 群糞便を用いた腸内細菌叢移植 (Fecal Microbita Transplantation: FMT)を行ったところ、HFD+ILG 群糞便を移植したレシピエントマウスでは、HFD 群糞便を移植したマウスに対して肥満や糖代謝調節異常が軽減していた。以上のことから、ILG は抗メタボリックシンドローム作用を示す機序の 1 つとして、腸内細菌の関与があると考えられた。

ILG has been reported to attenuate adipose tissue inflammation and metabolic disorder; however, the underlying mechanism remain to be fully elucidated. The aim of this study is to elucidate whether ILG ameliorates metabolic syndrome through the alteration in gut microbiota composition. ILG supplementation alleviated HFD-induced obesity, and diabetes and suppressed the expression of inflammatory genes in epididymal adipose tissue. 16S-rRNA sequencing analysis revealed that ILG supplementation modified gut bacterial composition by increasing the abundance of anti-metabolic disease-associated species (e.g., *P. goldsteinii* & *A. muciniphila*). FMT from ILG-fed donors counteracted HFD-induced body and epididymal fat weight changes, inflammatory gene expression, glucose tolerance, and insulin resistance, thereby suggesting that ILG-responsive gut bacteria exert anti-inflammatory and anti-metabolic syndrome effects.

isoliquiritigenin, metabolic syndrome, gut microbiota

発表責任者：石橋璃子（u156002@st.pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4G01-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

骨髄性細胞の 67LR を介した緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用における腸内細菌叢の関与の解析

Analysis of the involvement of gut microbiota in the anti-obesity effect of green tea catechin EGCG via 67LR in myeloid cells

○西岡 成汰、小原井 春香、冨岡 玲乃、村田 京介、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○ Seita NISHIOKA, Haruka KOBARAI, Reno TOMIOKA, Kyosuke MURATA, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

緑茶カテキンの一種である EGCG は、抗肥満作用をはじめとした多彩な生体調節作用を有する。また、肥満と腸内細菌叢を関連付ける報告が数多く存在するなど、腸内細菌叢と健康との関連が着目されている。我々はこれまでに、緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用が骨髄性細胞特異的 67-kDa ラミニン受容体ノックアウトマウス(67LR-KO マウス)において消失することを明らかにした。しかしながら、この作用における腸内細菌叢の関与は不明であった。そこで本研究では、骨髄性細胞特異的 67LR-KO マウスを用いて高脂肪高ショ糖食(HF/HS 食)および EGCG 摂食試験を行った際のマウスの腸内細菌叢を解析し、EGCG の抗肥満作用に対する腸内細菌叢の影響を検討した。

まず、種の豊富さの指標である Chao1 index を算出し、種多様性を評価した。Chao1 index は HF/HS 食摂食により両マウスともに低下したことから、肥満誘導により腸内細菌の種数が減少したことが示された。一方で、EGCG 摂食による種の豊富さの改善は両マウスともに観察されなかった。続いて、腸内細菌叢の類似度を NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling)にて評価した。普通食群と HF/HS 食群は各サンプルのプロット位置が遠く、HF/HS 食摂食により腸内細菌叢が変動したことが示された。一方、HF/HS 食群と HF/HS 食+EGCG 摂食群は両マウスともプロットが近接しており、EGCG 摂食による腸内細菌叢の変動は観察されなかった。以上の結果から、骨髄性細胞の 67LR を介した EGCG の抗肥満作用に腸内細菌叢の寄与は小さいことが示された。

We have previously shown that the anti-obesity effect of green tea catechin EGCG is abolished in myeloid cell-specific 67-kDa laminin receptor knockout mice (67LR-KO mice). However, the involvement of the gut microbiota in this effect was unclear. In this study, we analyzed the gut microbiota of 67LR-KO mice fed a high-fat/high-sucrose (HF/HS) diet with/without EGCG to evaluate the effect of gut microbiota on the anti-obesity effect of EGCG. The Chao1 index was calculated to evaluate species diversity. the Chao1 index decreased in both mice after HF/HS feeding and no improvement in species richness by EGCG was observed. The similarity of the gut microbiota was evaluated by NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling). The HF/HS diet group and the HF/HS diet + EGCG group were in close in both mice. This shows that no change in the gut microbiota was observed due to EGCG diet. These results indicate that the contribution of the gut microbiota to the anti-obesity effect of EGCG on the 67LR of myeloid cells is small.

EGCG, 67LR, microbiota

講演番号：4G01-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

食餌誘発性肥満モデルラットに対する乳酸菌 *Lacticaseibacillus paracasei* K71 の影響の解析

Analysis of the effect of *Lacticaseibacillus paracasei* K71 on anti-obesity in diet-induced obesity rat

○清水 佳祐[1]、三原 敏敬[2]、内山 公子[2]、髙橋 肇[2]、松本 雄宇[1]、鈴木 司[1]、井上 順[1]、山本 祐司[1]（[1]東農大院・応生科・農化、[2]亀田製菓（株））
○Keisuke SHIMIZU[1], Toshihiro MIHARA[2], Kimiko UCHIYAMA[2], Hajime TAKAHASHI[2], Yu MATSUMOTO[1], Tsukasa SUZUKI[1], Jun INOUE[1], Yuji YAMAMOTO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., Grad. Sch. of Agric. Chem., [2]KAMEDA SEIKA CO., LTD.)

【背景・目的】
乳酸菌は腸内細菌叢の変動を介して肥満の有病率に関与することが、近年の研究により明らかにされてきている。我々はアトピー性皮膚炎の症状軽減効果を有することが報告されている酒粕由来の乳酸菌 *Lacticaseibacillus paracasei* K71（旧分類：*Lactobacillus paracasei* K71、LpK71）が肥満改善効果を示すか否かについて検討し、結果を得たので報告する。
【実験方法】
Wistar ラットに高脂肪食を与え肥満モデルのラット（HFD 群）を作製し、さらに高脂肪食の重量の 3%及び 0.1%にあたるコーンスターチを LpK71 の死菌体に置換した飼料を与えた LpK71(3%)群、及び LpK71(0.1%)群の 3 群を、65 日間飼育を行った。屠殺後、体重や脂肪重量変動及び、脂質代謝関連因子の解析を行った。
【結果】
LpK71(3%)群には有意な差は見られなかったが、LpK71(0.1%)群において内臓脂肪の減少による体重増加の減少と菌叢の変動が確認された。脂肪組織における脂肪酸合成や脂肪酸 β 酸化に関連する因子に変動は見られなかったが、UCP1 のタンパク質発現量が増加したことから、内臓脂肪の減少は白色脂肪の褐色化によるものだと考えられる。菌叢は既知の肥満改善の報告と同様な Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の割合の変動が見られている。LpK71(3%)群ではなく LpK71(0.1%)群で顕著な変動が見られたことは、これら腸内細菌叢の変動の違いが影響を与えているのではないかと考えており、今後は白色脂肪の褐色化と腸内細菌叢の変動の繋がりを解析していく。

Currently, there are reports that lactobacilli improve obesity through changing the intestinal microflora. Therefore, we evaluated whether *Lacticaseibacillus paracasei* K71 (formerly designated as *Lactobacillus paracasei* K71, LpK71) derived from sake lees has obesity-improving effects using obese rats. As a result, we observed that LpK71 can reduced visceral fat by browning white fat, suppressed weight gain, and altered the intestinal microflora. Both changes were more pronounced in the LpK71(0.1%) group than in the LpK71(3%) group. We are planning to analyze the connection between browning of white fat and gut microbiota.

lactobacillus, browning, intestinal microflora

講演番号：4G01-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

スルフォラファンが腸内細菌叢に及ぼす影響と肥満抑制効果の解析

Effects of sulforaphane on intestinal flora and analysis of obesity suppression

○小高 愛未[1]、川上 優花[1]、吉良 早由里[1]、松本 雄宇[1]、鈴木 司[1,2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]（[1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化）
○ Manami KODAKA[1], Yuka KAWAKAMI[1], Sayuri KIRA[1], Yu MATSUMOTO[1], Tsukasa SUZUKI[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch. of Agric.Chem.)

【目的】食品成分の 1 つであるスルフォラファン（SFaN）は抗酸化作用やがん抑制効果が報告されており、これまでに私たちは、SFaN が脂質代謝調節を担う転写因子 SREBP の活性を抑制することや肥満抑制効果を示すことを明らかにしている。近年、肥満のヒトの腸内細菌叢を移植されたマウスが肥満になることが明らかになり、腸内細菌叢が肥満に関係していると考えられている。そこで本研究では、SFaN の肥満抑制効果に腸内細菌叢が関与しているか個体レベルで解析することを目的とした。
【方法】マウスに高脂肪食を 7 週間与え肥満状態にした後、6 群に分け、高脂肪食のみもしくは SFaN を 0.1%(w/w)含む高脂肪食、さらにそれぞれに抗生物質 Vancomycin もしくは Polymixin B のいずれかを 14 週間与えた。飼育期間中は肥満の指標として経時的に体重を測定し、腸内細菌叢のゲノム DNA を抽出するため糞を回収した。21 週の飼育後、肝臓、脂肪組織、盲腸内容物を摘出し、血液を採取して各種パラメーターを測定した。
【結果】高脂肪食を摂取したマウスは体重の増加が見られたが、SFaN を含む高脂肪食を摂取したマウスではそれが抑制された。しかし、Vancomycin もしくは Polymixin B を与えた群で SFaN による体重増加抑制効果が打ち消されることはなかった。現在、肝臓中のトリグリセリド量や SREBP のタンパクおよび mRNA 量、血中のコレステロール量の変化等を測定している。また、糞および盲腸内容物から腸内細菌叢のゲノム DNA を抽出し、腸内細菌叢の変化を解析中である。

Sulforaphane (SFaN), one of the food ingredients, has been reported to have antioxidant and tumor suppressor effects. Recently, it found that mice transplanted with obese human intestinal flora become obese, and hence it is thought that the intestinal flora is associated with obesity. In this study, we analyzed whether the intestinal flora is involved in the obesity-suppressing effect of SFaN.

After feeding mice a high-fat diet for 7 weeks to become obese, divide them into 6 groups. Then we fed mice a high-fat diet, a high-fat diet containing 0.1% (w/w) of SFaN, or a high-fat diet containing 0.1% (w/w) of SFaN and the antibiotics Vancomycin / Polymixin B for 14 weeks.

As a result, Mice fed a high-fat diet showed weight gain, but mice fed a high-fat diet containing SFaN suppressed it. However, the obesity-suppressing effect of SFaN was not overrided in the group fed Vancomycin or Polymixin B.

sulforaphan, SREBP, intestinal flora

発表責任者：小高愛未（mk207246@nodai.ac.jp）

講演番号：4G01-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

Restorative effect of 1-deoxynojirimycin on neuronal insulin resistance and its beneficial implication on tau hyperphosphorylation: in-vitro study using insulin-resistant neuroblastoma

○ Isabella Supardi PARIDA[1], Soo TAKASU[2], Junya ITO[1], Takahiro EITSUKA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. of Pharma. Sci., Gifu Pharmaceutical Univ.)

【Background】Growing evidence has supported the significance of neuronal insulin resistance in the onset of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). These prompt a growing call for therapeutic efforts that can sustain healthy brain insulin response, for instance, via intake of bioactive compounds. 1-Deoxynojirimycin (DNJ), a well-known iminosugar, might be a viable candidate for such purpose; it has long been known for its anti-diabetes and anti-obesity properties, partly due to its peripheral insulin-sensitizing effect[1], and we previously discovered substantial deposition of DNJ in brain after prolonged intake[2] in rodents. Thus, this study aimed to explore the alleviative effect of DNJ on neuronal insulin resistance and its implication on tau pathology (hallmark feature of AD) in an in-vitro study using insulin-resistant neuronal cell model.
【Method】Human neuroblastoma SK-N-SH cells were grown under high exposure to insulin (250 nM) for 24 hours to induce insulin-resistant (IR) state. Following this, IR cells then underwent treatment with DNJ (2.5, 5, or 10 μM) for another 24 hours. Meanwhile, insulin-sensitive cells (Control) were grown in absence of insulin or DNJ. Finally, cells were re-stimulated with insulin (100 nM, 30 min) before being harvested for qRT-PCR and western blotting assays.
【Results】IR cells exhibited abnormal expression of genes related to neuronal insulin signaling cascade (*Ir, Igf-1r, Irs, Pten, Akt, Gsk3b, Ide*), glucose transport (*Glut*), and ß-amyloid clearance (*Ide*). Moreover, we found a slight increase in TAU phosphorylation at Ser202 after the induction of insulin-resistant state, presumably due to the reduction in AKT and GSK3B phosphorylation (at Ser473 and Ser9, respectively) that led to an increased ability of GSK3B to promote TAU hyperphosphorylation. DNJ treatment at 5 and 10 μM appeared to be effective in reversing the insulin-resistant-induced changes in gene expression, while also promoting the activation of AKT/GSK3B pathway in IR cells; this, in turn, might account for the reduction of phosphorylated TAU that we observed in DNJ-treated groups. Overall, our results suggested the potential benefit of DNJ for prevention of neuronal insulin resistance and associated neurodegenerative disorders. Currently, we are also analysing the expression of other proteins that are involved in neuronal insulin signaling cascade to gain a more comprehensive insight into DNJ's effect on this pathway.

Reference: [1]Parida et al., 2020, *Food. Funct.*, 11, 3926-3940; [2]Parida et al., 2019, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 65, 157-163.

1-deoxynojirimycin, neuronal insulin resistance, tau hyperphosphorylation

発表責任者：Kiyotaka Nakagawa（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：4G01-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

尿中カテコールアミンを指標とした flavan 3-ols の交感神経活動亢進作用の検証

Verification of sympathetic hyperactivity induced by flavan 3-ols using urinary catecholamines as an indicator

○牟田 織江[1]、尾髙 南結[2]、藤井 靖之[1]、伏見 太希[1]、越阪部 奈緒美[1,2]（[1]芝浦工大院理工学、[2]芝浦工大シス理工）
○Orie Muta[1], Minayu Odaka[2], Yasuyuki Fujii[1], Taiki Fushimi[1], Naomi Osakabe[1,2] ([1]Shibaura Inst. of Tech., [2]Shibaura Inst. of Tech. Syst. Engr. and Sci.)

これまでに、ポリフェノールの 1 種である Flavan 3-ols(FL)を多く含む食品の摂取が、メタボリックシンドロームの危険因子を低減することが報告されている。一方、当研究室の先行研究では、摂取による一過的な循環動態の変動、エネルギー代謝亢進を確認し、これらの作用がアドレナリン受容体阻害剤の併用投与により抑制されることを見出した。本研究では、尿中に排出されたカテコールアミン(ノルアドレナリン・アドレナリン)量を指標に、FL の交感神経活動亢進作用を非侵襲的に検証することとした。代謝ケージに C57BL/6J 雄性マウスを 2 匹で収容し 48 時間の馴化期間を設けた後、24 時間分の尿を回収した。その後 vehicle または 50 mg/kg の FL を単回投与し、投与後 24 時間の尿を回収した。尿中カテコールアミンは電気化学検出器を搭載した HPLC を用いて定量を行った。FL 投与後、尿中カテコールアミン排泄量が有意に増加したことから、交感神経活動が亢進したことが明らかとなり、非侵襲的に検証できるようになった。

It has been reported that the intake of foods rich in flavan 3-ols (FL), a type of polyphenol, reduces risk factors for metabolic syndrome. On the other hand, previous studies in our laboratory confirmed transient changes in circulatory dynamics and increased energy metabolism due to ingestion, and found that these effects were suppressed by concomitant administration of adrenergic receptor antagonists. In the present study, we verified the sympathetic hyperactivity of FL using the amount of catecholamines (noradrenaline and adrenaline) discharged in urine as an indicator. Two male C57BL/6J mice were housed in a metabolic cage for a 48-hour acclimation period, and 24-hour urine samples were collected. Subsequently, a single dose of vehicle or 50 mg/kg FL was administered and urine was collected 24 hours after administration. Urinary catecholamines were quantified using HPLC equipped with an electrochemical detector. Urinary catecholamines excretion were significantly increased after FL administration, indicating increased sympathetic nerve activity.

flavan 3-ols, catecholamine, sympathetic nerve

発表責任者：越阪部奈緒美（nao-osa@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：4G01-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

山椒に含まれるα-グルコシターゼ阻害活性物質の探索

α-Glucosidase inhibitors from *Zanthoxylum piperitum*

○藤岡 美紅[1]、宇都宮 洋才[2]、河野 良平[2]、奥野 祥治[1] ([1]和歌山高専、[2]和歌山医大)
○Miku FUJIOKA[1], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2], Ryouhei KONO[2], Yoshiharu OKUNO[1] ([1]National Institute of Technology, Wakayama College, [2]Wakayama Medical Univ.)

近年、糖尿病患者の増加が著しく世界的な健康問題となっており、予防および改善が重要な課題となっている。その予防法のひとつとして、二糖類の分解酵素である α-グルコシダーゼの働きを阻害し血液中の糖の吸収を遅らせ、食後の高血糖状態を抑制する α-グルコシダーゼ阻害薬が注目されており、植物や微生物などの天然資源に含まれる阻害物質の探索が盛んにおこなわれている。

山椒(*Zanthoxylum piperitum*)はミカン科サンショウ属の植物である。全国収穫量のうち和歌山県が約 70%を占める有名な特産品である。山椒には、サンショウアミド類やテルペノイド類が多く含まれ、麻痺作用、抗糖化作用、抗菌作用などのさまざまな機能性が報告されており、我々の研究室でもアレルギー抑制物質として 2 種類のモノテルペンエステルを見出している。本研究では、山椒のメタノール抽出物が α-グルコシダーゼ阻害活性を示したため、山椒に含まれる阻害物質の探索を目的とした。

山椒の MeOH 抽出物より得た Hexane および EtOAc 抽出物に α-グルコシダーゼ阻害活性が見られた。まず、阻害試験を指標として Hexane 抽出物の分画を繰り返すことにより、阻害物質として Phytol を単離した。Phytol は 10 μM 以上で 75%以上の強い活性を示し、IC_{50} は 6μM であった。現在は、EtOAc 抽出物に含まれる阻害物質の精製および構造解析を進めている。

Recently, diabetes is a worldwide health problem and its prevention and treatment is important issue. Inhibition of α-glucosidase, which is a disaccharide-degrading enzyme, has been expected as one method for diabetes prevention.Natural occurring α-glucosidase inhibitors has been found from plant and microorganism and so on.

Zanthoxylum piperitum belong to be the genus Rutaceae. It has been most produced in Wakayama, which accounts for about 70% of the total harvest in Japan. The chemical components of *Z. piperitum* were reported sanshoamide and terpenoids. In our laboratory, two monoterpene esters were found as allergy inhibitors. MeOH extract of *Z. piperitum* showed suppressive effect against α-glucosidase activity. In this study, we investigated the isolation and identification of α-glucosidase inhibitor from *Z. piperitum*.

Hexane and EtOAc extracts from MeOH extract from *Z. piperitum* showed α-glucosidase inhibitory activity. Isolation of the active compounds was carried out the inhibition test of α-glucosidase activity as a guide. In Hexane extract, phytol was isolated and identified as an inhibitor, and it exhibited more 75 % inhibition at the concentration of 10 μM and IC_{50} value was 6 μM. We are proceeding with the purification of the active compounds from EtOAc extract.

Zanthoxylum piperitum, α-glucosidase, diabetes

発表責任者：奥野祥治（okuno@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：4G01-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

マウス培養細胞における ATP 合成経路の基質を供給する代謝経路の解析

Analysis of metabolic pathways that supply substrates for the ATP synthesis pathway in cultured mouse cells

○久保 裕亮[1]、佐藤 奈々[1]、北山 沙笑[1]、石野 孔祐[2]、片山 映[2]、大橋 隆治[2]、永田 宏次[1]、岡本研[1] ([1]東大農、[2]日本医大)
○Yusuke KUBO[1], Nana SATO[1], Sae KITAYAMA[1], Kousuke ISHINO[2], AKIRA KATAYAMA[2], Ryuji OHASHI[2], Koji NAGATA[1], Ken OKAMOTO[1] ([1]UTokyo, [2]NMS)

アデノシン三リン酸（ATP）は生物のエネルギー利用に必須なプリン化合物である。プリン代謝経路の増強による ATP 増加は、神経変性疾患など様々な病態の改善につながると言われている。プリン合成経路はリボースの供給源としてホスホリボシル二リン酸（PRPP）を基質とする。PRPP の合成経路は、グルコースを基質とするペントースリン酸経路、リボースを基質とする経路、リボヌクレオシドを基質とする経路の 3 種類が存在し得るが、各経路がどの程度 ATP 合成に寄与するのか分かっていない。本研究では ATP 合成の基質を効率的に供給する代謝経路を解明することを目的とし、マウス平滑筋由来培養細胞 MOVAS-1 を用いて各経路の基質添加によるプリン代謝物濃度変化を解析した。細胞の培地に PRPP 合成の前駆物質を添加して一定時間培養した後、細胞内プリン化合物を HPLC で定量した。ペントースリン酸経路特異的阻害剤である 6-AN を添加することで、グルコースを基質とした PRPP 合成を解析した。さらにリボース及び複数種類のリボヌクレオシドを添加することで、これらを前駆体とした PRPP 合成経路を解析した。それぞれの代謝経路は多くの細胞内プリン代謝物濃度に変化をもたらしており、ATP を増強する成分として応用が期待されるいくつかの前駆体が見出された。

Adenosine triphosphate (ATP) is a purine compound essential for the utilization of energy. The purine synthesis pathway uses phosphoribosyl diphosphate (PRPP) as a substrate for ribose, and there are three possible pathways for PRPP synthesis: the pentose phosphate pathway using glucose as a substrate, the pathway using ribose, and using ribonucleosides. However, it is not known to what extent each pathway contributes to ATP synthesis. In this study, we aimed to identify the metabolic pathways that efficiently supply substrates for ATP synthesis. Each precursor of PRPP synthesis were added to the medium of the cells (Mouse vascular smooth muscle cell line, MOVAS-1) and incubated, and then the intracellular purine compounds were quantified by HPLC. Each of the metabolic pathways resulted in changes in the concentrations of some intracellular purine metabolites, and several precursors were found that have potential applications as ATP-enhancing materials.

Purine metabolism, Inosine, Purine Salvage pathway

発表責任者：岡本研（akenokamoto@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4G01-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム G

ミリシトリンならびにヤマモモシクロデキストリン（CD)包接体の食後高血糖抑制効果

The preventive effect of myricitrin and readily water-soluble myricitrin on postprandial hyperglycemia

○山田 詩奈[1]、Odongo Kevin[1]、佐藤 良[2]、今田 隆文[2]、折越 英介[2]、芦田 均[1]、山下 陽子[1]([1]神戸大院・農、[2]三栄源エフ・エフ・アイ(株))
○Shina Yamada[1], Kevin Odongo[1], Ryo Sato[2], Takafumi Imada[2], Hideyuki Orikoshi[2], Hitoshi Ashida[1], Yoko Yamashita[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]San-Ei Gen F.F.I., Inc.)

食後高血糖は心血管疾患など様々な疾病の要因となりうるため、血糖コントロールは重要である。骨格筋は生体内の血糖調節において重要な組織であり、細胞内小胞にある糖輸送担体 4 型(GLUT4)が細胞膜に移行することで、糖を細胞内に輸送し血糖の調節を行っている。ミリシトリンはヤマモモの葉に含まれるフラボノイド配糖体であり、抗炎症作用などに加え、高血糖の改善作用も報告されている。しかし、食後の一過的な血糖値上昇に対する作用についてはまだ報告がない。一般的に、ミリシトリンは水への溶解性は低く、水溶液中での安定性が悪い。そこで、ミリシトリンとこの化合物を主成分として水溶性を高めたヤマモモシクロデキストリン（CD)包接体(W-Myr:三栄源エフ・エフ・アイ株式会社製）を用いて、これらの食後高血糖抑制効果の比較を目的とした。ICR マウスにミリシトリンならびに W-Myr を投与し、経口糖負荷試験を行ったところ、いずれも血糖値上昇を抑制し、その効果は W-Myr の方が強かった。次に、ラット骨格筋由来 L6 細胞を用いてミリシトリンを作用させたところ、ミリシトリンは 2-デオキシグルコースの細胞内への取り込み量を有意に増加させ、これに関わる GLUT4 の細胞膜移行を促進させた。腸管の L 細胞である STC-1 細胞にミリシトリンを作用させたところ、腸管ホルモンである glucagon-like peptide 1 (GLP-1) 分泌を促進した。以上の結果から、ミリシトリンは、筋肉細胞での GLUT4 の細胞膜移行を介したグルコース取り込み促進と腸管からの GLP-1 分泌を促進という 2 つの作用機構により食後高血糖予防に有効であることが示唆された。

Glycemic control is important to maintain homeostasis because postprandial hyperglycemia is a risk factor of cardiovascular diseases. Skeletal muscle plays a key role in glucose homeostasis by glucose uptake via translocation of glucose transporter 4 (GLUT4) from intracellular storage vesicles to the plasma membrane of the cells. Myricitrin is a flavonol glycoside found in Chinese bayberry, but its solubility is low. In this study, we investigated the preventive effect of myricitrin and readily water-soluble myricitrin (W-Myr) on postprandial hyperglycemia and its mechanisms. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed after oral administration of myricitrin and W-Myr in ICR mice. Both myricitrin and W-Myr significantly decreased blood glucose level after glucose-loading. In L6 myotubes, myricitrin significantly increased glucose uptake accompanied by translocation of GLUT4. In STC-1 cells as cultured intestinal L cells, myricitrin significantly promoted secretion of insulinotropic glucagon-like peptide 1 (GLP-1). These results strongly suggested that myricitrin is an effective compound to suppress hyperglycemia through promoting GLUT4 translocation and GLP-1 secretion.

hyperglycemia, glucose transporter 4, skeletal muscle

講演番号：4G03-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

ラット腸および肝臓におけるケルセチンの ex-vivo 代謝解析

Ex-vivo analysis of tissue-specific quercetin metabolism using rat inverted intestinal sack and perfused liver

○谷川 七海、西川 美宇、生城 真一（富山県立・工）
○Nanami TANIKAWA, Miyu NISHIKAWA, Shinichi IKUSHIRO (Toyama Pref. Univ.)

食品中のフラボノイドは UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）および硫酸転移酵素（SULT）などの異物代謝酵素による構造変換を受けて抱合代謝物となる。一部のフラボノイド代謝物は生理活性を発揮する場合があるため、代謝物自体の動態特性や機能性評価が重要である。本研究では、健康作用が報告されながらその作用機序が十分に明らかになっていないケルセチンの体内動態解明を目的として、ラットを用いた反転腸管サック法や肝臓灌流法などの組織特異的な代謝解析を行った。

反転腸管サック法によるケルセチン（Q）の代謝動態解析では、粘膜側（管腔）には未変化体およびケルセチンのグルクロン酸抱合体（Q-7G,Q-3G,Q-3'G）、硫酸抱合体（Q-7S,Q-3'S）および 3'位メチル化体（イソラムネチン）が検出された。漿膜側（体内）では未変化体と 4 種のグルクロン酸抱合体（Q-7G、Q-3G、Q-3'G、Q-4'G）および硫酸抱合体（Q-3'S）、3'位メチル化体（イソラムネチン）が検出された。肝臓灌流法によるケルセチンの代謝解析では、胆汁中に複数箇所が抱合された代謝物（QGS, MeQG）が検出された。静脈（全身循環）側では未変化体およびケルセチンのグルクロン酸抱合体（Q-7G、Q-3G、Q-3'G、Q-4'G）、硫酸抱合体（Q-7S,Q-3'S）および 3'位メチル化体（イソラムネチン）が検出された。現在、腸で代謝された後に肝臓でさらに代謝を受けるという生体での代謝動態を反映させるため、反転腸管サック法で得られた Q の代謝プロファイルを基に腸で生じる主要代謝物の肝臓灌流試験を行っている。

Dietary flavonoids undergo structural conversion by xenobiotic metabolizing enzymes such as UDP-glucuronosyltransferase (UGT) and sulfotransferase (SULT) to become highly water-soluble conjugated metabolites. Since some conjugated metabolites may exert physiological activity, it is important to evaluate the dynamics and functionality of the metabolite itself. In order to elucidate pharmacokinetics of quercetin, we investigated a tissue-specific metabolism of quercetin and its conjugated metabolites in rats by inverted intestinal sack and liver perfusion experiments. Detailed pharmacokinetic data might help to understand molecular mechanisms of flavonoid's health properties including quercetin, which often show low bioavailability.

Quercetin, Xenobiotic metabolizing, Ex vivo analysis

発表責任者：谷川七海（u156017@st.pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4G03-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

腸内細菌叢は生理活性物質ポリアミンの主要な供給源

Intestinal microbiota is a primary source of polyamines in the body

○生田 かよ、中村 篤央、松本 光晴（協同乳業）
○Kayo Ikuta, Atsuo Nakamura, Mitsuharu Matsumoto (Kyodo Milk Industry Co. Ltd.)

ポリアミン（PA）は、全生物の細胞内に普遍的に存在し、細胞増殖や分化、核酸保護、翻訳伸長など細胞の正常な活動に不可欠な物質である。加齢に伴い細胞内の PA 生合成能は低下するが、食事および腸内細菌由来の外因性 PA で補足でき、外因性 PA の長期供給は寿命延伸など老化抑制効果が報告されている。しかし、ほぼ全量が小腸で吸収される食事由来 PA と比べ腸内細菌の PA 供給源としての貢献度は不明で、特に大腸管腔内での産生・貯蔵量と生体への移行に関するデータが不足している。本研究では、生体の PA 供給源としての腸内細菌の価値を検証した。

健常成人 183 名の糞便中の遊離 PA 濃度を UPLC で測定した結果、大腸管腔内（大腸容量 400ml で換算）に平均 326 μmol（Putrescine 267 μmol, Spermidine 43 μmol, Spermine 16 μmol）の PA の存在が確認された。これは日本人の一日の食事由来 PA 平均摂取量 235 μmol（Food Chem 100:491-7, 2007）を大きく上回っていた。マウス出納実験でも、糞便中 PA 量は摂取 PA 量の 4.5 倍以上となり、食事由来量を超える PA が腸内細菌により産生され遊離状態で存在することが認められた。麻酔下で大腸管腔内に安定同位体ラベル化 putrescine を注入し生体への移行を検証した結果、血液、大腸、肝臓、腎臓等でラベル化 putrescine が検出され、大腸管腔から血流を介して各臓器に運ばれることが確認された。以上より、腸内細菌叢は食事に勝るとも劣らない PA 供給源であることが明らかとなった。これは、全身系に供給される腸内細菌叢由来生理活性物質の存在を示した最初の例と考えられる。

Polyamines (PAs) (putrescine, spermidine, and spermine) are ubiquitous in all living cells and are known to play some essential roles in cell proliferation, differentiation, antimutagenicity, and translation elongation. Although intracellular PA synthesis declines with age, it can be supplemented by exogenous PAs from the diet and colonic microbiota. Most of the dietary PAs are absorbed in the small intestine, but the potential of PAs produced by colonic microbiota has not been clarified. In this study, we investigated the potential of colonic microbiota as a source of the body PAs. Fecal PA levels in 183 healthy Japanese adults were determined by UPLC. Consequently, an average of 326 μmol PAs was detected in the colonic lumen, which was higher than average amount of dietary PAs (235 μmol/day in published data). Next, stable isotope-labeled putrescine was injected into the colonic lumen. Isotope-labeled putrescine was detected in blood, colon, liver, and kidney, confirming that putrescine in the colonic lumen is transported into each organ via blood stream. These results demonstrated the potential of colonic microbiota as a source of PAs in the body.

Polyamine, microbiota

講演番号：4G03-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

Angiopep-2 を修飾したクルクミン・ピペリン含有ナノ粒子の作製：クルクミンの脳内移行量の増加を目指して

Preparation of Angiopep-2 modified nanoparticles containing curcumin and piperine: aim to improvement of the brain uptake of curcumin

○板谷 麻由子[1]、宮澤 大樹[2]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]東北大　未来科技共研セ)
○Mayuko ITAYA[1], Taiki MIYAZAWA[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NICHe Tohoku Univ.)

【背景・目的】医療技術の発展に伴う平均寿命の延伸により、認知症の患者数は 2050 年には約 1.3 億人にのぼると推計されている。こうした中で、認知症の予防・治癒に向けて食品成分を活用する研究が進められている。中でも、クルクミン（CUR）は、抗酸化・抗炎症・抗アルツハイマー病（AD）作用等を持つことが報告されてきたが、その生体利用能の低さが課題とされている。この一因として、我々は、CUR の血中から組織への移行をアルブミン(ALB)が阻み、生理作用が制限される可能性を見出した。そして、CUR と ALB の結合を抑制するピペリン（PIP）の共添加により CUR の細胞移行量が増加し、生理作用発現の増大に繋がることを *in vitro* の試験によって明らかにしてきた。本研究では、この PIP による ALB と CUR の結合抑制が脳血管周囲で発揮されることが、CUR の脳移行量や生理作用の向上に繋がると仮説を立て、CUR・PIP を内包し、更に脳血管周囲への集積を指向したナノ粒子（NPs）の作製を目指した。
【方法・結果】NPs の担体として、生分解性のポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）を用い、ソルベントエバポレーション法により CUR/CUR・PIP-PLGA-NPs を作製した。AD 罹患時に脳血管壁での発現量が増加する LRP-1 を標的とするために、NPs 表面を Angiopep-2（A2）で修飾することを考え、NPs 作製時に架橋剤 BS3 を混合した CUR/CUR・PIP-BS3-PLGA-NPs を、更にその後 A2 とインキュベートすることで CUR/CUR・PIP-A2-PLGA-NPs を得た。物性評価後、LRP-1 を発現するタイトジャンクション形成細胞（MDCK 細胞）を用い、共焦点顕微鏡による細胞内移行量・トランスウェルによる透過量を比較し、CUR・PIP-A2-NPs の機能性を評価した。結果、CUR・PIP-A2-NPs 処理群では、他の粒子を処理したものと比較し、CUR やその代謝物の細胞内移行量や透過量が有意に増加した。
【結論・考察】PIP の内包・A2 修飾により、CUR の細胞内移行量や透過量が増加したことから、目的の機能性を持つ NPs を作製することができたことが考えられた。今後、動物試験により、in vivo での機能性評価を行っていく予定である。

Curcumin(CUR), a lipophilic polyphenol, potentially has anti-Alzheimer’s effect, however, its bioavailability is limited. Based on free drug hypothesis, we previously verified albumin(ALB) is a factor that limits bioactivities of CUR and piperine improve bioactivities of CUR by suppress the interaction between CUR and ALB. Here, we aimed to prepare CUR and piperine contained nanoparticles to exert the physiological effects of CUR in the brain.

curcumin, nanoparticles, piperine

講演番号：4G03-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

Piper longum 含有成分による尿酸トランスポーター（ABCG2）発現亢進作用

Induction of uric acid transporter (ABCG2) expression by compounds from *Piper longum*

桐生 莉沙[1]、茂木 一稀[1]、薩 秀夫[2]、○仁科 淳良[1]（[1]日大理工、[2]前工大工）
Risa KIRYU[1], Kazuki MOTEGI[1], Hideo SATSU[2], ○ Atsuyoshi NISHINA[1] ([1]Nihon Univ, [2]Maebashi Ins Tech)

【目的】
ミャンマーでは *Piper longum* L.（英名 Long pepper）を香辛料以外に生薬として抗炎症、皮膚保護に加えて腎臓保護の用途で用いている。我々は、腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来細胞（Caco-2 細胞、LS180 細胞）、尿酸排泄作用の指標として尿酸排泄トランスポーター（ABCG2）を選択し、同植物中の尿酸排泄を促進する化合物の探索を行った結果、5 種のネオリグナン類縁体を単離・同定した。また、5 種の化合物のうちの 1 化合物は細胞毒性が認められない濃度で ABCG2 遺伝子の発現を有意に亢進することが分かった。今回、*P. longum* から単離したネオリグナン類とそれらの ABCG2 遺伝子の発現亢進作用を *in vitro* 実験系で評価した結果を報告する。
【結果と考察】
P. longum の酢酸エチル画分から 5 化合物を単離した。各化合物の MS や NMR スペクトルを先行文献と比較することによりそれぞれを eupomatene (**1**)、eupomatenoid 7 (**2**)、licarin A (**3**)、licarin B (**4**)、veraguensin (5) と同定した。5 化合物のうち化合物 **3** は細胞毒性を示さない濃度で ABCG2 遺伝子の発現亢進作用が認められた。siRNA を用いた実験結果から化合物 **3** が芳香族炭化水素受容体（AhR）を活性化することにより ABCG2 遺伝子の発現を亢進することが示唆された。今後、ドッキングシミュレーションにより化合物 3 と AhR に親和性について考察する予定である。

In Myanmar, *Piper longum* L. (Long pepper) is used as a spice in addition to a herbal drug for anti-inflammatory and skin as well as kidney protection. We used human colon cancer-derived cells (Caco-2 and LS180 cells) as a model of intestinal epithelial cells. Furthermore, the uric acid excretion transporter (ABCG2) was selected as an index of uric acid excretion. As a result of elucidation for compounds that promote uric acid excretion in the plant, five compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of *P. longum*. By comparing the MS and NMR spectra of each compound with literature data, they were identified as eupomatene (1), eupomatenoid 7 (2), licarin A (3), licarin B (4), and veraguensin (5). Among the five compounds, compound **3** was found to enhance the expression of the ABCG2 gene. Experimental results using siRNA suggest that compound **3** enhances the expression of the ABCG2 gene by activation of the aromatic hydrocarbon receptor (AhR). By the day of presentation, the affinity for compound **3** and AhR will be evaluated by docking simulation.

Piper longum, uric acid excretion transporter, neo lignan analogs

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4G03-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

腸内細菌叢はマウスの循環血中エクソソームに内包される miRNA の変化を介して宿主生理に影響を及ぼす

Gut microbiota influences host physiology through altered miRNAs in circulating exosomes in mice

○唐津 勇吾、逢坂 文那、園山 慶（北大院農）
○YUGO KARATSU, FUMINA OHSAKA, KEI SONOYAMA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】細胞外小胞エクソソームに内包される miRNA は、細胞間の情報伝達を媒介するものとして注目されている。我々は、これが腸内細菌叢と宿主の相互関係を媒介するものと予想し、腸内細菌叢がマウス循環血中エクソソームの miRNA プロファイルに及ぼす影響を調べた。
【方法・結果】通常マウスおよび無菌マウスの血漿エクソソームから総 RNA を抽出し、マイクロアレイによる miRNA プロファイルの解析に供した結果、多くの miRNA の発現が無菌マウスにおいて一様に高値を示した。*in silico* 解析の結果、それらの miRNA の標的遺伝子として脂肪組織の分化や成熟への関与が報告されている *Hipk2* が予測された。そこで、白色脂肪組織における *Hipk2* の発現レベルを RT-qPCR で比較したところ、無菌マウスで有意に低値を示した。また、盲腸における miRNA のエクソソームへの積み込みに関わる遺伝子の一つである *Hnrnpa2b1* の発現レベルが通常マウスに比べ無菌マウスで有意に高いことが示された。
【考察】腸内細菌叢は盲腸における *Hnrnpa2b1* の発現減少を介してエクソソームに積み込まれる miRNA 量を減少させ、腸管から離れた組織の遺伝子発現を調節している可能性が示唆された。

【Background/Aims】miRNAs encapsulated in the extracellular vesicle exosomes have been considered as a mediator of cell-to-cell communication. We hypothesized that exosomal miRNAs mediate the interaction between the gut microbiota and the host and investigated the effect of gut microbiota on the miRNA profile of circulating exosomes in mice.
【Methods/Results】Total RNA was extracted from plasma exosomes of conventional and germ-free mice and subjected to microarray analysis for miRNA profiles. *In silico* analysis predicted *Hipk2* as a target gene of miRNAs higher in germ-free mice, which has been reported to be involved in the differentiation and maturation of adipocytes. RT-qPCR showed that *Hipk2* mRNA levels in white adipose tissue were significantly lower in germ-free mice than in conventional mice. Cecal mRNA level of *Hnrnpa2b1*, which is a gene involved in the loading of miRNAs into the exosome, was significantly higher in germ-free mice than in conventional mice.
【Discussion】We suggest that gut microbiota regulates gene expression in the extra-intestinal tissues by reducing *Hnrnpa2b1*-dependent loading of cecal miRNAs into exosomes.

gut microbiota, exosome, microRNA

発表責任者：園山慶（ksnym@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4G03-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

ラット骨中のメナキノン-4 低下が骨形成マーカーに及ぼす影響の解析

Decreased menaquinone-4 may induce mRNA expression of bone formation markers in rat bone.

○大崎 雄介[1]、駒野 悠太[1]、駒井 三千夫[1]、佐藤 俊郎[2]、白川 仁[1]([1]東北大・院農・栄養学、[2]J-オイルミルズ)
○Yusuke OHSAKI[1], Yuta Komano[1], Michio Komai[1], Toshiro Sato[2], Hitoshi Shirakawa[1] ([1]Tohoku Univ., [2]J-Oil Mills, Inc.)

【背景】生体内では摂取したビタミン K の一部がビタミン K2 の一種であるメナキノン-4 (MK-4)へと変換される。MK-4 は骨芽細胞分化誘導や破骨細胞分化抑制作用といった他のビタミン K にはない作用が報告される一方で、生理的濃度の MK-4 の機能は充分に解明されていない。本研究では、γ-グルタミルカルボキシラーゼの補因子作用を有し、MK-4 へ変換されない、2',3'-ジヒドロフィロキノン (dK1) をラットに給餌して MK-4 欠乏動物を作出し、骨中 MK-4 の生理作用解明を試みた。
【方法】Wistar 系雄性無菌ラット(6 週齢)に 5 mg/kg 飼料のビタミン K1 (K1 群)、dK1 (dK1 群) 添加飼料を与えて 5 週間飼育して採血し、血液凝固時間ならびに骨代謝マーカーの測定を行った。大腿骨中ビタミン K 濃度を蛍光 HPLC 法、骨代謝マーカーmRNA 発現量を RT-PCR 法により測定した。
【結果】血液凝固時間は群間で差を認めなかった。骨中 MK-4 濃度、総ビタミン K 濃度は K1 群と比較して dK1 群で有意に減少した。骨形成に関わるオステオカルシン(OC)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、I 型コラーゲンの大腿骨中 mRNA 発現量は K1 群と比較して dK1 で有意に上昇したが、骨吸収に関わる酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP) mRNA は差を認めなかった。血漿中 OC 濃度、ALP 活性は K1 群と比較して dK1 群で有意に上昇したが、TRAP 活性は差を認めなかった。
【結論】骨中 MK-4 の生理的濃度以下への低下は、骨形成を促進させる可能性が示唆された。

[Background] To investigate the physiological function of MK-4 in bone, rats were fed with a 2',3'dihydrophylloquinone (dK1) supplemented diet, which has γ-carboxylation activity and is not converted to MK-4. **[Methods]** Male germ-free Wistar rats were fed either control (5 mg K1/kg diet) or dK1 supplemented diet (5 mg dK1/kg diet) for 35 days. Blood was collected for blood coagulation time and plasma bone metabolism marker measurement. Femur vitamin K level and mRNA expression levels of bone metabolism markers were evaluated. **[Results]** No difference was observed in the blood coagulation time. Femur MK-4 and total vitamin K levels were significantly reduced in the dK1 group compared to the K1 group. The mRNA expression levels of osteogenic markers including osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (ALP), and type I collagen, were significantly increased in the femur of dK1 group compared to that of K1 group, while bone resorption marker, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), showed no difference. Plasma OC level and ALP activity were significantly increased in the dK1 group compared to the K1 group. No difference was observed in plasma TRAP activity. **[Conclusion]** Decrease of MK-4 in bone below physiological level may promote bone formation.

Vitamin K, menaquinone-4, osteogenesis

発表責任者：大崎雄介（yusuke.ohsaki.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：4G03-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

チーズとの組合せ摂取によるトマトからのリコピン吸収向上効果の検証　―非盲検クロスオーバー比較試験―

Promoting effect of combination intake of tomato and cheese on lycopene absorption –An open-label, crossover study–

○脇 尚子、鈴木 重徳、菅沼 大行（カゴメ・イノベーション本部）
○Naoko WAKI, Sigenori SUZUKI, Hiroyuki SUGANUMA (KAGOME CO., LTD.)

リコピンはトマトやその加工品に豊富に含まれる赤色のカロテノイドである。リコピンは優れた抗酸化作用を持ち、がんや心血管疾患などの慢性疾患のリスクを低下させることが知られている。食品に含まれるリコピンがこれらの生理機能を発揮するためには、まず消化管から生体内に吸収される必要があるが、疎水性が極めて高いリコピンの体内への吸収率は低い。そこで本研究では、様々な食シーンにおいてしばしばトマトと同時に喫食される食品であるチーズをトマトと組み合わせることによりリコピン吸収を向上できるか否かを、非盲検クロスオーバー比較試験にて検証した。研究対象者 24 名に、トマトピューレーのみ（リコピン 24 mg）、またはトマトピューレーとチーズとを組み合わせたもの（リコピン 24 mg、 脂質 19.5 g）を単回摂取させ、摂取前、及び摂取 2、4、6、9 時間後の血清中及び血清における triglyceride-rich lipoprotein fraction（TRL 画分）中のリコピン濃度を測定した。その結果、トマトピューレーのみを摂取した場合と比較して、トマトピューレーとチーズとを組み合わせて摂取した場合の方が、血清中及び TRL 画分中におけるリコピン濃度変化量の曲線下面積が有意に高値を示した。したがって、チーズと組み合せて摂食することによりトマトからのリコピン吸収率が向上することが明らかとなった。

Lycopene, a major carotenoid in tomato, shows a strong antioxidant activity and is known to reduce the risk of chronic diseases such as cancer and cardiovascular disease. In order to receive these physiological effects, therapeutic amount of lycopene need to be absorbed via digestive tract. But, the bio-accessibility of highly hydrophobic lycopene is low.

Cheese is often consumed in combination with tomatoes in various menus. Therefore, an open-label, crossover study was conducted to evaluate promoting effects of combination of tomato and cheese on absorption of lycopene. The subjects consumed either tomato puree only (24 mg of lycopene) or a combination of tomato puree and cheese (24 mg of lycopene and 19.5 g of fat). As a result, after ingestion of the combination of tomato puree and cheese, the incremental area under the curves from 0 to 9 h for the lycopene level in serum and serum triglyceride-rich lipoprotein fraction were significantly higher than that after ingestion of tomato puree only. Therefore, it was revealed that consuming tomato with cheese could enhance lycopene absorption.

Tomato, Lycopene, Cheese

発表責任者：脇尚子（Naoko_Waki@kagome.co.jp）

講演番号：4G03-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

油に分散させた茶カテキンの体内吸収挙動：LC-MS/MS による評価

Evaluation of the absorption of catechins from green tea leaves dispersed in oil in vivo using LC-MS/MS

○宮下 采夏[1]、伊藤 隼哉[1]、橋本 革[2]、市瀬 嵩志[3]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]不二製油株式会社 油脂開発部、[3]不二製油グループ本社株式会社　未来創造研究所)
○ Ayaka MIYASHITA[1], Junya ITO[1], Arata HASHIMOTO[2], Takashi ICHINOSE[3], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]FUJI OIL CO., LTD., [3]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

【背景】カテキンは緑茶茶葉に含まれるフラボノイドの一種で、抗酸化や抗がん作用などの機能性を有することが知られている。一方で、カテキンを摂取した際に、体内吸収率が比較的低いことや体内滞留時間が短いことが報告され、生理作用をより効果的に享受するうえで課題となっている。他方、水溶性の活性成分（例：メトホルミン、ベルベリンなど）を油溶媒に分散させた W/O 型エマルションは、吸収性向上や徐放性発揮によりバイオアベイラビリティーを高める技術として期待されている。しかし、実際に油に分散させたカテキンをヒトが摂取し、その体内濃度や挙動を評価した報告はほとんどない。そこで本研究では、W/O 型カテキン油分散液（油カテキン）をヒトが摂取した際の血漿を経時的に LC-MS/MS で調べ、カテキンの体内濃度や挙動を知ろうとした。
【方法】エピガロカテキンガレート（EGCG）を主成分とする緑茶抽出物、大豆油、乳化剤を用いて W/O 型エマルションである油カテキンを調製した。また、緑茶抽出物を水に溶解させた水カテキンも調製した。次いで、健常ボランティアによるクロスオーバー試験（1 週間の wash out）を実施し、油カテキンあるいは水カテキン 10 g を摂取し、0、1、3、6、8、12、24 時間後に採血した。
【結果】得られた血漿を LC-MS/MS で分析した結果、いずれのサンプル摂取時でも EGCG が検出された。さらに、血中曲線下面積（AUC）は同程度であったものの、水カテキンと比較し、油カテキン摂取時の EGCG は血中に長く留まり、穏やかな吸収の様子がみられた。以上の結果より、カテキンを油分散させた際も十分に体内へ吸収され、こうした知見はカテキンの利用性を広げると期待される。

【Introduction】Catechins are a type of flavonoids present in green tea leaves and are known to have some biological effects. According to some research, for water-soluble ingredients, W/O emulsions are expected to lead to bioavailability improvements. Considering such reports, in this study, we aimed to evaluate the bioavailability when human ingested catechins dispersed in oil.
【Method】We prepared oil-catechins using green tea extract (mainly (–)-epigallocatechin gallate: EGCG), soy oil and surfactant. Also, water-catechins were prepared by dissolving the green tea extract in water. These samples were ingested by human, and blood was collected over time.
【Result】Compared with the intake of water catechins, EGCG was more gradually absorbed in the body when human consumed oil-catechins. Our results suggested that oil-catechins are also absorbed sufficiently in the body and expanded the use of catechins.

tea catechins, absorption, LC-MS/MS

講演番号：4G03-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

ラットを用いた多様なアピゲニン配糖体の腸管吸収性比較

Comparison of the intestinal absorption of various apigenin glycosides in rats

○川本 実佳[1]、室田 佳恵子[1,2] ([1]島根大院自然科学、[2]島根大生物資源)
○Mika KAWAMOTO[1], Kaeko MUROTA[1,2] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】フラボノイドの 1 種であるアピゲニンは、食品中で *O*-配糖体や *C*-配糖体といった結合様式、糖の種類や位置が異なる様々な配糖体として存在している。そのため本研究では糖鎖構造の異なるアピゲニン配糖体を投与した際の腸管吸収性及び代謝について比較することを目的とした。
【方法・結果】胸管リンパカニュレーションラットに apigenin-7-*O*-glucoside(A7-*O*-G)、apigenin-7-*O*-apioglucoside(apiin)、apigenin-6-*C*-glucoside/isovitexin(IV)、isovitexin-4’-*O*-glucoside/isosaponarin(IS)を投与し、リンパ液、血漿、尿を回収した。採取したサンプルに未処理あるいは脱抱合酵素処理を施したものを分析試料とし、HPLC で定性・定量分析を行った。その結果、*O*-配糖体（A7-*O*-G、apiin）投与後では脱抱合後のリンパ液と血漿からアピゲニンが検出された。未処理のリンパ液からもアピゲニンが検出されたがごく少量であったため、大部分が抱合体として存在することが示された。さらに尿からもアピゲニン代謝物が検出された。リンパ液への輸送総量と血漿 AUC はどちらも 0-6 h の A7-*O*-G の方が 0-12 h の apiin よりも高く、A7-*O*-G が吸収されやすい配糖体であることが示唆された。*C*-配糖体（IV、IS）投与後では投与後 1 h 以内のリンパ液と血漿から各配糖体が少量検出されたのに対し、アグリコンは脱抱合の有無に関わらず検出されなかった。以上の結果からグルコースの結合様式の違いが吸収性を大きく変化させることが確認された。現在、*C*-配糖体投与後の尿についてもアピゲニン代謝物の有無を検討中である。

In this study, the intestinal absorption and metabolism after administration of various apigenin derivatives with different glycosidic moieties were investigated using thoracic lymph duct–cannulated rats. Apigenin derivatives were administered intraduodenally, and the collected lymph, peripheral plasma and urine were analyzed by HPLC. As a result, apigenin was present as its conjugates in the lymph and the plasma after administration of apigenin-7-*O*-glucoside (A7-*O*-G) and apigenin-7-*O*-apioglucoside (apiin). The absorbability of A7-*O*-G was higher than that of apiin. After administration of apigenin-6-*C*-glucoside (isovitexin) and isovitexin-4’-*O*-glucoside, the low levels of these *C*-glycosides were detected, although no aglycone was found in the lymph and the plasma with or without conjugation. These results indicate that the type of sugar moieties’ linkage significantly affect the absorption and metabolism of apigenin derivatives.

apigenin, glycoside, intestinal absorption

発表責任者：室田佳恵子（murota@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4G03-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

乳汁中ケルセチンの摂取が新生仔マウスの薬物代謝機構に与える影響

The influence of quercetin in breast milk on drug-metabolizing mechanisms in neonatal mice

○藤原 なお[1]、向井 理恵[2]、村上 明[1]、石坂 朱里[1]([1]兵庫県大・環境人間、[2]徳島大院・社会産業理工)
○Nao FUJIWARA[1], Rie MUKAI[2], Akira MURAKAMI[1], Akari ISHISAKA[1] ([1]Univ. of Hyogo, [2]Tokushima Univ.)

【背景・目的】Quercetin（QUE）は薬物代謝機構を介して様々な代謝物へと変換され血液中を循環する。従来、フラボノイドの生体利用性の評価対象として血液や尿が用いられてきたが、近年の研究では乳汁中にも QUE をはじめとするフラボノイドが存在すると報告されている[1, 2)]。しかし、先行研究の多くでは乳汁中アグリコンの有無や代謝物の種類は明らかにされておらず、血液と乳汁間のフラボノイド濃度の比較も行われていない。乳汁中フラボノイドが乳児へ及ぼす影響は未だ不明であるが、フラボノイドは生体異物であるため、乳児の薬物代謝酵素の発現調節に影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究では、母マウス乳汁及び母仔マウスの血液・尿試料中に含まれる QUE とその代謝物の定量、及び仔マウスにおける薬物代謝酵素の発現量や活性を解析することを目的とした。
【方法及び結果】ICR マウスをコントロール群と QUE 摂取群の 2 群に分け、交配・出産させた。分娩後 11-13 日目に母仔マウスから乳汁、血液及び尿試料を得た。各試料に sulfatase H-1 を添加し脱抱合処理を行い、LC-QTOF-MS/MS により総 QUE 量を定量した。また、脱抱合処理をせずに代謝物の種類及びアグリコン量を分析した。その結果、QUE 群の母仔マウス血液、尿及び乳汁から QUE アグリコン及び代謝物が検出された。興味深いことに、乳汁中 QUE 濃度は血液中の 5±4.5 倍という高濃度であった。以上より、QUE 摂取後の母仔マウス血液、尿及び乳汁中に QUE アグリコン及び代謝物が存在することが本研究で初めて確認された。現在、仔マウスの臓器試料を用いて薬物代謝酵素発現量及び酵素活性の検討を行っている。
参考文献 1）Song et al. *Nutrition*（2013）, 2）Romaszko et al. *Mol. Nutr. Food Res.,*（2014）

In this study, we quantified quercetin and its metabolites in breast milk, blood and urine of mother and neonatal mice. We collected milk from mother mice once or twice until postnatal day 11-13 and then collected blood and urine from mother and neonatal mice. Each sample was prepared with or without deconjugation, and quercetin and its metabolites in the samples were quantified by LC-QTOF-MS/MS analysis. As the results, we detected quercetin and its metabolites in milk, blood and urine from mother and neonatal mice. Interestingly, the concentrations of quercetin in milk was found to be as high as 5±4.5 times that in blood. Currently, we examine the expression levels and activities of drug-metabolizing enzymes in neonatal mice.

flavonoid, breast milk, drug metabolism

発表責任者：藤原なお（n.fuji.o512@gmail.com）

講演番号：4G03-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム G

ガーリック由来香気成分の抗動脈硬化作用に関する研究

Anti-arteriosclerosis effect of garlic derived organosulfur compound

○AN NI[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化)
○Ni AN[1], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【背景・目的】動脈硬化を基盤とした血管系の合併症は我が国の主要な死亡原因である。アテローム性動脈硬化の進行過程において、血管内皮細胞は炎症性サイトカインに暴露されると考えられる。しかし、炎症性サイトカインが血管内皮細胞に及ぼす影響は十分に解明されていない。我々はガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide（DATS）の抗がん、抗肥満、抗血小板作用などにについて明らかにし、報告してきた。本研究では、DATS の抗動脈硬化作用を解明する目的で、DATS が炎症性サイトカインで刺激した血管内皮細胞に及ぼす影響について検討した。【方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に DATS を添加処理 30 分後に TNFα または IL-1β を添加培養した。血液凝固・線溶系因子、細胞接着因子の mRNA 発現を qPCR により解析した。【結果】Control 群と比較し、TNFα の単独添加は HUVEC における血液凝固因子 TF, 線溶阻害因子 PAI-1, 細胞接着因子 VCAM-1 ならびに ICAM-1 の発現を増加させた。一方、TNFα は血液凝固阻害因子 TFPI の発現を減少させ、線溶因子 tPA の発現には影響を及ぼさなかった。DATS の前処理は TNFα による PAI-1, VCAM-1, ICAM-1 発現の上昇を抑制した。また、IL-1β の単独添加は HUVEC における TF, PAI-1, tPA, VCAM-1, ICAM-1 発現を増加させ、TFPI 発現を減少させた。DATS の前処理は IL-1β による TF, PAI-1, tPA, VCAM-1, ICAM-1 発現の上昇を抑制した。以上のことから、DATS は炎症性サイトカインによる血液凝固因子・細胞接着因子の遺伝子発現の上昇を抑制し、抗動脈硬化作用を示すことが明らかとなった。

Arteriosclerosis-based vascular complications are the major cause of death in Japan. In the onset of atherosclerosis, vascular endothelial cells are thought to be exposed to inflammatory cytokines. However, the effect of inflammatory cytokines on vascular endothelial cells have not been fully understood. We have previously reported that anti-cancer, anti-obesity and anti-platelet activities were provided by compounds derived from garlic including diallyl trisulfide (DATS). In this study, we investigated the effect of DATS on vascular endothelial cells stimulated by inflammatory cytokines to elucidate the anti-arteriosclerosis effect of DATS. TNFα or IL-1β was added to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) pretreated with DATS for 30 minutes, and the expression of coagulation/fibrinolytic factors and adhesion molecules was analyzed by qPCR. Pretreatment of HUVEC with DATS suppressed the increase in TF, PAI-1, VCAM-1, and ICAM-1 expressions induced by TNFα or IL-1β. These results suggest that DATS suppresses the arteriosclerosis and the following thrombotic events on endothelial cells.

Garlic, HUVEC, Arteriosclerosis

発表責任者：関　泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4G05-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

β-グルカンが実験的食物アレルギーの発症に及ぼす影響について
Influence of ß-glucans on the development of food-induced hypersensitivity in a murine model
○何 超琪、劉 云慧、鳥居 洸太、鄭 廷宇、戸田 雅子（東北大院農）
○Chaoqi HE, Yunhui LIU, Kota TORII, Ting Yu CHENG, Masako TODA (Tohoku Univ.)

水溶性食物繊維は抗炎症・抗アレルギー作用を発現することが報告されている。本研究では、β-1,3-グルカンと β-1,3/1,6-グルカンの抗アレルギー作用の解析を目的とした。BALB/c マウスを、AIN-93M 標準飼料を投与したコントロール群、β-1,3-グルカン含有飼料あるいは β-1,3/1,6-グルカン含有飼料の投与群に群分けした。試験食開始後にマウスをオボアルブミン（OVA）で感作し、その後の OVA 経口投与によりアレルギー症状を誘導した。コントロール群と比較して、β-1,3 グルカン群ではアレルギー性下痢の発生率が増加する一方、β-1,3/1,6-グルカン群では下痢発症に影響は見られなかった。マウスの腸間膜リンパ節細胞を調製し OVA で刺激したところ、コントロール群や β-1,3/1,6-グルカン群由来の細胞と比較して、β-1,3 グルカン群由来細胞では Th17 型サイトカイン IL-17A と共に Th2 型サイトカイン IL-4 や IL-5 の産生が有意に増強した。また、β-1,3-グルカン群においては糞便中トータル IgA と OVA 特異的 IgA のレベルが顕著に増加していた。β-1,3/1,6-グルカン群においても糞便中トータル IgA の増加は観察された。マウス空腸を組織解析に供したところ、β-1,3-グルカン群においては肥満細胞の数が増加していた。以上の結果から、β-1,3-グルカンは（i）腸管関連リンパ組織において免疫応答を増強するアジュバント効果を持ち、感染防御に重要な IgA 産生を誘導できるポテンシャルを持つが、（ii）Th2 細胞応答が増強された場合には肥満細胞数が増加し、食物アレルギー発症が促進されることが示唆された。

Evidence has suggested that soluble dietary fibers exhibit anti-inflammation and anti-allergy effects. In the present study, we aimed to assess the anti-allergy effects of β-1,3-glucan and β-1,3/1,6-glucan using a murine model of food allergy. BALB/c mice were fed AIN-93M control diet, β-1,3-glucan diet, or β-1,3/1,6-glucan diet, and received sensitization and oral challenge with ovalbumin (OVA, an egg white allergen). Unexpectedly, the occurrence of diarrhea was significantly increased in β-1,3-glucan group, compared to the control group. Mesenteric lymph node cells from β-1,3-glucan group produced higher levels of Th2-type cytokines IL-4 and IL-5 and Th17 cytokine IL-17A than those from other groups. The levels of total IgA and OVA-specific IgA levels in stool samples were significantly increased in β-1,3-glucan group, compared to the control group. Histological analysis showed that the number of mast cells in small intestine was increased in β-1,3-glucan group. These results suggest that β-1,3-glucan has potential as a mucosal adjuvant to induce IgA production in intestinal tissues, but may promote development of food allergy by enhancing allergen-specific Th2 cells and the number of mast cells.

β-1,3-glucan, ß-1,3/1,6-glucan, food allergy

発表責任者：戸田　雅子（masako.toda.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4G05-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

ユズ果皮の抗アレルギー作用に関する解析

Assessment for anti-allergy effect of yuzu's peer

○鳥居 洸太[1]、吉瀬 菜南[2]、何 超琪[1]、渡邉 賢[2]、戸田 雅子[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院工)
○Kota TORII[1], Nanami KISE[2], Chaoqi HE[1], masaru WATANABE[2], Masako TODA[1] ([1]Grad. Sch. of Agr., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ.)

近年、果物の果皮に含まれるペクチンやペクチン由来オリゴ糖が抗炎症・抗アレルギー効果を持つことが示唆されている。本研究ではユズ果皮の抗アレルギー効果について、花粉症モデルマウスを用いて解析することを目的とした。採汁後のユズ果皮を粉砕し、ペクチナーゼ処理あるいは未処理の材料を調製した。BALB/c マウスを（1）AIN93M 標準飼料（control diet）の投与群（CO 群)、(2）酵素未処理ユズ果皮を含有する飼料(yuzu peer contained diet) の投与群（YP 群)、(3）酵素処理ユズ果皮を含有する飼料（enzyme-treated yuzu peer contained diet）の投与群(EYP 群)と 3 群に分けて飼育した。試験飼料投与の開始から一週間後、アレルゲン（Ovalbumin :OVA）でマウスを腹腔感作し、さらに経鼻投与することでアレルギー性気道炎を誘導した。CO 群に比較して、YP 群あるいは EYP 群では血清中 OVA 特異的 IgE 抗体レベルの低下が観察された。また、肺胞洗浄液中の IL-5（好酸球遊走および活性化因子）濃度や好酸球数は YP 群あるいは EYP 群で減少傾向にあった。肺胞洗浄液中の IL-10 濃度（抗炎症性サイトカイン）は EYP 群で顕著に増加していた。ペクチナーゼ処理したユズ果皮サンプルにはペクチン由来オリゴ糖が含有されていると考えられる。以上の結果からユズ果皮ペクチン由来オリゴ糖が抗アレルギー作用を持つポテンシャルが示唆された。

Evidence has suggested that pectin, a soluble dietary fiber highly contained in peel of fruits, and its derived oligosaccharides exhibit anti-inflammation and anti-allergy effect. The aim of this study was to assess anti-allergy effect of peer from yuzu (*citrus junos*) and its pectinase-treated sample using a murine model of pollinosis. BALB/c mice were fed with (i) AIN93M standard diet (control group), (ii) pectinase-untreated yuzu peer contained diet (YP group), and (iii) enzyme-treated yuzu peer contained diet (EYP group). One week after the start of test diets, allergic airway inflammation was induced by peritoneal sensitization and intranasal challenges with ovalbumin (OVA), a model allergen. The levels of serum OVA-specific IgE antibody were reduced in YP and EYP groups, compared to control group. The concentrations of IL-5 (eosinophil chemoattracting and activation cytokine) and the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) tended to decrease in YP and EYP groups, whereas the concentrations of IL-10 in the BALF was significantly increased in EYP group. Pectinase-derived yuzu peel contains pectin-derived oligosaccharides. Our results suggested that oligosaccharides derived from yuzu peel pectin are functional components to exsert an antiallergic effect.

anti-allergy, yuzu, pectin

発表責任者：戸田雅子（masako.toda.a7@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4G05-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

紅藻カイガラアマノリに含まれる sulfoquinovosyl diacylglycerol の抗アレルギー効果
The anti-allergic effect of sulfoquinovosyl diacylglycerol from a red alga, *Neopyropia tenuipedalis*
○杉浦 義正[1]、柴田 敏行[2]、阿部 真比古[1]、村瀬 昇[1] ([1]水産機構水大校、[2]三重大院・三重大海藻バイオ研)
○Yoshimasa SUGIURA[1], Toshiyuki Shibata[2], Mahiko Abe[1], Noboru Murase[1] ([1]Natl Fish Univ, [2]Mie Univ)

【目的】紅藻カイガラアマノリは山口県の特産物である。これまでの研究で、クロロホルム／メタノール（C/M）抽出物に含まれる糖脂質（sulfoquinovosyl diacylglycerol（SQDG））に抗アレルギー性の可能性を見出した。本研究では、SQDG の抗アレルギー性評価と、構成脂肪酸の分析を行った。
【方法】C/M 抽出によって乾燥微粉末から脂溶性画分を回収し、薄層クロマトグラフィーで SQDG を調製した。抗アレルギー性評価は、ICR マウス（オス、4 週齢）における耳介浮腫抑制試験（経皮および経口投与）や RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制試験、アレルギー性炎症関連酵素の活性阻害の確認によった。また、ガスクロマトグラフィーを用いて、脂肪酸組成の分析を行った。
【結果】乾燥微粉末から得られた SQDG は、マウス耳介浮腫に対して、経皮および経口投与いずれの場合でも抑制を示した。また、炎症関連酵素の活性に対する阻害と RBL 細胞に対する脱顆粒抑制もみられた。脂肪酸分析の結果、パルミチン酸が 95%を占めていることが分かり、現在、質量分析により分子量を確認中である。

A red alga, *Neopyropia tenuipedalis* is a special local product in Yamaguchi Prefecture. In previous study, we found a probability for anti-allergic effect of sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) in the algal chloroform/methanol (C/M) extract. In present study, the anti-allergic effect of SQDG was evaluated, and the composition of fatty acid was analyzed.

SQDG was prepared from the C/M extract using thin layer chromatography. The eanti-allergic effect of SQDG was examined using mouse (ICR strain) ear swelling test, inhibition test of inflammation-related enzymatic activities, and anti-degranulation test in RBL-2H3 cells. The fatty acid composition was analyzed using gas chromatography (GC).

The obtained SQDG showed a suppression of mouse ear swelling, an inhibition of the enzymatic activities, and an anti-degranulation. From GC analysis, palmitic acid occupied 95% of the binding fatty acids. Currently, mass spectrum analysis is in progress.

Neopyropia tenuipedalis, sulfoquinovosyl diacylglycerol, antiallergy

発表責任者：杉浦 義正（ysugiura@fish-u.ac.jp）

講演番号：4G05-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

香料ライブラリーから得られた Salicylaldehyde の免疫調節機能

Immunomodulatory function of salicylaldehyde from aroma compounds library

○芦刈 翼、松原 宏樹、長田 和樹、八須 匡和、西山 千春（東理大先進工）
○TSUBASA ASHIKARI, HIROKI MATSUBARA, KAZUKI NAGATA, MASAKAZU HACHISU, CHIHARU NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

植物由来フィトケミカルの例にあるように、香気を発する化合物は摂取したヒトや動物の生体恒常性維持にしばしば有益な作用を示す。我々は、世界的に数千種類存在する香料化合物に着目し、免疫調節物質の探索に取り組んできた。構造的特徴から選抜した約 100 種類の香料化合物を対象に、マスト細胞の IgE 依存的な脱顆粒反応抑制作用を指標とし 6 種類の候補化合物を選抜するに至った。本研究では、これら候補化合物の 1 つ、サリチルアルデヒド(SA)について、細胞、個体レベルでの解析を行なった。SA は、細胞毒性を示さない濃度でマウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)の IgE 依存的な脱顆粒反応に加え、炎症性サイトカインの発現誘導も抑制すること、その一因として IgE 受容体 FcεRI の細胞表面発現抑制を引き起こすことが確認された。続いて、骨髄由来樹状細胞(BMDC)に対する作用を調べたところ、SA はリポ多糖(LPS)誘導性の炎症性サイトカイン発現や抗原提示関連分子発現上昇を抑制することが判明した。更に抗原提示依存性に誘導される T 細胞分化誘導や IL-2 分泌に対しても SA が抑制効果を発揮することが示された。最後に、生体への SA の効果検証としてマウス受動的アナフィラキシーモデルへの影響を解析した結果、全身性症状である急激な体温低下や、局所反応である耳介や足の腫れが SA 投与によって早期に回復、あるいは有意に緩和されることが明らかとなった。以上より、SA が免疫応答や関連疾患を制御し得ることが示された。

Aroma compounds often exhibit beneficial effects on biological homeostasis in humans and animals as known as plant-derived phytochemicals. To identify novel immunomodulators, we performed a screening and selected six candidate compounds, which inhibit IgE-dependent degranulation of mast cells, from approximating 100 aroma compounds. In the current study, we analyzed the effects of salicylaldehyde (SA) on immune responses *in vitro* and *in vivo*. First, we found that SA suppressed the IgE-induced inflammatory cytokine expressions of MCs as well as the IgE-dependent degranulation. A flow cytometric analysis revealed the surface expression level of FcεRI on MCs was reduced in the presence of SA. SA also inhibited the LPS-induced inflammatory cytokine production of dendritic cells, and the antigen mediated T cell differentiation and subsequent IL-2 release. Finally, we evaluated the biological significance of SA by using passive anaphylaxis model. The drop of body temperature and the swelling of ear and footpad, which were induced in an IgE-dependent manner as systemic and locality, respectively, were significantly reduced by intraperitoneal administration of SA. Taken together, we conclude that SA ameliorates immune-related diseases by suppressing activation of MCs and DCs.

Fragrance, Mast cell, Allergy

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4G05-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

中国産食用茸ツブイボダケ（*Thelphora vialis*）含有 vialinin A の RBL-2H3 細胞における TNF-α産生阻害活性メカニズムの解析

Analysis of the inhibitory mechanism of vialinin A on TNF-α production in RBL-2H3 cells

○横田 翔太[1]、小野瀬 淳一[1,2]、菅谷 紘一[1,2]、阿部 尚樹[1,2] ([1]東農大院・健康、[2]東農大・応生・健康)
○Shota YOKOTA[1], Jun-ichi ONOSE[1,2], Kouichi SUGAYA[1,2], Naoki ABE[1,2] ([1]Dept. of Nutri. Sci & Food Safety, Grad. Sch. of Applied Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Faculty of Applied Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】当研究室では、これまでに中国産ツブイボダケ（*Thelphora vialis*）より新規物質として単離・構造決定した vialinin A が、抗原刺激ラット好塩基球系細胞 RBL-2H3 細胞において、TNF-α分泌を強力に抑制することを明らかにした。さらに分子プローブを用いた探索研究により vialinin A が脱ユビキチン化酵素 USP5 を細胞内標的分子としていること及び、USP5 をノックダウンした RBL-2H3 細胞では、TNF-α発現量が有意に低下するということを明らかとした。そこで本研究では抗原刺激 RBL-2H3 細胞における vialinin A による USP5 活性阻害が、TNF-α産生メカニズムに及ぼす影響について検討することを目的とした。
【方法】RBL-2H3 細胞に対して 10 μM vialinin A ならびに任意の試薬を処理してから抗原刺激を行った。得られた Cell lysate をウェスタンブロット・共免疫沈降等の試験に供した。
【結果・考察】Vialinin A 処理を行った抗原刺激 RBL-2H3 細胞において、炎症反応に伴う TNF-α産生に関与する転写因子 NF-κB 活性化の抑制因子である IκBα のリン酸化、分解の抑制が認められた。
さらに共免疫沈降による検討により、vialinin A 処理により IκBα のプロテアソーム分解の目印となる K48 型ユビキチン修飾抑制が認められた。また炎症時に IκBα のプロテアソーム分解に至るシグナル伝達経路で働く TRAF6 の不安定化が vialinin A 処理により促進されていることが示唆された。
以上の結果から vialinin A は USP5 阻害を介して TRAF6 を不安定化し、抗原刺激に伴う TNF-α産生を抑制していることが示唆された。

Vialinin A, isolated from a Chinese edible mushroom *Thelephora vialis,* has inhibited TNF-α secretion from the RBL-2H3 cells sensitized by antigen. Furthermore, USP5 has been identified as an intramolecular target of vialinin A. A significant decrease in TNF-α production has been observed in USP5 knockdown RBL-2H3 cells. The purpose of this study is to clarify the mechanism of vialinin A on TNF-α production.
As a result, the proteasomal degradation of IκBα associated with K48 ubiquitination was suppressed in sensitized RBL-2H3 cells treated with vialinin A. In addition, it has been suggested that TRAF6, which acts in signaling pathway leading to K48 ubiquitination of IκBα, was destabilized by vialinin A treatment. These results suggest that vialinin A destabilizes TRAF6 via USP5 inhibition and suppresses TNF-α production though antigen stimulation.

TNF-α, TRAF6, NF-κB

発表責任者：横田 翔太（10720016@nodai.ac.jp）

講演番号：4G05-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

STAT5 転写活性を抑制する抗炎症性食品成分の探索・解析

Search and analysis of anti-inflammatory food ingredients that suppress STAT5 transcriptional activity

○石流 愛梨[1]、薩 秀夫[2] ([1]前橋工大院工、[2]前橋工大工)
○Airi ISHIGORI[1], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. Of Eng., Maebashi Inst. of Technol, [2]Maebashi Inst. of Technol)

【目的】近年、アトピー性皮膚患者数は増加傾向にあるが、薬剤塗布や保湿といった手間のかかる現在の治療法、治療費の負担などで QOL が低下しやすいといった点が問題となっている。また、炎症性サイトカイン産生に関わる Janus kinase(JAK)カスケードを阻害することで炎症を抑制する JAK 阻害薬が近年注目されている。本研究では、日常的に摂取する食品の中からアトピー性皮膚炎の症状緩和に有効な成分を探索することを目的とした。JAK 下流に位置する転写因子である Signal Transducer and Activator of Transcription(STAT)ファミリーの中でも特に STAT5 に注目し、動物培養細胞を用いた STAT5 転写活性を安定に測定する評価系を構築するとともに、実際に STAT5 転写活性を抑制する食品成分を探索・解析した。
【方法・結果】STAT5 応答配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に持つレポーターベクターを HEK293 細胞に安定に遺伝子導入した。薬剤選抜後にシングルクローンの単離を行い、約 70 個のうち STAT5 依存的転写活性を亢進する IFN-β に対する応答性が高く、増殖速度も速かった 1B9 株を STAT5 転写活性安定評価系に用いることとした。この系を用いて様々な食品成分のスクリーニングをおこなったところ、Apigenin や Ginkgolide B が STAT5 転写活性を抑制することが見出された。

[Objectives] In recent years, the number of patients with atopic dermatitis has been on the rise, but there is a problem that the QOL tends to decrease due to the time-consuming current treatment methods such as drug application and moisturizing. We focused on the Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) family, especially STAT5, which are involved in the inflammation. We constructed an evaluation system that stably assess STAT5 transcriptional activity using culture cell line and also searched for and analyzed food ingredients that suppress STAT5 transcriptional activity.
[Methods and Results] A reporter vector with STAT5-responsive element upstream of the luciferase gene was stably transfected into HEK293 cells. After drug selection, about 70 single clones were isolated and the 1B9 strain was selected for further study. Using this assay system, we searched for food ingredients and found Apigenin and Ginkgolide B suppressed STAT5 transcriptional activity.

Stat5, Atopic dermatitis, Phytochemical

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4G05-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

食物アレルギー性腸炎併発骨量減少における IL-4 の役割の解析

Roles of IL-4 in developing bone loss associated with food allergic enteropathy

○玉井 雅人[1]、宇野 智[1]、山田 悟生[1]、中村 翔太郎[1]、曽我 皓平[1]、中道 裕子[2]、小出 雅則[2]、高野 智弘[1]、宇多川 信之[2]、清野 宏[3,4,5]、八村 敏志[1]、足立(中嶋) はるよ[1] ([1]東大農、[2]松本歯科大、[3]東大医、[4]千葉大医、[5]カリフォルニア大医)

○MASATO TAMAI[1], SATOSHI UNO[1], SATOKI YAMADA[1], SHOTARO NAKAMURA[1], KOHEI SOGA[1], YUKO NAKAMICHI[2], MASANORI KOIDE[2], TOMOHIRO TAKANO[1], NOBUYUKI UDAGAWA[2], HIROSHI KIYONO[3,4,5], SATOSHI HACHIMURA[1], HARUYO ADACHI(NAKAJIMA)[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Matsumoto Dental Univ., [3]Tokyo Univ. Med., [4]Chiba Univ., [5]California Univ.)

骨粗鬆症の中には炎症性腸炎を併発するものがあるが、その発症機構は不明な部分が多い。本研究で用いた食物アレルギー性小腸炎モデルマウス OVA23-3 は卵白アルブミン(OVA)特異的な T 細胞受容体(TCR)遺伝子組換えマウスであり、卵白(EW)食の自由摂取により腸炎に併発して骨量減少が引き起こされる。この炎症モデルの腸炎発症には、IL-4 を産生する OVA 特異的な T 細胞の存在が必須である。腸炎発症時には骨髄(BM)においても IL-4 の mRNA 発現量の上昇が観察されているが、IL-4 は破骨細胞の分化を抑制するサイトカインであり骨量減少における IL-4 の役割は不明である。そこで本モデルにおいて IL-4 の役割を評価する目的で、抗 IL-4 抗体の投与実験を行った。実験群は抗体の非投与群に対し炎症誘導前投与群、および慢性期移行後投与群を設定した。その結果、事前投与により炎症初期の骨量減少は非投与群に比べ緩和されたが、慢性期ではその効果は減少し、慢性期移行後投与群でも有意な回復は認められなかった。さらに、BM における IL-4 産生細胞を検討した結果、主な産生細胞は腸間膜リンパ節(MLN)と異なり CD4+T 細胞ではなかった。以上より、IL-4 は骨量減少に一定の機能を果たすが、慢性期には他の要因が寄与する可能性があり、IL-4 を中心に BM で形成される Th2 環境の形成機構は腸管と異なる可能性が示唆された。

Some types of osteoporosis are associated with allergies, but the mechanism is still unclear. The food allergy model mouse OVA 23-3 is a transgenic mouse with an OVA-specific TCR, and the EW diet causes bone loss in conjunction with intestinal inflammation. In this model, the presence of OVA-specific T cells producing IL-4 is essential, and IL-4 mRNA expression is elevated in BM. However, IL-4 is a cytokine that inhibits osteoclast differentiation, and the role of IL-4 in bone loss is unknown. To evaluate the role of IL-4 in inflammation-induced bone loss, we administered anti-IL-4 antibody at several different time points. The results showed that pre-administration of the antibody alleviated bone loss in the early stage of inflammation compared to the non-administered group, but the suppression of bone loss was attenuated in the chronic stage, and no significant recovery was observed in the group administered after the transition to the chronic stage. Furthermore, we found that $CD4^+$ T cells, which are the main producers of IL-4 in the MLN, did not produce IL-4 in the BM. These results suggest that IL-4 plays a certain function in bone loss, but the IL-4 related Th2 environment formed in the BM may be different from that in the intestine.

food allergic intestinal inflammation, osteoporosis, IL-4

講演番号：4G05-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

細胞外小胞を介したデルフィニジンの抗炎症作用

Delphinidin exerts anti-inflammatory effects through extracellular vesicles

○竹内 陽奈子[1]、村田 希[1,2]、丸亀 裕貴[2]、藤村 由紀[2]、立花 宏文[2] ([1]愛媛大農、[2]九大院農院)
○ Hinako TAKEUCHI[1], Motoki MURATA[1,2], Yuki MARUGAME[2], Yoshinori FUJIMURA[2], Hirofumi TACHIBANA[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kyushu Univ.)

アントシアニジンの一種であるデルフィニジンは、抗炎症作用や抗がん作用など様々な生理作用を有することが報告されている。当研究室では、デルフィニジンが難吸収性であるにも関わらず、骨格筋においてマイクロ RNA の発現を上昇させることを見出している。一方、細胞外小胞（EVs）はマイクロ RNA やタンパク質などを内包し、細胞間コミュニケーションを担うことが報告されている。本研究は、デルフィニジンの生体調節作用と EVs の関係について明らかにすることを目的とし、デルフィニジンが細胞間コミュニケーションに与える影響を検討した。

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 の培養上清を超遠心分離することで EVs を回収した。デルフィニジン処理した RAW264.7 細胞から回収した EVs を LPS 処理した RAW264.7 細胞に添加した結果、IL-6 の mRNA 発現が抑制された。この結果より、デルフィニジンが直接細胞に作用して抗炎症作用を発揮するだけでなく、EVs を介して間接的に炎症を抑制する可能性が示された。そこで、デルフィニジンが EVs 中のマイクロ RNA 発現量に与える影響を評価した結果、デルフィニジン処理した RAW264.7 細胞から回収した EVs 中においてマイクロ RNA の発現が変化した。以上より、デルフィニジンは EVs に内包されるマイクロ RNA を変化させることにより細胞間の情報伝達に影響を与え、生体調節作用を発揮することが示唆された。

Delphinidin, a type of anthocyanidin, is known to have various beneficial effects. We previously revealed that delphinidin regulates microRNA (miRNA) expression in mouse skeletal muscle. Extracellular vesicles (EVs) are recognized as novel tools for intercellular communications and carry various functional biomolecules including miRNAs. The purpose of this study was to elucidate whether delphinidin affects cell-to-cell communication via EVs. EVs released from delphinidin-treated RAW264.7 cells suppressed IL-6 mRNA expression in LPS-treated RAW 264.7 cells. Delphinidin changed the expression of miRNA contained in EVs released from RAW264.7 cells. These results suggest that delphinidin regulates miRNAs expression contained in EVs and EVs are involved in the biological function of delphinidin.

Delphinidin, Extracellular vesicles, microRNA

講演番号：4G05-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

ブルーベリー葉を基軸とした機能性フードペアリングによる抗炎症作用評価

Evaluation of anti-inflammatory synergistic effect by functional food pairing with blueberry leaf extract

○工藤 七海[1]、野崎 雅彦[2]、廣澤 直也[2]、湯浅 友識[3]、金井 祐基[3]、平川 良子[3]、山﨑 正夫[4]、山﨑 有美[1] ([1]宮大地域、[2]SUNAO 製薬、[3]宮食開セ、[4]宮大農)
○Nanami KUDO[1], Masahiko NOZAKI[2], Naoya HIROZAWA[2], Tomonori YUASA[3], Yuki KANAI[3], Yoshiko HIRAKAWA[3], Masao YAMASAKI[4], Yumi YAMASAKI[1] ([1]Univ. Miyazaki, Reg., [2]SUNAO Ph, [3]MFDC, [4]Univ. Miyazaki, Agr.)

【緒言】

慢性炎症は、肥満やがんなどの生活習慣病に大きく関わっていることが明らかとなっており、食での慢性炎症抑制が期待されている。宮崎県の地域素材であるブルーベリー葉は、リポ多糖(LPS)誘導性マクロファージの一酸化窒素（ＮＯ）産生を抑制する抗炎症作用が認められている。一方近年、食べ物や飲み物を組み合わせることによって嗜好性や機能性が向上させることができる機能性フードペアリングという知見がある。本研究では、BLEx (Blueberry Leaf Extract)と他の食品素材由来の抽出物を組み合わせることによる炎症抑制増強作用について評価した。

【方法・結果】

食品抽出物は、各食品素材を乾燥・粉砕後、95℃、35 分で熱水抽出後の凍結乾燥粉末をリン酸緩衝液に溶解させ調整した。抗炎症作用は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用い、LPS で炎症を誘導したのち食品抽出物を処理し、NO の産生量を測定することにより評価した。BLEx と食品素材 25 種類の掛け合わせ試験を実施した結果、ショウガ、ラフマ、セントジョージズワートの 3 種類の食品においてＮＯ産生抑制作用が認められた。

【Introduction】

Chronic inflammation has been shown to play a major role in lifestyle-related diseases such as obesity and cancer, and it is expected that chronic inflammation can be improved through diet. Blueberry leaves, a regional material from Miyazaki Prefecture, have been shown to have anti-inflammatory effect by suppressing lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in macrophages. On the other hand, in recent years, the concept of functional food pairing has been proposed, in which the preference and functionality can be improved by combining foods. In the present study, we evaluated the anti-inflammatory enhancement effect of combining BLEx (Blueberry Leaf Extract) with extracts derived from other food materials.

Blueberry leaf, RAW 264.7, anti-inflammatory synergistic effect

発表責任者：山崎有美（yamasakiy@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4G05-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

Anti-inflammatory properties of indole compounds in fermented rice bran

○Afifah Zahra Agista[1], Yusuke Ohsaki[1], Takuya Koseki[2], Michio Komai[1], Hitoshi Shirakawa[1]
([1]Grad. Sch. Agri. Sci, Tohoku Univ., [2]Fac. Agri., Yamagata Univ.)

【Introduction】: Rice bran which was fermented by *Aspergillus kawachii* and a mixture of lactic acid bacteria (FRB) was found to be able to alleviate dextran sodium sulfate-induced inflammation in mice intestine. Yet, it is still unknown which of FRB's bioactive compounds is responsible for this anti-inflammatory effect. This research aimed to uncover this bioactive compound and its mechanism of action by using macrophages as a miniature model.
【Methods】: FRB was separated into different fractions with a series of extraction processes. The first stage of extraction was conducted with solvent-based extraction, followed by solid-phase extraction. The produced fractions were screened for their anti-inflammatory activity by using RAW 264.7 cells which were activated with lipopolysaccharide (LPS). Reverse phase HPLC analysis was used to determine the content of FRB fractions.
【Results】: Based on this screening process, we concluded that FRB fractions E (FRBE) has prominent anti-inflammatory properties. HPLC analysis showed that FRBE was rich in tryptophan and tryptamine. Tryptamine was also revealed to have an *Il-6* mRNA suppressing effect in LPS-induced RAW 264.7 cells. Furthermore, FRBE and tryptamine were able to ameliorate the expression of LPS-induced *Il-6* in intraperitoneal macrophage from wild type, but not Ahr deficient mice. Therefore, tryptamine in FRB was potentially able to suppress the LPS-induced inflammatory response in cells by modulating Ahr activity.

Fermented rice bran, Macrophages, Tryptamine

講演番号：4G05-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

微細藻類 *Botryococcus terribilis* 抽出物を用いた抗炎症効果に関する研究
Study on the anti-inflammatory effect of microalgae *Botryococcus terribilis* extracts

○山本 星里[1]、高橋 真哉[1]、フェルドウシ ファラハナ[1]、チャン ゴック リン[2]、有村 隆志[2]、打上 恵理子[2]、平野 篤[3]、額賀 佐知子[3]、野崎 広之[3]、富永 健一[2]、礒田 博子[1,2]（[1]筑波大・環境科学、[2]産総研・食薬資源 OIL、[3]東京電力 HD）
○Seri YAMAMOTO[1], Shinya TAKAHASHI[1], Farhana Ferdousi[1], Linh Tran Ngoc[2], Takashi ARIMURA[2], Eriko UCHIAGE[2], Atsushi HIRANO[3], Sachiko NUKAGA[3], Hiroyuki NOZAKI[3], Kenichi TOMINAGA[2], Hiroko ISODA[1,2] ([1]Univ.Tsukuba, [2]AIST FoodMed-OIL, [3]TEPCO)

本研究では、新たな微細藻類含有成分の薬理効果を見出すため、淡水緑色微細藻類の一種である *Botryococcus* 属含有成分に着目した。具体的には、ボトリオコッカスエタノール抽出物の抗炎症効果を確認し、抑制メカニズムを明らかにすることを目的とし研究を行った。凍結乾燥させたボトリオコッカス藻体に対して 10 倍量（w/v）の 70%エタノールを処理し抽出をおこなった。これをボトリオコッカスエタノール抽出物（BT-EE）とした。マウスマクロファージ様細胞（RAW264 細胞）で毒性が見られない濃度において、BT-EE 処理を行い、LPS を添加して炎症を惹起し、培養細胞における一酸化炭素（NO）産生量の定量を行った。さらに、６種の炎症関連遺伝子と５種の抗炎症関連遺伝子の発現変動について評価した。その結果、LPS による NO 産生の濃度依存的な減少が確認され、BT-EE の抗炎症効果が認められた。そして、BT-EE による遺伝子発現について解析を行った結果、ケモカインやインターロイキン、NO 産生関連遺伝子等の炎症関連遺伝子の発現量を抑制した。加えて、NF-κB 経路において抗炎症関連遺伝子（*PGC-1β*、*SOCS1*）の発現量の減少を抑制した。このことから、ボトリオコッカス含有成分が、NF-κB シグナル経路に作用し、炎症性関連遺伝子の発現を抑制することで、抗炎症効果を示す可能性が考えられた。

In this study, to find new pharmacological effects of microalgal compounds, we focused on the components of *Botryococcus*. Therefore, we studied on the anti-inflammatory effect of *Botryococcus terribilis* to clarify the inhibitory mechanism. We obtained the *Botryococcus* ethanol extract (BT-EE) and then used at concentrations that did not show toxicity. To observe the anti-inflammatory effects of BT-EE on mouse RAW264 cells, we quantified the lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in the BT-EE treated RAW264 cells. We also evaluated the expression of six inflammation-related genes and five anti-inflammation-related genes. In the BT-EE treated cells, LPS-induced NO production was significantly reduced in a dose-dependent manner, indicating the anti-inflammatory effect of BT-EE. Gene expression analysis showed that the BT-EE treatments suppressed the expression of inflammation-related genes such as chemokines, interleukins, and NO production-related genes. Also, the BT-EE treatment suppressed the decrease in the expression of anti-inflammatory genes (*PGC-1β* and *SOCS1*) in the NF-κB pathway. These results suggest that components contained in *Botryococcus terribilis* may exert their anti-inflammatory effects by acting on the NF-κB signaling pathway and suppressing the expression of inflammatory-related genes.

microalgae, anti inflammatory, RAW264 cell

講演番号：4G05-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム G

DHA 代謝産物レゾルビン D4 の抗炎症作用

An anti-inflammatory effect of RvD4, which is the metabolite of DHA, on macrophages

○富田 沙織[1]、近澤 未歩[2]、湊 健一郎[2] ([1]名城大院・農、[2]名城大・農)
○Saori TOMITA[1], Miho CHIKAZAWA[2], Kenichiro MINATO[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meijo Univ., [2]Faculty of Agriculture, Meijo Univ.)

【背景と目的】炎症性腸疾患（IBD）はその発症原因が不明であり，患者数は約 30 万人とされる。これらは完治せず寛解と再発を繰り返すため，炎症を抑えて寛解期を維持することが重要である。食品中機能性成分である DHA は，摂取後に体内でレゾルビン（Rv）などに代謝されて強力な炎症抑制作用を持つ。我々は，RvD4 の作用に注目して，その抗炎症効果について検討した。

【結果と考察】THP-1 細胞をマクロファージへ分化させた後，RvD4 を 1，5，10nM の濃度で各々添加した。その後 LPS 刺激によって生じた TNF-α 濃度を ELISA 法にて測定した。その結果，RvD4（5，10nM）は有意に TNF-α 産生を減少させ，炎症抑制作用を示した。次に作用機作の検証として，レゾルビンレセプターである GPR18 選択的アンタゴニスト（PSB-CB5），GPR18/55 アンタゴニスト（O-1918），および FPR2/ALX アンタゴニスト（WRW4）を使用して TNF-α 産生への影響を調査した。RvD4 添加 30 分前に上記アンタゴニストを添加し，LPS で刺激した後に TNF-α 遺伝子発現量を RT-PCR で測定した。その結果，PSB-CB5 と O-1918 添加において TNF-α 抑制作用が弱まり，その作用は O-1918 においてより顕著であった。また O-1918 と WRW4 の共添加では O-1918 単独添加と同様の作用を示した。以上の結果より，RvD4 の抗炎症効果が新たに示唆され，その作用機作として，アンタゴニストを用いた実験結果から，RvD4 は GPR18 と GPR55 を介し，FPR2/ALX は介さないシグナル伝達経路の関与が示唆された。

Inflammatory bowel disease（IBD）is a chronic inflammatory state in the intestinal tract. The number of patients with IBD has increased rapidly in recent decades. In this study, we have determined an anti-inflammatory effect of Resolvin D4（RvD4）, which is a metabolite of DHA, to inhibit a development of IBD. Regarding the anti-inflammatory effect of RvD4, it was suggested that the metabolite（at 5 and 10nM）could inhibit a secretion of TNF from the macrophages in which an inflammation was induced by LPS stimulation. We also have studied the mechanism which that effect was ongoing. We used some antagonists, PSB-CB5 for GPR18 which is a Rv receptor, O-1918 for GPR18/55, and WRW4 for FPR2/ALX to examine a signaling pathway of anti-inflammation inside of the cells. In the current study,it is suggested that the anti-inflammatory effect of RvD4 could be caused by a stimulation of the signaling through GPR18/55. We are also studying an inhibition effect of RvD4 on IBD by using the mice model with DSS-induced colitis.

Resolvin D4, anti-inflammatory effect, IBD

講演番号：4G06-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

トウモロコシの味噌様発酵による抗酸化活性増強効果

Enhancement of Antioxidant Activity by Miso-like Fermentation of Corn

○安彦 裕実、小田桐 望亜、津久井 隆行（札保医大）
○Hiromi Abiko, Noa Odagiri, Takayuki Tsukui (Sapporo Univ of Health Sci.)

世界３大穀類の一つであるトウモロコシは、大豆同様にポリフェノールを含むことから発酵（味噌様発酵）による機能性の増強が期待できる。本研究では、３種のトウモロコシ（フリント種１種、スイート種２種）を味噌様発酵させ、発酵中の一般生菌数および色差の変化を評価した。また、抗酸化活性の指標として総ポリフェノール含量および DPPH ラジカル消去能を測定した。

３種のトウモロコシいずれにおいても、発酵に伴う一般生菌数の消長および色差の変化が認められた。次に、総ポリフェノール量を測定したところ、３種とも発酵に伴い総ポリフェノール量の増加が見られたが、品種間差は認められなかった。一方、DPPH ラジカル消去能を測定したところ、発酵に伴う増加および品種間差が認められた。特に、フリント種が最も強いラジカル消去活性を示した。

上記の結果から、トウモロコシは味噌様発酵により抗酸化活性が増強されることが明らかとなった。また、発酵により生成されるポリフェノール類の組成に品種間差が見られることが推察された。

Corn, which is well known as one of the world’s three largest cereals, contains polyphenols like soybean, so it can be expected to enhance bioavailability and biological activity by fermentation (miso-like fermentation). In this study, three species of corn (one flint and two sweet species) were fermented in a miso-like manner, and the general viable bacterial count and change in color difference during fermentation were observed. In addition, the total polyphenol and DPPH radical scavenging activity were measured to investigate the antioxidant activity.

In common with three types of corns, the disappearance of general viable bacterial count and change in color difference were observed with fermentation. The total polyphenol content was significantly increased with fermentation in all three corns, but there was no difference among the species. In DPPH radical scavenging activity as well, it was shown an increasing tendency with fermentation. Especially, the flint species showed the strongest DPPH radical scavenging activity.

In conclusion, it was suggested that the antioxidant activity of corn polyphenols was enhanced by miso-like fermentation. And it seemed that there were differences in the composition of polyphenols produced by fermentation among species.

antioxidant activity, polyphenol, fermented corn

講演番号：4G06-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

オニグルミとペルシャグルミの脂肪酸組成および酸化安定性の比較

Comparative evaluation of fatty acid composition and oxidative stability of walnut oil between *Juglans mandshurica* Maxim. var. *sachalinensis* (Komatsu) Kitam and *J. regia* L.

○桐明 絢[1]、高田 大輔[2]、則藤 孝志[2]、牧 雅康[2]、望月 翔太[2]、吉永 和明[2]([1]秋田大院・理工、[2]福島大農)
○Aya KIRIAKE[1], Daisuke TAKATA[2], Takashi NORITO[2], Masayasu MAKI[2], Shota MOCHIZUKI[2], Kazuaki YOSHINAGA[2] ([1]Akita Univ., [2]Fukushima Univ.)

クルミの種子は脂質が多く含まれ、特にα-リノレン酸が豊富である。日本で流通しているのは外国産のペルシャグルミ（*Juglans regia* L.）であり、栄養成分など多くの報告がある。しかし、日本固有種であるオニグルミ（*J. mandshurica* Maxim. var. *sachalinensis* (Komatsu) Kitam）に関する知見は乏しい。そこで、本研究では、オニグルミとペルシャグルミそれぞれの種子からオイルを抽出し、脂肪酸組成およびトリアシルグリセロール (TAG) の *sn*-2 位に結合している脂肪酸の種類を GC-FID で定量し、比較した。また、クルミオイルを 60℃で 6 または 12 日間暗所で静置して酸化させ、過酸化物価（PV)、カルボニル価（CV)、トコフェロール含量、香気成分分析を指標に、酸化安定性を比較した。その結果、リノール酸の含量はオニグルミの方が多く、α-リノレン酸はペルシャグルミの方が多く含まれていた。また、どちらのクルミにおいても、TAG の *sn*-2 位にはリノール酸が、*sn*-1,3 位にはα-リノレン酸が結合していた。さらに、オニグルミは、γ-トコフェロール含量がペルシャグルミの約 2 倍で、PV、CV、香気成分分析からも酸化安定性に優れることが分かった。よって、オニグルミは、γ-トコフェロールを豊富に含む抗酸化性に優れた食品であることが明らかとなった。

Juglans regia L. is one of the most popular walnuts all over the world, and it has well been investigated its function and nutrition. However, fatty acid composition, regiospecific distribution of fatty acids and oxidative stability in oils of *J. mandshurica* Maxim. var. *sachalinensis* (Komatsu) Kitam, which is endemic to Japan, are not well understood. This study investigated the fatty acid composition and regiospecific distribution of triacylglycerol (TAG) in two walnuts (*J. mandshurica* var. *sachalinensis* and *J. regia* L.). To compared oxidative stability between the walnut oils, we also measured the peroxide value, carbonyl value, tocopherol content and volatile compounds. *J. mandshurica* var. *sachalinensis* oil exhibited higher contents of linoleic acid and γ-tocopherol and lower contents of α-linolenic acid than *J. regia* L oil. Linoleic acid was selectively esterified at the *sn*-2 position and α-linolenic acid was selectively esterified at the *sn*-1,3 position of TAG in both oils. Furthermore, *J. mandshurica* var. *sachalinensis* oil was less oxidized than *J. regia* L. oil. It is assumed that abundant γ-tocopherols play a key role in antioxidative activity of *J. mandshurica* var. *sachalinensis* oil. Our study suggests that *J. mandshurica* var. *sachalinensis* oil has remarkable ability to inhibit oxidation and may improve quality of life.

walnut oil, oxidative stability, fatty acid

発表責任者：吉永　和明（kyoshinaga@agri.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：4G06-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

キノン構造を有する機能性化合物の抗酸化作用とプロオキシダント効果

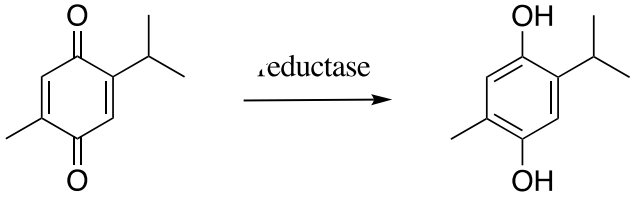
Antioxidant and prooxidant effect of thymoquinone and its hydroquinone metabolite

○水野 美麗、福原 潔 (昭和大薬)
○Mirei MIZUNO, Kiyoshi FUKUHARA (Showa Univ.)

目的：キノン構造を有する化合物は、生体高分子に付加して毒性を示すことが知られている。アセトアミノフェンの酸化代謝物でキノンイミン構造を持つ NAPQI が一例であり、過量服用による肝障害への関与が報告されている。一方、*p*-キノン構造を有するユビキノンやチモキノン(TQ)は、サプリメントやスーパーフードとして市場に多く流通している。我々は、これら化合物が有効性を示す一方で生体内の条件次第では毒性を示すと考えた。本研究では、天然抗酸化物質で多様な活性を示す TQ に着目し、抗酸化活性の視点から TQ の作用を化学的に解明した。

方法・結果・考察： TQ は生体内での還元反応により THQ が産生され、これが抗酸化活性の活性本体だと予想される。はじめに、TQ および THQ の活性酸素消去能を ESR を用いて評価した。その結果、TQ のラジカル消去活性は非常に弱く THQ の方が強力であった。次に、微量金属と化合物の相互作用による DNA への酸化的傷害をアガロースゲル電気泳動法により確認した。その結果、THQ は Cu^{2+}存在下で DNA 損傷が増強した。TQ が生体内還元酵素によって代謝された THQ は抗酸化活性を示すが、微量金属が存在すると DNA への酸化的障害を引き起こすことが明らかになった。

Thymoquinone is one of the antioxidants, but it is reported recently that it shows prooxidant effect. We hypothesized that not only thymoquinone (TQ) but also thymoquinone reductant (THQ) are contributed to these abilities. We evaluated antioxidant and prooxidant effect by agarose gel cataphoresis and ESR measurement. It is demonstrated that THQ shows much potent antioxidant and prooxidant activities than TQ.



otent antioxidant activity than TQ?

quinone, antioxidants, prooxidant

発表責任者：水野　美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

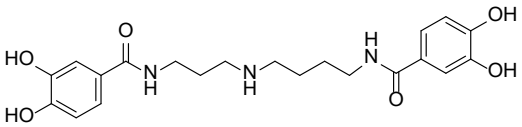
講演番号：4G06-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

ホウキタケ（*Ramaria botrytis*）に含有される pistillarin の抗酸化活性評価及び塩蔵ホウキタケ中に含有される pistillarin B の発見

Antioxidant activities of pistillarin in *Ramaria botrytis* and discovery of pistillarin B in salted *Ramaria botrytis*.

○酒見 裕香、中西 晴菜、荒木 悠梨香、新藤 一敏（日女大・家政・食物）
○Yuka SAKEMI, Haruna NAKANISHI, Yurika ARAKI, Kazutoshi SHINDO (Japan Women's Univ.)

ラッパタケ（*Gomphaceae*）科の食用キノコであるホウキタケ（*Ramaria botritis*）はヨーロッパやアジアに広く分布し、その独特の食感や栄養豊富さから、特にアジア領域で好まれて利用されている。今回ラット脳脂質酸化抑制活性を指標に、幾つかの食用キノコの抗酸化活性をスクリーニングした結果、ホウキタケが優れた同活性を有することを見出した。先行研究で、ホウキタケの MeOH 抽出エキスは DPPH ラジカル消去活性を有することが報告されていたが、抗酸化活性を有する化合物が何かについては明らかになっていなかった。我々は活性物質の単離精製・構造決定を行い、活性物質を pistillarin と同定した。Pistillarin の各種ラジカル種活性酸素（$^1O_2$, ･OH, O_2^-）に対する消去活性試験を実施した結果、本物質は $^1O_2$, ･OH の消去活性を示さなかったが（IC_{50} ＞100 μM）、O_2^-の強い消去活性を示す（IC_{50} 17±0.98 μM）ことが初めて明らかとなった。さらにラット脳脂質過酸化脂質抑制試験で pistillarin は優れた脂質過酸化抑制活性を示し（IC_{50} 0.24±0.03 μM）、この作用が鉄イオンキレーターとしてとしての性質であることも明らかとなった。



Pistillarin

さらにホウキタケの塩蔵物中に pistiilarin の類縁化合物である新規化合物 pistillarin B が含まれていることも初めて明らかにしたので、この点についても報告する。

Ramaria botritis is a popular mushroom in Asia and Europe countries because it has characteristic crispy texture and rich nutrients. During the screening of antioxidant mushrooms using rat brain lipid oxidation inhibiting activity test, we found that *Ramaria botritis* shows potent antioxidant activity. In the previous study, DPPH radical scavenging activity of MeOH extract of this mushroom was reported, but the antioxidant compound has not been identified yet. Thus, we isolated the antioxidant compound and identified its structure by HR-ESIMS and NMR analyses as pistillarin. We investigated the antioxidant activity of pistillarin against some reactive oxygen species ($^1O_2$, •OH, O_2^-) and lipid peroxidation, and clarified that pistillarin does not possess scavenging activity against $^1O_2$ and •OH (IC_{50} >100 μM), while it showes potent scavenging activity against O_2^- (IC_{50} 17±0.98 μM). Further, pistillarin was proved to possess potent antioxidant activity against the rat brain lipid oxidation (IC_{50} 0.24±0.03 μM) by acting as an iron chelator.

Since we also found a pistillarin related new compound in salted *Ramaria botrytis*, we also report about the structural determination and lipid peroxidation-inhibiting activity of this compound.

pistillarin, antioxidants, siderophore

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：4G06-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

Ergothioneine の抗酸化メカニズムに関する研究
Studies on the antioxidant mechanism of Ergothioneine

○村木 美晴[1]、安藤 知佳[1]、大社 勇太[2]、三谷 茂樹[2]、森光 康次郎[1] ([1]お茶大、[2]香栄興業)
○Miharu MURAKI[1], Chika ANDO[1], Yuta OKOSO[2], Shigeki MITANI[2], Yasujiro MORIMITSU[1]
([1]Ochanomizu Univ., [2]Koei kogyo Co.,Ltd)

Ergothioneine (**EGT**)は水溶性のベタインで、抗酸化性、抗炎症性など様々な機能性を持つことが明らかになっている。当研究室のこれまでの研究より、EGT は酸化されて Hercynine (**HER**)に変化すること、HER はさらに酸化を受けて分解されることが明らかになった。



1 EGT **2 HER**

しかし、生体内でも同様のメカニズムで抗酸化性を発揮するのかについては明らかになっていない。

そこで、LPS 投与マウスにおける EGT の抗酸化メカニズムの解明を本研究の目的とした。まず、EGT を 2 週間与えたマウスに酸化ストレスとして LPS 刺激を与えた。その後、代謝チャンバーに移動させ、24 時間代謝物を集めた後に解剖を行なった。採取した臓器と代謝物は LC-MS による EGT・HER の定量と TBARS の測定に用いた。定量の結果、EGT 投与群ではコントロール群に比べて、臓器中に EGT、HER が有意に多く含まれていた。よって、EGT が生体内でも抗酸化性を発揮して HER に変化することが示唆された。現在、酸化ストレス指標として TBARS の測定を行なっている。

Ergothioneine (EGT), a thiohistidine betaine, is one of the most abundant antioxidants. Our previous studies have been showed that EGT is oxidized to Hercynine (HER), and HER is further oxidized *in vitro*. However, there are only a limited number of reports about the redox mechanism of EGT *in vivo*. Therefore, this study aimed to clarify the oxidation mechanism of EGT in mice.

First, ICR mice were administered diet with EGT (120 mg/100 g) or without for 14 days before LPS injection. After 24 h, mice were sacrificed for each quantification of EGT, HER or TBARS.

From the results of this research, EGT and HER were significantly higher in liver, kidney and the other organs of the EGT-treated group compared with the control group. It is suggested that EGT is oxidized to HER *in vivo*. For an index of the oxidative stress, the TBARS measurement is continuing sequentially.

Ergothioneine, antioxidant, oxidative stress

講演番号：4G06-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

モリンガの乾燥葉に含まれる AGEs 生成阻害活性物質の探索

Search of AGEs inhibitory active substances in *Moringa oleifera*

○松榮 美樹[1]、丸岡 克哉[2]、藤田 佳孝[3]、澤邊 昭義[1,2]（[1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]王子食品(株)）
○Miki MATSUE[1], Katsuya MARUOKA[2], Yoshitaka FUJITA[3], Akiyoshi SAWABE[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Kindai University, [2]Faculty of Agriculture, Kindai University, [3]Oji Foods Inc., Ltd.)

近年，豊かな食生活の中で動物性食品の摂取増加などの変食や過剰栄養摂取に加え，運動不足や過度のストレスなども手伝って，糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病が深刻さを増している．糖尿病患者は生体内でのメイラード反応が進行しやすい．メイラード反応とは糖と蛋白質が結合し，その後様々な反応を経て最終的に AGEs が生成する反応のことを言う．この AGEs が体内に蓄積することにより，動脈硬化や糖尿病合併症が引き起こされる．そこで，モリンガの乾燥葉に含まれる AGEs 生成阻害物質の探索を行った．

モリンガの乾燥葉パウダーを 70%メタノールで抽出し，得られた抽出物をヘキサン，ブタノールを用いて分配抽出を行った．ついでブタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過で単離・精製した．抽出物および単離成分については，抗糖化作用評価として，AGEs (advanced glycation end products) 生成阻害試験を行った．

粗抽出物およびブタノール抽出物の活性が高く，モリンガの葉ブタノール抽出部から， 1-(4'-hydroxyl-3'-methoxyphenyl)-2-{2-menthoxy-4-[1-propen- 3-*O*-glucopyranosyl]-phenoxy}-propan-1,3-diol [1]，4'-Acetyl-niazirin [2], niazirin [3], kaempferol 3-*O*-glucopyranoside [4], quercetin 3-O- glucopyranoside [5] および 4-rhamnopyranosyloxy phenyl carbamate [6] の 6 種類の化合物を単離した．単離した化合物のうち [1]～[5]に高い活性を示した．

本研究では，AGEs 生成阻害活性を示したことから，生活習慣病など疾病および老化の進行を防ぐ高齢者用食品などへの食品添加物や毎日服用するサプリメントとしての利用が期待される．

We focused on anti-glycosylation and examined the AGEs inhibitory activity of the constituent included in *Moringa oleifera* for preventing aging progression and disease. Six compounds were isolated from the leaves of *Moringa oleifera*, and their structures were established on basis of MS and NMR spectroscopy. They were 1-(4'hydroxyl-3'-methoxyphenyl)-2-{2-menthoxy-4-[1-propen-3-*O*-glucopyranosyl]-phenoxy}-propan-1,3-diol [**1**], 4'-Acetyl-niazirin [**2**], niazirin [**3**], kaempferol 3-*O*-glucopyranoside [**4**], quercetin 3-*O*-glucopyranoside [**5**] and 4-rhamnopyranosiloxy phenyl carbamate [**6**] . As a result, compounds **1** - **5** showed high AGEs (advanced glycation end products) inhibitory activity. As for compounds and extracts, it might be used in general as supplement and food additives to take every day.

Moringa oleifera , AGEs inhibitory activity, anti-glycation

発表責任者：澤邊昭義（sawabe@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4G06-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

ジャバラ果皮に含まれる抗糖化物質

Natural products as anti-glycation agents from peel of *Citrus jabara*

○楠本 恵理、奥野 祥治（和歌山高専）
○Eri KUSUMOTO, Yoshiharu OKUNO (NIT, Wakayama College)

世界の糖尿病人口は増加の一途をたどっており、世界中で重要な課題となっている。糖尿病による高血糖状態は生体内での還元糖とタンパク質による非酵素的反応である糖化反応を促進し、終末糖化産物(AGEs)を生成することで網膜症や神経障害、糖尿病性腎症などの合併症引き起こす。ゆえに、糖尿病性合併症の発症、進行を防ぐ手段の一つとして、AGEs の生成を阻害することが注目されている。

本研究室ではこれまでに植物に含まれる糖尿病予防、抗肥満物質の探索とその作用機序についての研究を進めており、その一環として、和歌山県北山村原産の香酸柑橘類であるジャバラ(*Citrus jabara*)果皮の MeOH 抽出物が強い抗糖化活性を示すことを見出した。そこで本研究では、ジャバラ果皮に含まれる抗糖化物質の探索と構造決定を目的とした。

ジャバラ果皮の MeOH 抽出物を各種有機溶媒で転溶し、抗糖化活性画分である CH_2Cl_2 抽出物をグリセルアルデヒドおよびヒト血清アルブミンを用いた抗糖化試験を指標として繰り返し分画することで、2 つの抗糖化物質を単離した。化合物 **1** は 150 μM で 66%、**2** は 50 μM で 87%の抗糖化活性を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 85、26 μM であった。現在、抗糖化物質の AGEs 架橋切断作用についても検討している。

Diabetes is the most serious, chronic metabolic disorder and is characterized by hyperglycemia. The hyperglycemic state of diabetes promotes glycation within an organism, and cause complications such as retinopathy, neuropathy and diabetic nephropathy, so suppression of glycation is a key issue worldwide. Glycation is a non-enzymatic reaction between proteins and sugar to produce advanced glycation end products (AGEs), inhibiting glycation expected to suppress progression of diabetic complications. In our search for naturally anti-glycation compounds, we found that MeOH ext. of peel of *C. jabara* exhibited a suppression of glycation. In this study, we investigated the isolation and identification of the anti-glycation compounds from *C. jabara*.

Citrus jabara, a member of the family Rutaceae, is native to Kitayama village in Wakayama prefecture. The CH_2Cl_2 ext. from MeOH ext. of peel of *C. jabara* showed anti-glycation activity. This extract was fractioned to isolate active compounds using anti-glycation assay as a guide. Two anti-glycation compound **1**-**2** were isolated and identified. Compound **1** and **2** showed 66, 87% anti-glycation activity at 150 μM and 50 μM. IC_{50} value of **1** and **2** were 85, 26 μM respectively.

Citrus jabara, antiglycation, diabetes

発表責任者：奥野祥治（okuno@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：4G06-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

ジペプチド（Leu-Lys）は酸化および糖化ストレスの低下を介して線虫（*C. elegans*）の寿命を延長させる

Dipeptide Leu-Lys (LK) extends the lifespan by suppression of oxidative and glycative stress in *Caenorhabditis elegans*

○横山 壱成[1]、瀬戸山 央[2]、藤田 菜々[1]、和気 明音[1]、荻 雅棋[1]、小宮 佑介[1]、長竿 淳[1]、有原 圭三[1] ([1]北里大獣、[2]（地独）神奈川県立産業技術総合研究所)
○Issei YOKOYAMA[1], Ou Setoyama[2], Nana Fujita[1], Akane Waki[1], Yaqi Jia[1], Yusuke Komiya[1], Jun Nagasao[1], Keizo Arihara[1] ([1]Kitasato Univ., [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

生体は加齢に伴い、様々なストレスの影響を大きく受ける。特に酸化ストレスは、組織の機能障害を引き起こすだけでなく、生体内における糖化ストレス（グリケーション）とも深く関連する。これらストレスの上昇は、老化の促進に繋がることから、日常的な抗酸化物質の摂取が重要となる。このような抗酸化物質として、我々はロイシンとリジンからなるジペプチド（Leu-Lys, LK）を見出しており、老化に対する効果が期待される。抗老化作用の検討には、線虫（*C. elegans*）の寿命を指標とした実験系が利用されており、抗酸化物質により寿命が延長することが報告されている。本研究では、線虫を用いてジペプチド LK による老化への影響を明らかにすることを目的とした。

熱処理を施した大腸菌（OP50 株）および LK（終濃度 10 mg/mL）を線虫（N2 株）の生育培地に添加し、すべての線虫が死滅するまでの寿命を測定した。LK を投与した線虫の寿命は、対照区（蒸留水）と比較して約 17%延長することが明らかになった。線虫の酸化ストレスを蛍光試薬 H2DCFDA および DHE で評価したところ、LK の添加によりいずれも低下した。また、線虫におけるグリケーションの指標である青色自家蛍光を測定した結果、加齢により上昇する蛍光強度が LK の添加により抑制された。以上の結果より、ジペプチド LK は加齢に伴い上昇する酸化および糖化ストレスを低下させることで抗老化作用を示すことが示唆された。

Aging is affected by a variety of stresses. In particular, an increase in oxidative stress is related to the impairment of physiological functions and enhancement of glycative stress (glycation) *in vivo*. Since such stresses cause an acceleration of aging, dietary intake of antioxidants is important for the regulation of stresses. Recently, we have found that dipeptide (LK) from leucine and lysine has an antioxidative effect. In the current study, we investigated the effect of LK on the lifespan and stresses in *Caenorhabditis elegans (C. elegans).*

The lifespan of *C. elegans* treated with LK was prolonged by about 17% compared to the control group (distilled water). Also, oxidative stress in *C. elegans* was evaluated by fluorescent reagents and decreased by LK treatment. Furthermore, blue autofluorescence, an indicator of glycation in *C. elegans*, was also suppressed by LK. These results suggest that an antioxidant peptide LK exhibits an anti-aging effect by suppressing oxidative and glycative stresses in *C. elegans*.

Functional peptide, Anti-aging, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：横山壱成（da18001@st.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：4G06-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

鶏卵成分の骨格筋損傷回復及び筋萎縮抑制効果

Egg components could recover skeletal muscle damage and atrophy.

○澤野 祥子、小林 佑哉、前澤 涼香、水野谷 航（麻布大）
○Shoko SAWANO, Yuya Kobayashi, Suzuka Maesawa, Wataru Mizunoya (Azabu Univ.)

骨格筋萎縮は、栄養失調、加齢、怪我、不活動などにより誘発される。本研究では、鶏卵成分が筋萎縮抑制に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、筋萎縮時に発現の上昇がみられるユビキチンリガーゼである atrogin-1 及び MuRF-1 を筋萎縮マーカーとして、卵黄・卵白成分の筋萎縮抑制効果を評価した。C57BL/6J 雄性マウスの左脚前脛骨筋部にカルディオトキシンを注入し筋損傷を誘導した後、卵液をマウスに 10 日間経口投与した。投与後、損傷筋を摘出し atrogin-1、MuRF-1 の発現量を評価したところ、卵液投与群の atrogin-1 および MuRF-1 発現量はコントロール群と比較して有意に減少した。したがって、鶏卵由来の卵液には筋損傷後からの回復促進あるいは、萎縮進行の抑制に関与する成分が含まれていることが示唆された。次に筋萎縮抑制に効果のある成分を明らかにするため、複数の鶏卵成分を対象とした検討を行った。DEX 処理により筋萎縮が誘導されマウス C2C12 成熟筋管細胞において、卵黄成分である 3-Sn-ホスファチジルコリン、レシチン、ビオチン、L-α-ホスファチジルコリンを添加した群では、DEX 処理による筋管直径の減少が有意に抑制された。これらの結果から、卵黄成分に筋萎縮を抑制する成分が含まれていることが示唆された。

Skeletal muscle atrophy is defined as the reduction or loss of muscle tissue. In this study, we aimed to determine whether egg components have an inhibitory effect on muscle atrophy. Cardiotoxin was injected into the tibialis anterior muscle of male C57BL/6J mice, followed by oral administration of the egg mixture for 10 consecutive days. The protein levels of atrogin-1 and MuRF-1, the major factors of muscle atrophy, were elevated by TA muscle damage, but the egg mixture significantly reduced the elevated levels of atrogin-1 and MuRF-1 by western blotting. Furthermore, the effects of egg components avidin, lecithin, biotin, 3-sn-phosphatidylcholine, and L-α-phosphatidylcholine on dexamethasone (DEX)-treated C2C12 myotubes were investigated. Lecithin, biotin, 3-sn-phosphatidylcholine, and L-α-phosphatidylcholine from egg yolk significantly restored the decrease in diameter of C2C12 myotubes caused by DEX application. These results indicate that several components in egg yolk contribute to the recovery of skeletal muscle atrophy caused by muscle injury.

skeletal muscle, atrophy, egg

講演番号：4G06-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム G

カルノシンの筋肉機能改善効果とその分子基盤

Molecular basis for carnosine-induced activation of muscle function.

○藤木 結葉[1]、石橋 明寿香[1]、佐藤 三佳子[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院・生資環、[2]日ハム中研、[3]九大院・農院)
○Yuha FUJIKI[1], Asuka ISHIBASHI[1], Mikako SATO[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]R&D Center, NH Foods, Ltd, [3]Fac.Agric., Kyushu Univ.)

カルノシンは、食肉中に多く含まれるイミダゾールジペプチドであり、記憶機能改善効果をもつことが報告されている。我々はそのメカニズムとして、カルノシンが筋肉活性化を介して脳機能を活性化する可能性（筋脳相関の活性化）について研究を行っている。そこで本研究では、カルノシンが筋肉細胞に及ぼす効果について検証した。

まず、未分化の C2C12 細胞に対して 72 時間カルノシン処理を行い、その際のミトコンドリア活性の変化を追跡した。次に、カルノシン存在下で分化誘導した C2C12 細胞における筋繊維タイプおよびミトコンドリア活性の変化を追跡した。遅筋と速筋の割合の変化は、特異的抗体を用いた蛍光免疫染色によって検証した。また、筋線維関連遺伝子およびミトコンドリア関連遺伝子の発現量は定量 RT-PCR 法により検証した。

72 時間のカルノシン処理で、未分化 C2C12 細胞においてミトコンドリアの数と面積が有意に増加していることが明らかとなった。次に、カルノシン存在下で分化誘導した C2C12 細胞では、濃度依存的な速筋の増加、さらに SIRT1 及び PGC-1α 遺伝子の発現増強が確認できた。

今後、カルノシン添加により活性化された筋肉が脳機能に及ぼす景況について解析する予定である。

Carnosine is an imidazole dipeptide that is abundant in meat and has been reported to improve memory function. We have been studying the possibility that carnosine activates brain function through muscle activation. In this study, we examined the effects of carnosine on muscle cells.

First, we treated undifferentiated C2C12 cells with carnosine for 72 hours and verified mitochondrial activity. Next, we followed the changes in myofiber type and mitochondrial activity in C2C12 cells induced to differentiate in carnosine. Changes in the ratio of slow and fast muscle were verified by fluorescent immunostaining using specific antibodies. The expression levels of myofiber-related genes and mitochondria-related genes were verified by quantitative RT-PCR.

The number and area of mitochondria were found to be significantly increased in undifferentiated C2C12 cells after 72 hours of carnosine treatment. Next, in C2C12 cells differentiated in the presence of carnosine, we observed a concentration-dependent increase in fast twitch muscle as well as enhanced expression of SIRT1 and PGC-1α genes.

Carnosine, Muscle, C2C12

発表責任者：片倉　喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4G08-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

アルツハイマー病患者対象ロスマリン酸介入試験における microRNA 発現変動および機能解析

MiRNA profiles and their functional characteristics of patients with Alzheimer's disease after rosmarinic acid intake

○山本 萌乃[1]、篠原 もえ子[2]、浜口 毅[2]、小野 賢二郎[2]、山田 正仁[2]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1]、小林 彰子[1] ([1]東大農、[2]金沢医)
○ Moeno YAMAMOTO[1], Moeko SHINOHARA[2], Tsuyoshi HAMAGUCHI[2], Kenjiro ONO[2], Masahito YAMADA[2], Takumi MISAKA[1], Keiko ABE[1], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kanazawa Univ.)

当研究グループは、軽度アルツハイマー型（AD）認知症患者に対するロスマリン酸（RA）の臨床試験を実施し、24 週間の RA 摂取で患者の行動・心理症状が改善されることを報告した（Noguchi-Shinohara *et al., Sci Rep,* 2020）。一方、患者脳脊髄液中では RA は検出されなかったことから、RA 摂取後に生成する microRNA（miRNA）が脳において抗 AD 作用を発揮する機構を考えた。本研究は臨床試験で得られた患者血漿から、RA 摂取により血漿中で変動する miRNA を特定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

プラセボ群および RA 群各群の血漿中において、試験開始前/終了後で発現変動した miRNA を次世代シーケンシングにより選抜した。プラセボ群で発現変動した miRNA が 9 個抽出された一方、RA 群では発現変動 miRNA は抽出されなかったことから、本来軽度 AD 患者血漿で起こる miRNA の変動が RA 摂取により抑制されることが示唆された。また発現変動 miRNA の 1 つは、認知機能に関する臨床検査項目である MMSE score と強い相関を示したが、この miRNA は神経毒性に繋がるミクログリア活性化に関連する塩化物細胞内チャネル(CLIC)を標的遺伝子とすることが推定された。ルシフェラーゼアッセイを実施したところ、当該 miRNA の *CLIC* の 3′側推定結合部位に対する結合、ならびに *CLIC* の発現抑制が確認できた。現在、ヒトミクログリア細胞株 HMC3 にこの miRNA を導入し、炎症刺激時におけるミクログリアでの神経毒性作用への影響を調査している。

We previously reported that 24 weeks of rosmarinic acid (RA) intake improved behavioral and psychological symptoms of patients with mild Alzheimer's disease（Noguchi-Shinohara *et al., Sci Rep,* 2020）. Since RA amounts in the cerebral spinal fluid were undetectable, we hypothesized that produced microRNAs (miRNAs) after RA intake prevented AD development. This study aimed to identify miRNAs that changed in those expression levels after RA intake, and to investigate their functional characteristics. MiRNA expression profile was analyzed by next-generation sequencing, and nine miRNAs were extracted as differentially expressed genes in the placebo group, although they were not in the RA group. This result suggested that the deregulation of miRNA expression in patients with AD was suppressed by RA intake. *CLIC*, which is related to neurotoxicity, was predicted as a target gene for one of the nine miRNAs, which was correlated with the MMSE score. This miRNA reduced the luciferase activity by binding to the *CLIC* -3′ UTR. This result suggested that miRNA suppressed the expression of *CLIC* mRNA.

Rosmarinic acid, Alzheimer's disease, microRNA

発表責任者：小林彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4G08-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

黒米糠摂取による老齢マウス脳組織におけるアミロイドβ産生抑制

Oral intake of black rice bran attenuates amyloid beta production in the brains of normal aged mice

○石神 和佳奈[1]、大畠 悠実[1]、松井 美涼[2]、原 崇[2]、池内 健[3]、中村 澄子[4]、城 斗志夫[2]、大坪 研一[4]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命)
○Wakana ISHIGAMI[1], Yumi OHATA[1], Misuzu MATSUI[2], Takashi HARA[2], Takeshi IKEUCHI[3], Sumiko NAKAMURA[4], Toshio JOH[2], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

アルツハイマー病は老人斑と神経原線維変化を病理学的特徴とし，神経細胞が脱落し，脳が萎縮する疾患である。老人斑はアミロイドβ（Aβ）が，神経原線維変化は過剰リン酸化 tau が凝集して形成される。我々の研究グループは，野生型の老齢マウス（C57BL/6，♂，30～35 週齢）に黒米糠(おくのむらさき，5%および 15%混餌投与)を 11～12 ヵ月間自由摂取させたところ，脳組織における tau のリン酸化が有意に抑制されることを報告した。本研究では，黒米糠を摂取したマウスの脳組織における Aβ並びに C99，sAPPβなどのアミロイド前駆体タンパク質（APP）プロセシングにより生じる断片の低減がみられ，APP を切断して Aβを産生する酵素βセクレターゼ（BACE1）の発現レベルの低下が確認されたので報告する。また，黒米糠の有効成分としてアントシアニンを想定し，スウェーデン変異型 APP 安定発現細胞（N2a swe）の Aβ産生に対する生体内におけるアントシアニン代謝物（フェルラ酸，バニリン酸など）の抑制作用についても報告する。
本研究は，生研機構イノベーション創出強化研究推進事業「超高齢化社会対応と輸出促進のための認知症・糖尿病複合予防効果のある米加工食品の開発」の一部として実施した。

Alzheimer's disease is pathologically characterized by senile plaques and neurofibrillary degeneration, which are aggregates consisting of amyloid-β (Aβ) and hyperphosphorylated tau, respectively, and lead to neuronal loss and brain atrophy. We have previously demonstrated that normal aged mice (C57BL/6, ♂, 30-35 weeks old) fed black rice bran (Okuno-murasaki, 5% and 15% mixture) for 11-12 months exhibit a significant reduction in the levels of phosphorylated tau in the brain tissues. In the present study, black rice bran supplementation was found to reduce the amount of Aβ and its related fragments from amyloid precursor protein (APP), such as C99 and sAPPβ, with a concomitant decrease in the expression of β-secretase (BACE1), an enzyme that cleaves APP to produce Aβ, in the brain tissues. Assuming anthocyanins as the active ingredients of black rice bran, we also report the inhibitory effect of some anthocyanin metabolites (ferulic acid, vanillic acid, etc.) on Aβ production in Neuro 2a cells stably expressing the Swedish mutant of APP (N2a swe), which secrete high levels of Aβ.

black rice bran, amyloid beta, beta-secretase (BACE1)

発表責任者：原崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4G08-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

アミタケ（*Suillus bovinus*）に含有される神経細胞保護物質の探索研究

Studies on neuroprotective compounds in *Suillus bovinus*

○尾松 和夏子[1]、菅谷 紘一[1,2]、小野瀬 淳一[1,2]、阿部 尚樹[1,2] ([1]東農大院・健康、[2]東農大・応生・健康)
○Wakako OMATSU[1], Kouichi SUGAYA[1,2], Jun-ichi ONOSE[1,2], Naoki ABE[1,2] ([1]Dept. of Nutri. Sci & Food Safety, Grad. Sch. of Applied Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric, [2]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Faculty of Applied Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric)

Aβは凝集および沈着することで産生される過酸化水素により、神経細胞毒性を引き起こし、神経細胞のアポトーシスおよびアルツハイマー病を進行させると考えられている。当研究で実施したスクリーニングの結果、食用キノコであるアミタケ（*Suillus bovinus*）の抽出物が、抗酸化活性により、神経細胞保護効果を示す可能性を見出した。アミタケに含有される抗酸化物質を探索した結果、3 種の pulvinic acid 類化合物を単離した。Aβの凝集阻害活性および抗酸化活性試験の結果などから、その内の一つである variegatic acid が神経細胞である SH-SY5Y 細胞の細胞生存率を増加させることを明らかにした。さらに、フローサイトメーターを用いた分析により、variegatic acid を前処理することで SH-SY5Y 細胞の Aβ誘導性アポトーシスの割合が減少することが示唆された。現在、同様にアミタケから単離した、xerocomic acid 並びに atromentic acid についても活性試験に供することにより、pulvinic acid 類化合物の神経細胞保護作用における構造活性相関について検討を行っている。

The progression of Alzheimer’s disease(AD) is expected to be due to neuronal apoptosis caused by neurotoxicity induced by H_2O_2 produced by Aβ aggregation and deposition. In our screening for antioxidants, we have found that *Suillus bovinus* (Amitake) extract may give neuroprotective effects by its antioxidant activity, and, on the basis of their antioxidant activity, three pulvinic acids were isolated as active compounds in the extract. In the result of Aβ aggregation inhibitory activity and antioxidant activity tests, it was clarified that variegatic acid increases viability of SH-SY5Y cells. Furthermore, flow cytometric analysis suggested that pretreatment with variegatic acid reduced Aβ-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. We are also investigating the structure-activity relationship of pulvinic acids related to neuronal cells protective action by subjecting xerocomic acid and atromentic acid isolated from *S. bovinus* to the same examination.

Suillus bovinus, Pulvinic acids, Neuroprotective compounds

講演番号：4G08-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

老化による認知機能低下に対するカルノシン酸の効果解明

Effect of Carnosic Acid on Cognitive Decline in Aging

○松田 幸、林 遼太郎、岡田 晋治、石島 智子、阿部 啓子、小林 彰子（東大農）
○Miyuki MATSUDA, Ryotaro HAYASHI, Shinji OKADA, Tomoko ISHIJIMA, Keiko ABE, Shoko KOBAYASHI (The Univ. of Tokyo)

ローズマリーには様々な生理活性成分が含まれており、その抽出物には老化による認知機能低下抑制を示唆する報告が多数存在する。中でもテルペン類であるカルノシン酸（CA）は、抗酸化や抗炎症等様々な生理作用が報告されている。認知症発症には炎症が深く関わるため、CA が脳内で抗炎症作用を発揮し、老化による認知機能低下を抑制する可能性が考えられた。そこで本研究では、老化モデルを用いて CA の認知機能低下に与える影響を明らかにすることを目的とした。老化促進モデルマウス SAMP8 および背景系統 SAMR1 に CA（25 mg/kg BW）を 1 日 1 回経口投与し、投与開始 31 日目から 4 種類の認知行動試験を行った。その結果、位置認識試験において老化による認知機能低下と CA 摂取による認知機能低下抑制が見られ、CA が老化による認知機能低下の抑制効果を持つことが示唆された。一方、CA による炎症性サイトカインの発現抑制が in vitro 試験によって確認されたが、マウス海馬では観察されなかった。そこで、CA の作用機序を探索するため、行動試験後のマウス海馬のトランスクリプトーム解析を行った。抽出された発現変動遺伝子が有意に濃縮している機能を特定するため、Gene Ontology 解析および canonical pathway 解析を行った結果、神経伝達物質輸送等が抽出された。今後は、これら抽出された機能に含まれる遺伝子を確認すると共に、タンパク質レベルでの検討を行うことで、CA の作用解析を進める予定である。

Rosemary contains a variety of bioactive components, and its extracts are known to suppress cognitive decline in aging. Among them, Carnosic acid (CA) is reported to have antioxidant and anti-inflammatory effects. Because inflammation strongly relates to the onset of dementia, we considered that CA might suppress the age-related cognitive decline through its anti-inflammatory effects. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of cognitive function improvement by means of CA intake. After CA was orally administered to SAMP8 and SAMR1 mice for 31 days, we conducted behavioral tests. We found that cognitive function had declined from aging but that the decline had been suppressed through CA. However, there were no changes in inflammatory cytokines in the mouse hippocampus in contrast to the in vitro observation. Thus, we conducted transcriptome analysis in their hippocampus. Gene Ontology and canonical pathway analysis demonstrated that differentially expressed genes were related to some functions. We're going to quantify the protein level of factors in these functions.

Carnosic acid, cognitive function, aging

発表責任者：小林彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4G08-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

米糠摂取による高脂肪食負荷マウスの認知機能低下および tau リン酸化の抑制

Rice bran supplementation ameliorates cognitive decline and increased tau phosphorylation in mice fed a high fat diet

○大畠 悠実[1]、石神 和佳奈[1]、松井 美涼[2]、原 崇[2]、池内 健[3]、中村 澄子[4]、城 斗志夫[2]、大坪 研一[4]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命)
○Yumi OHATA[1], Wakana ISHIGAMI[1], Misuzu MATSUI[2], Takashi HARA[2], Takeshi IKEUCHI[3], Sumiko NAKAMURA[4], Toshio JOH[2], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

高脂肪食（HFD）は、耐糖能異常やインスリン抵抗性を発生させると同時に、認知機能の低下が報告されている。本研究では、HFD による C57BL/6 マウス（♂、30 週齢）の認知機能の低下を米糠（コシヒカリ）の摂取により改善し得るか、またアルツハイマー病の病理学的特徴に関連する tau リン酸化に及ぼす影響について検討した。米糠（0.5 g/day/mouse）は、HFD へ添加して給餌し（HFD+RB 群）、市販の繁殖用飼料を給餌したコントロール群と HFD 群と共に 12 週間飼育した。HFD 群および HFD+RB 群は、コントロール群より体重の増加と空腹時血糖値の上昇が確認された。しかし、HFD+RB 群は、経口グルコース負荷試験における血糖値上昇が HFD 群より穏やかであった。モリス水迷路試験の結果、退避用プラットホームに到達するまでの所要時間が HFD により延滞したが、HFD+RB 群は HFD 群より所要時間が短縮された。また、HFD により脳組織における tau のリン酸化が顕著に増大したが， HFD+RB 群では脳組織のリン酸化 tau レベルが対照群と同レベルに抑制されていた。
本研究は，生研機構イノベーション創出強化研究推進事業「超高齢化社会対応と輸出促進のための認知症・糖尿病複合予防効果のある米加工食品の開発」の一部として実施した。

High-fat diets (HFD) have been reported to cause cognitive decline as well as impaired glucose tolerance and insulin resistance. In the present study, we investigated whether rice (Oryza sativa L. cv. Koshihikari) bran supplementation could ameliorate HFD-induced cognitive decline and decrease phosphorylated tau levels relating to the pathology of Alzheimer's disease in C57BL/6 mice (♂, 30 weeks old) fed HFD. Mice were fed a control diet or a high-fat diet (HFD; 60% energy from fat) with or without rice bran (RB; 0.5 g/day/mouse) for 12 weeks. While HFD with or without RB led to increased body weight and elevated baseline blood glucose concentrations, HFD+RB group mice exhibited a reduction in blood glucose levels after glucose challenge compared with HFD group mice. In the Morris water maze test, the amount of time to reach the hidden platform to escape the water (escape latency) was increased by HFD, but HFD+RB group mice exhibited shorter escape latencies compared with HFD group mice. HFD group mice showed increased levels of phosphorylated tau in the brain tissues, which was suppressed in HFD+RB group mice to the same level as those in control mice.

rice bran, high fat diet, cognitive decline

発表責任者：原　崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4G08-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

プラズマローゲンによるフェロトーシス抑制

Suppression of ferroptosis by plasmalogen

○阿部 アキ[1]、中川 和也[2]、杉山 梢[2]、山田 秀俊[1,3]([1]帝京科学大学大学院 理工学研究科 バイオサイエンス専攻（帝科大・院・バイオ）、[2]株式会社 ADEKA（(株) ADEKA）、[3]帝京科学大学 生命環境学部 生命科学科（帝科大・生命環境））
○Aki Abe[1], Kazuya Nakagawa[2], Kozue Sugiyama[2], Hidetoshi Yamada[1,3] ([1]Grad. Sch. of Teikyo Univ. of Sci., [2]ADEKA Corp., [3]Teikyo Univ. of Sci.)

フェロトーシスは鉄依存性の制御された細胞死であり、虚血性疾患、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、神経変性疾患などへの関与が示唆されている。細胞内鉄イオンを触媒としたフェントン反応によって細胞膜リン脂質の過酸化が引き起こされ、フェロトーシスが誘導される。
プラズマローゲンはビニルエーテル結合を有するエーテル型リン脂質の一種であり、細胞膜リン脂質の酸化抑制に働く。プラズマローゲンは加齢と共に減少することが知られており、プラズマローゲン量の低下とアルツハイマー病の関連が報告されている。プラズマローゲンの作用として、細胞膜保護作用によるフェロトーシス抑制が想定され、サプリメント等による補給の有効性が期待されるが、エーテル型リン脂質によるフェロトーシス促進作用が報告されており、細胞へのプラズマローゲン補給のフェロトーシス抑制への有効性は明らかにされていない。
本研究では、PC-12 細胞における t-BHP を用いたフェロトーシス誘導に対するエーテル型リン脂質補給の有効性を検討し、プラズマローゲン補給がフェロトーシスによる細胞死を抑制することを見出した。

Ferroptosis is a controlled cell death depended on iron, which has been suggested the relevance to ischemic disease, amyotrophic lateral sclerosis and neurodegenerative disease. Ferroptosis is induced by peroxidation of plasma phospholipid by fenton reaction which was catalyzed by intracellular iron.
Plasmalogen is an ether-phospholipid which has vinyl ether bond. Plasmalogen suppresses oxidation of cell membran phospholipid. Plasmalogen decreases with aging and several reports suggested relationship between reduction of plasmalogen and Alzheimer’s disease. Supplementation of plasmalogen is expected to prevent ferroptosis by protection of cell membrane phospholipid, but it was reported that ether-phospholipid was needed ferroptosis induction. The effect of plasmalogen supplementation on ferrptosis is obscure.
In this study, we examined the effect of ether-phospholipid supplementation on ferroptosis induced by t-BHP in PC-12. The supplementation of plasmalogen decreased ferroptosis induced by t-BHP in PC-12 cell.

Plasmalogen, Ferroptosis

発表責任者：阿部アキ（g21ma001@st.ntu.ac.jp）

講演番号：4G08-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

活性酸素種を発生する食等由来抗酸化物質の探索と、疾患原因蛋白質の酸化・変性促進効果の検討

Examination of food-derived antioxidants that generate reactive oxygen species and promote the oxidation and denaturation of proteins that are causative agents for diseases.

○黒川 洋一、内田 智也、中村 有香（福井県大生物資源）
○Youichi Kurokawa, Tomoya Uchida, Yuka Nakamura (Dep. Bioscience, Fukui Pref. Univ.)

難病であるアルツハイマー病（ALZ）、パーキンソン病（PD）などの発症には、酸化ストレスが深く関わるとされるが、その詳細は未解明な点が多い。これらの疾患への予防対策を確立する上で、酸化ストレスの発生源と、疾患原因とされる蛋白質の酸化等との関連を解明することは重要である。

私どもは、最初に、遷移金属である銅イオン還元能を持ち、および、プロオキシダント能に基づく、活性酸素種（ROS）発生能を持つ抗酸化物質を選別した。次に、これらの化合物を用いて ROS を発生させ、ウシ血清アルブミン、ALZ あるいは PD の原因物質とされるアミロイドβあるいはαシヌクレインを標的蛋白質として、その酸化を、チロシン残基の酸化に伴って生じるジチロシン由来の蛍光シグナル、アミロイド形成をチオフラビン T 由来の蛍光シグナルを指標として評価した。その結果、銅イオンおよび、過酸化水素あるいは疎水性抗酸化物質存在下では、最も強い ROS であるヒドロキシルラジカルが検出されたが、標的蛋白質由来蛍光シグナルの強度や持続性などに差が見られたことから、蛋白質の酸化を評価する上では酸化ストレス発生源を検証する重要性が強く示唆された。

本講演では、上記の研究、および、私どもが進めている疾患原因蛋白質の酸化抑制物質の探索についてもご紹介したい。

Several lines of evidences have suggested the relation of oxidative stress and onset of neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease. However, etiology of these diseases remains largely unknown. Therefore, it is required to reveal the relation between generation of oxidative stress and oxidation of the causative protein.

We first screened chemicals that reduce copper (II) ion and generate reactive oxygen species (ROS) based on their pro-oxidant activity. We then examined the effects of chemicals with high ROS-generating activity on promoting oxidation or amyloid formation of target proteins (bovine serum albumin, amyloid beta and alpha-synuclein). Whereas copper ion generated hydroxyl radical, depending on hydrogen peroxide or hydrophobic chemicals with high pro-oxidant activity, these different conditions gave different intensity and duration time of the dityrosine fluorescence signal of target protein which formed as a result of oxidation. Taken together, these results suggest the importance of examining the relation of oxidative stress and its effects on the target protein of interest.

anti-oxidant, reactive oxygen species, protein oxidation

発表責任者：黒川洋一（kurokawa@fpu.ac.jp）

講演番号：4G08-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

Caco-2 細胞における大豆由来フェリチンによる抗酸化酵素遺伝子の発現応答

Expression response of antioxidant enzyme genes by soybean-derived ferritin in Caco-2 cells

○上野 有紀[1]、川本 善之[2]、増田 太郎[3]([1]愛知学院大心身科学、[2]中部大生命健康科学、[3]摂南大農)
○Yuki UENO[1], Yoshiyuki KAWAMOTO[2], Taro MASUDA[3] ([1]Aichi Gakuin Univ., [2]Chubu Univ., [3]Setsunan Univ.)

【背景】大豆由来フェリチンは、鉄貯蔵を機能とするタンパク質である。大豆由来フェリチンは、食事由来の鉄供給源として、無機鉄およびヘム鉄以外の候補として注目されているが、生体への抗酸化酵素の発現への影響については不明な点が多い。本研究では、ヒト由来腸管上皮株化細胞 Caco-2 を用いて、我々が作製したリコンビナント大豆由来フェリチン（rSBF）による抗酸化酵素遺伝子発現への影響について調べた。
【方法】Caco-2 細胞を常法により分化させた。rSBF（鉄濃度として 3.45ppm）を添加し 48 時間まで培養した。細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。遺伝子発現量の測定はリアルタイム PCR を用いた。内在性コントロールとして GAPDH 遺伝子発現量にて補正した。
【結果・考察】rSBF は、superoxide disumutase(SOD)1, catalase, glutathione peroxidase などの遺伝子発現には影響を与えなかったが、SOD2 の遺伝子発現を一過的に誘導した。本研究の結果から、rSBF は抗酸化酵素のうち SOD2 を特異的に発現誘導する機構が存在する可能性が新たに考えられた。

Soybean-derived ferritin is known as an iron storage protein. Soybean-derived ferritin is attracting attention as a candidate for dietary iron source other than inorganic iron and heme iron, but there are many unclear points about the expression of antioxidant enzymes *in vivo*. In this study, we investigated the effect of recombinant soybean-derived ferritin (rSBF) on the expression of antioxidant enzyme genes using human intestinal epithelial cell line Caco-2. Cells were differentiated by a conventional method. rSBF (3.45 ppm as iron concentration) was added and the cells were cultured for up to 48 hours. Total RNA was extracted from the cells and cDNA was synthesized. Real-time PCR was used to measure the gene expression level. GAPDH was used as an internal control. rSBF did not affect the gene expression of superoxide dismutase (SOD) 1, catalase, glutathione peroxidase, etc., but transiently induced the gene expression of SOD2. These results suggest that rSBF may specifically induce the expression of the SOD2 gene.

soybean-derived ferritin, antioxidant enzyme, Caco-2 cell

発表責任者：上野有紀（ueno@dpc.agu.ac.jp）

講演番号：4G08-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

オートファジー制御における細胞性粘菌由来の生物活性物質 DIF の機能解析

Functional analysis of DIF, a bioactive substance from cellular slime mold, in the regulation of autophagy

○山田 龍[1]、矢野 敏史[1]、山越 正汰[1]、菊地 晴久[2]、久保原 禅[3]、原 太一[1]([1]早大人科院、[2]慶應大薬学、[3]順天堂大院スポ健)
○Ryu Yamada[1], Satoshi Yano[1], Shota Yamakoshi[1], Haruhisa Kikuchi[2], Yuzuru Kubohara[3], Taichi Hara[1] ([1]Waseda Univ., [2]Keio Univ., [3]Juntendo Univ.)

細胞内成分のリサイクリングシステムであるオートファジーは、神経変性疾患やがん、生活習慣病などの様々な疾患の発症予防に機能する。また、モデル生物においてオートファジーを人工的に活性化することで健康寿命を延伸させることが示されており、オートファジーが関与する疾患の治療やアンチエイジングへの応用面からオートファジー活性化剤の開発に期待が高まっている。そこで本研究では、複数の生物活性（抗腫瘍活性、糖取り込み促進活性、免疫制御活性、抗菌活性など）を有することが報告されている細胞性粘菌由来の分化誘導因子（differentiation-inducing factor-1, DIF-1）とその誘導体（DIFs）に着目し、HeLa 細胞のオートファジーに与えるそれらの影響を検討した。その結果、いくつかの DIFs にオートファジーを亢進および抑制する活性を見出した。さらに、DIFs によるオートファジーの亢進は、オートファジーの主要な制御シグナルである mTORC1 シグナルとは異なる機序によることが示唆された。また、DIFs によるオートファジー亢進作用と抗腫瘍作用の機序は少なくとも一部異なる可能性が見出された。

Autophagy is an intracellular recycling system in which the cytoplasmic contents are degraded in the lysosome, producing molecules that can be reused. Autophagy functions to prevent the onset of diseases such as neurodegenerative disorders, tumorigenesis, and lifestyle-related diseases. In addition, the artificial activation of autophagy in model organisms has shown to extend healthy life span. Thus, the development of autophagy-activating agents has been attracting attention in terms of their application to the treatment of autophagy-related diseases and anti-aging. In this study, we focused on differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) found in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* and its derivatives (designated DIFs), which have been reported to exert several biological activities (such as antitumor, glucose-uptake promoting, immunoregulatory, and antibacterial activities). In the present study, we examined the effects of DIFs on autophagy regulation in HeLa cells *in vitro* and found that some of DIFs exhibit autophagy-promoting activity while some exhibit autophagy-suppressing activity. It was also suggested that the DIFs may promote autophagy via an mTORC1-independent pathway; mTORC is a major regulatory signal molecule for autophagy. In addition, it was shown that the mechanisms underlying the autophagy promotion and tumor-growth suppression by DIFs are different from each other at least in part.

Autophagy, mTORC1, DIF

発表責任者：原　太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：4G08-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:00～ ミーティングルーム G

S-アリルシステイン高含有ニンニクエキスの精神的疲労感へ及ぼす影響

The Effect of *S*-allylcysteine Enriched Garlic Extract on Mental Fatigue

○松永 尚之、西原 豊、若松 淳一郎、瓜生 圭介、丸 勇史（備前化成）
○ Naoyuki MATSUNAGA, Yutaka NISHIHARA, Jyunichiro WAKAMATSU, Keisuke URYU, Isafumi MARU (Bizen Chemical Co., Ltd.)

【目的】ニンニクの機能性成分として知られる含硫化合物 *S*-アリルシステイン（以下、SAC）には、日常の疲労感の蓄積や運動に起因する疲労感の軽減効果があることが報告されている。しかし精神的負荷に起因する脳疲労への有効性は実証されていない。本研究では、SAC 高含有化ニンニクエキス粉末（以下、SGE）の摂取による脳疲労軽減効果を検証した。
【方法・結果】22 名の健常成人を SGE 摂取群またはプラセボ群に割り振り、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行った。摂取開始後 2 週間および 4 週間においてパソコン作業の課題処理による精神的負荷をかけ、この負荷前後の疲労に関する VAS アンケートにより SGE の抗疲労効果を評価した。その結果、摂取開始後 4 週間において、精神的負荷による疲労感および集中力の悪化が有意に軽減された。また、頭の疲れとストレス感は摂取開始後 2 週間に有意に軽減され、頭の冴えとやる気の悪化においても有意に軽減された。今後、SAC による抗酸化・抗炎症メカニズムに焦点をあて、疲労感や疲労軽減メカニズムの解明を目指す。

We investigated the efficacy of *S*-allylcysteine (SAC)-enriched garlic extract (SGE) supplementation to mitigate fatigue sensation and the exacerbation of psychological feelings related to mental fatigue. Twenty-two eligible healthy adults who felt fatigue in everyday life were assigned to either a test food (SGE) group or a placebo group for the randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel, comparative clinical study. Two and four weeks after administration of either foods containing SGE or placebo, the subjective fatigue sensation and psychological feelings were examined using a visual analogue scale (VAS) before and after mental load. The change of VAS values between mental load for subjective fatigue sensation at 4-weeks since taking SGE supplementation lowered versus placebo through intake of SGE significantly. The change of VAS values between mental load for feeling of mental fatigue and feeling of stress were lowered after 2-weeks since taking SGE supplementation significantly. Moreover, the SGE group demonstrated significant differences in feeling about getting more focused and showed a tendency to reduce the VAS values for feeling having a clear head and feeling motivated after 4-weeks post-intervention. In conclusion, supplementation of SGE can mitigate fatigue sensation and the exacerbation of psychological feelings related to mental fatigue.

S-allylcysteine, Fatigue, Garlic

発表責任者：松永尚之（naoyuki-matsunaga@bizen-c.co.jp）

講演番号：4H02-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

チョコレートの品質に関与するカカオ豆成分の産地による比較

Comparison of components of cacao beans from different production areas

○磯野 未来、堀江 秀樹（都産技研・食技セ）
○Miki ISONO, Hideki HORIE (TIRI)

チョコレートの風味・品質には、カカオの品種や、栽培・発酵条件、ロースト等の製造工程など多くの要因が関わっている。近年、日本国内でも多様なカカオ豆が入手できるようになり、それらの特徴を生かした製品が数多く販売されている。カカオ豆、チョコレートの風味の評価には主に官能評価が用いられていることから、生豆の品質のばらつきを把握したり、各豆の特徴を生かすための製造工程を選択する際、データの比較が困難となるという問題がある。

そこで、本研究では製造現場で役立つ理化学的データの収集を目的として、①メーカーやブランドの異なる市販チョコレート 18 種、②異なる条件でローストしたカカオ豆、③産地の異なるカカオ豆 13 種について成分分析を行った。その結果、市販チョコレートの総ポリフェノール量、有機酸量等は幅広い分布を示した。また、それらの成分はローストの強弱および有無によって大きな相違は認められなかったが、産地の違いにより幅広い分布を示した。このことから、チョコレートの味質に関わる成分については、ロースト工程よりも、生豆が持つ特徴の影響が大きいことが示唆された。

Many factors are involved in the flavor and quality of chocolate, including the cacao cultivar, cultivation/fermentation conditions, and manufacturing processes, such as roasting. Recently, various cacao beans have become available in Japan, and many products that have taken advantage of their characteristics are now on sale. Sensory evaluation is mainly used to evaluate the flavor of cacao beans and chocolate; however, comparative analysis of the resultant data is difficult in relation to the variation in the quality of raw beans and selection of manufacturing processes. Therefore, in this study, with the aim of collecting useful data at the manufacturing site, we analyzed the components of 18 types of commercial chocolate, cacao beans roasted under different conditions, and 13 types of cacao beans from different production areas. Total polyphenol content and organic acid content, among other components, showed various values in our comparisons of commercial chocolates. Although little variation was observed in these components due to differences in roasting conditions, they differed substantially according to different production areas; thus, the characteristics of raw beans have a greater effect than the roasting process on the components related to the taste of chocolate.

cacao, chocolate, organic acid

発表責任者：磯野未来（isono.miki@iri-tokyo.jp）

講演番号：4H02-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

瀬戸内海沿岸で養殖されたマガキの季節変動と特徴

Seasonal variations and characteristics of oysters from Seto Inland Sea

○桑田 七帆[1]、西島 功貴[2]、丸田 ひとみ[2]、花田 恭孝[3]、山下 広美[1,2] ([1]岡山県立大学大学院、[2]岡山県立大学、[3](株) マルト水産)

○Nanaho KUWATA[1], Kouki NISHIJIMA[2], Hitomi MARUTA[2], Yasutaka HANADA[3], Hiromi YAMASHITA[1,2] ([1]Graduate School of Okayama Pref. Univ., [2]Okayama Pref. Univ., [3]Marutosuisan)

瀬戸内海で養殖されたマガキ（*Crassostrea gigas*）の主要成分の変動や生殖サイクルの特徴について明らかにすることを目的にこれまで、瀬戸内海沿岸の養殖地域である広島県、岡山県、兵庫県産マガキの収穫時期における主な成分の変動について検討を行ってきた。本研究では、カキに含まれるグリコーゲンおよびミネラルの含有量の年間を通じての変動、ならびにカキの組織変化について解析し、瀬戸内海産マガキの特徴について検討したので、報告する。

試料は広島県と兵庫県で養殖、水揚げされたマガキを用いた。むき身重量、グリコーゲン含有量、8 種類のミネラル含有量を測定し、年間を通じての変動を解析した。また、組織染色を行いマガキの組織化学的解析を行った。グリコーゲン含有量は広島県では 3 月にピークを迎えて 6 月に著しく低下した。兵庫県では 2 月にピークを迎えて 5 月に著しく低下した。また、ミネラルでは、グリコーゲン含有量の減少後に、一過的に亜鉛と銅の含有量が増加することが観察された。これらの成分の変動と生殖サイクルとの関わりについても検討を行う。

In order to investigate the variation of constituents and characteristics of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the Seto Inland Sea, we had studied the variation of constituents during the harvest season of oysters from three coastal regions of Hiroshima, Okayama and Hyogo. In this study, we present variations in glycogen, mineral contents and tissue changes of oysters from Seto Inland Sea throughout the year.

We used oysters cultured and harvested from Hiroshima and Hyogo prefectures. Oyster weight and contents of glycogen and eight minerals were measured and analyzed for variation throughout the year. Tissues of oysters were analyzed histochemically. Glycogen content of oysters from Hiroshima peaked in March and decreased sharply in June. Glycogen content of oysters from Hyogo peaked in February and decreased sharply in May. Zinc and copper contents were transiently increased after period of reduction in glycogen content. We investigate that the relationship between the variation of these constituents and the reproductive cycle.

Crassostrea gigas, Glycogen, Minerals

講演番号：4H02-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

擦過処理による積極的な真菌類の接種がドライ熟成肉の製造や品質に与える影響
The effects of direct fungal inoculation on the production and qualities of dry-aged beef
○三上 奈々[1]、豊留 孝仁[2,3,4]、高谷 政宏[5]、田村 健一[6]([1]帯畜大・畜産、[2]帯畜大・獣医、[3]帯畜大・動物・食品検診セ、[4]千葉大・真菌医研セ、[5]とかち財団、[6]北一ミート（株））
○Nana MIKAMI[1], Takahito TOYOTOME[2,3,4], Masahiro TAKAYA[5], Kenichi TAMURA[6] ([1]Obihiro Univ. Agri., [2]Obihiro Univ. Vet. Med., [3]Obihiro Univ. Diagnostic Center, [4]Chiba Univ. Med. Myco. Res. Center, [5]The Tokachi Foundation, [6]Kitaichi Meat Co., Ltd.)

【背景・目的】ドライ熟成肉（Dry-aged beef : DAB）は、空気にさらしながら一定期間低温熟成庫で貯蔵された食肉製品である。独特な熟成香や味わいを特徴とし、それらはクラスト（肉表面の硬い外殻）に生育する真菌類の作用によると言われている。従来の DAB 製造では真菌類の接種を庫内に浮遊する蔵付カビの付着に依存しているが、付着度合の制御が難しいことから、熟成期間の長期化・品質の不均一性が課題とされてきた。そのため、本研究では積極的な蔵付カビの菌叢の接種（肉表面への擦過処理）を行い、DAB の品質への影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】ホルスタイン去勢牛のランプを 2 等分し、一方の表面に擦過処理（予め調製した DAB のクラスト（*Mucor flavus*、*Helicostylum purchrum*、*Penicillium* series *Camembertiorum* を菌叢に含む）を擦り付ける）を行い、もう一方は無処理とした。これらを熟成庫内（温度 2.9℃、湿度 90%）で 26 日間貯蔵し、脂肪酸組成を GC、揮発性化合物を GC-MS によって分析した。
【結果・考察】擦過処理ありの DAB のクラストでは熟成 7 日目に綿状の白い真菌類が確認され、13 日目には肉表面の全体が覆われた。一方で処理なしでは 26 日目まで目視で確認ができなかった。この結果より擦過処理が真菌の生育を促進することが示された。また、口どけに関わるオレイン酸の割合やナッツ香と表現される揮発性成分も擦過処理によって増強された。以上の結果より、菌叢の擦過処理は DAB の製造を促進し、効果的に DAB の特性を付与することが示唆された。

We established a method to produce dry-aged beef (DAB) by rub inoculation with fungal flora on the prepared DAB surface. Portions of Holstein steers' rumps were prepared by direct rub inoculation of fungal flora or without treatment, and were dry-aged for 26 days in an aging room. The fungal-inoculated DAB was almost entirely covered with white mold, in contrast to the DAB without treatment. Moreover, the proportion of oleic acid and the intensity of nine volatile compounds significantly increased in fungal-inoculated DAB. These results suggest that direct rub inoculation of fungal flora from prepared DAB may accelerate DAB production and efficiently enhance melt-in-the-mouth feeling and flavors of DAB.

dry-aged beef, direct rub inoculation, meat quality

発表責任者：三上奈々（nanam@obihiro.ac.jp）

講演番号：4H02-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

キュウリモザイクウイルスの感染がミニトマトの果実含有成分に与える影響

Effect of Cucumber Mosaic Virus Infection on Fruit Components of Tomatoes

○毛利 哲[1]、中村 茂雄[1]、進藤 友恵[2]、板橋 建[2]([1]宮城大食産業、[2]宮城県農園総研)
○Satoshi MOHRI[1], Shigeo NAKAMURA[1], Tomoe SHINDO[2], Takeru ITABASHI[2] ([1]Miyagi Univ., [2]Miyagi Prefectural Agriculture and Horticulture Research Center)

【目的】農作物のウイルス病防除において弱毒ウイルスの予防的接種は強毒ウイルスの感染リスクを軽減する有効な手段であるが、接種の手間を考えると防除効果以外の付加価値が望まれる。弱毒キュウリモザイクウイルス（CMV）接種トマトでは果実のアスコルビン酸含量の増加の例も知られているが、それ以外の成分についての知見はほとんどなく収穫物の品質を総合的に評価する必要がある。そこで本研究では、独自に分離・選抜した弱毒 CMV をミニトマトに接種し、果実の各種食品成分の変化および味への影響について検討した。【方法】ミニトマト（品種：アイコ）の苗に CMV 弱毒株 H301 を接種し、無接種区と接種区を各 6 株、1/2000a ワグネルポットに定植（2021 年 7 月 20 日）して屋外で栽培した。果実の収穫は 9/8～28 の間 2～4 日間隔で実施した。収穫した果実は重量測定後-60℃で冷凍し、凍結乾燥前後の重量差を水分とした。凍結乾燥粉末について総アスコルビン酸、リコペン，β-カロテン、総ポリフェノール、および元の水分含量となるよう蒸留水を加えて Brix 糖度および酸度を測定した。味の評価は市販のトマトから調製したジュースに食用アスコルビン酸を加えて行った。【結果】接種区では無接種区に比べ果実総数、果実重量とも若干減少していた。総アスコルビン酸含量は接種区で 9/13 以降高く、9/15 では無接種区、接種区でそれぞれ 25.7、35.6mg/100g であり最大の差が見られた。第 1 果房収穫終期から第 2 果房にかけて効果が顕著と思われた。カロテノイド、総ポリフェノール含量には有意差は見られず、また水分、Brix 糖度、酸度にも差は見られなかった。アスコルビン酸を上記の濃度差に調整したモデルのトマトジュースでの味には差は見られなかった。以上のことから、弱毒ウイルスを接種したミニトマトにおいて、アスコルビン酸は増加するが他の成分や味への影響は小さいことが示唆された。本研究は JSPS 科研費 JP19K22315 の助成を受けて行った。

Mini tomato “Aiko” plants were inoculated with an attenuated isolate of cucumber mosaic virus (CMV), and the effects of virus infection on the food components and taste of fruits were examined. After the middle of the harvest period, ascorbic acid tended to be higher in the inoculated plots, but carotenoids, total polyphenols, degrees of brix and acidity did not differ. It was suggested that ascorbic acid increased but the effects on other components and taste-related components were small.

ascorbic acid, cucumber mosaic virus, tomato

発表責任者：毛利　哲（mourisat@myu.ac.jp）

講演番号：4H02-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

機械学習を利用した機器分析によるしょうゆの官能的な特徴の予測

Prediction of sensory characteristics of soy sauce by using instrumental analysis and machine learning

○大野 直土、戸塚 直哉、大友 裕絵、今村 美穂（キッコーマン株式会社）
○Naoto OHNO, Naoya TOTSUKA, Hiroe OTOMO, MIHO IMAMURA (Kikkoman Corporation)

食品の開発において、食に対するヒトの感覚を明らかにする官能評価は重要である。しかしながら、官能評価には大きな資源（ヒト・時間）が必要となり、また感覚疲労により多サンプルの評価が難しいという課題がある。加えて、昨今では COVID-19 により人々の行動変容が生じ、ヒトを集って官能評価を行うことが困難になっている。そこで本研究では、しょうゆの香りや味に関与する成分情報を機器分析により取得し、その官能的な特徴を予測するシステムの構築を試みた。

サンプルには国内の市販のこいくちおよび減塩しょうゆを用いた。官能評価では訓練された社外パネルを対象に定量的記述分析(QDA)法を実施し、各官能特性の数値化を行った。香気成分および呈味成分のデータは、GC/MS および ^{1}H、^{13}C-NMR 分析を用いて未同定成分を含め網羅的に取得した。次いで、各官能特性の評点を目的変数、成分データを説明変数とし部分的最小二乗回帰（PLS）により予測モデルを作成した。また、クロスバリデーション（Leave-One-Out 法）にて予測精度を評価した。その結果、訓練データと比較してテストデータでは予測精度が低下し、予測モデルは過学習していることが明らかとなった（例）甘い香り - R^2 : 0.92、RMSE : 0.077、R^2_{cv} : 0.32、$RMSE_{cv}$: 0.27。過学習の原因として成分データが多く（847）官能的な特徴と関係のない成分も多く含まれることが考えられた。そこで PLS に加えて LASSO、Elastic Net、Random Forest を用いて予備的な予測式を算出し、各成分の予測式への寄与度を見積もり、その寄与度を得点化することで官能的な特徴に重要な成分を抽出した（変数選択）。この変数選択により抽出された成分を説明変数とし、再度 PLS モデルを作成したところ、テストデータにおいても高精度な予測式が得られた（例）甘い香り - 説明変数の数 : 35、R^2 : 0.99、RMSE : 0.029、R^2_{cv} : 0.92、$RMSE_{cv}$: 0.077。以上より GC/MS および NMR 分析を用いた網羅的な香気成分および呈味成分のデータから、複数の予測モデルを組み合わせた変数選択を行い、しょうゆの官能的な特徴を高精度に予測可能なシステムを構築した。

Sensory evaluation requires a large amount of resource and the COVID-19 infection has made it difficult to conduct. Therefore, we attempted to develop a system that can quickly predict sensory characteristics of soy sauce by using instrumental analysis and machine learning. We found that prediction models made using all the data obtained from GC/MS and the NMR were overfitted. In order to reduce the overfitting, we applied a variable selection method to calculate the importance of compounds from multiple prediction models. As a result, it was confirmed that this method contributes to improve the accuracy of prediction models.

Soy Sauce, GCMS, NMR

発表責任者：大野　直土（naoono@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：4H02-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

渋味飲料による脂っこさのリセット作用

Anti-greasiness effect　by tea beverages with astringency

○古居 優季[1]、岩﨑 至令[2]、坂本 裕香[2]、赤川 貢[3]、柏 計雄[4]、石井 剛志[1,2]([1]神院大院栄養、[2]神院大栄養、[3]阪府大院生命、[4]大塚食品（株）琵琶湖研)
○Yuki FURUI[1], Yukino IWASAKI[2], Yuka SAKAMOTO[2], Mitsugu AKAGAWA[3], Kazuo KASHIWA[4], Takeshi ISHII[1,2] ([1]Grad Sch. of Kobegakuin Univ., [2]Kobegakuin Univ., [3]Grad Sch. of Osaka Prefecture Univ., [4]Otsuka Foods)

食欲は、類似した風味を持つ料理を食べ続けると低下することが知られており、食事を楽しむ上で相性の良い飲料と料理の組合せは重要である。「赤ワインと肉料理」や「烏龍茶と中華料理」のように、渋味飲料と脂っこい料理 の組合せは食事相性が良いと考えられているが、科学的に実証された研究例は極めて少ない。本研究では、渋味飲料の摂取が口腔内の脂っこさを緩和し“サッパリ”させる効果を有するとの仮説を基に「脂っこさのリセット作用」を分子レベルで検証できる技術を構築し、作用機序を解明することで渋味飲料と料理の相性に科学的根拠を与えることを目的に以下の研究を実施した。

人工リン脂質膜が表面にコーティングされた 96 穴プレートを用い、異なる順序で試料を添加する(1)～(3)の実験系を構築し、嗜好飲料（緑茶、紅茶、烏龍茶、珈琲、麦茶等）とそれらの含有渋味成分（カテキン類、テアフラビン類、ウーロンホモビスフラバン類）による脂っこさのリセット作用を評価した。

(1) リン脂質膜表面に付着した油を嗜好飲料によって洗浄した際の油の残存性の評価
(2) 嗜好飲料中の渋味成分等がリン脂質膜表面に残存している際の油の付着性の評価
(3) 油を嗜好飲料に分散させた際のリン脂質膜表面に対する油の付着・残存性の評価

実験系(1)において、緑茶や紅茶飲料で有意に付着・残存する油量の低下が確認され、茶系飲料が脂っこさのリセット作用を備えていることを見出した。茶ポリフェノールを用いた検証においては、強い渋味を呈するガレート型のカテキン類・テアフラビン類で同様の結果が確認された。その際に、茶ポリフェノールの膜表面に対する結合・蓄積が認められたことから、脂っこさのリセット作用には渋味物質の膜への吸着に伴い油脂の結合を阻害するバリア機能が重要な役割を担うことが示唆された。

In many cultures around the world, people ingest a variety of astringent beverages during meals, but the reasons for this practice are unclear. It has been believed that astringent beverages such as red wine and tea make a good accompaniment for greasy foods because they have anti-greasiness effect such as rinsing effects and surfactant-like behaviors on fatty aftertaste.

We developed a new method for the characterization of the anti-greasy behaviors of astringent beverage and its components on the artificial phospholipid membranes by using 96-well plate assay-based oral model. Here, we evaluated several beverages by the method and discovered that tea beverages have strong anti-greasiness effect because barrier functions by astringent polyphenols (gallate-type catechins and theaflavins).

tea polyphenols, astringency, Anti-greasiness effect

発表責任者：石井剛志（ishii_t@nutr.kobegakuin.ac.jp）

講演番号：4H02-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

ゲラニオール配合ローズフレーバーソフトキャンディの喫食影響の研究

Study on the Effect of Eating Geraniol-Containing Rose Flavor Soft Candy

○石田 幸子、秋山 朝子（クラシエフーズ株式会社）
○SACHIKO ISHIDA, ASAKO AKIYAMA (Kracie Foods,Ltd.)

近年、ウイルスの感染予防や花粉対策などのため、マスクの着用が常態化している。このような中、マスクの着用による息苦しさ、蒸れ、臭いなどをストレスに感じる人が増えており、社会的な関心事になっている。そこで本研究では、ゲラニオール配合ローズフレーバーソフトキャンディが、マスク着用時の不快感の解決に繋がる可能性について検証した。

まず、マスク着用時に、ゲラニオール配合ローズフレーバーソフトキャンディを喫食した場合の、精神面への影響をアンケートにより確認した。その結果、キャンディを喫食することでリラックス・リフレッシュしたと感じること、気分が良化し、ネガティブな感情が減少する傾向があることを確認した。加えて、マスク内空間(マスクと体表面の空隙)の状態を調査すべく、マスク内面に付着した成分を GC/MS にて分析した。その結果、ゲラニオールが、喫食 30 分後のマスクから検出された。また、キャンディ喫食時の脳波への影響を確認した。その結果、喫食前後でα波の出現率(%)が上昇していることが確認された。

これらの結果より、ゲラニオール配合ローズフレーバーソフトキャンディを喫食することで、マスク内空間の環境が改善され、α波の出現率上昇及び、気分の良化・ネガティブ感情が減少する可能性が示唆された。

Recently, people normally wear masks to prevent the virus or pollen. Under this situation, stresses from stuffiness, dampness, and unpleasant smell when wearing masks is becoming social concern. In this study, we tested the hypothesis that geraniol-containing rose flavored soft candy reduces the stresses from wearing masks.

Firstly, we surveyed the mental effect of rose flavored soft candy by questionnaire. The result showed that they felt relaxed, refreshed and less negative after eating the candy. And from GC/MS analysis, geraniol was detected in inner layer of masks 30minutes after eating candy. In addition, we tested the effect of candy by EEG measurement. The result showed the ratio of alpha waves increased after eating the candy.

These results suggested that geraniol-containing soft candy increased the ratio of alpha waves and reduce the negative effect by improve the environment of the inner space of the masks.

Geraniol, GC/MS, alpha waves

発表責任者：石田幸子（s.ishida@kracie.co.jp）

講演番号：4H02-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

緑豆もやしの炒め加熱におけるアクリルアミド生成

Acrylamide formation in pan-fried mung bean sprout

○野田 響子[1]、安東 ひまわり[1]、多田 貴美子[1]、佐竹 海音[1]、中内 風花[1]、筒浦 さとみ[2]、島村 裕子[3]、増田 修一[3]、村田 容常[1,4] ([1]お茶大、[2]新潟大、[3]静岡県大、[4]農大)
○Kyoko NODA[1], Himawari ANDO[1], Kimiko TADA[1], Mio SATAKE[1], Fuuka NAKAUCHI[1], Satomi TSUTSUURA[2], Yuko SHIMAMURA[3], Shuishi MASUDA[3], Masatsune MURATA[1,4] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Nigata Univ., [3]Univ. Shizuoka, [4]Tokyo Univ. Agriculture)

アクリルアミド (AA) は遺伝毒性を持つ発がん物質である。食品中では主にアスパラギンと還元糖とのメイラード反応により生成し、加熱した植物性食品に含まれている。食品安全委員会が加熱食品由来の AA についてリスク評価を行った結果、炒め野菜からの摂取量が多く、中でも炒めもやしに由来する摂取量が最大であると推定された [1)]。そこで本研究では、もやしの中でも最も消費量の多い緑豆もやしについて、フライパンでの炒め加熱中における AA 生成量や、アスパラギンや糖などの反応物の量を分析し、褐変の程度と AA 生成量の関連ついて調べた。また、もやしの前処理による AA 生成の抑制効果についても検討した。

緑豆もやしをフライパンで 3, 6, 9, 12 分間炒め、Δ*E* およびアクリルアミド量の推移を分析したところ、Δ*E* の増加とともに AA 量が増加し、3 分後、9 分後には、生もやし 100 g あたりそれぞれ 100、200 μg 程度になった。しかしアスパラギンおよび糖の量については、炒め加熱中に顕著な減少は認められなかった。また、緑豆もやしペーストにアスパラギナーゼを添加・保温後炒めた場合、AA 形成量は減少した。また、緑豆もやしの予備保存や加温処理は AA の生成を抑制した。

Acrylamide (AA) is a genotoxic carcinogen and exists in various kinds of heated plant-derived food. The compound is mainly formed from asparagine and reducing sugars through the Maillard reaction in foods. Food Safety Committee in Japan conducted the risk assessments of AA in foods generated through heating in Japan. In the estimate, the intake of AA from heated vegetables was large, especially that from pan-fried or sautéed bean sprout being the largest. In this study, we analyzed the content of formed AA and substrates of AA, asparagine and sugars, and the relationship between browning and AA formation during pan-frying of mung bean sprout. We also examined a mitigation method for AA formation by pretreatment of the sprout.

Mung bean sprout was pan-fried for 12 min, then the Δ*E* value and the AA content were analyzed. The AA content was increased with the increase in Δ*E* value, reaching 100 and 200 μg/100 g pre-heated fresh sample after 3 and 9 min of heating, respectively. The content of asparagine and sugars did not decrease significantly during pan-frying. When the sprout paste was preincubated with asparaginase, the AA content in the heated past was lower than that of the control. The AA formation was also mitigated by the pre-storage or pre-mild heat treatment.

1) Food Safety Commission of Japan. *Food Safety*, **4**, 74-88 (2016).

acrylamide, mung bean sprout, pan-frying

講演番号：4H02-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

亜臨界水処理による柿果実由来ポリフェノールの低分子化

Depolymerization of polyphenols from persimmon fruits by subcritical water treatment

○楠橋 里佳子[1]、星川 慶明[1]、竹森 久美子[1]、米谷 俊[1,2] ([1]近畿大農、[2]（株）ファーマフーズ)
○Rikako KUSUHASHI[1], Yoshiaki HOSHIKAWA[1], Kumiko TAKEMORI[1], Takashi KOMETANI[1,2]
([1]KINDAI Univ., [2]Pharma Foods)

【目的】柿果実ポリフェノールには食後血糖値の上昇抑制作用があることを当研究室では明らかにしている。ポリフェノール類ではオリゴマーの生理活性が高いことが知られているので、加水分解能を有する亜臨界水により、高分子である本物質を低分子化し、その生理活性について検討した。
【方法】亜臨界水処理では、柿果実ポリフェノールを 100～240℃（20℃毎に処理温度を上昇）で各温度に達してから 5 分間保持し、低分子化を行った。ポリフェノール量は Folin-Ciocauteu 法と vanillin-HCl 法で、亜臨界水処理の生成物は HPLC（ODS、ゲル濾過）で分析した。生理活性の評価は、糖質分解酵素（α-amylase、maltase、sucrase、α-glucosidase）の阻害活性（IC_{50}）と抗酸化活性（DPPH ラジカル補足能）を用いた。
【結果】亜臨界水処理後の柿果実ポリフェノールを ODS (HPLC)で分析したところ、100～160℃までは未処理とほとんど変化はなかったが、180～240℃までは温度の上昇に伴い低分子の生成物が増加したこと、ゲル濾過（HPLC）によって分子量分布が低下していることなどから、低分子化が起こっていることが確認できた。糖質分解酵素の阻害活性および抗酸化活性は、低分子化により高くなった。

[Objective] It has already been clarified that polyphenols from persimmon fruits, mainly proanthocyanidins, have suppressed a postprandial blood glucose elevation. In general, oligomers of proanthocyanidins are known to have higher bioactivity among them. Since persimmon polyphenols were polymer, they were degraded by subcritical water having hydrolytic activity, and the physiological activity of the resulting compounds were investigated.
[Methods] For subcritical water treatment, the temperature of persimmon polyphenol solution was maintained at 100 to 240 ° C for 5 minutes after reaching each temperature. The amounts of polyphenols were analyzed by Folin-Ciocauteu method and vanillin-HCl method, and the products were analyzed by HPLC (ODS, gel filtration). The physiological activity was evaluated using the inhibitory activity (IC_{50}) of amylolytic enzymes (α-amylase, maltase, sucrase and α-glucosidase) and antioxidant activity (DPPH radical scavenging ability).
[Results] When persimmon polyphenols treated with subcritical water were analyzed by ODS (HPLC), the smaller molecules were observed at the temperature from 180 to 240℃, and a decrease in molecular weight distribution was detected by gel filtration (HPLC). Inhibitory activity against amylolytic enzymes and antioxidant activity increased according to lowering their molecular weights.

persimmon, polyphenol, subcritical water

講演番号：4H02-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム H

ウメ果実におけるプロアントシアニジンの分布

Distribution of proanthocyanidins in the fruit of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)

○堀西 朝子[1,2]、大崎 秀介[3]、尾崎 嘉彦[1] ([1]近大生物理工、[2]和歌山ノーキョー食品（株）、[3]和歌山県工業技術センター)
○Asako HORINISHI[1,2], Shusuke OSAKI[3], Yoshihiko OZAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Wakayama Nokyo Food Ind. Co., Ltd.,, [3]Ind. tech. Ctr. of Wakayama pref.)

【背景と目的】プロアントシアニジン(PA) はリンゴなどバラ科果実の機能性成分として注目されているが、同じバラ科のウメ果実の PA についてはほとんど調べられていない。そこで本研究では、ウメ果実の PA の分布を明らかにすることを目的に、最も一般的なウメの品種である‘南高’の果肉および核の PA 含量を測定すると共に、それぞれに含まれる主要な PA の分子種の特定を試みた。
【方法と結果】ウメ果肉、核の 50%EtOH 抽出物を DMAC(4-dimethylaminocinnamaldehyde)法で分析し、果実生長過程でのそれぞれの PA 濃度の変化を調べた。成熟果実の抽出物から Diaion HP20、 Sephadex LH20、HPLC を組み合わせ主要な PA を単離し、Phloroglucinol 分解法により構造を特定した。さらに HPLC-ESI-MS/MS 分析による解析を行った。果実成熟に伴い果肉の PA 含量は緩やかに増加したのに対し、核では成熟前期に急増した。完熟果実における総 PA 含量は、果肉 3.9 mg/果、核 37 mg/果であった。果肉には単量体 2 種， 2 量体 B 型 4 種、A 型 3 種、3 量体 B 型 2 種、A 型 1 種、4 量体 B 型 1 種の合計 13 種、核には単量体 2 種、 2 量体 B 型 1 種、A 型 2 種の合計 5 種の PA の存在を確認した。核で検出された PA はすべて果肉にも存在し、核から果肉への PA の移行が示唆された。
Whereas proanthocyanidins (PAs) have been focused as functional components of apples and other rosaceous fruits, information on PAs in fruit of Ume, Japanese apricot had been limited. In this study, PAs content of ‘Nanko’ fruit tissues were analyzed and structures of major PAs were determined to clarify the PAs distribution in the fruit. Fifty% EtOH extracts of flesh or endocarp were analyzed for PA content by DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde) method. The PA content in the flesh increased slowly along with the fruit maturation, whereas the those in the endocarp increased rapidly after the stone-hardening stage. Total PA content in ripe fruits were estimated to be 3.9 mg/fruit in the flesh and 37 mg/fruit in the endocarp, respectively. The major PAs were isolated from the extracts of mature fruits by the combination of chromatography using Diaion HP20, Sephadex LH20 and HPLC. The RTs on an HPLC of isolated compounds and their phloroglucinol adducts were compared with those of PA standards to identify the structure of PA. Furthermore, the PA fractions were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. Although 13 kinds of PAs, including 2 monomers, 4 B-type dimers, 3 A-type dimers, 2 B-type trimers, 1 A-type trimer, and 1 B-type tetramer were detected in the flesh, only 2 monomers, 1 B-type dimer, and 2 A-type dimers were detected in the endocarp. All PAs detected in the endocarp were also present in the flesh, suggesting the transfer of PAs from endocarp.

proanthocyanidin, *Prunus mume* Sieb. et Zucc., Japanese apricot

発表責任者：尾崎嘉彦（ozaki@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4H04-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

ジビエにおける節類加工の試み

An experiment on process gibier into dried and fermented meat

○小木曽 加奈、浜 奈々子、武藤 ゆきな (長野県立大健康発達)
○Kana KOGISO, Nanako HAMA, Yukina MUTO (Univ. of Nagano)

今回はイノシシ肉とシカ肉について乾燥加工品（節類加工）としての検討を行い、その官能的評価と食品としての衛生的な知見が得られたので報告する。肉の加工においては、カツオのなまり節の加工を参考にし、作製したものを試験試料とした。各試験試料について一般生菌数を測定した。また削り節を作成し、それを用いて 3%の熱水抽出物を作成、官能試験を行った。

今回の結果、電子レンジの加熱がある場合は脂質が適当に抜けることでなまり節状のものが作成できた。塩分を追加しないで作成した場合は味に深みがなくなるため塩分を添加して作成した。そのような添加をすることで塩分の増加、塩味の増加がみられた。官能試験の結果、総合的な評価ではシカ肉のなまり節エキスはカツオ節エキスと同程度の評価を得ることができた。各種なまり節について作成後、一般生菌数は 10 倍希釈液においてどちらもほぼ 0～3 程度であり、衛生的に作成が可能であった。

なお、本研究は科研費（20K02345）の助成を受けた。

In this study, wild boar and deer meat were examined as dried processed products, and the results of sensory evaluation and sanitary inspection as foods were obtained. In the processing of meat, the test samples were prepared by referring to the processing of Namari-bushi (dried bonito). The processed meat was used as test samples. The total viable count of bacterial colonies was measured for each sample. In addition, meat shavings were prepared and a 3% hot water extract was made from them for sensory testing.

As a result of this study, a Namari-bushi -like product could be created by appropriate removal of lipids with microwave heating made from each meat. In addition, when created without the addition of salt, the flavor lost its depth. Therefore, in this method, salt was added and processed. The addition of salt caused an increase in salt content and saltiness. However, as a result of sensory testing, deer meat namari-bushi extract was evaluated at the same level as bonito-bushi extract. In addition, the total viable count of bacterial colonies of each namari-bushi was about 0 to 3 in the 10-fold diluted solution, indicating that they can be prepared hygienically.

This work was supported by Grants-in Aid for Scientific Research(KAKENHI) (20K02345).

gibier, process, dried meat

発表責任者：小木曽加奈（kogiso.kana@u-nagano.ac.jp）

講演番号：4H04-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

加熱調理時にスジと脂肪を流出させる畜肉前処理方法の開発

A pretreatment method to promote the flow of connective tissue and fat from meat during cooking

○西村 耕作、阿部 竜也（（公財）東洋食品研究所）
○Kosaku NISHIMURA, Tatsuya ABE (Toyo Institute of Food Technology)

【背景と目的】畜肉の結合組織（スジ）や脂肪は加工工程で除去されることが多いが、除去には熟練した技術を要するうえに、多数の肉を一括で処理する方法はほとんどない。本研究では、加熱調理時にスジと脂肪が流出することで除去できるような畜肉前処理方法の開発を目指した。
【方法と結果】スジと脂肪からなる牛脂身に、プロテアーゼ処理（パパイン溶液に浸漬）、急速冷凍処理（液体窒素で冷却後解凍）ならびにこれら両方を順に処理する併用処理を施した。処理後の脂身を焼成したところ、無処理区、プロテアーゼ処理、急速冷凍処理ではそれぞれ全重量の 14、23、18%が液体として流出した。一方、併用処理においては焼成中に著しい組織の崩壊が認められ、流出量が有意に増加した（42%）。脂身の切片を作製し、各処理が組織に与える影響を観察したところ、プロテアーゼ処理区では結合組織タンパク質の分解に因ると推察される空隙が、急速冷凍処理区では脂肪細胞の細胞膜の形状の乱れが確認された。したがって、各処理はそれぞれ異なる機序で脂身の崩壊に寄与していることが示された。以上のことから、プロテアーゼ処理と急速冷凍処理の併用は、スジや脂肪の除去に対し有効な前処理方法であると考えられた。

[Objectives] Connective tissue and fat are often removed from meat during processing, but their removal requires skilled butchery techniques and few methods are available for batch processing large numbers of pieces of meat. In this study, we aimed to develop a pretreatment method to promote the flow of connective tissue and fat from meat so that they are removed during cooking.
[Methods and Results] Beef tallow consisting of connective tissue and fat was treated with protease by immersion in papain solution, or quick freezing by cooling with liquid nitrogen then thawing, or a combination of both treatments. When the tallow was grilled, 14%, 23%, and 18% of the total weight of the tallow during the control, protease, and quick freezing treatments, respectively, came out as liquid. In contrast, during the combined treatment, the tissue disintegrated during grilling and the amount of liquid coming out increased significantly to 42%. Therefore, the combination of protease and quick-freezing treatments proved to be an effective pretreatment for removing connective tissue and fat from meat during cooking.

connective tissue and fat, protease treatment, quick freezing treatment

発表責任者：西村　耕作（kousaku_nishimura@shokuken.or.jp）

講演番号：4H04-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

Mucor flavus を用いて製造したドライエイジングビーフへの味と香りの効果

Effect of dry-aging with *Mucor flavus* on beef taste and aroma

○花ケ崎 敬資[1]、安里 直和[2] ([1] 沖縄県工業技術センター、[2] 沖縄県畜産研究センター)
○Takashi HANAGASAKI[1], Naokazu ASATO[2] ([1]Okinawa Industrial Technology Center, [2]Okinawa Livestock Research Center)

本場と言われるニューヨークではカビ熟成させてドライエイジングビーフを製造するのが通常である。我々は芳醇な香りを付与する菌を *Mucor flavus* と同定しており（Hanagasaki and Asato, 2018）、沖縄県内でも本菌を使って熟成する企業が増えている。*Mucor flavus* を用いたドライエイジングビーフによる味と香りへの効果を明らかにするため、トリミング後の肉表面の各アミノ酸を LCMS によって、トリミング部位の芳香揮発性化合物をヘッドスペース固相マイクロ抽出での GCMS によって分析した。以前の研究で、カビ自身は各種アミノ酸を高く産出するものの、カビで熟成、またはしない場合どちらもトリミング後の肉内部では各アミノ酸は増加しなかった（Hanagasaki and Asato, 2018）。しかし、本研究で各アミノ酸はトリミング後の肉表面中では熟成後に増加する事が分かり、肉表面中では水分含量の勾配があると推定、そこではアミノ酸がタンパク質の分解により容易に生成されていると推定された。さらに、Wax カラムを用いた GCMS による揮発性化合物のピークの数はカビによるドライエイジングでより多く検出、また長く保持されており、*Mucor flavus* がより高極性の化合物を産出できることが示唆された。数種のアルデヒド化合物はカビドライエイジング肉のみで検出、2,4-ノナジエナール、2-オクテナール、2-ウンデセナールがナッツ香、焼いた肉の香りに関連している事が分かった。

Dry-aging beef is originally from New York and usually made by aging with mold. We succeeded in isolating the mold strain, *Mucor flavus*, creates savory odors (Hanagasaki and Asato 2018). In Okinawa, several companies already produce dry-aged beef using the mold we isolated. To reveal an effect of dry-aging with *Mucor flavus* on beef taste and aroma, each amino acid in the meat surface after trimming were analyzed by LCMS and aroma volatile compounds from the headspace of trimming part were analyzed by SPME followed by GCMS. We previously reported that each amino acid did not increase in the meat about 3cm depth from the surface after trimming in cases of dry aging with mold or not despite that mold itself produced many kinds of amino acids (Hanagasaki and Asato, 2018). However, each amino acid was found to increase in the meat surface after dry-aging in this study and then ingredient of moisture content in the meat surface where amino acids easily generate from the protein degradation was presumed. Besides, the peak number of volatile compounds by Wax column with GCMS was higher detected and peaks were retained longer in dry-aged beef with the mold. As a result, there is a high possibility that *Mucor flavus* can produce more of higher polar compounds on beef meat. Several aldehydes such as 2,4-nonadienal, 2-Octenal, and 2-undecenal detected only in dry-aged beef with the mold were found to be related to savory flavor, such as nutty and boiled meat.

Dry-aging beef, Mucor flavus, Aroma volatile compounds

講演番号：4H04-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

ドライエイジングビーフの熟成過程における可溶性成分の網羅的解析

Metabolome analysis of soluble metabolites from lean beef during dry-aging process

○新川 麗[1]、解良 康太[2]、松井 伸祐[2]、平山 雄[2]、松沢 雄斗[2]、飯嶋 益巳[1,2]、中山 勉[1,2]([1]東農大院応、[2]東農大応)
○Rei NIIKAWA[1], Kouta KERA[2], Shinsuke MATSUI[2], Takeru HIRAYAMA[2], Yuuto MATSUZAWA[2], Masumi IIJIMA[1,2], Tsutomu NAKAYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch., Tokyo Univ of Agriculture, [2]Tokyo Univ of Agriculture)



図1.トリミング前後のドライエイジングビーフ

ドライエイジングビーフは、低温乾燥状態で牛肉を熟成させる手法である。熟成の過程で、微生物の働きにより、独特の風味が生まれることから近年注目されている。しかし、熟成度の見極めについては、職人の経験に依存しているのが現状であり、客観的な品質評価手法の確立が求められている。本研究は、成分分析に基づくドライエイジングビーフの評価手法の開発のために、熟成過程における水溶性成分の変化を解明することを目的としている。本発表では、ドライエイジングビーフの赤身に含まれる水溶性成分に着目し、熟成日数に比例して増加した成分について報告する。赤身は、熟成日数が異なるドライエイジングビーフを購入し、脂身と乾燥変質部分をトリミングしたものを使用した(図1)。水/アセトニトリル/クロロホルムを用いて抽出した水溶性成分について、液体クロマトグラフィー連結質量分析器を使用し、エレクトロスプレーイオン化法(陽イオンモード)で分析した。データマトリクスの作成には PowerGet、多変量解析には MetaboAnalyst を使用した。

In the dry-aging process, beef is exposed to unimpeded airflow in a humidity- and temperature- controlled room for several weeks. During this process, fungal species on the external surface of beef help to tenderize by proteolysis and promote unique flavor. Although quality of dry-aged beef depends on the aging environment, it is evaluated by experience of purveyors. Therefore, the objective of this study was to evaluate dry-aging beef. We are going to show metabolites increasing during dry-aging process by metabolomics approach using liquid chromatography mass spectrometry (LC/Q-TOF) equipped with electrospray source operating in positive-ion mode. The beef rounds at several aging steps were purchased from supplier. After trimming the crust and fatty parts, the soluble metabolites were extracted from the remaining lean meat using water/acetonitrile/chloroform solvent system. The data matrix of components was prepared by PowerGet and multivariate analysis was performed by MetaboAnalyst.

Dry aging beef, Metabolome analysis, Multivariate analysis

発表責任者：中山勉（tn206794@nodai.ac.jp）

講演番号：4H04-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

亜臨界水中での糖の反応挙動に及ぼす緩衝液の種類の影響

Effect of the type of buffer on the reaction behavior of sugars in subcritical water

○尾西 佑一朗[1]、安達 修二[2]、谷 史人[1]、小林 敬[1] ([1]京大院農、[2]京都先端大)
○Yuichiro ONISHI[1], Syuji ADACHI[2], Fumito TANI[1], Takashi KOBAYASHI[1] ([1]Grad Sch Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ Adv Sci.)

亜臨界水は加圧条件で液体として存在する水であり、酸または塩基触媒として働く。

ガラクトース水溶液を亜臨界水処理すると、ガラクトースの異性化が起こり、タガトースとタロースが生成する。しかし、純水中の処理では、糖の異性化収率は著しく低い。本研究では、種々の緩衝液やそれらを混合した混合緩衝液中で異性化を行い、異性化収率の改善について検討すると共に、緩衝液中での副反応による有機酸などの副生成物の同定、および反応経路を検討した。

ガラクトースを種々の緩衝液や混合緩衝液に溶解した。この糖溶液を管型反応器に通液し、140℃亜臨界水処理（30～300 s）を実施し、処理液中の成分を HPLC で定量した。

ガラクトースの分解はリン酸緩衝液中とクエン酸緩衝液中で顕著であった。タガトース収率もこれら 2 種類の緩衝液中で特に高く、その収率は約 14%に達した。一方、混合緩衝液中では相乗効果は得られず、反応は各緩衝液中でのそれらの中間的な値であった。

また、何れの条件においても反応後に pH が低下し、処理液中にはグリコール酸、ギ酸、酢酸などの有機酸の生成が観察された。さらに pH の低下とともに異性化の反応速度が低下した。これは生成する有機酸が反応を抑制するためと考えられる。

Subcritical water is water that exists as a liquid under pressurized conditions. When galactose was treated in subcritical water, isomerization of galactose occurred, producing tagatose and talose.

However, the isomerization yield was remarkably low in pure water. In this study, isomerization was performed in various buffer or their mixtures to improve the isomerization yield. Formation of byproducts such as organic acids was also investigated.

Galactose was dissolved in various buffers or in the mixtures. The subcritical water treatment of galactose was carried out at 140°C for 30–300 s. The composition of the treated solution was quantified by HPLC.

The degradation of galactose was more pronounced in the phosphate buffer or in citrate buffer. The yield of tagatose was also particularly high in these two buffer, reaching about 14%. On the other hand, no synergistic effect was observed in the mixed buffer solution. Under all treatment conditions, the pH decreased with progress of the reaction, and the formation of organic acids was observed. The rate of isomerization decreased as the pH decreased. This would be due to the organic acids' formation inhibited the isomerization..

subcritical water, rare sugar, isomerization

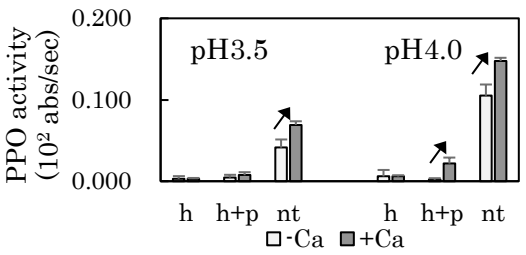
講演番号：4H04-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

中温中高圧処理においてポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼすカルシウムおよび pH の影響

Effect of calcium and pH on polyphenol oxidase activity in medium high temperature-medium high hydrostatic pressure treatment

○山崎 慎也（長野工技セ）
○Shinya YAMAZAKI (Nagano GITC)

我々は 100 MPa 程度の静水圧と加熱を併用する食品加工技術「中温中高圧処理」を用いた果実加工の研究を行っている。果実加工において、変色の原因となる「ポリフェノールオキシダーゼ(EC.l.10.3.1)」(PPO)の不活性化は重要であるが、中温中高圧処理が PPO 活性に及ぼす影響は十分に明らかにされていない。本研究において、リンゴおよびモモの凍結乾燥粉と、pH の異なる緩衝液(塩化カルシウム(Ca)有り、無し)を合わせ、中温中高圧処理を行ったところ、PPO 活性は塩化 Ca の存在下において増加し、さらには pH、圧力等の諸条件によって異なる挙動を示した。



Ca 塩は加熱による軟化を抑制することから、果実加工において欠かせない添加剤の一つである。この結果から、Ca は中温中高圧処理における PPO 活性に影響していることが示唆され、またその効果は pH 等の条件に依ることが示された。

本研究成果は、 JST 研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP トライアウト JPMJTM20NQ の支援を受けた。

We have studied fruits processing with "medium high temperature-medium high hydrostatic pressure treatment" (MTMHP) that combine a hydrostatic pressure about 100 MPa and heating. Although the inactivation of "polyphenol oxidase (EC.l.10.3.1)" (PPO) that causes discoloration is important in a fruit processing, the effect of MTMHP on PPO activity has not been fully clarified. In this study, lyophilized apple and peach powder and buffers with different pH (with and without calcium (Ca) chloride) were combined and treated by MTMHP. In result, the PPO activity increased in the presence of Ca and showed different behavior depending on pH and pressure.

Ca salt is one of the indispensable additives in a fruit processing because it suppresses softening due to heating. From this results, it was suggested that Ca affects the PPO activity in MTMHP, and it was shown that the effect depends on some conditions such as pH.

This work was supported by JST Adaptable and Seamless Technology transfer Program through Target driven R&D (A STEP) Grant Number JPMJTM20NQ.

poliphenol oxidase, high pressure, activity

発表責任者：山崎慎也（yamazaki-shinya-r@pref.nagano.lg.jp）

講演番号：4H04-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

乳化系を対象としたミクロゲルと低分子乳化剤の油滴表面における競合吸着の検討

Competitive adsorption between microgels and small molecule emulsifiers at the oil droplet surfaces in emulsion systems

○金本 悠里[1]、松宮 健太郎[1]、石井 統也[2]、松村 康生[3] ([1]京大院・農、[2]香川大・農、[3]京大・生存研)
○Yuri KANAMOTO[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Toya ISHII[2], Yasuki MATSUMURA[3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Agric., Kagawa Univ., [3]RISH, Kyoto Univ.)

【背景と目的】タンパク質や多糖類の「ミクロゲル」を用いて調製されるエマルションは、油滴の合一に対する高い安定性等のユニークな特性を発現する。このような加工機能性の発現には、ミクロゲルが高いエネルギー障壁をもって油滴表面に不可逆的に吸着することが必要であるが、実際の食品のような低分子乳化剤が混在する系で吸着状態が維持されるかどうかは明らかにされていない。本研究では、低分子乳化剤存在下でのミクロゲルの不可逆的吸着の可能性を検証することを目的として、乳化系を対象にミクロゲルと低分子乳化剤との油滴表面における競合的相互作用を解析した。
【材料と方法】ミクロゲルのタンパク質素材として乳清および大豆タンパク質を、多糖類素材として寒天とカードランを用いた。低分子乳化剤は Tween20、SDS、CTAB を用いた。トップダウン的アプローチにより作成したミクロゲルの分散液と大豆油を用いてエマルションを調製後、低分子乳化剤を添加した。これらエマルションを 25 ℃で静置しクリーミング挙動の観察を行い、油滴表面における吸着層の変化が生じているのかを推定した。さらに、油滴表面のタンパク質および多糖類濃度(mg/m^2)を生化学的手法によって測定し、低分子乳化剤によるミクロゲルの置換作用を定量的に評価した。
【結果と考察】タンパク質および多糖類ミクロゲルは、クリーミング挙動の観察結果および界面組成の解析結果より、低分子乳化剤により置換される傾向にあり、その程度は低分子乳化剤の種類により異なっていた。このことより、ミクロゲルと低分子乳化剤とは油滴表面上で競合的に相互作用することが明らかとなった。以上から、ミクロゲルは実際の食品のような系で用いた場合には、そのユニークな加工機能性が発揮できない可能性があることが示唆された。

Microgels obtained from proteins and polysaccharides are known as a novel class of emulsifying agents to impart unique properties such as high stability against coalescence to emulsions. To impart such functional properties, microgels are required to irreversibly adsorb to the oil droplet surfaces even in real food systems containing small molecule emulsifiers. In this study, to give insight into the competitive adsorption between microgels and emulsifiers on the interface, the creaming of emulsions and surface excess of microgels on the droplet surface were investigated, when small molecule emulsifiers were added to microgel-stabilized emulsions. Protein and polysaccharide microgels on the oil droplet surfaces tended to be displaced by small molecule emulsifiers, and the degree of displacement was dependent on the small molecule emulsifier type, indicating the competitive interaction between microgels and small molecule emulsifiers on the oil droplet surfaces.

microgel, competitive adsorption, emulsion

発表責任者：松宮健太郎（matsumiya.kentaro.6w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4H04-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

卵白ミクロゲルの卵黄マヨネーズへの添加効果

The effects of egg white microgels on the properties of mayonnaise

○半田 明弘[1,2]、井上 陽菜[3]、小山 翔大[2]、辻井 良政[3]（[1]キユーピー、[2]東農大キユーピーエッグイノベーション、[3]東農大農化）
○Akihiro Handa[1,2], Hina Inoue[3], Shota Koyama[2], Yoshimasa Tsujii[3] ([1]Kewpie Corp., [2]Kewpie Research Div. for Egg Innovation, [3]Agri. Chem., Tokyo Univ. of Agri.)

マヨネーズは卵黄または全卵を乳化剤とした高油含量の水中油滴型のエマルションである。本研究では卵黄マヨネーズへの卵白ミクロゲル添加効果を保存中の粘度変化から検討した。

卵白ミクロゲルは卵白加熱ゲルに等重量の水を加え高速ブレンダーで磨砕して調製した。マヨネーズの基本配合は食用油、卵黄、4.5%酢酸、食塩をそれぞれ 70%、14.4%、14%、1.6%とし、卵黄固形分の 9.3%を卵白または卵白ミクロゲル固形分で置換えた。調製直後、24 時間後、48 時間後に粘度、油滴メディアン径（分散媒は水または 5%SDS 溶液）を測定した。水相部のみを混合攪拌したものも同様に粘度測定した。マヨネーズの油滴界面吸着タンパク質を電気泳動より同定した。

マヨネーズおよび水相部の保存後の粘度上昇率は、対照＞卵白置換え＞卵白ミクロゲル置換えの順で高くなった。水分散と 5%SDS 溶液分散の油滴メディアン径の差、すなわち油滴凝集の程度はどの試験区も保存後に小さくなった。また、油滴界面には卵白タンパク質はほとんど認められなかった。

以上より、卵白および卵白ミクロゲルはマヨネーズの水相に存在し、水相中の卵黄タンパク質の相互作用を阻害することにより、マヨネーズの経時的な粘度上昇を抑制すると考えられた。

Mayonnaise is an emulsion with high oil content stabilized by egg yolk or whole egg. The objective of this study was to investigate the effect of partial replacement of egg yolk with egg white microgels on the stability of mayonnaise. Egg white microgels were prepared by homogenizing the mixture of an equal amount of egg white microgels and water. The basic formula of mayonnaise was canola oil (70%), egg yolk (14.4%), 5% acidic acid solution (14%), and salt (1.6%). The solid portion of egg yolk was replaced 9.3% with that of egg white or egg white microgels. The viscosity and the particle size suspended with water or 5% SDS solution were measured after storage. The aqueous phase was prepared, and the viscosity was measured at the same time interval. SDS-PAGE was done to identify the protein species on the interface of oil droplets. The increasing ratio of the viscosity of mayonnaise and the aqueous phase was in the order of control > egg white replacement > egg white microgels replacement. The degree of aggregation of oil droplets got smaller after storage. Almost no egg white proteins were detected at the interface of oil droplets. These results demonstrate that egg white proteins or egg white microgels exist in the aqueous phase of mayonnaise and hinder the interaction of egg yolk proteins mainly in the aqueous phase resulting in restraining the increase of the viscosity during storage.

Egg white, Microgel, Mayonnaise

発表責任者：半田明弘（ah206741@nodai.ac.jp）

講演番号：4H04-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

フレッシュなレモンの香りをオリーブオイルに移す方法

Evaluation of the process for flavoring limonene from lemone to olive oil

○柏木 彩子（小豆島ヘルシーランド（株））
○AYAKO KASHIWAGI (Shodoshima Healthyland Co., Ltd.)

近年、ハーブや柑橘、スパイスなどの香りや風味を移したオリーブオイル（フレーバーオリーブオイル）が人気である。その中でも人気が高いのがレモンオリーブオイルである。通常、レモンオリーブオイルは、オリーブ果実とレモン果実を一緒に搾油機に投入し、搾油することによって製造される。しかしながら、搾油時にレモン果実から出現する酸性果汁がオリーブオイルの品質に影響することが考えられた。そこで、我々はレモンオリーブオイルの新たな製法について検討した。レモンの爽やかな香りを構成する物質はモノテルペン炭化水素類（リモネン、α-ピネン、β-ピネン、γ-テルピネンなど）であり、その中でも成分割合が最も高いのがリモネンである。電子嗅覚システム（Alpha MOS 社製 HERACLES II）を用いて、レモンオリーブオイル中のリモネンを定量した。まず、レモン果実を果皮部（フラベドとアルベド）とそれ以外に分別し、それぞれをオリーブオイルに直接作用させてレモン由来の香気成分の抽出を行った。その結果、リモネンは主に果皮（フラベド）部に局在することがわかった。さらに、果皮（フラベド）からリモネンをオリーブオイルに最大限に抽出するための条件（抽出時間、温度、フラベド投入量）を検討し、最適条件を得た。得られたレモンオリーブオイルの熱安定性についても検討したので報告する。

Lemon-flavored olive oil is one of several popular flavored oils on the market due to its tart flavor. In general, to obtain lemon-flavored olive oil, fresh lemons are directly added to be olive mill together with fresh olives for extraction. However, this method has negative effects on oil quality, such as increase in free fatty acidity, dramatic decreases in phenolics, and the sensory profile of the product. Because there is a risk of physical instability of the product upon exposure to the acidic juice from fresh lemons, as it is an oil-in-water dispersion. This study aimed to examine the amount of limonene that is transferred from lemon to olive oil under different flavoring conditions. Limonene is known to be most abundant in lemon, and other terpene compounds, such as α-pinene, β-pinene, and γ-terpinene. Volatile compounds in the headspace of the oil samples were analyzed using a HERACLES II electronic nose (Alpha MOS). First, the presence of limonene in different parts of fresh lemon tissue (flavedo, albedo, and tissues other then flavedo and albedo) was examined in olive oils flavored with each tissue. Limonene was found to be mainly distributed in the flavedo. Effects of extraction time, temperature, and quantity of the flavedo added were determined as independent variables. Thermal stability of the flavored oil was evaluated.

Olive oil, Lemon, limonene

講演番号：4H04-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム H

乳化 *d*-リモネン溶液の噴霧乾燥における *d*-リモネン残留率に及ぼす再構成油滴径の影響

Effect of reconstituted oil-droplet diameter on *d*-limonene retention during spray drying

○吉井 英文[1]、高重 至成[2]、アフロザ スルタナ[3] ([1]摂大農、[2]愛大連農、[3]チッタゴン獣医大)
○Hidefumi Yoshii[1], Shisei Takashige[2], Sultana Afroza[3] ([1]Setsunan Univ., [2]Ehime Univ., [3]CVASU Univ.)

乳化フレーバー粉末は，微細な油滴を含むエマルションを噴霧乾燥することにより得られる．噴霧乾燥後の再構成乳化油滴平均径と平均粉末径がフレーバー残留率に及ぼす影響について，*d*-リモネンをモデルフレーバーとして用い、賦形剤としてショ糖、ラクトース、マルトデキストリン（DE=25, および DE=19）乳化剤として加水分解ホエイタンパク質を用いて検討した。*d*-リモネンは、中鎖脂肪酸オイル（MCT オイル）に重量比 0.2 で溶解した。固形分濃度 60wt%, 固形分基準で賦形剤 35.7wt%, 乳化剤 7wt%, 抗酸化剤アスコルビン酸ナトリウム 3.4wt%、*d*-リモネン入り MCT オイル 53.9wt%の組成の溶液を乳化後、入口温度 140℃、出口温度 82-92℃で乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末を作製した。

d-リモネンの噴霧乾燥後の残留率を、再構成油滴平均径 *d*e と平均粉末径 *d*p の比(*d*e/*d*p)に対してプロットした結果、良好な負の相関関係が得られた。*d*-リモネンの安定な乳化溶液の場合、油滴が大きなほうが *d*-リモネンの揮発が大きく残留率が小さかった。粉末表面 *d*-リモネン量を包括 *d*-リモネン量で割った表面油率をプロットすると、*d*e/*d*p が 0.01 以上では 10 以上と非常に大きくなり、このことが未包括の *d*-リモネンの揮発が大きいことが *d*-リモネン残留率が小さくなる要因と考えられた。賦形剤の種類の違いによる *d*-リモネン残留率への影響は小さかった。

Effects of the average diameter of the reconstituted emulsified oil droplets and the average powder diameter after spray drying on the retention of d-limonene were investigated with sucrose, lactose, or maltodextrin (DE = 25, and maltodextrin) as wall material, 35.7wt%, and hydrolyzed whey protein as an emulsifier, 7wt%. d-Limonene was dissolved in medium chain fatty acid oil (MCT oil) at a weight ratio of 0.2. Solid content was 60wt% and core oil content was 53.9wt%. Emulsified *d*-limonene solution was feed to spray dryer and spray-dried at 140ºC, inlet air temperature and 82-92 ºC, outlet air temperature.

Plotting of the retention of *d*-limonene after spray drying against the ratio (*d*e/*d*p) was obtained a good negative correlation. Larger oil droplets might be larger volatilization of *d*-limonene and smaller the retention. The surface oil ratio on the powder to the encapsulated *d*-limonene become above 10 at the value (*d*e/*d*p) above 0.01. These results suggest non-encapsulated *d*-limonene might be evaporated during spray drying. Effect of different types of wall material on the retention of *d*-limonene could not be found.

spray drying, flavor, retention

講演番号：4H07-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

線虫モデルにおけるフェルラ酸ルチノシドの神経保護効果および作用機序の解析

Analysis on neuroprotective effects of ferulic acid rutinoside in *C. elegans*

○守谷 望[1]、松本 果楠子[1]、バグドウ　アブデル ファワズ[1]、鄭 屹峰[2]、片山 茂[1,2] ([1]信州大院農、[2]信州大バイオ研)
○Nozomi MORIYA[1], Kanako MATSUMOTO[1], Fawaz Bagoudou Abdel[1], Yifeng ZHENG[2], Shigeru KATAYAMA[1,2] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. Biomed.)

高齢化社会の進展に伴い、アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患の患者数は増加の一途を辿っており深刻な社会問題となっている。我々はこれまでに、フェルラ酸ルチノシド（FAR）を合成し、FAR の水溶性及び細胞透過性がフェルラ酸（FA）に比べて向上すること、さらには FAR がアルツハイマー病モデル線虫において神経保護効果を発揮することを明らかにした。そこで本研究では、パーキンソン病（PD）関連神経毒を用いて線虫モデルにおける FAR の神経保護効果およびその作用機序について検討した。FAR は韃靼ソバ由来ルチナーゼの逆反応を利用して合成した。同調培養した野生型系統 N2 線虫に試料とドーパミン作動性神経毒である 6-OHDA を添加し生存率を測定した。N2 線虫の生存率は 6-OHDA の添加により低下するのに対して、FAR の添加は 6-OHDA による生存率低下を抑制した。FOXO 転写因子のホモログ DAF-16 および酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 のホモログ SKN-1 のノックアウト線虫においては、6-OHDA に対する FAR の神経保護効果は消失した。インスリン/IGF1 シグナル経路（IIS 経路）は DAF-16 や SKN-1 を直接抑制することが知られている。インスリン様受容体 DAF-2 のノックアウト線虫では FAR の神経保護効果が見られなかった。以上の結果より、6-OHDA に対する FAR の神経保護効果には、IIS 経路の抑制を介したストレス抵抗性の向上が関与することが示唆された。

We synthesized new rutinoside of phenol compounds using rutinase, a transglycosidative enzyme. The purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effects of ferulic acid-rutinoside (FAR) against 6-OHDA in *Caenorhabditis elegans*. FAR was prepared using the reverse reaction of hydrolysis of rutinase obtained from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) seeds. 6-OHDA was used to induce dopaminergic neurotoxicity in *C. elegans* as a model of Parkinson's disease. 6-OHDA treatment resulted in a significant decrease in the viability of wild-type N2; however, the pretreatment with FAR suppressed the decrease in N2 viability. The neuroprotective effects of FAR against 6-OHDA was not observed in *daf-16*, *skn-1*, and *daf-2* mutant worms. Insulin and insulin-like growth factor signaling (IIS) pathway plays a major role in the control of longevity, and DAF-2 in IIS pathway inhibits DAF16 and SKN-1 activities. These results suggest that the neuroprotective effects of FAR against 6-OHDA might be caused by enhancement of stress resistance via inhibition of IIS pathway.

Neuroprotection, *C. elegans*, Ferulic acid

講演番号：4H07-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

脳腸相関を活性化する熟成ホップ由来苦味酸の単回摂取による自律神経活性化と注意機能改善

Supplementation with matured hop bitter acids improves attention via the activation of autonomic nerve

○金留 理奈[1]、髙良 毅[2]、梅田 聡[3]、阿野 泰久[1]([1]キリンホールディングス株式会社、[2]タカラクリニック、[3]慶應大文学部)
○ Ayana Kanatome[1], Tsuyoshi Takara[2], Satoshi Umeda[3], Yasuhisa Ano[1] ([1]Kirin Holdings Company, Ltd., [2]Takara Clinic, [3]Keio Univ.)

超高齢社会を迎え、加齢に伴う脳や心の健康が大きな社会課題となっている。我々はビール原料であるホップを熟成することによって穏やかな苦味を持つ熟成ホップ由来苦味酸（MHBA）が生成されることを発見した。MHBA は、消化管の特定の苦味受容体に作用し、自律神経の一つである迷走神経を介した脳腸相関の活性化により、モデル動物の認知機能やうつ様行動を改善すること、またアルツハイマー病の予防効果が報告されている。さらに MHBA の継続摂取は健常中高齢者の認知機能や気分状態を改善することを報告されている。しかし、ヒトでの機序は検証がなされていない。本研究では MHBA が自律神経活動へ及ぼす影響を評価するため、健常な男女を対象にランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験を実施した。30～64 歳の被験者 34 名を 2 つのシークエンスに 17 名ずつ無作為に割り付け、MHBA またはプラセボを単回摂取させた。試験食品の摂取前後に認知機能検査を実施し、心拍計用いて認知機能課題中の心拍変動を継続的に記録した。その結果、MHBA の単回摂取によって、課題中の HF（副交感神経活動の指標）および TP（自律神経総活動の指標）がプラセボ比較で有意に増加した（$p = 0.033$ および 0.025）。さらに、MHBA は、注意機能および実行機能を評価する認知機能スコアをプラセボ比較で有意に増加させた（$p = 0.006$ および 0.022）。迷走神経刺激によって HF が増加することが過去の研究より報告されており、本結果より MHBA は脳腸相関を介して認知機能や気分状態を改善することがヒトにおいても示唆された。

Matured hop bitter acid (MHBA) has been shown to improve cognitive function and depression-like behavior in mice and to prevent Alzheimer's disease pathologies via the activation of vagal nerve, one of the autonomic nerves. Continuous intakes of MHBA have been reported to improve cognitive function and mood state in healthy middle-aged adults. However, the underlying mechanisms remain unclear. In this randomized double-blind placebo-controlled crossover study, we evaluated the effect of single supplementation with MHBA on autonomic nervous system activity in humans. Thirty three healthy men and women (30-64 years old) were supplemented with MHBA or placebo. Cognitive tasks were conducted before and after the intake of the test foods. In addition, heart rate variability during the task was monitored. Compared with the placebo, a single supplementation with MHBA showed a statistically significantly increased HF (high frequency) and TP (total power) during the task. Additionally, MHBA significantly increased the task scores of attention and executive function.

autonomic nerve, attention, cognitive

発表責任者：金留理奈（Ayana_1_Kobayashi@kirin.co.jp）

講演番号：4H07-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

黒ショウガ（*Kaempferia parviflora*）による脳認知機能改善効果の検証

Verification of the effects of black ginger (*Kaempferia parviflora*) on improving brain cognitive function

○吉田 泉[1]、吉田 香[2]、高橋 有志[1]、藤田 和弘[1]、五十嵐 友二[1] ([1]日本食品分析セ、[2]同志社女大)
○Izumi Yoshida[1], Kaoru Yoshida[2], Yushi Takahashi[1], Kazuhiro Fujita[1], Tomoji Igarashi[1] ([1]JFRL, [2]Doshisha W. Col)

高齢化社会に伴い認知症の患者数が増加し、社会的問題となっている。認知症の半分以上を占めるアルツハイマー型認知症の発症においては、炎症が関与すると言われており，抗炎症作用を持つ物質が予防となる可能性が示唆されている。また、近年、神経細胞の分化・再生を促進させる低分子物質が脳老化改善・認知症予防に有効であることも示されている。これまで我々は，PC-12 細胞を用いた試験で，黒ショウガ(KP)に神経突起伸長作用があること，また，加齢マウスを用いた行動試験および脳の免疫染色試験で，KP は脳内炎症を抑え，認知機能改善効果があることを報告してきた。今回，KP 投与マウス群(KP 群)と普通食投与マウス(CN 群)の脳のプロテオミクス解析を行い，KP の作用機構の解明を試みた。KP 群では，HSP90 や Microtubule-associated protein 1A (Map1a)，Cell division control protein 42 homolog (Cdc42)が増加し，Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin (Hpca)，Macrophage migration inhibitory factor (Mif)，α-synuclein (Snca)が減少していた。この結果より KP によって神経突起伸長が促進され，炎症が抑制されていることが確認できた。KP の抗炎症作用における関与成分としてはポリメトキシフラボン(PMF)が知られている。神経突起伸長作用においても PMF が関与成分であるか PC-12 細胞を用いて調べた。PMF の一種の 5,7,4’-トリメトキシフラボン(TMF)に神経突起伸長作用が認められた。さらに，KP エキス(KPE)および PMF にβ-アミロイド凝集抑制効果があるかを ThT アッセイにより調べた。KPE および TMF にβ-アミロイド凝集抑制効果があり，IC50 はそれぞれ 7.5μg/mL，16.5μM であった。以上のことより、KP の PMF は認知機能改善作用を持つ有効な機能性素材であることが示唆された。

We analyzed the brain proteomics of KP-administered mice (KP-G) and normal diet-administered mice (CN -G), and attempted to elucidate the mechanism of action of KP. In the KP-G, HSP90, Map1, Cdc4 increased, while Hpca, Mif, Snca decreased. KP was considered to promote neurite outgrowth and suppress inflammation. Polymethoxyflavone (PMF) is known as a component involved in the anti-inflammatory action of KP. We investigated whether PMF was also a component involved in neurite outgrowth using PC-12 cells. A neurite outgrowth effect was observed in 5,7,4'-trimethoxyflavone (TMF), a type of PMF. In addition, we examined whether KP extract (KPE) and PMF have a β-amyloid aggregation inhibitory effect using ThT assay. KPE and TMF had β-amyloid aggregation inhibitory effects, and IC50 was 7.5 μg / mL and 16.5 μM, respectively. These results suggested that PMF of KP was an effective functional material improving a cognitive function.

black ginger, cognitive, proteomics

発表責任者：吉田　泉（yoshidai@jfrl.or.jp）

講演番号：4H07-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

緑茶成分ストリクチニンの老齢マウス海馬における神経新生促進作用

The effect of strictinin on hippocampal neurogenesis in old mice

○松井 優樹、李 寛雨、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Yuki MATSUI, Kwanwoo LEE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

ストリクチニンは緑茶に含まれる加水分解型タンニンの一種であり、抗ウイルス作用や IgE 産生阻害活性が報告されているが、その他の機能性については不明である。そこで本研究では、ストリクチニンの新たな生体調節作用を明らかとするため、ストリクチニンが脳機能に与える影響について検討した。

66 週齢雄性 C57BL/6J マウスにストリクチニン 10 mg/kg b.w を 14 日間経口投与し、行動試験及び臓器重量の測定を行った。その結果、新奇物体認識試験において、ストリクチニンの投与による認知機能の向上が認められた。また、肝臓、腎臓、脾臓、睾丸周辺脂肪の重量に変化はみられなかった一方で、脳重量は有意に増加した。そこで、ストリクチニンが脳機能に与える作用メカニズムを明らかにするため、海馬における脳機能関連タンパク質発現を評価した。その結果、神経可塑性促進の指標である CREB のリン酸化が確認されるとともに、神経新生関連タンパク質である BDNF、SOX2、DCX、NeuN の発現上昇が認められた。以上の結果より、ストリクチニンは海馬において神経新生および可塑性を誘導することで、認知機能を向上させる可能性が示された。

Strictinin, one of the ellagitannin, has been reported to have various bioactivity, including antiviral and IgE production inhibitory activities but its other functionalities are unknown. In this study, we investigated the effect of Strictinin on brain function to elucidate new bioregulatory action.

Old (66 week) male C57BL/6J mice were orally administered Strictinin 10 mg/kg b.w. daily for 14 days and behavioral tests and organ weights were measured. The result showed that the administration of Strictinin improved the cognitive function of old mice in the novel object recognition test. Interestingly, brain weight was significantly increased whereas the weight of liver, kidney, spleen, and epididymal fat was not changed in old mice treated with strictinin. To clarify the mechanism of its effect on brain function, we evaluated the expression of brain function-related proteins in the hippocampus. The result showed that phosphorylation of CREB to indicate neuroplasticity and expression of BDNF, SOX2, DCX and NeuN, neurogenesis-related proteins, were increased. These results suggest that Strictinin improves cognition function and hippocampal neurogenesis.

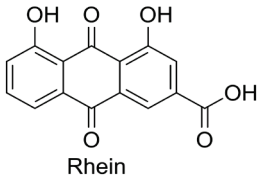
strictinin, brain function, neurogenesis

講演番号：4H07-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

消化管に作用する天然成分から見出された TRPA1 活性

TRPA1 activity found in natural compounds acting on the gastrointestinal tract

○新田 貴大[1]、鴨井 享宏[1]、岩﨑 有作[2]([1]ハウス食品グループ本社（株)、[2]京都府立大院 生命環境科学)
○Takahiro NITTA[1], Takahiro KAMOI[1], Yusaku IWASAKI[2] ([1]HOUSE FOODS GROUP INC., [2]Kyoto Prefectural Univ.)



Rhein

【目的】TRPA1 チャネルは辛味受容に関与する三叉神経だけでなく、消化管や内臓感覚神経にも発現し、消化管運動等に関与している。従って、消化管に作用する天然素材からも TRPA1 アゴニストを見出せる可能性がある。本研究では、便秘改善作用を持つ大黄の成分“Rhein”（4,5-Dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid）に着目し、その TRPA1 活性を調べた。
【方法と結果】ヒト TRPA1 を安定的に発現させた HEK293 細胞を作出し、細胞内 Ca^{2+}イメージング法により Rhein の TRPA1 活性を評価した。TRPA1 アゴニストの Allyl isothiocyanate (30 μM)に対して、Rhein は 200 μM で 85%の活性を示した。この活性は TRPA1 アンタゴニストの A-967079 によって消失した。一方、Rhein は、ヒト TRPV1 あるいはヒト TRPM8 発現 HEK293 細胞のいずれに対しても活性を示さなかった。Rhein の構造活性相関を検証するために、Rhein 類縁体の TRPA1 活性を評価した。Rhein におけるカルボキシ基がメトキシ基で置換された化合物は活性が Rhein 比 16%まで低下し、メチル基で置換された化合物は活性を示さなかった。
【結語】Rhein は TRPA1 チャネル特異的アゴニストであり、その活性にはカルボキシ基が関与する。

TRPA1 channels are expressed not only in the trigeminal nerve and responsible for the pungency receptor, but also in the gastrointestinal tract and involved in intestinal peristalsis. Therefore, it could be possible to discover TRPA1 agonists from traditional herbal medicines affect the gastrointestinal tract. In this study, we focused on the bioactive compound “Rhein” in Rhubarb which has constipation-improving properties, and examined its TRPA1 activity.
The activity of hTRPA1 expressed in HEK293 cell was evaluated by calcium imaging. TRPA1 was activated by Rhein and inhibited by addition of A-967079, one of the antagonists. In addition, both hTRPV1 and hTRPM8 were not activated by Rhein. Moreover, the structure-activity relationship was investigated using analogues of Rhein. Consequently, the compounds without carboxy groups did not show any activity.
In conclusion, we found that Rhein is an agonist that specifically acts on TRPA1 channel.

Trpa1

発表責任者：新田貴大（t-nitta@housefoods.co.jp）

講演番号：4H07-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

緑茶カテキン EGCG の肝細胞由来細胞外小胞を介した生体調節作用

The effects of green tea polyphenol EGCG are mediated by extracellular vesicles derived from hepatocytes

○宮脇 早希[1]、村田 希[1,2]、丸亀 裕貴[2]、藤村 由紀[2]、立花 宏文[2] ([1]愛媛大農、[2]九大院農院)
○Saki MIYAWAKI[1], Motoki MURATA[1,2], Yuki MARUGAME[2], Yoshinori FUJIMURA[2], Hirofumi TACHIBANA[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kyushu Univ.)

緑茶カテキンの主成分である（－）-Epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）は、細胞膜上受容体である 67-kDa laminin receptor（67LR）に結合し、様々な生体調節作用を発揮することが明らかになっている。一方、細胞外小胞（EVs）は細胞から分泌される直径 50-150 nm の顆粒状の物質で、核酸やタンパク質を内包しており、細胞間のコミュニケーションを担っている。EVs は生理学的な現象や疾患に関与しており、食品成分の機能性発現に関わる因子となりうる可能性がある。そこで本研究では、EGCG が肝細胞から放出される EVs を介して神経細胞の機能に与える影響を検討した。
ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 の培養上清を超遠心分離することで EVs を回収し、ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y 細胞に添加した。EGCG 処理した HepG2 細胞から放出された EVs を添加した SH-SY5Y 細胞では、細胞の増殖ならびに生存に影響は見られなかったものの、脳機能を改善する遺伝子（BDNF, NGF, BCL-2, Neprilysin）の発現量が増加した。以上より EGCG は肝細胞から放出される EVs を介して脳機能を改善する可能性が示された。

(－)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) is a major polyphenol component of green tea that shows various pharmacological properties through a cell surface receptor, 67-kDa laminin receptor (67LR). Extracellular vesicles (EVs) are granular substances released from cells with a diameter of 50-150 nm, which contain nucleic acids and proteins and are responsible for cell-to-cell communication. The modulation of EVs secretion by polyphenols may be partially relevant to their physiological effects. In this study, we investigated the relationship between EGCG and EVs. EVs released from EGCG-treated HepG2 cells had no effect on the viability of SH-SY5Y cells but increased BDNF, NGF, BCL-2, and Neprilysin mRNA expression in SH-SY5Y cells. These results suggest that EGCG improves brain function via EVs released from hepatocytes.

EGCG, Extracellular vesicles, Hepatocytes

講演番号：4H07-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

ガランガル抽出物の注意機能改善作用および生理機能に及ぼす影響

The effect of galangal extract on attentional and physiological function

○對馬 千沙都、田立 益巳、加藤 敬太、森戸 暁久、高岡 彰子（大正製薬株式会社　セルフメディケーション研究開発所）
○Chisato TSUSHIMA, Masumi TADACHI, Keita KATO, Akihisa MORITO, Akiko TAKAOKA (R&D Laboratories, Self-medication, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的・背景】ショウガ科の植物であるガランガルの抽出物は、臨床試験において注意力・覚醒水準を向上させることが報告されているが、その詳細な作用やメカニズムは明らかになっていない。一方、同様の注意力向上作用を有するカフェインは、アデノシン受容体を阻害することや、高用量において中枢興奮作用や心血管系に影響を及ぼすことが知られている。そこで、本研究ではガランガル抽出物の注意機能に対する作用や、中枢神経系や心血管系などの生理機能に対する影響を明らかにすることを目的として検討を行った。
【方法・結果】マウスを用いた 5-選択反応時間課題により、ガランガル抽出物の注意機能および衝動性への作用を評価した。ガランガル抽出物は注意機能の低いマウスの無反応試行率を有意に低下させ、注意機能を改善した。一方、衝動性への影響は認められなかった。次に、自発運動量に対する影響を検討したところ、カフェインでは自発運動量が有意に増加したが、ガランガル抽出物では変化が認められなかった。さらに、心血管系への影響を検討するため、テールカフ法によりラットの心拍数及び血圧を測定したところ、カフェインでは心拍数や血圧が有意に上昇したのに対して、ガランガル抽出物ではいずれも変化が認められなかった。
【考察・結論】ガランガル抽出物は注意機能を改善するが、カフェインのような中枢興奮作用や心血管系への影響を示さないことが明らかとなった。

Extract of galangal, a member of the ginger family, has been reported to improve attention and alertness levels in clinical trials. However, its detailed effects and mechanisms have remained unclear. Caffeine also improves attention and alertness levels and has been known to block adenosine receptors, while it shows central excitatory and cardiovascular effects at high dose. In this study, we investigated the effect of galangal extract on attentional function and physiological function (e.g., central nervous and cardiovascular system). In a 5-choice serial reaction time task, galangal extract significantly reduced the rate of omissions in mice in low-attentive group. Galangal extract had no effect on impulsivity. Caffeine significantly increased spontaneous locomotor activity, heart rate and blood pressure, while galangal extract had no effects. These results suggest that galangal extract improves attentional function, without exhibiting central excitatory and cardiovascular effects which are observed by caffeine intake.

galangal extract, attentional function, caffeine

発表責任者：對馬千沙都（c-tsushima@taisho.co.jp）

講演番号：4H07-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスに対するジオスゲニンの血中ステロイドホルモンに及ぼす影響

Effect of diosgenin on level of steroid hormones in streptozotocin-induced diabetes ICR mice

○小野田 圭汰[1]、吉川 悠子[1,2]、吉岡 泰淳[1]、三好 規之[1] ([1]静県大院薬食、[2]日獣大獣)
○Keita ONODA[1], Yuko YOSHIKAWA[1,2], Yasukiyo YOSHIOKA[1], Noriyuki MIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. of Integ. Pharm. Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka, [2]Sch. of Vet. Med., Nippon Vet. and Life Sci. Univ.)

ステロイドホルモンは、生体内において血糖値の上昇や水分の保持など多義的な作用をもつ一方で、過剰分泌により高血糖や脂質代謝異常などを引き起こすことが報告されている。血中ステロイドホルモン量を調節することは、健康増進につながる。ジオスゲニンは、血糖値の上昇抑制や脂質代謝異常の改善、大腸がん予防など多様な効果が報告されているステロイドサポゲニンである。そこで本研究では、LC-MS を用いて、ジオスゲニン摂取による血中ステロイドホルモンへの影響を検討した。5 週齢雌性 ICR マウスにストレプトゾトシン (STZ) を 250 mg/kgBW となるように単回腹腔内投与し糖尿病を誘発させた。STZ 投与マウスには、通常食 AIN-93M、100 ppm または 500 ppm ジオスゲニン混餌を自由摂取させた。また、対照として生理食塩水を投与したマウスには通常食または 500 ppm ジオスゲニン混餌を自由摂取させた。10 週間飼育後、血液中の糖質コルチコイドを LC-MS を用いて測定した。その結果、STZ の投与は、血中グルココルチコイド濃度を上昇させた。しかしながら、その上昇はジオスゲニン摂取により抑制された。また、通常食群においても、ジオスゲニンの摂取は血中グルココルチコイド濃度を減少させた。このことから、ジオスゲニンは血中のグルココルチコイド濃度の上昇を調節することが明らかとなった。

Steroid hormones have multiple effects *in vivo*, such as increasing blood glucose levels and water retention. On the other hand, excessive secretion of steroid hormones causes hyperglycemia and abnormalities in glycolipid metabolism. Regulation of steroid hormones in the blood leads to health promotion. Diosgenin, a Steroid sapogenin, has been reported to have various effects such as suppression of elevated blood glucose levels, improvement of lipid metabolism abnormalities, and prevention of colon cancer. In this study, we investigated the effects of diosgenin administration on steroid hormones in the blood of mice using LC-MS. Diabetes was induced in 5-week-old female ICR mice by a single intraperitoneal administration of 250 mg/kgBW streptozotocin (STZ). The mice were classified five groups as normal saline-treated mice fed with AIN-93M, the diet mixed with 500 ppm diosgenin, STZ-treated mice fed with AIN-93M, the diet mixed with 100 ppm diosgenin, and 500 ppm diosgenin. After ten weeks, glucocorticoids in the blood of the mice were measured by LC-MS. Treatment with STZ increased in the levels of glucocorticoid. Administration of diosgenin at 100 and 500 ppm suppressed STZ-induced elevation of glucocorticoid levels. Additionally, in the control group, administration of diosgenin at 500 ppm decreased in the blood glucocorticoid level. From these results, it is suggested that diosgenin regulated the elevation of blood glucocorticoid levels in mice.

diosgenin, steroid hormone, LC-MS

講演番号：4H07-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

オレガノの匂いによるマウスの食塩摂取量調節に関する研究

Inhibition of salt consumption in mice by the odor from oregano.

○秋山 菜々子、細野 朗、大畑 素子、長田 和実（日大生物資源）
○Nanako AKIYAMA, Akira HOSONO, Motoko OHATA, Kazumi OSADA (Nihon Univ.)

食品に由来する香気成分は食塩摂取量の修飾因子であることが示唆されているが，動物実験を用いた直接証拠は散見するに過ぎない．本研究は，食品中の匂い成分を分離同定し，マウスに対する生得的な適塩効果の有無を確認することを目的として行った．匂い源はオレガノを用いた．乾燥オレガノから発せられる揮発性成分を HS-SPME および GC-MS で分析した結果，主要香気成分は Carvacrol であることを確認した．嗅覚行動実験には C57BL/6j マウス 66 匹を用い，オレガノの匂いをマウスに汎化させた後に，二瓶選択実験（滅菌された精製水 vs 0.15MNaCl 水溶液）をオレガノ臭【Carvacrol 換算で 0.2~3pmol/mL(air)】暴露時と非暴露時に 24 時間ずつ実施し，食塩水摂取量の変化を測定した．その結果，雌ではオレガノ及び Carvacrol の匂いは食塩水の摂取率，摂取量を容量依存的に低下させた（P<0.020;Wilcoxon test）．一方，オレガノは雄に対しても雌と同様な結果が得られたが（P<0.011;Wilcoxon test），Carvacrol では食塩水の摂取率を有意に低下させたものの（P<0.028;Wilcoxon test），抑制率はメスの半分程度であった．オレガノの匂いは食塩の嗜好を減少させることが示唆され，オレガノ臭における減塩の活性成分は Carvacrol であることが示唆された．

The present study aims to investigate the effect of the scent of oregano to control the preference of sodium chloride in mice, then explore the active component of odorants to control the salt appetite. Carvacrol, the candidate of the active component, was identified. Sixty-six C57BL/6j mice were employed in the olfactory behavioral study. Before experiments, all experimental mice were generalized with the odor of oregano, then conducted two-bottle choice test (water vs 0.15M NaCl aqueous solution) presence or absence of odor generator with 1g oregano. As results, in females, the odor of oregano and Carvacrol significantly decreased the rate and amount of saline intake (P<0.02; Wilcoxon test). Oregano achieved similar results in males as in females (P<0.011; Wilcoxon test). The effect of carvacrol to male was significant (P<0.028; Wilcoxon test), but inhibition rate was almost half that of females.

olfactory sense, Oregano, salt appetite

講演番号：4H07-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:30～ ミーティングルーム H

食品の匂い成分が嗅覚認知機能に及ぼす影響について

The effect of coffee odor　on olfactory cognitive function

○鯨井 麗晋、坂本 彩乃、河上 知華、石塚 里瑚、山田 萌夏、細野 朗、津田 真人、大畑 素子、長田 和実（日大生物資源）
○Riyuki Kujirai, Ayano Sakamoto, Chika Kawakami, Riko Ishiduka, Moeka Yamada, Akira Hosono, Masato Tsuda, Motoko Ohata, Kazumi Osada (Nihon Univ.)

オキシトシン受容体(Oxtr)は社会性や嗅覚認知機能を修飾する。Oxtr Venus-knock in(KI)マウスには社会認知行動に加え、刺激臭忌避反応に対する異常がある。この異常は、オオカミカイロモン（P-mix）を嗅がせることで Oxtr 発現量が野生型の半分程度の Oxtr KI ヘテロ（以下 H）マウスの嗅覚行動異常を改善させた。そこで、P-mix が含まれるコーヒーの香気成分が H マウスの嗅覚異常行動に対する作用を検索した。実験には H マウス 50 匹（オス 23 匹，メス 27 匹；2-5 か月齢）を用いた。コーヒー豆を粉砕し、1 日 2 時間 2～4 週間継続的に暴露した。コーヒーの匂いを嗅いだ H マウスの刺激臭忌避反応を Y-字型迷路を用いて測定した。その結果、約 2 週間のコーヒー臭の暴露により酪酸に対する忌避反応が正常化する傾向が見られた。マウス脳組織での定量 PCR の結果、4 週間のコーヒー基づく暴露により Oxtr の有意な増加が確認された。この結果はコーヒーの匂いの継続的な暴露により Oxtr の増加に嗅覚異常行動が改善したことを示している。

Recently, we demonstrated that Oxtr plays a crucial role in regulating olfactory behavior in the absence of a social context. Moreover, wolf kairomones (P-mix) ameliorated the abnormal olfactory behavior observed in the Oxtr Venus-knock in (KI) mouse (Unpublished data). We thought that the coffee aroma could improve the abnormal olfactory behavior observed in Oxtr KI heterozygous (hetero) mice because coffee aroma contains P-mix and their analogs. Fifty H mice were employed the behavioral and molecular biological experiments of odor exposure 2hour per day between 2-4 weeks. As a result, we found a significant effect to normalize olfactory behavior to butyric acid and a significant increase of Oxtr expression due to exposure to the coffee aroma with qPCR analysis in mouse brain tissue.

Olfactory sense, Oxytocin receptor, Coffee odor

講演番号：4H09-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

硬度の異なる海洋深層水由来にがり抽出物添加水が肥満マウスの認識機能へ与える影響について

Effect of extract-added water derived from deep sea water with different hardness on cognitive function in obese mice

○福井 浩二[1]、鈴木 優希[1]、加藤 優吾[1]、竹内 望[2]、竹中 浩貢[2]、河野 雅弘[1]([1]芝工大生命、[2]ダイドー・タケナカ)
○Koji FUKUI[1], Yuki SUZUKI[1], Yugo KATO[1], Nozomu TAKEUCHI[2], Hirotsugu TAKENAKA[2], Masahiro KOHNO[1] ([1]Shibaura Inst Technol, [2]Dydo-Takenaka)

海洋深層水には豊富なミネラルが含まれ、様々な利用が行われている。本実験では、高知県室戸市沖より採取された海洋深層水由来のにがり抽出物を硬度別（200、300、500）に飲料に添加して飲料水を作成、その飲料水を肥満マウスに添加し、様々な効果について検証を行った。その結果、高脂肪食添加で有意に増加した体重を抑制する効果はなかったものの、水迷路試験で高脂肪食添加により低下した認識機能を添加水は有意に改善した。また、ローターロッド試験ではロッドからの落下時間が顕著に改善した。解剖後の血清検査では、中性脂肪や尿素窒素が有意に改善した。しかし、これらの結果は、いずれも硬度に依存しておらず、硬度 200 もしくは 300 に調整した添加水で最も良い結果を示した。

本講演では、上記の研究と共に、我々の研究室で現在取り組んでいる海洋深層水由来のにがり抽出物添加水を使った実験について紹介したい。

Deep sea water contains multiple minerals and is widely used. In this study, several types of extract-added water with different hardness (200, 300, 500) were prepared from deep sea water (DSW) collected off the coast of Muroto City, Kochi Prefecture. We gave it to obese mice and tested it for several effects. Although, it was no anti-obesity effect this water in obese mice, cognitive function was significantly improved in the water maze test. Time to fall by the Rota-rod test also showed dramatically improved. The levels of triglyceride and blood urea nitrogen were significantly decreased in DSW-extract added water-treated obese mice. However, these results did not depend on a hardness-dependent manner. Hardness 200 or 300 water were much better than 500.

In this presentation, we would like to introduce our related experimental data using DSW-extract added water.

deep sea water, obesity, cognition

発表責任者：福井浩二（koji@sic.shibaura-it.ac.jp）

講演番号：4H09-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

β-ヒドロキシ酪酸摂取による健常者の睡眠の質に対する改善作用の可能性

A Possible Improvement Effect on Sleep Quality in Healthy Individuals by Beta-Hydroxybutyrate Intake

○草刈 剛[1]、加藤 真理子[1]、坪田 潤[2]([1]大阪ガスケミカル株式会社　フロンティア マテリアル研究所、[2]大阪ガス株式会社　エネルギー技術研究所)
○Takashi KUSAKARI[1], Mariko KATO[1], Jun TSUBOTA[2] ([1]Osaka Gas Chemicals Co., Ltd., [2]Energy Technology Laboratories, Osaka Gas CO., Ltd)

【目的】
我々は、砂糖等の天然物をハロモナス菌により発酵させることで、β-ヒドロキシ酪酸（BHB）を生成する発酵生産技術を開発し、食品素材としての可能性を検討している。今回、BHB を摂取したときの健常者の睡眠の質の主観的評価へ及ぼす影響について検証を行った。
【方法】
本試験は睡眠の質に悩みを持つ健常な日本人成人男女を対象とし、スクリーニング兼摂取前検査の結果から、問題ないと判断した 22 名を本試験に組み入れた。BHB3,000 ㎎含有飲料を 1 日 1 本 4 週間摂取の前後で、OSA 睡眠調査票 MA 版（OSA-MA)、ピッツバーグ睡眠質問票(PSQI-J)による睡眠状態の評価をそれぞれ行った。
【結果】
OSA-MA では、起床時眠気、入眠と睡眠維持、疲労回復の各スコアにおいて、摂取 4 週間後の得点が摂取前と比較して有意に高値を示した。また、PSQI-J では、PSQI 総合得点、睡眠の質（C1)、入眠時間(C2)、日中覚醒困難 (C7)において、摂取 4 週間後の得点が摂取前と比較して有意に低値を示した。なお、本試験条件下では安全性に問題が無いことが確認された。
【結論】
OSA-MA、PSQI-J の結果より、入眠や日中の覚醒、疲労回復など睡眠に関する自覚症状の改善が認められた。今後は、対照群を設定したランダム化比較試験による再現性の確認が必要である。
The effect of ß-hydroxybutyrate (BHB) ingestion on the subjective evaluation of sleep quality of the healthy subject was examined. Twenty-two healthy Japanese adults suffering from sleep quality were enrolled in the trial. They were asked to consume one BHB contain beverage daily for 4 weeks, and their sleep status was assessed. OSA-MA Sleep Questionnaire showed significantly higher levels of sleepiness on awakening, sleeping and maintaining sleep, and recovering from fatigue compared with those prior to ingestion. Pittsburgh Sleep Questionnaire also showed significantly lower values in overall score, sleep quality, hour to fall asleep, and daytime wakefulness difficulties compared to pre-ingestion. Subjective symptoms related to sleep such as falling asleep, awakening during daytime, and restoring fatigue were improved.

sleep, ß-hydroxybutyrate, ketone bodies

講演番号：4H09-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

カルノシン酸の脳での抗炎症機序の検討

Mechanism of anti-inflammatory effect of carnosic acid on the brain

○海野 美月[1]、柴田 紗知[2]、海切 弘子[3]、萱島 知子[4]、松原 主典[1] ([1]広大院人間、[2]福山大薬、[3]広島文化学園短大、[4]佐賀大教育)
○ Mitsuki UMINO[1], Sachi SHIBATA[2], Hiroko KAIKIRI[3], Tomoko KAYASHIMA[4], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Fukuyama Univ., [3]Hiroshima Bunka Two-Year Col., [4]Saga Univ.)

脳での炎症は認知症や抑うつといった脳機能の低下に関与している。我々は食品機能成分による脳機能保護を目的として，ローズマリーの機能成分カルノシン酸（carnosic acid: CA）の脳における抗炎症効果について検討を進めている。これまでに CA 摂取が老化に伴う認知機能の低下を抑制すること，そして脳におけるトランスサイレチン（transthyretin: TTR）の沈着を抑制することが炎症抑制につながっている可能性を明らかにしているが，詳細なメカニズムは完全には明らかにできていない。そこで，脳での炎症において重要な役割を担うミクログリアに焦点をあて作用機序を検討した。老化促進モデルマウス（senescence-accelerated mouse prone 8: SAMP8）に飲料として水のみを与えた対照群と CA 50 μM を与えた CA 群の脳組織を用いて，ミクログリアの炎症性・活性化状態（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD: ASC・CD68）及び神経細胞保護効果を持つ neuropeptide Y（NPY）について各免疫染色による評価を行った。その結果，CA 群では対照群に比べ炎症性を示す ASC スペックを含むミクログリア，および活性化を示す CD68 陽性ミクログリアの割合が有意に低かった。また，NPY 産生細胞の数は有意に多かった。以上のことから，CA を摂取することでミクログリアの活性化抑制と NPY 産生細胞維持により，脳での炎症抑制と神経細胞保護につながるという作用機序が示された。

Carnosic acid (CA) is a major bioactive compound in rosemary. We found that CA consumption suppressed transthyretin (TTR) deposition in the brain and improved cognitive function, but the detailed mechanisms of these effects have not been clarified. In this study, we investigated the anti-inflammatory effects on microglia. First, we performed immunostaining of brain tissues from SAMP8. The results showed that the ratios of microglia containing inflammatory ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) and positive with CD68 were significantly lower in the CA group than those in the control group, indicating its anti-inflammation and anti-activation effects on microglia. In addition, the number of neuropeptide Y (NPY)-positive cells, which play a neuroprotective function, was significantly higher in the CA group. These results suggest that CA may protect the brain from inflammation by regulating the activation of microglia and protecting NPY producing cells, then preventing brain function associated with aging.

carnosic acid, microglia, anti-inflammatory

講演番号：4H09-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

茶カテキンによるコロナウイルス・メインプロテアーゼの阻害
Inhibition of SARS-CoV-2 main protease by tea catechin

○加藤 陽二[1,2]、東山 明香里[1]、西川 美宇[3]、生城 真一[3]([1]兵庫県大環境人間、[2]兵庫県大先端食セ、[3]富山県大工)
○Yoji Kato[1,2], Akari Higashiyama[1], Miyu Nishikawa[3], Shinichi Ikushiro[3] ([1]Univ. Hyogo, [2]Univ. Hyogo, RIFNS, [3]Toyama Pref. Univ.)

ウイルス酵素メインプロテアーゼ（main protease, M^{pro}）は、新型コロナウイルス治療標的の一つである。本研究では M^{pro} を阻害する食品成分を探索した。マルトース結合タンパク質（MBP）をタグとする組換え体 M^{pro}、及び MBP 部分を切断した M^{pro} を調製して実験に用いた。酵素 M^{pro}（0.5 μM）と食品成分（20 μM）を 30 分間、37 度で反応させた。続いて、蛍光ペプチドを基質として添加し、生じた蛍光性切断ペプチドを HPLC 分離して定量することにより、化合物の消光作用や自己蛍光の影響を除外して酵素活性を評価した。阻害の認められた成分の中で、茶カテキン類に焦点をあて、その抑制機構について調べたところ、B 環にピロガロール基を持つカテキン類が強い阻害を示した。エピガロカテキンガレート（EGCG）及びメチル化 EGCG（D 環の水酸基が 1 つメチル化）では付加修飾ペプチドの解析においていずれも D 環の脱離が観察されたことから、B 環のピロガロール構造が活性部位システインと結合していると考えられた。市販ペットボトルの緑茶を希釈して M^{pro} と反応させたところ、大きく薄めても M^{pro} に茶カテキンが付加結合し、酵素を阻害した。

SARS-CoV-2 main protease, M^{pro}, is one of the promising targets against the virus. This study aimed to find the inhibitor to the virus enzyme from food chemicals. To prepare the recombinant enzyme was designed as MBP-tagged one and used. In some cases, MBP moiety was removed from the recombinant. The enzyme activity was evaluated by analyzing the cleaved fluoresce peptide from a substrate using HPLC. The enzyme (0.5 μM) was incubated with 20 μM of a test chemical for 30 min at 37°C and then analyzed the residual enzyme activity. Some food chemicals, such as epigallocatechin gallate (EGCG), theaflavin, and myricetin, strongly inhibited the enzyme. Among the active food chemicals, we focused on tea catechins, and the inhibitory mechanism was then examined. By comparison of the inhibitory effect of 8 tea catechins on the enzyme, B-ring (pyrogallol moiety) must be the critical structure for the inhibition. The mass spectrometric analysis of the EGCG- or methylated EGCG conjugated peptide showed the liberation of D-ring moiety. It indirectly indicates that the B ring of the catechin(s) was conjugated with the cysteine located at the enzyme's active site. Tea catechins in highly diluted green tea from a pet bottle are bound onto the enzyme and inhibited.

tea catechin, virus main protease, covalent modification

発表責任者：加藤陽二（yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：4H09-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

コリアンダー果実米麹発酵液の開発と肌に対する有効性評価

Development of Coriander Fruit Rice Ferment Filtrate and Evaluation of Its Efficacy on Skin

○青野 栞[1]、田中 千智[1]、小田 彩水[1]、土井 翔太[2]、西 拓哉[2]、前橋 万里子[1]、稲川 大地[1]([1]株式会社シーボン、[2]株式会社永廣堂本店　R&D)
○ Shiori AONO[1], Chisato TANAKA[1], Ayami ODA[1], Shota DOI[2], Takuya NISHI[2], Mariko MAEBASHI[1], Daichi INAGAWA[1] ([1]C'BON COSMETICS Co.,Ltd., [2]EIKODO&CO.,LTD. R&D)

コリアンダーの果実は古来より薬用・食用として用いられてきた。近年では化粧品用途としても利用されているが、その有効性の報告は多くない。本研究ではコリアンダーの果実を用いた、より有効性の高い化粧品原料の開発を目指した。そこで、従来から保湿や美白効果を目的に化粧品原料に利用されている米麹に着目し、新たにコリアンダー果実米麹発酵液（CRF）を開発した。この CRF は美白試験や抗酸化試験において有用な結果を得られている。特に興味深いことに、保湿成分であるアミノ酸量が相乗的に増加していることが明らかになっている。

また本研究では、CRF のさらなる機能性を検証するため、正常ヒト表皮ケラチノサイトと正常ヒト真皮線維芽細胞に CRF を添加し 24 時間培養した後の遺伝子発現解析を行った。その結果、皮膚バリア機能に関する遺伝子群とヒアルロン酸合成酵素 *HAS2* が優位に発現増加することを明らかにした。以上の結果から、我々が開発した CRF は皮膚に対し様々な面での有効性があると考えられる。特に皮膚バリア機能関連因子が多く発現増加していたことから、乾燥肌や荒れ肌に対する化粧品への応用が期待できる。

The coriander fruit has been used for food and medicine since long ago.　In recent years, it has been used for cosmetics, but there are few reports on its efficacy. In this study, we aimed to develop a more effective cosmetic raw material using coriander fruit. Therefore, we focused on rice koji, which has traditionally been used as cosmetics for its moisturizing and whitening effects. Finally, we developed Coriander Fruit Rice Ferment Filtrate (CRF).

The CRF have effect on whitening and antioxidant tests. Particularly interestingly, this has a synergistic increase in the amount of amino acids.

In this study, to further verify the functionality of CRF we also conducted gene expression analysis of normal human epidermal keratinocytes and normal human dermal fibroblasts 24 hours after CRF addition. As the results, genes related to skin barrier function and hyaluronic synthase *HAS2* were predominantly upregulated.

Based on these results, it is likely that the CRF retain their efficacy in all aspects of the skin. In particular, because of the upregulation of many genes related to skin barrier function, we expect that it can be applied to cosmetics for dry and rough skin.

Skin barrier, Keratinocytes, Cosmetic material

発表責任者：青野栞（s_aono@cbon.co.jp）

講演番号：4H09-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

麹甘酒飲用は健常者の頬部皮膚水分量を維持する

Beneficial effects of *koji amazake* in maintaining the water content at the cheek skin in healthy adults

○榎本 利彦、小島 彩奈、小平 一也、小黒 芳史、倉橋 敦（八海醸造株式会社）
○ Toshihiko ENOMOTO, Ayana KOJIMA, Kazuya KODAIRA, Yoshifumi OGURO, Atushi KURAHASHI (Hakkaisan Brewery Co., Ltd.)

【目的】麹甘酒は, 米麹と水から作られる日本の伝統的甘味飲料である. 2015 年の甘酒ブームを期に, 健康飲料としての立ち位置を築いてきた．我々は，長期摂取や過剰摂取試験，食後血糖値推移などの安全性試験や便通改善効果などの健康機能を明らかにしてきた．本研究は，便通改善と同様に飲用者の実感としてお問い合わせを頂くことが多い麹甘酒摂取が肌保湿に与える影響の解明とその機能性関与成分の同定を目指して行った.
【方法】本研究は，うえのあさがおクリニック倫理審査員会の審査を経て，UMIN-CTR に事前登録の上実施した．脱落者 1 名を除く，59 人の被験者を麹甘酒飲用群とプラセボ飲用群に分けて，無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行った．飲用前と飲用 8 週間後の肌水分量と TEWL を測定し，群間有意差を統計解析した．肌保湿の機能性成分は，先行研究より麹甘酒に含まれているグルコシルセラミド (GlcCer)と推定し，その含有量を HPLC-ELSD を用いて測定した.
【結果】飲用 8 週間後の左頬水分量の変化量を比較したところ，麹甘酒飲用群とプラセボ飲用群には有意な差があり，麹甘酒は肌水分量を維持する機能があることが明らかになった．また，麹甘酒中の GlcCer 量は，「肌のバリア機能を高める」など保湿をテーマとした機能性表示食品に含まれているものと同程度含まれていた．本研究から，麹甘酒飲用は肌水分量を維持する機能があり，その機能性関与成分は GlcCer であると結論付けた.
【Introduction】*Koji amazake* which is made from *koji* and water is Japanese traditional beverage. Since *amazake* boom in 2015, *koji amazake* has been recognized as healthy beverages by consumers. To scientifically identify health effects derived intake of *koji amazake*, we have reported some studies. In this study, it has reported the effect of intake of *koji amazake* on skin barrier function and functional ingredients in it.
【Methods】Excluding a dropout, 59 subjects were divided *koji amazake* or placebo group. The water content and TEWL at pre-intake and 8 weeks in both groups were measured. Based on previous studies, functional ingredients in *koji amazake* was presumed to be GlcCer. The content of GlcCer was quantified by HPLC-ELSD.
【Results】In the *koji amazake* group, the change in the water content at left cheek from pre-intake to 8 weeks was significantly differed from the placebo group. *Koji amazake* contributed to maintenance of the water content. In addition, the content of GlcCer in *koji amazake* was the same amount where plant GlcCer improve skin barrier function. In conclusion, *koji amazake* improve skin barrier on human, and its functional substrate is GlcCer.

koji amazake, glucosylceramide, skin barrier function

発表責任者：倉橋敦（a.kurahashi@hakkaisan.jp）

講演番号：4H09-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

食用昆虫の摂取が実験動物の代謝に及ぼす影響

Edible insects regulate lipid metabolism in experimental animals.

○増田 尚輝[1]、阪本 鷹行[2]、西海 信[3]、渡邉 崇人[4]、櫻谷 英治[2]、三戸 太郎[4]、向井 理恵[2]([1]徳大院、創成、生物、[2]徳大院、社会産業理工、食料、[3]兵庫医大、疾患オミクス、[4]徳大、BIRC、昆虫)
○ Naoki MASUDA[1], Takaiku SAKAMOTO[2], Shin NISHIUMI[3], Takahito WATANABE[4], Eiji SAKURADANI[2], Taro MITO[4], Rie MUKAI[2] ([1]Tokushima Univ., [2]Tokushima Univ. Food, [3]Hyogo College Of Med., [4]Tokushima Univ. BIRC)

世界の人口増加により食料問題が深刻化することが予測されている。昆虫の食用化が解決策の 1 つとして提案され、日本国内でも開発促進の兆しがある。昆虫食の食用化の推進のためには栄養学に基づく基礎データの集積が必要であると考え、昆虫を摂取させた実験動物の解析を行った。

粉末化した食用昆虫を混合させる割合を改変した餌を調製し、数日に渡る摂餌試験を行い、採血、臓器摘出ならびに糞便を回収し、各実験に供した。試験の結果、食用昆虫混合餌を給餌した群での体重推移はコントロール群と同等であった。また、解剖時の血漿中の肝機能障害マーカー等の増悪は認められなかった。食用昆虫の混合割合の増加に伴い、糞便排出量の増加及び糞便中の粗脂質量が増加する傾向が認められた。これは栄養成分の吸収が昆虫食によって阻害された結果ではないかと考え、糞便中の脂質組成を薄層クロマトグラフィーで解析した。マウスが摂取した昆虫混合餌にはトリグリセリド（TG）の豊富な存在が検出された一方で、糞便中で TG の検出が顕著に減少したことから、昆虫食による脂質吸収阻害は否定された。また、脱脂した昆虫を用いた試験においても同様の結果が得られたことから、昆虫食に含まれる脂質以外の成分が実験動物の脂質動態を調節していることが示唆された。

It is predicted that the food problem will become more serious owing to the increasing global population. Using insects as food has been proposed as one of the solutions. To promote the edibility of insects, it is necessary to accumulate basic nutrition data. A diet with modified proportions of powdered edible insects was prepared, feeding tests were carried out, and blood samples, organs, and feces were collected. The amount of fecal discharge and crude lipid in feces tended to increase with the increased mixing ratio of edible insects. Since this may be the result of the inhibition of nutrient absorption by the insect diet, the lipid composition in the feces of mice that ingested the insect mixture was analyzed by thin-layer chromatography. The abundance of triglycerides (TGs) was markedly reduced, indicating that the insect diet does not inhibit lipid absorption. Similar results were obtained in the experiment using defatted insects, suggesting that components in the insect diet other than lipid regulate lipid metabolism in experimental animals.

Edible Insects, lipid metabolism, SDGs

発表責任者：向井　理恵（rmukai@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4H09-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

核内受容体の活性化を指標とした国産のつる性薬用樹木カギカズラ生葉の機能性解析について

Functional analysis of fresh leaves of Japanese vine medicinal tree, *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks., using nuclear receptor reporter assay

○森田 直樹[1]、奥澤 亜美[1]、伊藤 哲男[2]、谷口 亨[3]、坂下 真実[1]([1]産総研 生物プロセス、[2](有)イトウグリーン、[3]森林総研 林育セ東北)
○Naoki MORITA[1], Tsugumi OKUZAWA[1], Tetsuo ITO[2], Toru TANIGUCHI[3], Mami SAKASHITA[1] ([1]Bioprod. Res. Inst., AIST, [2]ITO GREEN LLC., [3]FTBC, FFPRI)

国産のつる性薬用樹木カギカズラ（*Uncaria rhynchophylla*（Miq.） Jacks.）の側枝の付け根には釣り針状のカギがあり、このカギ付きの側枝は「釣藤鉤（チョウトウコウ）」と呼ばれる生薬として利用されている。一方、カギカズラの葉のバイオマス量は薬用部位の 2.6～11.9 倍程度あるが、葉を医薬品に使用することは厚生労働省の規程に合わず、現時点では葉の有効な利用方法がない。本研究では、カギカズラの葉の新規利用法開発のために、カギカズラ生葉の機能性について、ヒト核内受容体活性化能の評価を行った。その結果、細胞レベルでの核内受容体レポーターアッセイを用いた網羅的な解析により、カギカズラ生葉の水抽出物及び 100%エタノール抽出物には、PPARγ及び RARβを活性化する成分が含まれていることが解った。このことから、カギカズラ生葉には糖代謝や脂質代謝の改善作用があることが示唆された。

本発表では、上記研究とともに、葉の加工品であるお茶の機能性評価についても紹介したい。

The base of the leaves on the branches of Japanese vine medicinal tree, *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks., has hooks, and the side branches with these hooks are used as an herbal medicine called “chotoko” or “Gou-Teng”. Although the biomass of the leaves of *U. rhynchophylla* is 2.6 to 11.9 times that of the medicinal parts, there is no effective way to use the *U. rhynchophylla* leaves at present, because the use of the leaves for medicinal purposes does not meet the regulations of the Ministry of Health, Labor and Welfare. In this study, to develop a new use for the leaves of *U. rhynchophylla*, the functional properties of *U. rhynchophylla* leaves were evaluated for their ability to activate human nuclear receptors. The results showed that the aqueous and 100% ethanol extracts of fresh leaves contained components that activated PPARγ and RARβ, in accordance with a comprehensive analysis using a nuclear receptor reporter assay at the cellular level. This suggests that the fresh leaves of *U. rhynchophylla* have the effect of improving glucose and lipid metabolism.

In this presentation, we would like to introduce the above research as well as the functional evaluation of the tea, a processed product of *U. rhynchophylla* leaves.

nuclear receptor reporter assay, functional analysis, *Uncaria rhynchophylla*

発表責任者：森田直樹（morita.n@aist.go.jp）

講演番号：4H09-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

ホウレンソウとグリーンキウイのスムージー調製時に起こるクロロフィル分解酵素によるフィトール増加

Chlorophyll-degrading enzyme-catalyzed phytol increase during preparation of smoothies made from spinach leaves and green kiwi fruits.

○横坂 伸一[1]、浅田 ゆり[2]、妹尾 勇志[2]、三上 輝志[2]、松田 寛子[1,2]、奈良井 朝子[1,2]([1]日獣医大院・応生科、[2]日獣医大・応生科)
○Shin-ichi Yokosaka[1], Yuri Asada[2], Yuji Seo[2], Koji Mikami[2], Hiroko Matsuda[1,2], Asako Narai[1,2] ([1]G.S.N.V.L.U., [2]N.V.L.U.)

光合成色素であるクロロフィル（Chl）やその類縁体であるフェオフィチン（Phein）がクロロフィル代謝に関わるクロロフィラーゼ（CLH)、フェオフィチナーゼ（PPH）などによって酵素的に加水分解されると、脂肪族アルコールのフィトールが生じる。これまでにフィトールは抗肥満、抗糖尿病につながる生理活性を示すことが報告されてきた。近年、生鮮青果物を磨砕して製造するスムージーが健康維持・増進の点から注目されており、食材由来の CLH, PPH と Chl 類との反応によって生じるフィトールはスムージーの健康機能の一端を担う可能性がある。しかし、生鮮青果物のフィトール含量や CLH, PPH の活性に関する知見は乏しい。演者らはこれまでに、ホウレンソウの葉とグリーンキウイの果実にフィトールが含まれることや、これら食材から抽出した粗酵素に含まれる CLH や PPH の酵素学的特性を報告してきた。今回、特性解析の結果をもとに、これら酵素の活性が高い pH 8 に調整した各食材の磨砕液中でフィトールが増加するのか検証した結果を発表する。

pH 8 に調整したホウレンソウの磨砕液（S）とキウイの磨砕液（K）を 40℃でインキュベーションした。インキュベーション前後の各試料からアセトンとヘキサンを用いてフィトールを抽出し、RP-HPLC で定量した。その結果、S ではインキュベーション中にフィトールが著しく増加した一方で、K では増加が認められなかった。K に含まれる Chl 量が不足している可能性を考え、次に、Chl a を K に添加したところフィトールが顕著に増加した。このことから、食材の組み合わせ方や調理条件によって、スムージー加工中にフィトールが生成することが示唆された。今後は、K に Chl を豊富に含む S を混合してフィトールが増加するのか検証する。

Phytol is an acyclic diterpene alcohol, which is released from chlorophyll and pheophytin catalyzed by chlorophyllase (CLH) and pheophytinase (PPH), respectively. Although it has been reported that the intake of phytol shows anti-obesity and antidiabetic effects in rodents, little is known about phytol contents and the CLH and PPH activities in plant foodstuffs. In this study, we measured those parameters in spinach leaves and green kiwi fruits. Furthermore, based on the enzymatic properties, we made the smoothies from the fruits and vegetables to verify whether phytol could be increased in the prepared smoothies or not. Consequently, phytol levels in the smoothies were found to increase through the CLH- and PPH-catalyzed degradation of chlorophyll derivatives.

phytol, spinach, kiwi

発表責任者：奈良井　朝子（a-narai@nvlu.ac.jp）

講演番号：4H09-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

デラウェアの小規模試験醸造による産地特性の解明 （2020 年）

Characteristics of Small-Scale Vinified Wines from Delaware Grapes from Various Regions of Japan (2020)

○下野 雄太[1]、三浦 季子[1]、三輪 由佳[1]、平松 和也[1]、後藤 奈美[2]、小山 和哉[2] ([1]（地独）大阪府立環境農林水産総合研究所、[2]（独）酒類総合研究所)
○ Yuta SHIMONO[1], Toshiko MIURA[1], Yuka MIWA[1], Kazuya HIRAMATSU[1], Nami GOTO-YAMAMOTO[2], Kazuya KOYAMA[2] ([1]Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture, [2]National Research Institute of Brewing)

ワインの味や香りは，同じ原料品種でも，ぶどうの産地によって異なることが経験的に知られているが，品種デラウェアでは十分な情報が蓄積されていない。そこで「日本ワインのテロワール解明に係る研究コンソーシアム」では，全国 5 産地の早摘み果実，8 産地の完熟果実で 1 ロット 10kg 程度の小規模試験醸造を行い，ワインの理化学分析を実施した。またワインの官能評価を，コンソーシアムの参画機関で実施した。本講演ではその 1 年目の取組結果を紹介する。

香気成分解析の結果，デラウェアを含むアメリカ系品種の特徴的な香気成分であるアントラニル酸メチル含量は，産地差が大きかった。また，味認識装置の分析ではデラウェアワインの「酸味値」と「旨味値」の間に負の相関関係がみられ，酸味が穏やかな産地は旨味の強さが特徴である可能性が示唆された。ワイン官能評価の結果では，ぶどうの産地による差よりも収穫時期の差の方が大きくなり，完熟果実のワインでは，早摘み果実のワインと比較して「果実香（熟した・甘い)」「キャンディ・綿飴」「花様」の香りが強かった。カラメル様の甘い香気成分であるフラネオールは，完熟果実のワインでは早摘み果実のものに比べて平均値ベースで約 50 倍も含まれ，さらにネロールやベンジルアルコール等のフローラル調の香気成分も多く，これらの違いが早摘み果実と完熟果実のワインの風味の違いを生んでいると推察された。

To clarify the characteristics of Delaware wines produced in various regions in Japan, wine samples were made from Delaware grapes in a small scale (approximately 10 kg). Early harvest fruits were obtained from 5 regions, and ripe fruit were obtained from 8 regions.

Methyl anthranilate, which is known as a characteristic aroma component of *Vitis labrusca* varieties, had a large difference depending on the harvest area. Analysis using a taste sensor showed a negative correlation between "acid value" and "umami value". Therefore, in Delaware wines, it was suggested that the region where the acidity of the wine is mild may be characterized by the strength of the umami of the wine. In the result of sensory evaluation, the difference in harvest time had a greater effect than the difference in harvest area. Wines made from ripe fruits scored higher than wines made from early harvest fruits in terms of “ripe fruit-like and sweet aroma”, “candy-like and caramel-like aroma”, “flower-like aroma”. Suggested that these components such as furaneol, nerol and benzyl alcohol affect the sensory evaluation results.

wine, terroir, Delaware grape

発表責任者：下野雄太（ShimonoY@mbox.kannousuiken-osaka.or.jp）

講演番号：4H09-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

コーヒー豆の焙煎時間に伴う機能性成分含有量をモニタリングするための一斉分析法

Simultaneous analytical method for monitoring the contents of functional ingredients with the roasting time of coffee beans

○岩田 奈津紀、堀江 真之介（株式会社島津製作所）
○Natsuki IWATA, Shinnosuke HORIE (Shimadzu Corporation)

近年、コーヒーの摂取には、認知症、糖尿病、がんなどの生活習慣病の予防または改善効果が報告されている。また、それらの効果にピロカテコールやトリゴネリンなどの成分が関与していることも分かってきた。
本研究では、HPLC によるコーヒー中の各種機能性成分の一斉分析法を検討した。対象成分はトリゴネリン、クロロゲン酸、カフェイン、カフェイン酸、および、ピロカテコールである。中でも、トリゴネリンは一般にイオン交換モードや順相モードで分析するが、一斉分析を想定し、逆相モードでの分離を試みた。トリゴネリンは、塩基性物質のため C18 カラムでは保持しなかったが、ペンタフルオロフェニルプロピル基(PFPP)を有する固定相のカラムを使用することによって保持することができ、一斉分析法を構築できた。
コーヒー中のトリゴネリンとクロロゲン酸は、焙煎時間の増加に伴い含有量が減少した。一方、ピロカテコールは含有量が増加した。これら機能性成分の含有量をモニターすることができたため、本法は食品に含まれる機能性成分の開発に貢献すると考えられる。

Recently, it has been reported that coffee intake is effective in preventing or improving dementia, diabetes and cancers. It has also been found that compounds such as pyrocatechol and trigonelline are involved in these effects. In this study, an HPLC method was investigated for simultaneous analysis of various functional ingredients in coffee. Trigonelline, chlorogenic acid, caffeine, caffeic acid, and pyrocatechol were target compounds. Although trigonelline was analyzed in cation exchange or normal phase mode, reversed phase mode was utilized for simultaneous analysis. It was not retained by C18 stationary phase due to a basic substance. However, it could be retained by the stationary phase having pentafluorophenylpropyl groups (PFPP). As a result, the simultaneous analytical method was developed.
As the roasting time increased, the concentration of trigonelline and chlorogenic acid in coffee decreased, but the concentration of pyrocatechol increased. This method is considered to contribute to the development of foods containing functional ingredients.

HPLC, coffee, functional ingredients

発表責任者：岩田　奈津紀（natsuki@shimadzu.co.jp）

講演番号：4H09-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 14:30～ ミーティングルーム H

プラセンタエキスの細胞増殖機能に及ぼす加熱処理の影響

Effect of heat treatment of placenta extract on its cell proliferation function

○座間 悠次[1]、宮下 忠士[2]、関口 聡[2]、山浦 信明[2]、影山 将克[2]、丹羽 光一[1]([1]東農大、[2](株)DHC)
○Yuji Zama[1], Tadashi Miyashita[2], Satoru Sekiguchi[2], Nobuaki Yamaura[2], Masakatsu Kageyama[2], Koichi Niwa[1] ([1]Tokyo Univ. agricult., [2]DHC Corp.)

プラセンタ（胎盤）から抽出したプラセンタエキス（PE)は、健康食品や化粧品素材として広く利用されており、創傷治癒、抗炎症、抗酸化などの効果を持つことが報告されている。一般に PE 製品は、加熱による滅菌処理を行っているが、加熱によって PE の成分が変性し、機能性が失われている可能性がある。本研究では、加熱処理が豚 PE（PPE）の成分と機能性に及ぼす影響を明らかにするため、培養線維芽細胞を用いて実験を行った。

培養液に PPE を添加してヒト皮膚線維芽細胞（NB1RGB）を培養し、細胞数を測定したところ、PPE は細胞増殖を濃度依存的に促進した。50、60、70、80、90 及び 100℃で加熱した PPE を添加すると、高温で加熱した PPE ほど細胞増殖を促進する効果が弱くなった。加熱した各試料を SDS-PAGE 及び CBB 染色に供してタンパク質を染色したところ、高温で加熱するほど PPE のタンパク質量は減少した。ウェスタンブロットで PPE 中の線維芽細胞増殖因子（FGF）を検出すると、高温度で加熱した PPE ほどその量が減少した。非加熱及び 60 あるいは 100℃で加熱した PPE をゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ、加熱によりピークの強度が変化する分画が認められた。

以上の結果から、PPE は加熱することで増殖因子などの成分が変性し、細胞増殖に影響を与える事が示唆された。加熱により細胞増殖機能が減弱する成分を特定することが今後の課題である。

To clarify the effect of heat treatment of porcine placenta extract (PPE) on its functions, we investigated the cell proliferation of fibroblast grown in the medium containing heat-treated PPE. An addition of PPE to culture medium augmented the cell proliferation. The proliferative effects of PPE was reduced by heating of PPE in a temperature-dependent manner. Heat treatment of PPE reduced its contents of the proteins and fibroblast growth factor. When the unheated and heated PPEs were subjected to gel filtration chromatography, peak intensities of some fractions changed depending on the temperature. These results suggest that changes in some components of PPE such as FGF by heat treatment lead to an attenuation of cell proliferative potencies. Further investigations are needed to clarify the cell proliferative component of PPE that is decreased or inactivated by the heating process.

placenta extract, cell proliferation, heat treatment

発表責任者：丹羽光一（k3niwa@nodai.ac.jp）

講演番号：4I01-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

オピオイドによる脳腸経路と免疫系の複合的な機能調節を介した食物アレルギー改善機構の解明

The complex regulation of the brain-gut axis and immune system by opioids contribues to the relief of the food allergy

○長田 和樹[1]、長瀬 博[2]、八須 匡和[1]、西山 千春[1] ([1]東理大先進工、[2]筑波大)
○Kazuki NAGATA[1], Hiroshi NAGASE[2], Masakazu HACHISU[1], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Tsukuba Univ. IIIS.)

神経系と消化器系は双方向の自律神経ネットワークを形成することで、いわゆる「脳腸相関」と呼ばれる複雑な相互作用を可能にしている。近年、このシステムが様々な疾患の病態形成に寄与することが報告されているが、食物アレルギーに関しては罹患率が高いにもかかわらず不明な点が多い。本研究では、脳や消化管の機能調節に寄与するオピオイドが食物アレルギーに及ぼす影響を検証し、本病態における神経系と免疫系の関与ついて解析した。

まず我々は、κ受容体（KOR）を活性化するκオピオイドの腹腔投与により OVA 誘導性食物アレルギーマウスの下痢や体温低下が改善することを見出した。これらの症状はマスト細胞を産生源とするエフェクター分子セロトニンやヒスタミンが腸管や血管透過性を亢進することで生じる。κオピオイドはマスト細胞活性化を仲介する IgE レベルに影響を及ぼさなかった一方、セロトニン投与で誘導される下痢症状を改善することが判明した。更に興味深いことに微量のκオピオイド脳室内投与によっても下痢が改善したことから、KOR が脳-腸経路を介して作用することが示された。一方、体温低下は血液脳関門不透過性のκオピオイドによっても緩和されたことから、中枢以外の抑制機構の存在が示唆された。そこで受動的皮膚アナフィラキシーモデルを用いてマスト細胞依存的アレルギーを解析すると、κオピオイドによる症状抑制が観察され、KOR が末梢でマスト細胞活性化をも制御する可能性が示された。以上より、KOR は脳-腸経路やマスト細胞において複合的に機能することで食物アレルギーの病態改善に寄与することが示唆された。

The brain-gut interaction is the system, which makes it possible for the central nerve system (CNS) and the gastrointestinal tract to interact bi-directionally. Although it has been clarified that this axis contributes to a large variety of diseases, there are few reports concerning on food allergies. In the present study, we investigated the effects of an opioid, which plays an important role in the brain-gut interaction, on the food allergy model. OVA-induced food allergy mice injected with a κ opioid receptor (KOR) agonist, exhibited with milder symptoms than control mice. Interestingly, diarrhea was relieved by intracerebroventricular injection of κ opioid, suggesting the involvement of KOR in the brain. Further analysis revealed that a drop in the body temperature was alleviated by the peripheral KOR agonist that does not pass the blood-brain barrier, implying the pathway other than the CNS. The mouse passive cutaneous anaphylaxis model revealed that ear swelling caused by mast cell activation tended to be reduced by the KOR agonist administration. These results indicate that KOR functions as an ameliorator for food allergies by multiply acting on the CNS and immune system.

Opioid, Brain-gut axis, Food allergy

講演番号：4I01-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

粘膜型マスト細胞特異的プロテアーゼの遺伝子発現制御と *Cre* マウスの作出

Regulation of gene expression of mucosal mast cell-specific proteases and generation of *Cre* mice

○川添 響[1]、長田 和樹[1]、蔭山 あずさ[1]、笠倉 和巳[1]、八代 拓也[1]、八須 匡和[1]、岩倉 洋一郎[2]、後飯塚 僚[2]、西山 千春[1]([1]東理大先進工、[2]東理大生命研)
○Hibiki Kawazoe[1], Kazuki Nagata[1], Azusa Kageyama[1], Kazumi Kasakura[1], Takuya Yashiro[1], Masakazu Hachisu[1], Yoichiro Iwakura[2], Ryo Goisuka[2], Chiharu Nishiyama[1] ([1]Tokyo Univ. Sci. Dept. Biolog. Sci. Tech., [2]Tokyo Univ. Sci. Res. Inst. Biomed. Sci.)

アレルギー疾患に関与するマスト細胞(MC)は、骨髄から未熟なまま血中に移行する白血球である。末梢組織の微小環境に応じて最終分化を遂げるため、局在する組織によって性質が異なり、結合組織型 MC(CTMC)と粘膜型 MC(MMC)に大別される。CTMC 特異的プロテアーゼ *Mcpt5* の発現特異的に *Cre* を発現するマウスが CTMC の研究に利用されている。一方、MMC は食物アレルギーの発症や腸管免疫恒常性に寄与すると考えられるが不明な点が多い。そこで、本研究では MMC 特異的プロテアーゼ *Mcpt1*、*Mcpt2* の発現機構解析を行うと共に、MMC の分化や生体内分布の解析を目的とした遺伝子改変マウスの作出に取り組んだ。マウス骨髄由来培養細胞 MC(BMMC)を用いた解析から、*Mcpt1*、*2* 発現には転写因子 GATA2 が必須であり、TGF-β 刺激誘導性に活性化する Smad2/Smad4 と GATA2 の協調作用により、*Mcpt1* や *Mcpt2* 遺伝子上流領域に存在する GATA-Smad 繰り返し配列を介して転写活性化されることが示唆された。これらの知見を元に MMC での十分な転写が期待された *Mcpt2* を選択し、*Mcpt2-iCre* マウスを作製した。この *Mcpt2-iCre* マウスを *Rosa26-lsl-tdTomato* マウスと交配して得られた *Mcpt2* レポーターマウスを解析したところ、胃の幽門部に tdTomato 陽性細胞が多く存在し、腹腔内 MC の半数程度が tdTomato を発現することが明らかとなった。また、レポーターマウスの BMMC は、TGF-β 刺激により、ほぼ全ての細胞が tdTomato 陽性となった。以上、本研究により MMC 特異的遺伝子発現機構の一端が明らかになり、その in vivo 解析に利用可能なノックインマウスが得られた。

Mast cells (MCs), which play essential roles in allergic diseases, are classified into two subtypes, connective tissue MCs (CTMCs) and mucosal MCs (MMCs). Although the roles of CTMCs in various immuno-responses have been revealed by using *Mcpt5-Cre* mice, the biological significance of MMCs are largely unknown. In this study, first, we analyzed the expression mechanism of MMC-specific proteases, *Mcpt1* and *Mcpt2*, and found that a transcription factor GATA2 is required for the expression of Mcpt1/2 in MCs, and that GATA2 synergistically transactivates the promoters with TGF-β-activated Smad2/Smad4 via GATA-Smad sequences in proximal regions of the *Mcpt1* and *Mcpt2* genes. Next, we generated *Mcpt2-iCre* mice and obtained the *Mcpt2* reporter mice by mating with *Rosa26-lsl-tdTomato* mice. It was confirmed that almost all MCs expressed tdTomato following TGF-β stimulation in vitro, and that tdTomato-expressing cells were detected in pylorus of the stomach and peritoneal cavity.

Mcpt1/2, GATA2, Smad

講演番号：4I01-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

抗体工学を利用した抗 DNA 自己抗体の解析

Analysis of anti-DNA antibodies based on antibody engineering

○阿南 優佑[1]、佐々木 栄太[1]、板倉 正典[1]、上田 宏[2]、内田 浩二[1]([1]東大農、[2]東工大科学技術創成院)
○Yusuke ANAN[1], Eita SASAKI[1], Masanori ITAKURA[1], Hiroshi UEDA[2], KOJI UCHIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

我々はこれまでにタンパク質修飾反応の一つとして、リジン残基のピロール化を発見した。ピロール化タンパク質は核酸染色試薬や抗 DNA 抗体と結合するなどの DNA 様の性質を示す。さらに、自己免疫疾患の一種である SLE(全身性エリテマトーデス)モデルマウスにおいては、ピロール化タンパク質と DNA の両方に結合する Pyrrole/DNA 二重交差性抗体が発見されている。本研究では、二重交差性抗体の生理的・病態生理学的意義を抗体工学的な手法により解明することを目的とした。まず SLE モデルである MRL-*lpr* マウス由来のファージ抗体ライブラリを作製し、そこから 7 種類の Pyrrole/DNA 二重交差性抗体を作製した。次にこれらの抗体について抗体可変領域 (V_H、V_L ドメイン) のみを発現し、親和性解析を行ったところ、V_H ドメインのみで二重交差性を示した。さらに、二重交差性抗体の V_H 上に多く存在する Arg 残基に変異を導入すると、両方の抗原に対する親和性が減少することが判明した。以上のことから、Pyrrole/DNA 二重交差性抗体は V_H 上の正電荷を帯びた Arg 残基を介して、負電荷を帯びたピロール化タンパク質または DNA に結合していることが示唆されている。

We previously discovered N^{ε}-pyrrolation of lysine residues as a covalent modification of lysine residues by electrophilic aldehydes. Pyrrolated proteins exhibit DNA-like properties such as binding capacity for DNA-intercalator and anti-DNA antibodies. Moreover, we have found that Pyrrole/DNA cross-reactive antibodies that bind to both pyrrolated proteins and DNA from SLE (systemic lupus erythematosus) -prone mice. Here we aimed to elucidate physiological and pathophysiological significance of the Pyrrole/DNA cross-reactive antibody using antibody engineering technology. First, we selected anti-DNA antibodies by biopanning from antibody-phage library, derived from SLE-prone MRL-*lpr* mice, and established 7 pyrrole/DNA cross-reactive antibodies. Based on solid-phase binding assay, we then found that their cross-reactivity was predominantly attributed to the variable region of heavy chain (V_H), but not to that of light chain (V_L). Furthermore, mutation of the Arg residue, which is abundant on the cross-reactive V_H, attenuated the affinity for both antigens. These results suggest that the Pyrrole/DNA cross-reactivity may arise from electrostatic interaction between negatively charged pyrrolated protein or DNA and positively charged Arg residues on the V_H domain.

Post-translational modification, Phage display, Antibody

発表責任者：阿南優佑（y-anan@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4I01-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

酵母と線虫においてS-アデノシルホモシステインはメチオニン制限を模倣し寿命を延長する

S-adenosylhomocysteine mimics methionine restriction and extends lifespan in yeast and *C. elegans*

○古原 優希[1]、小川 貴史[1,2]、益村 晃司[1]、金井 宗良[3]、曽我 朋義[4]、水沼 正樹[1]([1]広大院・統合生命、[2]ハーバード大、[3]酒類研、[4]慶應大・先端生命)
○Yuki KOHARA[1], Takahumi OGAWA[1,2], Koji MASUMURA[1], Muneyoshi KANAI[3], Tomoyosi SOGA[4], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Grad. Sch. of Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]Harvard Univ., [3]Natl. Res. Inst. of Brew., [4]Keio Univ.)

食生活は、生物の老化を制御する重要な要素一つである。特に、メチオニン制限（MetR）による健康増進と長寿の両立には大きな関心が寄せられている。MetR を模倣して加齢プロセスに介入する方法はいくつか知られているが、Met を直接減少させるものやヒトにすぐに使用できるものではない。

我々は、Met の代謝産物である *S*-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy)を摂取することで、細胞内の Met を十分に減少させ、酵母や線虫の寿命を延ばすなど、MetR を模倣した効果を誘導することを発見した。AdoHcy は、エネルギーセンサーである AMPK や mTORC1 など、寿命制御に重要な役割を果たしている栄養・代謝感知経路の活性制御に関わることが分かった。また、AdoHcy を投与した酵母のミトコンドリアでは、呼吸活性と活性酸素 ROS の増加が観察され、AdoHcy が「ホルミシス」効果を発揮して寿命を延長している可能性が示唆された。これらの結果から、AdoHcy は MetR の模倣物質として機能しているのではないかと推測される。

特に、AdoHcy は内因性の代謝産物であるため、安全で信頼性の高い MetR ツールとして、他のモデル生物にも利用することができ、老化の分野だけでなく、食品や医療の分野でも、すぐにかつ広範囲に影響を与えることが期待できる。

Diet is an important determinant controlling organismal aging. In particular, there has been considerable interest in the ability of Methionine restriction (MetR) to both improve health and increase longevity. While there are several known ways to intervene in the aging process with MetR mimetics, none of them directly reduce intracellular Met or are suitable for immediate use in humans.

Here we discovered that intake of Met metabolite *S*-adenosyl-L-homocysteine (AdoHcy) is sufficient to reduce intracellular Met and induces benefits that mimic MetR, including extends lifespan in yeast and nematode. Further, AdoHcy has effects on multiple pathways, including energy sensor AMPK and mTORC1. In the mitochondria of yeast treated with AdoHcy show elevated respiration and increased ROS levels, indicating that AdoHcy may elicit 'hormesis' effect with resultant lifespan extension. On the basis of these results, it is tempting to speculate that AdoHcy may be functioning as a MetR mimetic - a metabolite that provides the benefits of MetR without requiring a reduction in food intake.

yeast, lifespan, *S*-adenosylmethionine

講演番号：4I01-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

モデル生物としてのメダカを用いた組織特異的誘導変異個体の作製

Establishment of Tissue-Specific Induced Mutants Using Japanese medaka as a Model Organism

○石川 雄太[1]、勝村 恵理[1]、マン チー[1]、辰川 英樹[1]、渡邉 優子[1]、橋本 寿史[2]、人見 清隆[1] ([1]名大院・創薬科学、[2]名大院理)
○ YUTA ISHIKAWA[1], ERI KATSUMURA[1], QI MENG[1], HIDEKI TATSUKAWA[1], YUKO WATANABE[1], HISASHI HASHIMOTO[2], KIYOTAKA HITOMI[1] ([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】 動物遺伝子を時期および組織的に発現抑制させることは、その機能を探る上で不可欠である。ニホンメダカ（*Oryzias latipes*）は豊富な数の受精卵を得られ、かつ体外環境で成体まで育成できることから、ゲノム編集による遺伝子個体の作出が容易であり、様々なヒトの類似遺伝子の機能解析に有用なモデル生物として注目されている。我々はこれまでにメダカを用いて血液凝固因子・トロンビンに着目して研究を行ってきた。トロンビンは通常肝臓で分泌され凝固形成に働くが、肝臓以外にも皮膚や腸などの組織での発現を新たに見出した。そこで、このような組織に存在するトロンビンの新規機能解析をめざし、Cre-lox システムを用いた組織特異的なトロンビン欠損個体の作製を最終目的としている。本発表では肝臓、表皮(上皮)組織特異的に発現する遺伝子を利用して、組織特異的な Cre（cre recombinase）の発現が行える個体を確立したので報告する。
【方法・結果】メダカにおいて肝臓および上皮組織に限定して発現する遺伝子をデータベースを用いて検索し、肝臓に発現する遺伝子として choriogenin(ChgH)、上皮組織として periplakin(ppl)を候補として選んだ。まずこれらの遺伝子発現パターンを逆転写 PCR と *in situ* hybridization で確認したところ、ChgH は主に肝臓で、ppl は皮膚、エラ等の上皮組織で特異的に発現していた。そこでゲノム編集法により、これら遺伝子のプロモーター下流に Cre-GFP 遺伝子を組み込み、F0 個体を得た。これらを成育させて目的の遺伝子導入の行われた個体を、蛍光発色を利用して選別した。さらに、Cre が発現した際に蛍光発色が変化するメダカと交配させることで、活性のある Cre の発現を確認し、目的となる個体を得た。
【Purpose】Controlling the expression of animal genes in time and tissue specific is essential to explore their functions. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) has attracted attention as a useful model organism in the functional analysis of various human-like genes, because it can produce a large number of fertilized eggs and can be grown to adulthood in an in vitro environment, which facilitates genome editing. Our research has focused on thrombin, one of the blood coagulation factors, and we have newly discovered that thrombin is expressed in tissues such as skin and intestine in addition to the liver. In order to analyze the novel function of thrombin in tissues, we attempted to generate tissue-specific thrombin-deficient medaka using the Cre-lox system. In this presentation, we report on the establishment of tissue-specific Cre-expressing individuals using genes specifically expressed in liver and epidermal (epithelial) tissues.
【Method and Result】In medaka, we selected choriogenin (ChgH) and periplakin (ppl) as a expressed gene in the liver and epithelial tissue, respectively. The Cre-GFP gene was knocked in the downstream of the promoters of these genes by genome editing, and F0 individuals were obtained. Individuals with the desired transgene were selected using fluorescent coloration in target tissues. Furthermore, we confirmed the expression of active Cre by crossing medaka, whose fluorescent coloration changes when cre recombinase is expressed.

Medaka, Cre-lox, Genome editing

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4I01-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

大腸ムチンの量的・質的変化における転写抑制因子 Bach1 の影響

Evaluation of intestinal mucus properties in Bach1 deficiency mice

○米澤 明莉[1]、水島 かつら[2]、平井 泰子[2]、舘野 浩章[3]、武藤 哲彦[4]、五十嵐 和彦[4]、髙木 智久[2]、内藤 裕二[2]、東村 泰希[1,2]([1]石川県大院・生資環、[2]京府医院・医、[3]産総研・細胞分子工学、[4]東北大院・医)
○Akari YONEZAWA[1], Katsura MIZUSHIMA[2], Yasuko HIRAI[2], Hiroaki TATENO[3], Akihiko MUTO[4], Kazuhiko IGARASHI[4], Tomohisa TAKAGI[2], Yuji NAITO[2], Yasuki HIGASHIMURA[1,2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Univ. of Med, [3]AIST, [4]Tohoku Univ.)

腸管組織を覆う粘液層は、管腔内に存在する無数の異物から組織を保護するバリアとして機能している。粘液層の主成分であるムチンは MUC2 に多数の糖鎖が付加された糖タンパク質であり、適切な糖鎖修飾は粘液層の安定性において極めて重要である。BTB domain and CNC homolog1（Bach1）はヘム結合性の転写抑制因子であり、酸化ストレス応答系に関わる遺伝子の発現制御に関与している。Bach1 は全身に発現する因子であるが、腸管生理機能における働きは未だ不明である。本研究では Bach1 欠損マウス（Bach1KO）を用いて、腸管生理機能における Bach1 の機能解析を実施した。

組織学的解析の結果、Bach1 の欠損に伴い粘液産生細胞である杯細胞の顕著な増加が示され、Bach1KO では粘液産生が強化されることが示唆された。続いて、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色法および糖鎖還元末端蛍光ラベル法を用いて、野生型マウス（WT）および Bach1KO の糞便中ムチン含量を定量した。PAS 染色法の結果、Bach1KO において糞便中ムチン含量が有意に増加した。しかし、糖鎖還元末端蛍光ラベル法の結果、2 群間で有意な変化は認められなかった。同様のムチン画分を SDS-PAGE で分離後、PAS 染色による可視化を実施した結果、WT と Bach1KO では異なる電気泳動パターンを呈した。lectin array および lectin blotting を用いて糞便ムチン画分の糖鎖組成解析を実施した結果、Bach1KO において GalNAc、シアル酸の有意な増加が示唆された。

以上の結果より、Bach1KO では GalNAc およびシアル酸が増加し、大腸ムチン糖鎖が伸長している可能性が示唆された。詳細な分子機序に関しては現在解析中である。

Intestinal mucus functions as a barrier that protects epithelial cells from harmful factors such as bacteria and virus existing in the intestinal lumen. The main component of mucus in intestine is Mucin 2 (MUC2) and its glycosylation is important for formation of a strong mucus layer. BTB domain and CNC homolog1 (Bach1) is a transcription repressor, which are mainly involved in the regulation of antioxidative pathway. Although Bach1 is ubiquitously expressed genes, its effect on intestinal physiology is still unclear. In this study, we investigated the function of Bach1 in intestinal physiology, especially mucus secretion and its properties, using Bach1-deficient mice.

Bach1, mucin, glycosylation

講演番号：4I01-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

炎症性腸疾患における核内受容体型転写因子 NR4A3 の関与

Involvement of Nuclear Receptor　NR4A3 in inflammatory bowel disease

○南川 夏己、伊藤 直人、片桐 万由佳、八須 匡和、西山 千春（東理大先進工）
○ Natsuki MINAMIKAWA, Naoto ITO, Mayuka KATAGIRI, Masakazu HACHISU, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

Nuclear Receptor superfamily に属する NR4A3 は、脳や血管など、様々な臓器や細胞において各種刺激によって発現誘導される初期活性化遺伝子であり、中枢神経の形成や動脈硬化の病態へ寄与することが報告されている。一方、免疫細胞が関わる生体の炎症反応における NR4A3 の役割は不明な点が多い。我々は、樹状細胞(DC)分化誘導時に NR4A3 発現が著しく増加することを見出し、siRNA を用いた NR4A3 の解析から、DC の炎症性サイトカイン遺伝子発現に NR4A3 が関与していることを報告してきた。本研究では、生体の炎症応答における NR4A3 の機能を明らかにするために、炎症性腸疾患モデルを用いて NR4A3 欠損マウスの病態を解析した。デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性大腸炎モデルでは、DSS 含有水の自由飲水投与によって腸管上皮が傷害され、免疫系の活性化や炎症反応が誘導される。*Nr4a3*$^{+/+}$マウスは DSS 摂取により、体重減少や下痢の症状を呈したが、*Nr4a3*$^{-/-}$マウスでは、体重減少の程度や下痢などを指標とする病態スコアが有意に改善された。解剖の結果、線維化に伴う腸の萎縮や、血中の IL-6 亢進も *Nr4a3*$^{-/-}$において著しく緩和されていた。以上、本研究により、NR4A3 が炎症性腸疾患に寄与することが示された。

NR4A3, a member of the nuclear receptor superfamily, is an early activation gene expressed in various cells and organs such as brain, blood vessels. Although several studies have reported the roles of NR4A3 in the development of central nervous system and arteriosclerosis symptoms, the involvement of NR4A3 in inflammatory responses involving dendritic cells (DCs) and other immune cells remains unclear. We have focused on the role of NR4A3 in DCs, because we found that NR4A3 expression is markedly increased during the development of DCs, and that NR4A3 is involved in the expression of proinflammatory cytokine genes in DCs by experiments using siRNA. In the current study, we investigated the role of NR4A3 in inflammatory response by using an inflammatory bowel disease model mice. In the dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model, free drinking of DSS-containing water damages the intestinal epithelium, result in the activation of the immune system and induction of inflammatory responses. *Nr4a3*$^{-/-}$ mice showed significantly improved weight loss, and diarrhea, accompanied with reduced intestinal atrophy, and the suppression of increase of IL-6 level in the blood in comparison with these of *NR4A3*$^{+/+}$ mice. These results indicate that NR4A3 is involved in the severity of inflammatory bowel disease.

inflammatory bowel disease, nuclear receptor, dendritic cell

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4I01-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

核内受容体型転写因子 NR4A3 の樹状細胞における機能解析と皮膚疾患への寄与

Functional analysis of a nuclear receptor NR4A3 in dendritic cell and the involvement of NR4A3 in skin diseases

○片桐 万由佳、伊藤 直人、南川 夏己、八代 拓也、八須 匡和、西山 千春（東理大先進工）
○ Mayuka KATAGIRI, Naoto ITO, Natsuki MINAMIKAWA, Takuya YASHIRO, Masakazu HACHISU, Chiharu NISHIIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

NR4A3 は核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド非依存的転写因子である。我々は *Nr4a3* 欠損マウスが接触性皮膚炎に耐性を示し、樹状細胞(DC)の機能変化がその一因である可能性を示してきたが、*Nr4a3* 欠損マウスでは皮膚炎の自然発症が観察されるなど、皮膚恒常性維持における NR4A3 の機能には不明な点が多い。そこで、マウス耳へのイミキモド塗布により乾癬様の病態を誘導するイミキモド誘導性乾癬モデルを展開したところ、*Nr4a3*$^{-/-}$(KO)では *Nr4a3*$^{+/+}$(WT)よりその病態の指標となる耳介の肥厚の程度が有意に亢進することが判明した。続いて、TLR7 を発現しイミキモドの標的細胞である DC について解析を行った。その結果、KO 由来 DC では定常状態、活性化状態ともに MHC class II, CD86, CCR7 など表面分子の発現レベルが低いことが明らかとなった。DC 機能に重要な転写因子の発現レベルを調べたところ、KO 由来 DC では IRF4 や IRF8 の発現レベルが低く、この発現低下が抗原提示関連分子の発現減少をもたらした可能性が示された。加えて興味深いことに、TLR7 のリガンド刺激に呼応した IL-6 や TNF-α の発現誘導が KO の DC で有意に亢進することが明らかとなった。これらのことから、NR4A3 の欠損は DC の抗原提示能や遊走能の減弱化と炎症反応の亢進を引き起こすことによって接触性皮膚炎の緩和と乾癬の悪化という一見対称的な影響をもたらしていることが示唆された。

NR4A3 is a ligand-independent transcription factor that belongs to the nuclear receptor superfamily. Although we have revealed that Nr4a3-deficient mice are resistant to contact hypersensitivity (CHS) due to a defective function of dendritic cells (DCs), the role of NR4A3 in skin homeostasis remains unclear, as represented by spontaneous dermatitis. In the current study, we applied an imiquimod-induced psoriasis model and found that *Nr4a3*$^{-/-}$ (KO) mice showed significantly enhanced ear swellings, a marker of psoriasis, compared to *Nr4a3*$^{+/+}$ (WT) mice. We also found that the expression levels of MHC class II, CD86, and CCR7 were low in KO DCs in both the steady and activated state, and there were differences in differentiation. The protein expression levels of transcription factors IRF4 and IRF8 in KO DCs were lower than that of WT, suggesting the reduction of key transcription factors caused a decreased expression of antigen presentation-related molecules. In addition, the secretion of IL-6 and TNF-α from TLR7 ligand-stimulated DCs was significantly enhanced by KO. These results suggest that deficiency of NR4A3 alleviates CHS and aggravates psoriasis, by decreasing the ability of antigen presentation and migration of DCs, and increasing DC mediated inflammatory responses, respectively.

skin, dendritic cell, nuclear receptor

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4I01-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:00～ ミーティングルーム I

ショウジョウバエ遺伝学で明らかになる栄養応答基盤

Drosophila genetics reveals mechanism of nutritional response

○小幡 史明[1,2,3] ([1]理化学研究所、[2]京大生命、[3]東大薬)
○Obata Fumiaki[1,2,3] ([1]RIKEN, [2]Kyoto Univ., [3]Tokyo Univ.)

生命の基本的な栄養素であるタンパク質は、成長、代謝、生殖、老化など、様々な生理現象を司る。したがって、細胞に備わるアミノ酸感知機構によりタンパク質摂食量を適切に感知し、応答することが栄養環境への適応に不可欠である。しかしながら、実際に生きた動物において、どのアミノ酸がどのような形でタンパク質への適応応答を調節するかの理解は不十分である。ショウジョウバエは、豊富な遺伝的および栄養学的手法を備えており、栄養に対する生物の反応のメカニズムを研究するために有用なモデル動物である。例えば完全合成培地を利用することで、各アミノ酸が宿主の生理機能にどのように寄与するかを理解することが出来る。我々は、ショウジョウバエを用いて、メチオニンに由来する代謝物である S-アデノシルメチオニンが腸幹細胞と個体寿命を制御していることを見出しました。本発表では、最近我々が行なった 20 種類のアミノ酸それぞれの栄養制限応答を解析した成果を紹介し、アミノ酸特異的な細胞応答について議論したい。

As a fundamental nutrient for life, the intake of dietary protein regulates many aspects of physiologies, including growth, metabolic status, fecundity, and lifespan across various species. Detecting dietary protein through amino acid (AA) sensing is vital for adaptation to the nutritional environment. However, it is not fully understood which AAs regulate the adaptive responses in living animals and how they coordinate organismal adaptation to protein restriction. *Drosophila melanogaster*, with its abundant genetic and dietary tools, has utilised to study the mechanism of the organismal response to nutrition. A chemically defined diet in flies has been a useful tool to understand how each amino acid contributes to the host physiology. We have identified S-adenosylmethionine, a metabolite derived from methionine, controls intestinal stem cells and organismal lifespan. We also performed systematic analyses of organismal response to specific depletions of 20 amino acids. We would like to discuss how each amino acid is detected and concomitantly trigger cellular responses in *Drosophila*.

amino acid, Nutrition, Drosophila

講演番号：4I03-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

Aβ42 海馬注入アルツハイマー型認知症モデルマウスにおける時間帯依存的な海馬依存性記憶想起障害

Time-of-day dependent impairment of hippocampal memory retrieval in Alzheimer's disease mouse model

○ボーグ ジェームス、喜田 聡（東大院）
○James BORG, Satoshi Kida (Univ. of Tokyo)

アルツハイマー型認知症（AD）では認知機能が低下する時間帯の存在が広く知られているが、この実態とその機構は不明である。一方、我々は学習・記憶能力に対する生物時計の役割の解析を進め、前脳特異的な時計遺伝子 BMAL1 のコンディショナ変異マウスでは時間帯依存的（明期開始後 10 時間; ZT10）に海馬依存性記憶の想起障害を示すこと、さらに、野生型マウスにおいても ZT10 で弱い記憶想起障害を示すことを明らかにして、海馬依存性記憶の想起が海馬生物時計によるサーカディアン制御を受けると結論した（Nature Commun., 2019）。本研究では、AD における記憶障害を中心とする認知機能の概日変化とそのメカニズムを解明する端緒として、アミロイドβ42(Aβ42)を海馬に局所注入した AD モデルマウスにおける海馬依存性記憶能力の概日変化を解析した。社会認知記憶課題を用いて、ZT4 と ZT10 においてトレーニングあるいはテストを様々な組み合わせで行った結果、Aβ42 注入マウスでは ZT4 及び ZT10 における記憶形成と ZT4 における記憶想起は正常に認められたのに対して、ZT10 における記憶想起の異常が観察された。さらに、新規物体認識記憶課題および物体位置認識記憶課題でも同様に Aβ42 注入マウスでは ZT10 における記憶想起異常が観察された。従って、Aβ42 注入マウスには ZT10 における記憶想起障害、すなわち、時間帯依存的な記憶想起障害が観察されることが明らかとなり、この AD モデルマウスは AD と同様に認知機能低下の概日変化を示すことが初めて明らかにされた。

Alzheimer's Disease (AD) has been known to show time-dependent declines of cognitive performance. Additionally, cognitive performance in humans varies according to time-of-day, with memory retrieval declining in the late afternoon-early evening. We have shown that mice show circadian regulation of memory retrieval and that hippocampal circadian clock positively regulates memory retrieval (Nature Commun., 2019). To understand the signatures and mechanisms of memory deficits in AD, we examined time-dependent memory performance in AD model mice micro-infused Amyloidβ42(Aβ42) into the dorsal hippocampus (Aβ42-injected mice). Aβ42-injected mice showed impairments of memory retrieval for social recognition memory, novel object recognition memory and object location memory only at ZT10. These results indicate that Aβ42-injected mice exhibit impairments of memory retrieval at ZT10, raising the possibility that these AD model mice show time-of-day dependent memory retrieval impairment.

Alzheimer's Disease, Circadian Rhythm, Memory Retrieval

発表責任者：ボーグ　ジェームス（j-borg97@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4I03-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

2 型糖尿病が脳インスリンシグナルとアルツハイマー病態に与える影響

Effects of type 2 diabetes on brain insulin signaling and Alzheimer's disease

○辻 竜平[1]、田之頭 大輔[1]、王 蔚[1]、丸山 めぐみ[1]、黒岩 智恵美[1]、斉藤 貴志[2]、西道 隆臣[2]、田口 明子[1] ([1]国立長寿医療研究センター、[2]理化学研究所)
○ Ryuhei TSUJI[1], Daisuke TANOKASHIRA[1], Wei WANG[1], Megumi MARUYAMA[1], Chiemi KUROIWA[1], Takashi SAITO[2], Takaomi SAIDO[2], Akiko TAGUCHI[1] ([1]National Center for Geriatrics and Gerontology, [2]RIKEN)

2 型糖尿病はアルツハイマー病(AD)を含む認知症の発症に関わることが近年の認知症研究から明らかとなってきている。これまでに我々は、AD 患者死後脳で発見されたインスリンシグナル主要調節分子 Insulin receptor substrate 1 (IRS1)の特異的リン酸化が、２型糖尿病モデルマウスでは認知機能障害に連動し、次世代型 AD モデルマウスである APP ノックイン(APP KI)マウスではアミロイドβ（Aβ）の変化に関与することを明らかにしている。

しかしながら、2 型糖尿病が AD の発症と進行に与える影響とその機序については未だ不明である。本研究では、２型糖尿病付加 APP KI マウスを作製し、認知機能、脳 IRS1 シグナル等について解析を行った。2 型糖尿病を誘導した APP KI マウスでは、同齢 APP KI マウスに比べ認知機能低下の進行と海馬 IRS1 の特異的リン酸化の亢進が観察されたが、この時 AD 病理像に変化はなかった。これらの結果から、２型糖尿病は脳 IRS1 シグナルの特異的変化を誘導し、Aβとは独立に AD の認知機能障害を悪化させることが示唆された。

Type 2 diabetes (T2DM) is known to be associated with the development of dementia, including Alzheimer's disease (AD). We have shown that the specific phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS1), a major insulin signaling regulator found in the postmortem brain of AD patients, is connected with cognitive dysfunction in T2DM model mice and is implicated in the change of amyloid ß (Aß) in the APP knock-in (APP KI) mice for new AD model. However, the effects of T2DM on the onset and progression of AD and its mechanism are still unclear. In this study, we produced T2DM-induced APP KI mice and then analyzed cognitive function and brain IRS1 signaling, etc. T2DM-induced APP KI mice exhibited progression of cognitive decline and enhancement of specific IRS1 phosphorylation in the hippocampus compared to those in age-matched APP KI mice, without change of AD pathology. These results suggest that T2DM may exacerbate cognitive impairment accompanied by specific changes of brain IRS1 signaling in AD independently of Aß.

type 2 diabetes, Alzheimer's disease, IRS1

講演番号：4I03-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

低タンパク質食摂取が ob/ob マウスの血中可溶性レプチン受容体とレプチン作用に与える影響

Effect of low-protein diet on plasma soluble leptin receptor and leptin activity in ob/ob mice

○内山 瑞稀[1]、武井 柚[2]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Mizuki UCHIYAMA[1], Yu TAKEI[2], Asako TAKENAKA[2] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景】leptin は脂肪細胞から分泌され食欲抑制や体脂肪量調節に働くホルモンである。我々は，低タンパク質食を与えた C57BL/6J マウスで肝臓 leptin 受容体 (Ob-R) mRNA 量及び血中可溶性 Ob-R (sOb-R) 濃度が増加することを報告した。また，低タンパク質食を給餌した C57BL/6J マウスに leptin を投与したところ，対照食給餌マウスでみられた摂食量低下がみとめられなかった。従って，タンパク質欠乏時の sOb-R 増加は leptin による摂食抑制作用を低下させると考えられた。本研究では，変異 leptin を発現し leptin 作用が欠損した *ob/ob* マウスに低タンパク質食を与え, 投与したレプチンの作用を解析した。
【方法・結果】雄の 7 週齢の *ob/ob* マウスを 4 群に分け，タンパク質を 20%含む対照食（20C），あるいは 1%含む低タンパク質食（1C）をそれぞれ 2 群に与えて飼育した。実験食 8 日目から 4 日間，各食餌群の 1 群に leptin（2 mg/kg）を 1 日 1 回腹腔内投与し，もう 1 群には vehicle として PBS を投与した。その結果，1C 群では肝臓 Ob-R mRNA 量が増加したが，血中 sOb-R 濃度は増加しなかった。また，C57BL/6J マウスとは異なり，1C 群でも leptin 投与による摂食量低下がみられ，視床下部の食欲調節因子の mRNA 量も leptin 作用に応じて変動した。
【結論】*ob/ob* マウスではタンパク質欠乏時に血中 sOb-R 濃度が増加しなかったことから、血中 sOb-R 増加には正常なレプチンの存在が必要であることが明らかになった。また、血中 sOb-R が増加しなかったために，*ob/ob* マウスではタンパク質欠乏時に leptin の食欲抑制作用が低下しなかった可能性が考えられた。

Leptin is a hormone secreted by adipose tissue and works to suppress appetite and regulate fat mass. We found that liver leptin receptor (Ob-R) mRNA and plasma soluble Ob-R (sOb-R) levels increased in C57BL/6J mice fed a low-protein diet. In addition, appetite-suppressing effect of exogenous leptin was decreased in mice fed a low-protein diet. In this study, we fed *ob/ob* mice with a low-protein diet and investigated the effect of leptin administration on food intake and gene expression in hypothalamus. Plasma sOb-R levels did not increase in low-protein diet-fed *ob/ob* mice, and the effect of exogenous leptin was not suppressed in these mice. From the result that plasma sOb-R level did not increase in *ob/ob* mice, it was demonstrated that presence of normal leptin is required to increase plasma sOb-R during protein deficiency. The absence of increased sOb-R may be responsible for the lack of suppression of leptin action in *ob/ob* mice.

low-protein diet, soluble leptin receptor, ob/ob mice

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：4I03-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

骨格筋由来細胞外小胞の体内動態及び生理機能の解析

Analysis of biodistribution and functions of skeletal muscle-derived extracellular vesicles *in vivo*

○渡辺 祥[1]、須藤 優里[1]、櫻井 英俊[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大・CiRA)
○Sho WATANABE[1], Yuri SUDO[1], Hidetoshi SAKURAI[2], Ryuichiro SATO[1], Yoshio YAMAUCHI[1]
([1]Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Tokyo Univ., [2]CiRA, Kyoto Univ.)

細胞外小胞 (Extracellular vesicle, EVs) は様々な生理活性分子を含んでおり、細胞間・組織間の情報伝達に重要な役割を果たしている。近年、骨格筋細胞においても EVs の分泌が認められ、生理的に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかしながら、生体内においては様々な細胞や組織に由来する EVs が混在するため、骨格筋から分泌された EVs が体液中に占める割合、体内動態及び生理機能については明らかになっていない。我々はプロテオミクス解析によって骨格筋由来 EVs のマーカータンパク質 (ATP2A1, β-enolase 他)を同定し、これらのマーカータンパク質によって骨格筋由来 EVs が血中を介したエンドクライン的な機能ではなく組織内でパラクリン的に機能を発揮する可能性を示唆した。骨格筋由来 EVs の生理機能を明らかにするため、骨格筋間質に蓄積する EVs を単離し、筋芽細胞への添加実験を行ったところ、EVs の取り込みが認められ、筋分化関連遺伝子の発現上昇と共に上流転写因子である Pax7 の発現抑制が認められた。骨格筋間質から単離した EVs からは Pax7 をターゲットとする 4 種の miRNA(miRs-1, -206, -431 and -486)が検出されたことから、骨格筋繊維が EVs を介して筋芽細胞の分化を制御する新たなメカニズムが示唆された。

Extracellular vesicles (EVs) contain a variety of bioactive molecules including nucleic acids, proteins, and lipids. They play important roles in cell-cell communications. Recently, secretion of EVs has been observed in skeletal muscle cells, and their physiological functions have been suggested. However, the proportion of skeletal muscle derived EVs (SkM-EVs) in body fluid and biological function of SkM-EVs *in vivo* remain unknown because not only skeletal muscle but also other tissues release EVs. In this study, we first identified protein markers for SkM-EVs by quantitative proteomics. Using these protein markers, we confirmed that SkM-EVs were present in muscle interstitium but little in the blood. Furthermore, we showed that SkM-EVs isolated from muscle interstitium were incorporated into C2C12 myoblast and promoted muscle differentiation by regulating gene expression of Pax7 and myosin heavy chain at least partially through myomiRs (miRs-1, -206, -431, and -486). This work provides a conceptually new basis how skeletal muscle EVs exert their functions *in vivo*.

Extracellular vesicle, Skeletal muscle, Interstitium

発表責任者：渡辺祥（watanabe-sho650@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4I03-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

骨格筋における Tmem100 の機能解析

Functional analysis of Tmem100 in skeletal muscle

○東平 征哉、佐々木 崇、久保山 文音、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大農）
○MASAYA HIGASHIHIRA, TAKASHI SASAKI, AYANE KUBOYAMA, MAKOTO SHIMIZU, YOSHIO YAMAUCHI, RYUICHIRO SATO (Tokyo Univ.)

Transmembrane protein 100 (Tmem100) は 134 アミノ酸からなり、2 つの膜貫通領域を持つタンパク質である。Tmem100 は腎臓や心臓における胎生期の形態形成、肺や肝臓におけるがん細胞の転移・増殖の抑制など、幅広い組織において重要な生理機能を持つことが報告されているものの、骨格筋における機能は未だよく分かっていない。

当研究室は過去に Transmembrane protein 100 (Tmem100) が複数の筋萎縮条件で発現が上昇することを確認し、その機能解析に取り組んできた。今回、*in vivo* electroporation によってマウス骨格筋に Tmem100 を過剰発現させた際に、導入したプラスミドが経時的に減少することを確認した。また、プラスミドの導入に起因する複数の炎症性サイトカインの発現上昇が、Tmem100 の過剰発現によって抑制されることを明らかにした。

骨格筋における異所性の核酸の存在は細胞質やエンドソームに存在する DNA センサーを介して炎症を誘導し、筋萎縮を引き起こす可能性がある。今回得られた結果から、骨格筋において Tmem100 が骨格筋細胞内の DNA を減少させ、DNA センサーを介した炎症の発生を抑制することで、筋機能維持に関与する可能性が示唆された。

Transmembrane protein 100 (Tmem100) is a 134 amino acid protein with two transmembrane regions that has been reported to have important physiological functions in a wide range of tissues, including embryonic morphogenesis in the kidney and heart, and inhibition of cancer cell metastasis and growth in the lung and liver. However, its function in skeletal muscle is still poorly understood.

In the past, our laboratory has shown that the expression of transmembrane protein 100 (Tmem100) is upregulated under several conditions of muscle atrophy, and we have been working to analyze its function. In this study, we found that overexpression of Tmem100 in mouse skeletal muscle by *in vivo* electroporation resulted in a decrease in the number of transduced plasmids over time. We also found that overexpression of Tmem100 suppressed the upregulation of several pro-inflammatory cytokines caused by plasmid transfer.

The presence of ectopic nucleic acids in skeletal muscle may induce inflammation via DNA sensors in the cytoplasm and endosomes, leading to muscle atrophy. The results obtained in this study suggest that in skeletal muscle, Tmem100 may be involved in the maintenance of muscle function by reducing DNA in skeletal muscle cells and inhibiting the generation of inflammation via DNA sensors.

Tmem100, skeletal muscle, muscle inflammation

講演番号：4I03-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

Lactate treatment suppressed insulin-induced glucose uptake in adipocytes and caused whole body insulin resistance

○Zheng Ni[1], Takahiro Gunji[1], Yu-Sheng Yeh[1], Jungin Kwon[1], Su-Ping Ng[1], Haruya Takahashi[1], Wataru Nomura[1,2], Teruo Kawada[1,2], Kazuo Inoue[1,2], Tsuyoshi Goto[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. C-PIER, Kyoto Univ.)

【Purpose】It is reported that plasma lactate level is increased in type 2 diabetic patients. It has also been known that production and secretion of lactate in adipose tissue are increased under the obese state. However, the effect of adipose tissue lactate production on glucose metabolism is still unknown. Therefore, the purpose of this study is to investigate the effect of lactate on cellular and systemic glucose metabolism.

【Results】The culture media from lactate-treated 3T3-L1 adipocytes contained higher glucose concentrations compared with those from control adipocytes, indicating the glucose uptake was changed by lactate treatment. After insulin stimulation, the phosphorylation level of Akt, which is an index of insulin signaling, was decreased by lactate treatment, suggesting that lactate negatively regulates the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. In addition, the activation of Akt phosphorylation level by insulin stimulation was enhanced by the lactate dehydrogenase (Ldh) inhibitor treatment. Conversely, it was reduced by the Ldh activator treatment, indicating that lactate is an endogenous factor in the regulation of insulin sensitivity in adipocytes. In animal experiments, intraperitoneal administration of lactate to male C57BL/6J mice induced glucose intolerance and insulin resistance. The decreased Akt phosphorylation levels in tissues including white and brown adipose tissue after insulin injection with lactate treatment indicated that decreased insulin sensitivity in such tissues may contribute to lactate-induced insulin resistance.

【Conclusion】Lactate might be an endogenous regulator of insulin sensitivity, and increased lactate production in obese adipose tissues might be related to obesity-induced insulin resistance.

lactate, adipocyte, insulin sensitivity

発表責任者：Tsuyoshi Goto（goto.tsuyoshi.6x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4I03-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

The Role of Mevalonate Biosynthetic Pathway in Brown Adipose Tissue and Whole Body Metabolism

○Jungin Kwon[1], Yu-Sheng Yeh[1], Satoko Kawarasaki[1], Wataru Nomura[1,2], Haruya Takahashi[1], Kazuo Inoue[1,2], Teruo Kawada[1,2], Tsuyoshi Goto[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., C-PIER., Kyoto Univ.)

Mevalonate biosynthetic pathway (MVA pathway) produces various important metabolites, including cholesterol, to maintain adequate cellular functions. In addition to sterols, MVA pathway-producing non-sterols have been shown to play essential roles for cell growth and cell viability in many cells. However, their roles in brown adipocytes which have high thermogenic activity to maintain body temperature remain largely unclear.

In this study, we investigated the role of MVA pathway in the regulation of brown adipocytes function and whole body metabolism using a transgenic mouse model. To achieve this, brown adipocytes-specific 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), a rate-limiting enzyme in MVA pathway, knockout mice (BAT KO mice) were generated by using *Hmgcr*-floxed mice (mice which have two loxP sites separated by DNA containing *Hmgcr* exon 12-14 in their genomic DNA) and *Ucp1*-Cre mice (mice in which Cre recombinase is expressed in *Ucp1* (uncoupling protein 1, a representative brown adipocyte specific gene) expressing cells). Notably, BAT KO mice showed atrophy of brown adipose tissue (BAT) and displayed hypothermia when exposed to cold. Moreover, BAT KO mice showed higher respiratory exchange ratio, indicating they dominantly used carbohydrate as an energy substrate. Although there were no differences in glucose tolerance and insulin sensitivity, BAT KO mice showed higher gluconeogenic capacity than control mice. Consistent with the significant upregulation of the expression levels of glucose-6-phosphatase (*G6pc*), increase in phosphorylation-mediated activation of cAMP response element binding protein (CREB), a transcriptional activator of *G6pc*, and decrease in phosphorylation-mediated activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), a transcriptional repressor of *G6pc*, were observed in the liver of BAT KO mice.

In summary, *Hmgcr* deficiency in brown adipocytes induced BAT atrophy and loss of its thermogenic function, suggesting that MVA pathway in brown adipocytes plays an indispensable role to maintain BAT function. Furthermore, *Hmgcr* deficiency-mediated BAT atrophy led to upregulation of gluconeogenesis possibly mediated by CREB and STAT3-mediated regulation of *G6pc* expression. These findings indicated that BAT plays an important role in the physiological regulation of not only thermogenesis but also gluconeogenesis.

Mevalonate Biosynthetic Pathway, Brown Adipose Tissue, Gluconeogenesis

発表責任者：Tsuyoshi Goto（goto.tsuyoshi.6x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4I03-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

褐色脂肪組織での熱産生に及ぼす男性ホルモンの作用とそのメカニズム

Effect of androgens on brown adipose tissue thermogenesis and its mechanism

○久保 慶太朗[1]、原田 直樹[1]、北風 智也[1]、乾 博[1,2]、山地 亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境、[2]大手前大・健康栄養）
○Keitaro KUBO[1], Naoki HARADA[1], Tomoya KITAKAZE[1], Hiroshi INUI[1,2], Ryoichi YAMAJI[1]
([1]Osaka Pref Univ., [2]Otemae Univ.)

【目的】体温調節は恒常性の維持において重要である。男性ホルモン作用不全モデルであるアンドロゲン受容体（AR）全身性ノックアウト（ARKO）マウスおよび去勢マウスで体温が上昇したことから、我々は男性ホルモンが体温調節に寄与することを見出している。生体内での熱産生を担う主要な組織として褐色脂肪組織（BAT）がある。BAT での熱産生には、β3 アドレナリン受容体（β3AdR）を介した cAMP/PKA/CREB シグナリングの活性化とそれに伴う脱共役タンパク質 1（UCP1）の発現促進が関与する。本研究では、男性ホルモンが BAT での熱産生に及ぼす作用とその分子機構について検討した。
【方法・結果】ARKO マウスでは性成熟にあたる 8 週齢時から、去勢マウスでは手術後に体温（直腸温度）が有意に高くなり、β3AdR アゴニスト CL316243 投与時の体温上昇レベルに関しても、対照群と比較して ARKO および去勢群で有意に高くなった。さらに CL316243 投与時の BAT での *Ucp1* mRNA 発現レベルと CREB リン酸化レベルが ARKO 群で有意に高くなり、ARKO マウスにおいて BAT での熱産生亢進が示された。培養細胞を用いた分子機構の検討により、男性ホルモンは AR を介して β3 アドレナリンシグナリングを抑制すること、その作用は AR が CREB と複合体を形成して CREB のリン酸化を抑制する機構によることが明らかになった。
【Objectives】Thermoregulation is important for maintaining homeostasis. We found that defects in androgen signaling due to global androgen receptor (AR) knockout and castration increased body temperature, indicating that androgens contribute to thermoregulation. Brown adipose tissue (BAT) is the main tissue responsible for thermoregulation *in vivo*. BAT thermogenesis is induced by β3AdR-mediated activation of cAMP/PKA/CREB signaling that increases uncoupling protein 1 (UCP1) expression. In this study, we investigated the effect of androgens on BAT thermogenesis and its molecular mechanism.
【Methods and Results】Body temperature (rectal temperature) was significantly higher in androgen deficient (i.e., ARKO or castrated) mice than in control mice. Increase in body temperature by the β3AdR agonist CL316243 administration was significantly higher in ARKO and castrated mice than in control mice. In BAT, the induction of *Ucp1* expression and CREB phosphorylation by CL316243 administration was significantly higher in ARKO mice, indicating that BAT thermogenesis is more active in ARKO mice. In mechanistic studies in cultured cells, we showed that androgen-bound AR suppressed β3AdR signaling by binding to CREB and inhibiting its phosphorylation.

androgen, brown adipose tissue, protein kinase A

発表責任者：原田　直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4I03-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

高脂肪食摂取時に IRS-1 欠損は耐糖能異常を惹起し肝脂質蓄積を抑える

The disruption of IRS-1 impairs glucose tolerance and suppresses hepatic lipid accumulation under high-fat diet feeding in rats

○鈴木 晶子[1]、豊島 由香[2,3]、藤原 葉子[2,4]([1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大・HLI 研、[3]宇大・農、[4]お茶大・基幹研究院)
○Akiko SUZUKI[1], Yuka TOYOSHIMA[2,3], Yoko FUJIWARA[2,4] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ, [2]Inst. HLI, Ochanomizu Univ., [3]Utsunomiya Univ., [4]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ.)

インスリン受容体基質(IRS)-1 は、インスリンや IGF-1 のシグナル伝達に重要なタンパク質である。これまでに我々は、全身で IRS-1 を欠損させたラット（KO）を作出し、KO では成長が阻害されること、インスリン抵抗性と軽度の耐糖能障害が起こることを見出した。本研究では、高脂肪（HF）食摂取に応答した糖・脂質代謝変動に IRS-1 が果たす役割を明らかにするために、6 週齢雄性の野生型ラット(WT)と KO に HF 食を与えた際の糖・脂質代謝の変化を検討した。その結果、HF 食摂取時の KO ラットにおける耐糖能は、WT に比べて血中インスリン濃度が上昇していたにもかかわらず、悪化した。肝臓 TG 量は、HF 食摂取によって、WT では約 2 倍増加したのに対し、KO では変わらなかった。また、肝臓における脂肪酸合成関連酵素のタンパク質量は、HF 食摂取によって、WT で減少傾向であったが、KO では変化しなかった。以上の結果から、HF 食摂取時に IRS-1 が欠損すると、耐糖能障害が惹起されるとともに、肝脂質蓄積が抑制されることが明らかとなった。また、この肝脂質蓄積の抑制は、肝臓における脂質合成量の低下によって起こる現象ではないと示唆された。したがって、ラットにおいて、IRS-1 は HF 食摂取時の血糖恒常性の維持に重要な役割を果たすと考えられた。

Insulin receptor substrate (IRS)-1 is the major substrate protein for insulin and IGF-1 receptors. We have previously created IRS-1 knockout (KO) rats using by the CRISPR/Cas9 system and showed that the disruption of IRS-1 impairs growth and insulin function in rats. Here, we examined the role of IRS-1 on the regulation of glucose and lipid metabolism during high-fat diet (HF) intake in rats. The 6-week-old male wild-type (WT) and KO rats were fed either a control diet or HF for 10 weeks. Under HF-feeding, the glucose tolerance was impaired in KO rats compared to WT rats, despite the higher plasma insulin level in KO rats. The hepatic triglyceride (TG) level was two-fold increased by HF feeding in WT rats but not in KO rats. In addition, HF tented to decrease the protein levels of the enzymes involved in fatty acid synthesis in WT rats but not in KO rats. These results indicate that the lack of IRS-1 leads to the impairment of glucose tolerance and the suppression of hepatic TG accumulation under HF-feeding. We, therefore, conclude that IRS-1 plays important roles in glucose homeostasis during HF intake in rats.

insulin receptor substrate, insulin signaling, high fat diet

発表責任者：鈴木晶子（g2040531@edu.cc.ocha.ac.jp）

講演番号：4I03-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

抗ロコモ緑茶葉成分の骨密度に対する影響について

Influence of the anti-locomotive syndrome green tea leaf ingredient on bone density

○山中 布武己[1]、松田 智子[2]、栗谷 健志[1]、梅川 逸人[1]、西尾 昌洋[1]([1]三重大生物資源、[2]三重県農業研究所)
○ FUBUKI YAMANAKA[1], Tomoko Matsuda[2], Kenji Kuriya[1], Hayato Umekawa[1], Masahiro Nishio[1] ([1]Mie Univ., [2]Mie Pref. Agricult. Res. Inst.)

我々は，抗ロコモーティブシィンドロームを有する緑茶の研究をし，これまでに，抗ロコモ緑茶葉(ALTL)の抗骨粗鬆症効果を報告してきた。ALTL は，骨粗鬆症予防に有効であるエピガロカテキンガレート (EGCg)とビタミン K_1（VK_1）を含んでおり，VK_1 は体内で代謝されて骨粗鬆症治療薬である VK_2 となる。しかし，当研究室ではカフェインが ALTL の骨粗鬆症抑制効果を弱めている可能性を示すことが明らかとなり，本研究では，超臨界処理により脱カフェイン化処理を行ったデカフェイン化抗ロコモ緑茶葉 (D-ALTL)の骨粗鬆症抑制効果について検証を行った。
卵巣摘出モデル骨粗鬆症マウスを用い，ALTL もしくは D-ALTL を試験餌に混合し，4 週間給餌し，3D-X 線 CT 装置（㈱リガク）にて大腿骨遠位部を測定した。コントロール群と D-ALTL 投与群または ALTL 群とを比較検討した結果，両群ともに有意な骨密度・骨梁数低下抑制作用が認められた。ALTL 群と D-ALTL 群を比較すると有意な差はないものの D-ALTL 群の方が骨密度は上昇傾向にあった。以上のことから，デカフェイン処理によるカフェインの減少と VK_1 と EGCg 効果が複合的に作用し，D-ALTL が ALTL と比較して骨密度低下を抑制したと考えられる。

Anti-Locomotive syndrome green Tea Leaf (ALTL) had previously reported by using in our study not only contains epigallocatechin gallate (EGCg), which was effective in preventing osteoporosis, but also contains vitamin K_1 (VK_1), which was metabolized in the body to VK_2, a known osteoporosis drug. However, our previous results showed that caffeine might weaken the inhibitory effect of ALTL on osteoporosis. Therefore, we examined the inhibitory effect of supercritical Decaffeinated Anti-Locomotive syndrome green Tea Leaf (D-ALTL) on osteoporosis. We examined the effect of D-ALTL on osteoporosis in osteoporosis ovariohysterectomy model mice. ALTL or D-ALTL were mixed in the powder feeding diet for 4-weaks. In the ALTL group and the D-ALTL group, is no significant difference, although the D-ALTL group have shown increased inhibition of bone mineral density and bone trabecular number than the ALTL group. These results suggest that D-ALTL suppressed the bone mineral density decrease more than ALTL, due to the combined effects of decaffeination and VK1 and EGCg.

Bone density, Green tea, Ovariectomy model mouse

発表責任者：西尾　昌洋（nishio@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4I03-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:00～ ミーティングルーム I

インテグリンシグナルによる運動誘導性マイオカインの発現制御機構

Integrin-FAK signaling mediates the exercise-induced expression of myokines

○木本 早耶、清水 誠、佐藤 隆一郎、山内 祥生 (東大農)
○Saya KIMOTO, Makoto SHIMIZU, Ryuichiro SATO, Yosio YAMAUCHI (Tokyo Univ.)

マイオカインとは、生理機能を有する骨格筋由来分子の総称である。運動によって発現および分泌が上昇する一部のマイオカインは、運動がもたらす有益な効果と密接に関連しており、その機能が注目されている。一方、多くのマイオカインにおいてその運動依存的な発現制御機構はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではマウスおよび C2C12 細胞を用いて、運動によって誘導されるマイオカインの発現制御機構について解析した。マウス骨格筋培養細胞である C2C12 筋管細胞に電気パルス刺激 (EPS) を与え、筋収縮を模倣させる実験系において、マウス運動時に発現が上昇する複数のマイオカインの遺伝子発現が EPS により誘導されるとともに、細胞外マトリックスの一種であるラミニンによって EPS 依存的なマイオカインの発現上昇がさらに増強されることが見出された。そこで、ラミニンの主要な受容体であるインテグリンを介したシグナルに着目し、非受容体チロシンキナーゼである FAK およびその下流の Src が EPS 依存的なマイオカインの発現誘導に関与するか検討した。その結果、EPS 刺激や運動させたマウスの腓腹筋において FAK の活性化が認められるとともに、これらの分子を阻害することで EPS 依存的なマイオカインの発現誘導が抑制された。以上の結果より、運動によって発現が上昇する一部のマイオカインは、インテグリン-FAK-Src シグナルを介して発現が制御されることが示唆された。現在、このシグナルによって活性化される転写因子について解析している。

Several myokines mediate the health benefits of exercise. Although their expression and secretion are increased by exercise, the mechanism by which exercise upregulates their expression remains poorly understood. In this work, we examined the molecular mechanism using C2C12 myotubes and mice. As an in vitro muscle contraction model, C2C12 myotubes were subjected to electrical pulse stimulation (EPS). We found that EPS increased the expression of several myokines and that the EPS-dependent upregulation was further enhanced by laminins, ligands for integrins. The expression of these myokines was also upregulated in the gastrocnemius of mice immediately after exercise. Furthermore, it was shown that EPS-induced upregulation of these myokines was suppressed by inhibiting focal adhesion kinase (FAK) and Src. Our results thus suggest that integrin-FAK-Src signaling is involved in the exercise-induced expression of myokines.

myokines, exercise, skeletal muscle

講演番号：4I05-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

バイオメタン鉱床造成/生産法: Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) - 地下環境褐炭層では何が起こっているか？
Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) method - what happens in the lignite formation of the subsurface environment?
○上野 晃生[1]、玉澤 聡[1]、玉村 修司[1]、村上 拓馬[1]、木山 保[1]、猪股 英紀[1]、山口 眞司[2]、長沼 毅[3]、五十嵐 敏文[1,4] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]三菱マテリアル株式会社、[3]広島大院統合生命科学研究科、[4]北海道大学工学研究院)
○Akio UENO[1], Satoshi Tamazawa[1], Shuji Tamamura[1], Takuma Murakami[1], Tamotsu Kiyama[1], Hidenori Inomata[1], Shinji Yamaguchi[2], Takeshi Naganuma[3], Toshifumi Igarashi[1,4] ([1]H-RISE, [2]Mitsubishi Material Co. Ltd., [3]Hiroshima University, [4]Hokkaido University)

幌延地圏環境研究所では、地下の原位置環境を利用し、未利用資源である褐炭をバイオメタンへ変換しエネルギー資源として回収する方法「バイオメタン鉱床造成/生産法(SCG 法)」を提唱した[1,2)]。現在、北海道、天北炭田、小石地区において SCG 法の現場試験を行っており、地下環境でのメタン生成の確証を得ることを目的とし、2021 年度に褐炭層にギ酸を注入する試験を行った。原位置温度は 8℃という低温であるにも関わらず、7 日以内にギ酸濃度の減少に伴い酢酸の生成が確認され、原位置環境に棲息する微生物によるギ酸から酢酸への変換が成されていることが考えられた。本講演では、現場地下環境でどのような事が生じているかを明らかにするため、室内での培養試験で再現実験を行い、同じ現象が生じるかどうか、その際、微生物群集構造がどのように変化するかの結果について紹介したい。

H-RISE proposed "Subsurface Cultivation and Gasification (SCG)", a method of converting unused lignite into biomethane and recovering it as an energy resource employing the underground *in situ* environment[1,2)]. Currently, a field test of the SCG method is being conducted in Koishi mining area of Temboku Coalfield, Hokkaido, Japan, and a test of injecting formate into the lignite layer was conducted in 2021 with the aim of obtaining confirmation of methane production in the underground environment. Despite the low *in situ* temperature of 8°C, the production of acetate was confirmed within 7 days as the formate concentration decreased, implying that formate would be converted to acetate by microorganisms in the *in situ* environment. In order to clarify what is happening in the underground environment at the site, we will conduct a reproduction experiment in a cultivation experiment to examine if the same phenomenon would occur and how the microbial community structure would change. I would like to show the results in this presentation.

References : [1]Aramaki *et al.* (2017) Energy Conversion and Management 153, 566-575. [2]特許 6396068 (2018 年 9 月 26 日)

Subsurface Cultivation and Gasification (SCG), lignite, acetate

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

講演番号：4I05-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

二酸化炭素固定に貢献するバイオミネラル中の炭酸脱水酵素の活用

Application of Carbonic Anhydrase in biominerals for CO2 Sequestration

○浪川 勇人[1]、森安 賢司[2]、勝又 聡[3]、前山 薫[4]、渡部 終五[5]、安元 剛[5]、鈴木 道生[6]（[1]東大農、[2]日本海水、[3]出光興産、[4]御木本製薬、[5]北里大海洋生命、[6]東大院農）

○ Yuto NAMIKAWA[1], KENJI MORIYASU[2], SATOSHI KATSUMATA[3], KAORU MAEYAMA[4], SHUGO WATABE[5], KO YASUMOTO[5], MICHIO SUZUKI[6] ([1]Faculty of Agriculture, Univ Tokyo., [2]Nihonkaisui, [3]Idemitsu Kosan, [4]Mikimoto Pharmaceutical, [5]Kitazato Univ., [6]Univ Tokyo.)

アコヤガイ貝殻は、炭酸カルシウムを主成分として外側が稜柱層、内側が真珠層から構成されている。貝殻内に存在する様々な有機物が緻密な炭酸カルシウム結晶の微細構造を形成すると考えられている。その一つである炭酸脱水酵素(nacrein）は水溶液中の二酸化炭素を重炭酸イオンに変換する反応を触媒し、アコヤガイの貝殻形成の場で炭酸イオンを供給する役割を持つ。また地球温暖化が進行する現在、炭酸脱水酵素を利用して大気中の二酸化炭素を加水分解し、炭酸カルシウムとして固定化する研究が注目されている。本研究では、アコヤガイの真珠層に存在する nacrein の炭酸脱水酵素活性の測定及びアコヤガイの真珠層粉末を用いた二酸化炭素固定系の構築を行った。*p*-nitrophenylacetate (*p*-NPA) を基質とした発色定量法により炭酸脱水酵素活性を評価したところ、アコヤガイの真珠層に存在する nacrein は炭酸脱水酵素活性を維持した状態で保持されていて、酵素反応を複数回繰り返しても活性が低下しないことが判明した。次に、海水をカルシウム源として、大気中の二酸化炭素を海水に水和し、炭酸カルシウムを合成する実験を行ったところ、アコヤガイの真珠層粉末を添加した系では、試薬の炭酸カルシウムを加えた系と比較して、二酸化炭素の加水分解が速く、巨大で分散性の高い炭酸カルシウム結晶を合成できることが判明した。これらの結果から、アコヤガイの貝殻粉末そのものが二酸化炭素固定を促進する工業プロセスの触媒材料として利用できる可能性が示された。

The shell of *Pinctada fucata*, composed mainly of calcium carbonate, has the outside prismatic layer and the inside nacreous layer. Organic matrix proteins in the shells are the key to shell formation. Nacrein, which has a carbonic anhydrase (CA) domain, plays a significant role in providing bicarbonate ions in shell formation. Recently, as global warming has become one of the most major problems on earth, the technology of CO_2 sequestration using CA has been investigated. We studied the CA activity of the nacrein and constructed CO_2 sequestration system using the nacre powder. To determine the kinetic parameters and check the reusability, we used *p*-NPA as substrate. Nacrein was kept in the nacreous layer with CA activity and retained CA activity even after 8 cycles of *p*-NPA hydration. The nacre powder promoted the hydration of carbon dioxide in the atmosphere and was applied to the seawater to form the precipitation of calcium carbonate. The nacre powder induced the synthesis of larger and more dispersive calcium carbonate than commercially available calcium carbonate. These results suggested that the nacre powder of *P. fucata* is suitable candidate for use in CO_2 sequestration.

CO2 sequestration, nacrein, carbonic anhydrase

発表責任者：浪川勇人（namikawa-yuto634@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4I05-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

固体腐植ヒューミンを用いた生物電気化学システムにおける酢酸生成菌よる二酸化炭素変換の促進
Promotion of the carbon dioxide conversion of acetogenic bacterium in bioelectrochemical system by using humin, a solid-phase humic substance

○笠井 拓哉[1,2]、伊藤 啓人[2]、Pham Minh Duyen[1]、菰田 峰生[3]、片山 新太[1,2]（[1]名古屋大 IMaSS、[2]名古屋大工、[3]中部電力（株））
○Takuya KASAI[1,2], Akito ITO[2], Minh Duyen Pham[1], Mineo Komoda[3], Arata Katayama[1,2] ([1]IMaSS, Nagoya Univ., [2]Sch. Eng., Nagoya Univ., [3]Chubu electric power co., inc.)

【背景と目的】二酸化炭素（CO_2）の固定化は喫緊の課題であり、回収・貯留に加え、資源化技術が求められている。CO_2 資源化技術として光、触媒、電気等を用いた多様な方法が開発されているが、微生物を用いた技術は高密度化が可能な省エネルギー技術として期待されている。この様な背景から、電気活性酢酸生成菌を用いた生物電気化学的 CO_2 資源化技術の開発が進められているが、反応効率の増加には微生物への電子供給が鍵とされ電極形状の工夫等が行われている。これに対し、我々は固体腐植物質（ヒューミン）が嫌気性酢酸生成菌群へ細胞外電子供与して、CO_2－酢酸変換反応を促進することを見いだした。そこで本研究では、ヒューミンを用いた微生物電気化学システムによる CO_2 資源化技術の構築を目的とした。
【結果と考察】電気活性のある嫌気性非光合成酢酸生成菌として *Clostridium aceticum* JCM15732 株を用い、CO_2 還元反応に対するヒューミンの影響を評価した。炭素源を CO_2/HCO_3^-、電子源を水素とした嫌気培養におけるヒューミンの酢酸生成への効果を調べたところ、ヒューミン添加によって酢酸生成量の増加がみられ、本株の CO_2－酢酸変換反応に対するヒューミン促進効果が明らかとなった。そこで、ヒューミンを細胞外電子伝達物質として用いた 2 槽式生物電気化学培養槽を組立て、カソード電極を唯一の電子源として電気培養を 5 日間行ったところ（カソード槽 220 mL 培養液）、水の電気分解があまり進まない－0.4 V（vs.水素標準電極）の温和な条件でも、高効率で CO_2－酢酸変換反応を行う事ができることが明らかとなった（生成量 521 μmol、421 μmol/L/day）。

CO_2-fixation is an urgent issue in the world. In addition to the CO_2 recovery and storage technologies, the development of the CO_2 conversion technologies to resources are considered essential. Chemoautotrophic acetogen, being able to convert CO_2 to acetate, has attracted attentions in the utilization in the CO_2 conversion technologies. The electron transfer to the acetogen has been considered as a key for the higher efficiency in the microbial CO_2 conversion. Our previous study demonstrated that humin, insoluble humic substance at any pH, is able to promote the microbial CO_2 reduction to acetate under anaerobic condition, by the donation of extracellular electrons from humin to the enriched acetogenic microorganisms. Here, we show that a bioelectrochemical system using humin achieves the promotion of CO_2 reduction to acetate by *Clostridium aceticum* JCM15732 under the mild conditions with little electrolysis of water (-0.4 V vs. standard hydrogen electrodes).

CO_2 fixation, Humic substance, Clostridium aceticum

講演番号：4I05-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

嫌気呼吸を利用した好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株による H_2/CO_2 からのアセトン生産性の増強

Enhancing acetone productivity from H_2/CO_2 with the modified thermophilic acetogen *Moorella thermocatica* by anaerobic respiration

○竹村 海生[1]、加藤 淳也[1]、加藤 節[1]、藤井 達也[2]、和田 圭介[2]、岩崎 祐樹[2]、青井 議輝[1]、松鹿 昭則[2]、森田 友岳[2]、村上 克治[2]、中島田 豊[1] ([1]広島大学院・統合生命、[2]産総研)
○Kaisei Takemuea[1], Junya Kato[1], Setsu Kato[1], Tatsuya Fujii[2], Keisuke Wada[2], Yuki Iwasaki[2], Yoshiteru Aoi[1], Akinori Matsushika[2], Tomotake Morita[2], Katsuji Murakami[2], Yutaka Nakashimada[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]AIST)

【背景と目的】

H_2/CO_2 を基質として化合物を生産するガス発酵プロセスは、地球温暖化の原因となる CO_2 を直接利用した有用物質生産ができる点が魅力である。我々は H_2/CO_2 資化性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* を代謝改変し、化成品原料などに用いられる有用物質アセトンを生産する株の構築に成功した。この改変株は、獲得できるエネルギーが高い糖や合成ガスを基質とした場合には菌体増殖とともにアセトンを生産した一方で、H_2/CO_2 培養では増殖、生産性ともに著しく低いことが課題である。本改変株はアセトン生産のために酢酸合成が低下している。酢酸合成は ATP 合成と共役しており、ATP 合成能の低下が課題の要因と推測された。そこで、本研究では嫌気呼吸を活用した ATP 合成能向上による、H_2/CO_2 ガス発酵のアセトン生産性向上を目指した。

【結果と考察】

M. thermoacetica が電子受容体として利用できる可能性のある化合物を添加して H_2/CO_2 培養したところ、*M. thermoacetica* がジメチルスルホオキシド (DMSO)を電子受容体として嫌気呼吸を行うことを見いだした。そこで、DMSO を添加した H_2/CO_2 培養を行ったところ、アセトン生産株の細胞内 ATP 量は 3 倍増加し、菌体増殖および物質生産ともに向上した。特にアセトン生産性が向上しており、比アセトン生産速度が 4 倍向上した。DMSO 呼吸は ATP 合成が低下した代謝改変株によるガス発酵の生産性向上に有効であると考えられる。

[Introduction]

Gas fermentation utilizing hydrogen (H_2) and carbon dioxide (CO_2) is an attractive process because it can directly convert CO_2, a causative agent of global warming, to valuable materials. We previously succeeded in engineering a thermophilic acetogen, *Moorella thermoacetica*, which produces acetate from H_2/CO_2, to produce acetone. However, growth and acetone production of this strain were significantly lowered in H_2/CO_2 condition, compared to other substrates such as sugar and syngas. We assumed this was due to a low level of ATP production because the metabolic pathway modification weakened acetate synthesis coupled with ATP production. Therefore, this study aimed to improve acetone productivity in H_2/CO_2 fermentation by anaerobic respiration-mediated ATP generation.

[Results & Discussion]

When the *M. thermoacetica* wild-type strain was cultured in H_2/CO_2 with candidate electron acceptors, dimethyl sulfoxide (DMSO) supported anaerobic respiration. Therefore, DMSO was applied to the acetone-producing strain cultured in H_2/CO_2. As a result, the intracellular ATP level was increased three-fold, and the strain recovered growth and acetone productivity was improved. Furthermore, the specific acetone production rate was increased four-fold with DMSO. These results demonstrated that DMSO respiration can be applied to overcome the bottleneck in H_2/CO_2 fermentation.

Gas fermentation, Acetone, Anaerobic respiration

発表責任者：中島田　豊（nyutaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4I05-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

Clostridium paraputrificum のピルビン酸ギ酸リアーゼ遺伝子の解析と水素ガス生産への応用
Characterization of pyrufate-formate lyase genes of *Clostridium paraputrificum* for bio-hydrogen production
西村 しおり、竹内 束沙、國武 絵美、○木村 哲哉（三重大院生資）
Shiori Nishimura, Tabasa Takeuchi, Emi Kunitake, ○Tetsuya Kimura (Mie Univ.)

海浜の土壌から単離された *Clostridium paraputrificum* M21 株は、海洋バイオマスであるキチンを炭素源として生育し水素ガスを生産することから、バイオ水素ガス生産に応用が期待される。当研究室では、*C. paraputrificum* M21 株についてゲノム解析情報をもとにして、バクテリア GroupII イントロンを利用した遺伝子破壊法により代謝経路の解析を行ってきた。その結果、本菌の水素ガス生産の中心経路はピルビン酸からアセチル CoA への変換においてピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ（PFO）が働き、生じた還元力が水素ガス生産に流れることが予測されている。一方、ピルビン酸からギ酸とアセチル CoA を生じるピルビン酸ギ酸リアーゼ（PFL）遺伝子も存在するが、この役割については不明であった。PFL は PFL 活性化酵素（ACT）によって活性が制御されていることが知られており、PFL と ACT 遺伝子の破壊を試みたところ、ACT 遺伝子の破壊のみ成功した。ACT 破壊株ではギ酸の生産が大きく低下し、水素ガス生産が増加した。このことは、PFL による代謝が低下することで PFO 経路への流れが増え、その結果、水素ガス生産が増加したのではないかと推測された。

Clostridium paraputrificum M21 isolated from our seaside campus soil grows on chitin as a carbon source and produces hydrogen gas, so it would be used for biohydrogen gas production from marine biomass chitin. In our previous research, we have analyzed the metabolic pathway of this strain by gene disruption using bacterial Group II intron. As a result, it is predicted that pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFO) acts in the central pathway of hydrogen gas production. PFO works conversion of pyruvate to acetyl-CoA and the generated reducing power would flow into hydrogen gas production. On the other hand, there are genes encoding pyruvate formate lyase (PFL) that produces formic acid and acetyl-CoA from pyruvate, but their role has been unclear. It is known that the activity of PFL is regulated by the PFL activating enzyme (ACT), therefore, we attempted to disrupt the PFL and the ACT gene, respectively. Only the the ACT disruptant was obtained. Production of formic acid by the disruptant decreased significantly and hydrogen gas production increased. This may due to an increase of the flow of PFO pathway to compensate the PFL pathway.

Clostridium paraputrificum, hydrogen gas, formate

発表責任者：木村哲哉（t-kimura@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4I05-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

Search for new microbial catalysts for Biological Inorganic Hybrid System

○ DAICHI KAZAMA, TAKUMI KONDO, TAIKI SATO, ERIKO MORIMOTO, KOZO SATO, HAJIME KOBAYASHI (Tokyo Univ.)

The Biological Inorganic Hybrid System (BIHS) is a carbon dioxide (CO2) conversion system that combines microbial metabolic reactions with inorganic reactions using chemical catalysts. In addition to the advantages of chemical catalysts, such as high energy efficiency and stability, it is possible to add value to the reaction products by using microbial functions and genetic recombination. Furthermore, by using renewable energy sources such as solar cells as the power source, unstable electrical energy can be stored in the form of compounds, which is expected to contribute to a sustainable, efficient, versatile, and low-cost platform for chemical synthesis.
In our laboratory, we are particularly interested in BIHS that uses hydrogen and oxygen generated by water electrolysis as an energy source to convert and utilize CO2. In this type of BIHS, autotrophic hydrogen-oxidizing bacteria are used as microbial catalysts. Hydrogen-oxidizing bacteria are microorganisms that oxidize hydrogen and use the energy produced by the reaction for carbon fixation. Most hydrogen-oxidizing bacteria oxidize hydrogen by hydrogenase in their bodies and fix CO2 through a carbon fixation circuit called the Calvin cycle. Cupriavidus necator (Ralstonia eutropha) has been studied in the most detail as a hydrogen-oxidizing bacterium, and examples of the synthesis of biofuels such as butanol and isopropanol using BIHS have been reported. However, the use of microorganisms other than C. necator in BIHS has not been sufficiently investigated so far. In this study, we aimed to search for new microbial catalysts from the environment that have useful properties for the production of substances from CO2 by BIHS. We constructed an electrochemical reactor using CoPi as the anode and Co-P alloy as the cathode catalyst. It has been reported that the combination of these catalytic electrodes reduces the formation of reactive oxygen species and metal ions that inhibit the growth of microorganisms and achieves high energy conversion efficiency. Environmental samples were inoculated into the constructed reactor and incubated at a voltage of 2.0 V with CO2 as the sole carbon source.

biological inorganic hybrid system, hydrogen-oxidizing bacteria, CO2

講演番号：4I05-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

生物機能リソースとしての昆虫、複合微生物系のスクリーニング

Screening of insect/microbial ecological interactions as biological function resources.

○古賀 汐莉、石丸 陽子、劉 暁輝、長濱 一弘 (崇城大)
○Shiori KOGA, Youko ISHIMAL, Xiaohui LIU, Kazuhiro NAGAHAMA (Sojo Univ.)

我々は、昆虫生態を微生物の側面から解析し、新たな工業生産に応用可能な酵素、害虫駆除方法等の開発を目的として、昆虫起源の微生物のスクリーニングを行っている。これまでに貯蔵穀物類の食害昆虫であるココクゾウムシからセルラーゼ/アミラーゼ生産菌である、*Cellulosimicrobium* sp. を得た。本研究では、穀物類の害虫であり、貯蔵穀物類の食害昆虫であるココクゾウムシ、コクゾウムシならびにシバンムシ成虫のもつ酵素と、腐葉土等を餌とするカブト虫と腐朽木材を餌とする 2 種のクワガタムシ幼虫の唾液の酵素活性を検討した。その結果、用いた 6 種の昆虫はいずれもアミラーゼ活性、セルラーゼ活性を有していることが判明した。また、クワガタムシ幼虫からのみ（キシラナーゼ＆）キシロシダーゼ活性が認められた。コクゾウムシ由来の微生物から、セルラーゼ、アミラーゼ、キシロシダーゼ活性を有する菌をスクリーニングし、現在、その詳細を検討中である。

We analyze chemical ecology of insect from the aspect of microorganisms. Screening of microorganisms from insect origin for the purpose of developing useful enzymes and pest control methods that can be applied to new industrial production. So far, *Cellulosimicrobium* sp., which is a cellulase / amylase-producing bacterium, has been obtained from the rice weevil. In this study, we investigated the enzymes of adult beetle of rice weevil(*Sitophilus oryzae*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*) and *Lasioderma serricorne*, which are pests of stored grains. And also two species of stag beetle larvae and Japanese rhinoceros beetle larvae were examined. As a result, it was found that all of the 6 species of insects used had amylase activity and cellulase activity. In addition, xylosidase activity was observed only from stag beetle larvae. From microorganisms derived from maize weevil, bacteria having cellulase, amylase, and xylan decomposed activity have been screened, and the details are currently under investigation.

insect, microorganisms, enzyme

発表責任者：長濱一弘（kazuhiro@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4I05-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

遺伝子改変鉄酸化細菌によるアンモニアの電気合成

Electrosynthesis of ammonia by engineered *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○山田 祥平、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Shohei YAMADA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

鉄酸化独立栄養細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は炭酸固定能に加えて窒素固定能を有し、電気をエネルギー源として利用できることから、空気と電気を用いて窒素化合物（アンモニア等）を生産するためのホストとして期待されている。しかし、一般に窒素固定系（ニトロゲナーゼ）は厳密に制御されており、*A. ferrooxidans* においても生育に必要な量以上のアンモニアは合成されない。そこで本研究では *A. ferrooxidans* を遺伝子改変し、アンモニアを電気合成するプロセスを開発した。

これまでに我々は、アンモニア同化酵素（グルタミン合成酵素）の阻害剤（L-methionine sulfoximine; MSX）を添加して *A. ferrooxidans* を電気培養し、培養液中にアンモニアを分泌させることに成功している（特許 6919880 号）。本研究ではまずこのアンモニア生産がニトロゲナーゼの働きによることを実証するため、CRISPR 干渉法（Yamada et al., 2021. *J Biosci Bioeng*, in press）によりニトロゲナーゼ構造遺伝子（*nifH*）の発現抑制株（Kd_*nifH* 株）を作製し、電気培養時のアンモニア生産量を野生株と比較した。その結果、Kd_*nifH* 株のアンモニア生産量は野生株よりも有意に少なく、電気培養時にニトロゲナーゼを介してアンモニアが生産されていることが示された。次に *A. ferrooxidans* のニトロゲナーゼ活性を増強するため、ニトロゲナーゼ遺伝子の転写活性化因子（*nifA*）の過剰発現株を作製した。その結果、本遺伝子改変株ではニトロゲナーゼ活性が顕著に向上しており、電気培養時に MSX を添加しない場合でもアンモニアが生産された。以上の結果から遺伝子改変によってニトロゲナーゼ活性を増強することで、*A. ferrooxidans* によるアンモニアの電気合成が可能になることが示された。

Acidithiobacillus ferrooxidans is regarded as a potential host for microbial electrosynthesis (MES) of ammonia based on its capabilities for fixing nitrogen and receiving electrons from low-potential electrodes. Ammonia production by this bacterium is however inhibited by regulatory systems for nitrogen-fixation genes. This study aimed to develop a bioelectrochemical ammonia production system using engineered *A. ferrooxidans*. We constructed a knockdown mutant of a nitrogenase gene (*nifH*) and demonstrated that *A. ferrooxidans* is capable of bioelectrochemical ammonia production using the nitrogenase system. We also constructed an overexpressing strain of *nifA* (a regulatory gene for nitrogenase) and demonstrated that this mutant strain can produce ammonia in bioelectrochemical systems even in the absence of L-methionine sulfoximine, an inhibitor of glutamine synthase. These results show that ammonia is synthesized from nitrogen in the air by *A. ferrooxidans* derivatives in MES, if we engineer its nitrogenase system.

Acidithiobacillus ferrooxidans, Microbial electrosynthesis, Ammonia

発表責任者：山田祥平（s19805@toyaku.ac.jp）

講演番号：4I05-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

脱脂米糠由来タンパク質の食品化学的特性の評価
Evaluation of food chemical properties of rice protein derived from defatted rice bran.
○上田 恵子[1]、廣瀬 明日香[2]、遠藤 修二郎[3]、山田 千佳子[4]、渡辺 昌規[1] ([1]山大院農、[2]山大農、[3]三和油脂（株）、[4]名古屋学芸大院管栄)
○Keiko UEDA[1], Asuka HIROSE[2], Shujiro Endo[3], Chikako Yamada[4], Masanori Watanabe[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Yamagata Univ., [2]Yamagata Univ., [3]Sanwa Yushi co. ltd., [4]Grad. Sch. Nur. Sci. Nagoya university of arts and science)

研究代表者らが開発した等電点沈殿・電解水処理を組み合わせたタンパク質回収・精製技術(IP-EWT 法)は、脱脂米糠(DFRB)から高栄養価・アレルゲンフリータンパク質を高濃度且つ、高収率にて製造することが可能である。しかしながら、本法により得られる DFRB タンパク質の食品分野への適用性評価に必要な食品機能諸特性は明らかとなっていない。そこで本研究では、DFRB タンパク質の食品機能諸特性の解明を目的とした。

DFRB タンパク質の吸水・吸油特性は、大豆タンパク質とほぼ同等であることが明らかとなった。また、吸水・吸油特性は、当該タンパク質抽出時の水酸化ナトリウム濃度、等電点沈殿時の pH 値(pI)により変化し、吸油特性は、タンパク質回収時の pI 値により大きく変化することが認められた。さらに、FTIR によるタンパク質の二次構造解析（デコンポリューション解析）の結果、米糠タンパク質の二次構造のスペクトルパターンは、小麦や大豆などの穀物系タンパク質に共通する特徴的なパターンを示した。疎水性度に影響を与えるβ構造（シート、ターン）変化は pI 値に依存していることから、上記吸油特性の変化は、DFRB タンパク質の疎水度の変化によるものと推察された。

IP-EWT process which consists of isoelectric precipitation and electrolytic water treatment, can produce highly nutritious and allergen-free proteins from defatted rice bran (DFRB) with high concentration and high recovering efficiency. However, the food functional properties of DFRB protein have not been clarified. Therefore, in this study, food functional properties of DFRB protein were elucidated.

Water and oil absorption capacity of DFRB protein were varied with the concentration of sodium hydroxide in the protein extraction and the pH value (pI) in the isoelectric precipitation, and the oil absorption capacity were significantly varied as the pI value changes in the protein recovering.

Furthermore, FTIR analysis of the secondary structure of the protein (deconvolution analysis) showed that extracted spectrum pattern of rice bran protein was similar with the grain-based proteins such as wheat and soybean. Since the ß-structure (sheet, turn) shifts that affect the hydrophobicity level are dependent on the pI value, the change in oil absorption capacity was inferred from the change in hydrophobicity of DFRB protein.

rice protein, defatted rice bran, deconvolution analysis

発表責任者：渡辺昌規（mwata@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4I05-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

土壌環境と地温の関係解析

Analysis of the relation between soil environment and soil temperature

○平井 佑治、Tran Quoc Thinh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Yuji HIRAI, Quoc Thinh TRAN, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】物理的性質が異なる土壌では、土壌微生物の挙動と地温変化も異なると考えられる。本研究では、土壌環境のうち物理的性質と土壌細菌の地温に対する影響に着目した。先行研究において、気温が変動する野外環境下では土壌細菌数は地温の安定化に寄与する可能性が示唆された。しかし、この実験は日射量など外的要因の影響が均一ではなく、土壌の組成や物理的性質も同じではなかったことから、本研究では、日射量と気温が同一の野外環境下で、物理的性質が均一の土壌での地温と細菌数の変化から土壌細菌による地温への影響を検証することを目的とした。
【方法・結果】立命館大学 BKC 敷地内の草地に 0.6 × 0.9 × 0.3 m の穴を 6 つ 0.6 m 間隔で掘った。有機肥料を施肥し、土壌の物理的性質 (固相・気相・液相の割合) が一定で、かつ、微生物数が異なる土壌条件を 5 つ作製した。この 5 種類の土壌と草地の自然土壌を合わせて 6 種類の土壌を掘った穴に埋めた。土壌の深さ 10 cm と 20 cm 部分に温度測定データロガーを設置し、2021 / 8 / 12 ~ 2021 / 9 / 16 の期間、1 時間ごとの地温を測定した。その結果、時間ごとの地温平均をとると、21 時 ~ 12 時では細菌数の少ない土壌よりも多い土壌のほうが地温は有意に高かったが、地温が上昇する時間帯である 13 時 ~ 20 時では温度差は少なかった。そのため、気温が変動する野外の環境下で物理的性質が均一な土壌では、細菌数の多い土壌ほど地温が高くなることが明らかとなった。

【Background and aims】In this study, we focused on the effects of physical properties and soil bacterial biomass on soil temperature. The objective of this study was to explore the influence of soil bacterial biomass on soil temperature in various changes of soil temperature and bacterial biomass with unified physical soil property under the same solar radiation and air temperature.
【Methods and results】Sixth of 0.6 × 0.9 × 0.3 m holes were dug out at 0.6 m intervals in grassland in the Ritsumeikan University. Five soil conditions with organic fertilizer were prepared for same ratios of 3 phases (solid, gas, and liquid phase areas) and different levels of bacteroid biomass. These 5 types of soils were put in each hole. The temperature data logger device was placed at the depth of 10 cm and 20 cm in the each soil, and the soil temperature was measured every one hour for the period 2021 / 8 / 12 ~ 2021 / 9 / 16. The results show the average soil temperature was significantly higher in soils with abundant bacterial biomass from 21:00 to 12:00.

Organic materials, Soil bacterial biomass, Soil temperature

講演番号：4I05-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 11:00～ ミーティングルーム I

機械学習を用いたオリーブの収量予測の試み

Prediction of olive crop yield using machine learning technique based on climate data

○岸本 憲人（小豆島ヘルシーランド（株）オリーヴ健康科学研究所）
○ Norihito KISHIMOTO（Central Institute of Olive and Health Sciences, Shodoshima Healthyland Co., Ltd.）

機械学習を利用して、香川県における過去のオリーブ生産情報と気象情報からオリーブ収穫量の予測を試みている。香川県（小豆島）は「日本のオリーブ栽培発祥の地」として 100 年以上の商業栽培の歴史をもつ。農林水産省の農作物統計調査において、国産のオリーブ生産に関する長期調査結果が存在するのは、香川県産オリーブだけである。そこで、機械学習を行う上で必要な過去のオリーブ生産情報（栽培面積、収穫量）および気象データ（香川県内海観測所における気温、降水量、日照時間、風速の各月別平均）を農林水産省および気象庁から収集し、データセットを作成した。単位面積当たりのオリーブ収穫量を目的変数とし、気象情報ごとに月別平均値を説明変数として、機械学習によるオリーブ収穫量予測モデルの作成を試みた。その結果、オリーブ収穫量には、気温（特に、5 月）が強く影響し、降水量の影響は弱いことがわかった。5 月はオリーブの開花時期であり、また日照時間も正に影響していたことから、開花・結実量が収穫量にとって重要な要素であると考察された。これにより、早期のオリーブ収穫量の予測だけではなくオリーブオイルの生産量の予測にもつながる。また、圃場を選定するための指針になるかもしれないと考えている。

It is noted that the production of olives varies from year to year due to the climatic factors that contribute to fluctuating production based on climate elements. Applying machine learning (ML) and data mining techniques to analyze data in agriculture is a promising approach for the prediction of agricultural yield management. We focused on the availability of recorded data for olive productivity and climate data in Kagawa for decades or more, which we were able to collect from ministry reports. In this study, we tried to study the impact of climatic factors (temperature, rainfall, daylight, and wind) on olive productivity using ML technique. We aim to determine the most important climatic parameters that play a major role in determining the level of the past and future production of olives. We found that the influence of temperature had the largest coefficient of determination followed by wind, daylight, and rainfall. Especially, May temperature even among monthly temperatures was the most important element and was linked strongly to the olive crop yield. Interestingly, May is the timing of olive full flowering, therefore our model indicated May temperature as a major impact factor on the crop yield. This information would be useful for farmers to predict the olive productivity in the early time of the year and to allow for them to make a future perception of olive oil yield and for the strategic planning for productions.

olive, climatic factor, machine learning

講演番号：4I06-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

トウモロコシごま葉枯病菌に感染したトウモロコシ葉に誘導されるカウラレキシンと MBOA の蓄積
Accumulation of kauralexins and MBOA induced by inoculation with conidia of *Bipolaris maydis* in maize leaves

○鶴嶋 鉄[1]、森 直樹[2] ([1]阪南大流通、[2]京大農)
○Tetsu Tsurushima[1], Naoki Mori[2] ([1]Hannan Univ., [2]Kyoto Univ.)

トウモロコシ根(品種；ゴールデンバンタム)を水で摩砕し、その上澄液を TLC にスポットし、溶媒展開後にウリ類炭疽病菌（*Colletotrichum orbicurare*）の分生胞子と懸濁した PDA 培地を噴霧すると、4 つの抗菌スポットが検出された。抗菌性物質は 6-methoxybenzoxazolin-3-one (MBOA)、kauralexin A3 (K-A3)と B3(K-B3)、2-hydoroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA)と同定され、摩砕後の時間経過とともに生産量は増大した。根を液体窒素で摩砕したメタノール抽出物からは抗菌スポットは検出されなかった。ところが、根を液体窒素で摩砕し、摩砕物を水に移すと反応は急速に進み、上記 4 つの抗菌性物質が認められた。これは、抗菌性物質が前駆体から酵素誘導されることを示唆する。一方、葉に、トウモロコシごま葉枯病菌（*Bipolaris maydis*）の分生胞子懸濁液（5 x10^5 個胞子/ml）を接種し、経時的にメタノールで抽出した。接種 16 時間後の抽出物からは MBOA の抗菌スポットだけが検出されたが、24 時間後には MBOA と K-B3 が主要スポットとして確認された。48 時間後には２つのスポットは拡大し、K-B3 も確認された。この結果は、トウモロコシ葉の植物病原菌に対する防御応答にカウラレキシン類とともに MBOA も重要な役割を果たしている可能性を示す。

Roots of maize were homogenized in mortar contained a small quantity of H_2O. After incubation for short time, the supernatant of the homogenate was separated by TLC and the plate was visualized with a bioassay for growth of *Colletotrichum orbiculare*. Four antifungal spots were detected. They were identified as 6-methoxybenzoxazolin-3-on the ne (MBOA), kauralexin A3 (K-A3), B3 (K-B3) and 2-hydoroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA). Roots were also homogenized in N_2 and extracted with MeOH. Antifungal spots were not detected in the MeOH extract. Next, roots were homogenized in liquid N_2 in mortar, and the fine powders were scrapped by spoon from the mortar and were transferred to H_2O. The supernatant was spotted on the TLC and the plate was visualized with TLC plate bioassay. It was shown that induction of four antifungal compounds progressed at rapid pace in this situation. This suggests that they might be enzymatically converted from precursors of them. On the other hand, the second leaves of seedlings were inoculated with 5 x10^5 conidia·ml^{-1} of pathogenic *Bipolaris maydis*. The leaves were extracted with MeOH at 16 h, 24 h and 48 h. The MeOH extracts were separated by TLC and the plate was visualized by CAM staining or with TLC plate bioassay. Minute antifungal spot of MBOA was only detected in the extract at 16 h and clear spots of MBOA and K-A3 were detected in them at 24 h. Size of their two spots grew larger and a spot of K-B3 was also detected in them at 48h. This shows that MBOA might play the important role on defense response for plant pathogens in maize.

maize, kuralexin, MBOA

発表責任者：鶴嶋　鉄（tsuru@hannan-u.ac.jp）

講演番号：4I06-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

植物発酵物は青枯病菌の植物体内での増殖を抑制する
Fermented botanical product inhibits growth of bacterial wilt pathogen in plant
○緋田 安希子[1]、田所 千佳[2]、鳥居 英人[3]、竹中 航平[3]、藤岡 耕太郎[3]、岸田 晋輔[3]、田島 誉久[1]、加藤 純一[1] ([1]広島大院・統合生命、[2]広島大・工、[3]万田発酵株式会社)
○Akiko HIDA[1], Chika TADOKORO[2], Hideto TORII[3], Kohei TAKENAKA[3], Kotaro FUJIOKA[3], Shinsuke KISHIDA[3], Takahisa TAJIMA[1], Junichi KATO[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]Manda Fermentation Co., Ltd.)

青枯病は土壌伝染性病原細菌 *Ralstonia solanacearum* によって引き起こされる植物病害であり、世界各地で深刻な農作物被害をもたらしている。これまでの研究で、青枯病の防除に植物発酵物（FBP：Fermented Botanical Product、万田発酵株式会社製）が有効であることが明らかとなったが、その作用機序は不明であった。そこで本研究では、FBP の青枯病防除機構について解析を行った。

本研究で使用した FBP は、黒糖をベースに 41 種類以上の果実類・穀類・海藻類・野菜類などを 3 年以上発酵・熟成し製造されたものである。液体培地での培養試験の結果、FBP 自体に青枯病菌に対する直接的な殺菌・抗菌効果はなく、むしろ増殖に有利にはたらくことが判明した。しかし、根部を FBP で浸漬処理したトマト苗では、青枯病菌を土壌に間接的に接種した場合、ほとんどの個体で青枯病の発症は見られず、接種後 10 日経過しても植物体地上部に青枯病菌はほとんど存在しなかった。そこで、茎に直接接種してみたところ、間接接種時と比べ発症率は高くなったものの、それでもなお FBP 処理区では未処理区と比較して発症が抑制される傾向にあった。このことから、FBP は植物側に作用し、植物の抵抗性を向上させることで、青枯病を抑制する可能性が示唆された。この可能性については、現在、植物側の遺伝子発現解析により検証している。

Bacterial wilt caused by the soilborne phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* is a serious plant disease. We have previously shown that fermented botanical product (FBP) is effective in control of the disease. However, it was unclear how FBP can suppress the disease. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of bacterial wilt control by FBP.

FBP used in this study is a fertilizer produced taking more than three years by fermenting more than 41 kinds of materials including fruits, grains, and seaweeds. Bacterial growth assay in culture medium revealed that FBP acts as a growth substrate rather than an antibacterial substance for *R. solanacearum*. However, there were few or no *R. solanacearum* cells in the aerial part of tomato seedlings with roots soaked in a diluted FBP solution when the pathogen was indirectly inoculated into the soil around the roots. Furthermore, when *R. solanacearum* was directly inoculated on the stem of tomato seedling, the percentage of wilted seedlings was lower in FPB-treated group than in non-treated group. These results suggest a that FBP would improve plant resistance to the pathogen. To demonstrate this possibility, further analysis on gene expression in plant is underway.

disease control, bacterial wilt, Ralstonia solanacearum

講演番号：4I06-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

イネの受容体型キナーゼ FliRK2 および ERC1 の植物免疫誘導における役割

Role of receptor like kinase FliRK2 and ERC1 on induction of plant immunity

○綿谷 幸樹[1]、伊庭 弘貴[2]、桂木 雄也[1]、蔡 晃植[1,2,3] ([1]長浜バイオ大、[2]長浜バイオ大院、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○KOKI WATAYA[1], KOKI IBA[2], YUYA KATSURAGI[1], FANG-SIK CHE[1,2,3] ([1]Dept. of Bio-sci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [2]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [3]GERI, Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech.)

我々はこれまで、イネは病原細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンの C 末端領域に存在する CD2-1 や Elongation factor-Tu の中央領域に存在する EFa50 を pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)として認識し、活性酸素の発生やカロースの沈着、免疫関連遺伝子の発現誘導などの PAMPs-triggered immunity（PTI）と呼ばれる植物免疫反応を誘導することを報告した。さらに、イネに存在する CD2-1 の受容体候補として FliRK2 を、EFa50 の受容体候補として ERC1 についても報告した。FliRK2 と ERC1 が実際に受容体として機能しているのかを調べるため、まず CD2-1 と FliRK2 および EFa50 と ERC1 間の相互作用について調べた。FliRK2 および ERC1 過剰発現イネから調整した膜画分に CD2-1、EFa50 を加え、抗 FliRK2 抗体、抗 ERC1 抗体を用いて共免疫沈降実験を行ったところ、FliRK2 は CD2-1 と、ERC1 は EFa50 とのみ結合することが示された。次に、CRISPR/Cas9 法を用いて FliRK2 および ERC1 ノックアウトイネを作製し、CD2-1 と EFa50 に対する PTI 誘導能について調べた。その結果、FliRK2 ノックアウトイネは CD2-1 による PTI 誘導能を失っており、ERC1 ノックアウトイネでは EFa50 による PTI 誘導能を失っていた。以上の結果、FliRK2 は CD2-1 の受容体として、ERC1 は EFa50 の受容体として機能して植物免疫を誘導していることが示された。

We previously reported that rice recognizes the CD2-1 in the C-terminal region of the flagellin and EFa50 in the middle domain of elongation factor Tu from as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and induces PAMPs-triggered immunity (PTI), which includes generation of reactive oxygen species, callose deposition, and the expression of immune-related genes. We also reported FliRK2 as a receptor candidate for CD2-1 and ERC1 as a receptor candidate for EFa50. To clarify whether FliRK2 and ERC1 actually act as receptor, interaction experiments between CD2-1 and FliRK2, and EFa50 and ERC1 were attempted. A co-immunoprecipitation experiments showed that FliRK2 binds only to CD2-1, and ERC1 binds only to EFa50. Furthermore, FliRK2 and ERC1 knockout rice generated by CRISPR / Cas9 method lost their ability to recognize the corresponding PAMPs. These results indicated that FliRK2 acts as a receptor for CD2-1 and ERC1 acts as a receptor for EFa50.

rice, receptor like kinase, pamp

講演番号：4I06-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

ゴール非形成性動物へのオーキシン生産能の付与

Introduction of auxin productivity to the non-galling animals

○吉田 響[1]、鈴木 義人[1]、土田 努[2] ([1]茨城大農、[2]富山大理)
○Hibiki YOSHIDA[1], Yoshihito SUZUKI[1], Tsutomu Tsuchida[2] ([1]Ibaraki Univ., [2]Toyama Univ.)

ゴール形成ハバチ *Pontania* sp. は高濃度のインドール-3-酢酸（IAA）を内生しており、ゴール形成との関連性が示唆されている。ハバチにおける IAA 生合成経路は、トリプトファン（Trp）からインドール-3-アセトアルデヒド（IAAld）を経由して IAA が生成する経路が推定されている。この経路上で律速段階である Trp→IAAld の変換に対してハバチは強い変換活性を示す。我々は Trp→IAAld の変換を触媒するハバチの酵素として PonAAS2（*Pontania* aromatic aldehyde synthase 2）を同定しており、本酵素がハバチのゴール形成能獲得の鍵となった酵素であると考えている。

ゴール形成における植物ホルモンの関与を証明する手段の一つとして、ゴール非形成昆虫への植物ホルモン生合成能の付与が考えられる。本研究では、そのためのモデルシステムとして、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた。*C. elegans* は一般的な昆虫と同様に IAAld→IAA の変換能を有し、また IAA 内生量は低いため、PonAAS2 導入により IAA 生産能を高めることができるかを検討した。PonAAS2 過剰発現系統を作出し、IAA 内生量を LC-MS/MS により測定したところ，野生型と比較して高濃度の IAA が検出された。これにより、*PonAAS2* の導入により個体レベルでの IAA 生産能を向上させられることが示唆された。現在，昆虫への PonAAS2 導入のモデルとしてノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* の幼虫及び初期胚への *PonAAS2* 遺伝子導入にも取り組んでおり，本大会ではその進行状況についても併せて報告する。

Galling sawfly *Pontania* sp. contains indole-3-acetic acid (IAA) at high concentration, suggesting the involvement of IAA in gall induction and/or maintenance. Trp→IAAld→IAA could be the IAA biosynthetic pathway in insects. The sawfly shows strong conversion activity for the conversion from Trp to IAAld. PonAAS2 is an enzyme that converts Trp to IAAld from the sawfly. This enzyme could be the key enzyme for sawflies to have evolutionarily acquired gall-inducing ability.

The involvement of phytohormones in gall induction could be demonstrated by introducing the ability of phytohormone biosynthesis to non-galling insects. In this study, we used *Caenorhabditis elegans* as a model system. Although *C. elegans* can convert IAAld to IAA, it contains IAA at very low level. Thus, we investigated whether the introduction of *PonAAS2* to *C. elegans* could increase the IAA productivity. LC-MS/MS analysis showed that the PonAAS2-overexpressing strain has higher concentration of endogenous IAA compared to the wild type.

gall, auxin, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：鈴木義人（yoshihito.suzuki.chemeco@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：4I06-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

根分泌モデル実験系を用いたトマチンによるトマト根圏微生物叢形成の解析

Analysis of the tomatine-mediated formation of tomato rhizosphere microbial community using a model experimental device

○高松 恭子、豊福 美和子、奥谷 芙季、中安 大、矢﨑 一史、杉山 暁史（京大生存研）
○Kyoko TAKAMATSU, Miwako TOYOFUKU, Fuki OKUTANI, Masaru NAKAYASU, Kazufumi YAZAKI, Akifumi SUGIYAMA (Kyoto Univ.)

根圏とは、植物の根から影響を受ける土壌領域と定義される。植物が根から根圏へと分泌する代謝物は、根圏における植物-微生物間相互作用において重要な役割を果たす。近年、二次代謝産物が根圏微生物叢の形成に関与することが明らかになり、根圏における二次代謝産物や微生物の動態に関する研究が広く行われている。我々の研究グループでは、根圏分泌のモデル実験系として、ムライトセラミックチューブと豊浦砂を用いた実験装置を開発し、ダイズの主要な根分泌物であるダイゼインによる根圏微生物叢形成に関する検討を行った（豊福ら、本大会 2020 年度大会）。本研究では、トマト根から分泌される主要な二次代謝産物であり、根圏のスフィンゴモナス科を増加させるトマチンを対象として、本実験装置を用いたトマト根圏微生物叢の形成過程の解析を試みた。本装置に圃場土と豊浦砂を異なる比率で混合して充填し、疑似植物根としてムライトセラミックチューブからトマチン溶液を添加した。毎日トマチン添加を行い、14 日後に、中心から 5 mm 間隔で土壌を回収した。サンプルに含まれる微生物の DNA とトマチンを定量した結果、ムライトセラミックチューブへの距離が短くなるに比例して微生物 DNA の量が増加する傾向が認められ、根圏に微生物が豊富に存在することの再現が示唆された。また、疑似根の近傍においてトマチン量が最大となることが確認された。現在、16S rRNA アンプリコンシーケンス解析による菌叢解析を進めている。

Rhizosphere is the soil area affected by plant roots. Metabolites secreted from the roots play important roles in plant-microbiota interactions. Recently, it was uncovered that secondary metabolites alter bacterial communities in the rhizosphere. In addition, the dynamics of secondary metabolites and microorganisms in the rhizosphere have been widely investigated. We have developed an experimental model device to analyze the effects of root exudates in shaping the rhizosphere microbial communities, and then analyzed the effect of daidzein, which is a major isoflavone secreted from soybean roots (Toyofuku et al., the 2020 annual meeting of JSBBA). In this study, we analyzed the formation of rhizosphere microbiota by tomatine, which is secreted from tomato roots to enrich Sphingomonadaceae. Field soil and Toyoura sand were mixed and filled in the device at different ratios, and a tomatine solution was applied into a tube. The amount of DNA was increased in the vicinity of the tube. Bacterial community analysis by 16S rRNA amplicon sequencing is currently in progress in our laboratory.

tomato, tomatine, rhizosphere

発表責任者：高松恭子（takamatsu.kyoko.48w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4I06-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

ユキツバキとヤブツバキの送粉者の違いにおける化学生態学

Chemical ecology on the pollination system of *Camellia rusticana* and *Camellia japonica*

○森 信之介[1]、長谷川 陽一[2]、森口 喜成[3] ([1]慶大理工、[2]森林総研、[3]新大院自然研)
○ Shinnosuke MORI[1], Yoichi HASEGAWA[2], Yoshinari MORIGUCHI[3] ([1]Keio Univ., [2]FFPRI, [3]Niigata Univ.)

東日本にはヤブツバキとユキツバキの 2 種のツバキが自生している。これらの花は類似した形態を持つが、ヤブツバキは鳥媒（メジロ）でユキツバキは虫媒（ハチやハエなど）である。花の種間色差がこの違いをもたらす可能性に着目し、両種の葯と花弁を調べた。多くの植物の花粉と葯は青色蛍光を示す。これまでに 6 種の虫媒花から青色蛍光色素としてヒドロキシ桂皮酸類を同定し、その蛍光にミツバチが誘引されることを報告してきた [1]。このことから、虫媒のユキツバキは蛍光を示すのではないかと考え、両ツバキを観察した。予想通り、ユキツバキには葯の表皮層に青色蛍光が認められ、青色蛍光色素としてアントラニル酸類 2 種を単離・同定した。これらの蛍光色素はヤブツバキの葯にも含まれていたが、その含量はユキツバキと比べて著しく低かった。アントラニル酸およびその類縁体は、幅広い鳥類に対して忌避効果を有する。ユキツバキの葯において、これらの化合物は蛍光による視覚刺激で送粉昆虫を呼び寄せると同時に、メジロに対しては化学刺激による忌避剤として機能していると推察された。また、送粉者の可視領域に対応する花弁の拡散反射スペクトルを測定したところ、2 種には UV 領域に違いがあり、ユキツバキの花弁がハチの色覚に適応的であることも分かった。

Flower employs its color as one of the major traits to allure foraging pollinators, which can drive a plant speciation via pollinator shift. In eastern Japan, two sect. *Camellia* species are naturally distributed: the Japanese camellia (*C. japonica*) and the snow camellia (*C. rusticana*). These recruit different pollinators: *C. japonica* is entomophilous (bees, fries, beetles), while *C. rusticana* is ornithophilous (passerine). This may be associated with color difference, but their color characterization remains rudimentary. During an observation under UV irradiation, we found that *C. rusticana* anthers emit blue fluorescence, and its petals reflect UV, while *C. japonica* does neither. We identified two major fluorescent compounds in the anthers of *C. rusticana* as anthranilate derivatives. Its amount in the anther was significantly higher in *C. rusticana* than *C. japonica*. In the anther of *C. rusticana*, the anthranilate derivatives likely serve as a visual cue for attracting pollinating insects and as a chemical cue for repelling passerines. Furthermore, *C. rusticana* offers more conspicuous petal to bees than *C. japonica*. These characteristics may contribute to the difference of pollinator and have played a role in pollinator shift.

[1] Mori S, Fukui H, Oishi M, Sakuma M, Kawakami M, Tsukioka J, Goto K, Hirai N (2018) J Chem Ecol 44, 591–600.

Camellia, pollinator, fluorescent compound

発表責任者：森信之介（mori.shinnosuke.72x@kyoto-u.jp）

講演番号：4I06-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

ソムレによる漆の増産

Increase in production of lacquer by SOMRE

○染井 正徳[1]、田口 武[2]、染井 秀[1]、染井 和子[1] ([1]ソメイヤッコ研究所、[2]灯火栽培研究所)
○Masanori SOMEI[1], Takeshi Taguchi[2], Hiizu Somei[1], Kazuko Somei[1] ([1]Someiyakko Kenkyusho, [2]Toukasaibai Kenkyusho)

我々は、「ソムレ」がほぼ全ての植物の成長を助け、食料増産、環境緑化、砂漠緑化に役立つことをこれまでに報告してきた。今回は、日本の伝統文化、漆を守る試みについて発表する。
漆塗りは，国宝，重要文化財等の表面塗膜として世界に冠たる文化であり，その技術を守り抜くことは日本人の使命である。植林後 10～15 年かけ育った成木の幹に傷をつけ，分泌される樹液を集めたものが漆液である。１本の木から得られる樹液は約 200 mL 程であり，その後伐採され，木の一生を終える。貴重な国宝，諸文化財の修理に要する日本産漆の需要量は，時が経つにつれ増大しつつある。年間生産量は，平成２１年度約 1.4 トンと需要量（約 69 トン）には程遠い（農林水産省，2018)。日本産漆の供給対策・解決策が求められている。浄法寺の漆の種子、岩手県二戸市の漆植林地で，漆掻き後伐採され放置されている漆の木の枝を切断して，挿し木用漆の枝材料とした。さらに漆掻き後伐採され放棄された漆の木の根を切断して，分根用根の材料とした。既に特定の波長の光が植物の成長を促進する事が知られている。そこで通常行われている漆の種子の発根法と，ソムレ水溶液で処理する方法との比較，「殺し掻き」され切断された漆の枝及び分根用根をソムレ水溶液で処理して LED ライトで光照射下，発根・発芽実験を行った。その結果漆の種子発芽率，挿し木の成功率の向上，分根からの再生を達成できる新技術を発見した。本法は，漆の木の命を，一代限りで失うことなく，新しい命として再生する新技術の開発に成功した事を意味している。漆の生産・増産を十分見込めるので，現在更に検討を重ねている。
Protection of lacquer coating technology is the mission of the Japanese. Lacquer sap is secreted by damaging the trunk of an adult tree that has grown for 10 to 15 years after planting. The demand for Japanese lacquer required is increasing over time. Supply measures and solutions for Japanese lacquer are required. Lacquer seeds of Johoji Temple, the branches that had been cut down and left unattended after scraping the lacquer were cut and used as the branch material. Furthermore, the abandoned roots were cut and used as the material for the roots for branching. After treating these materials with SOMRE and LED light, we discovered a new technology that can improve the germination rate of lacquer seeds, the success rate of cuttings, and the regeneration from roots. We succeeded in regenerating the life of a lacquer tree as a new life without losing it for one generation.

lacquer, SOMRE, Increase in production

発表責任者：染井正徳（someiyakko@smail.plala.or.jp）

講演番号：4I06-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

3-Galloyl glucose の皮膚バリア機能改善効果に関する研究

Study on the skin barrier function improving effect of 3-galloyl glucose

○井上 卓思[1]、竹内 ちひろ[1]、新谷 恵[1]、石川 文博[1]、水出 夏央[2]、佐藤 芽衣[2]、加藤 敦[2,3] ([1]株式会社伏見製薬所、[2]富山大学学術研究部薬学・和漢系　臨床薬剤学研究室、[3]富山大学附属病院薬剤部)

○Takashi INOUE[1], Chihiro TAKEUCHI[1], Megumi SHINTANI[1], Fumihiro ISHIKAWA[1], Kao MIZUIDE[2], Mei SATO[2], Atsushi KATO[2,3] ([1]FUSHIMI pharmaceutical Co.,Ltd., [2]Faculty of Pharmaceutical Science, University of Toyama, [3]Department of Hospital Pharmacy, University of Toyama)

近年、国内外を問わずアトピー性皮膚炎や乾癬、老人性乾皮症などの慢性皮膚疾患が増加しており、これら疾患の発症や悪化に皮膚バリア機能の低下が強く関係していることが知られている。これまで皮膚バリア機能は角質細胞間に存在するセラミドや角質細胞中の天然保湿因子が中心的な役割を担っていると考えられてきたが、近年、これら因子の他に、表皮中の顆粒層におけるタイトジャンクション形成も第二のバリア機能として重要である事が判明した。

そこで我々はセラミドやタイトジャンクションを増強する成分の探索を行ったところ、インドや東南アジアに自生するムラサキフトモモに含まれる希少成分 3-galloyl glucose にセラミド分解酵素阻害作用と、タイトジャンクション増強作用があることを見出した。本発表では 3-galloyl glucose によるセラミダーゼ阻害作用やクローディン 1 及び 4 遺伝子の発現増加作用、皮膚状態改善効果について報告する。

The chronic skin diseases such as atopic dermatitis, psoriasis, and senile xerosis have been increasing all over the world for some time, and it is known that the deterioration of the skin barrier function is strongly related to the onset and worsening of these diseases. To date, it has been thought that ceramide existing between corneocytes and natural moisturizing factors in corneocytes play a central role in the skin barrier function, but in recent years, it has been found that a tight junction exists in the stratum granulosum in the epidermis as a second skin barrier.

Therefore, we searched for a component that improves the skin barrier function, and discovered that 3-galloyl glucose, which is a rare component contained in Java Plum that grows naturally in India and Southeast Asia. This compound has a ceramide-degrading enzyme inhibitory effect and a tight junction improving effect. In our presentation, we will report on the ceramidase inhibitory effect, claudin 1 and claudin 4 gene expression increasing effect, and skin condition improving effect of 3-galloyl glucose.

skin barrier function, tight junction, ceramide

講演番号：4I06-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルームⅠ

クレオメ（*Tarenaya hassleriana*）から生じるメチルイソチオシアネートの定量

Quantification of methyl isothiocyanate generated from Cleome *Tarenaya hassleriana*

○晴山 陽平[1,2]、古川 智宏[2]、多羅尾 光徳[3]、藤井 義晴[3]、久城 真代[2]（[1]東京農工大院・BASE、[2]農研機構・食品研、[3]東京農工大・農）
○Yohei HAREAYAMA[1,2], Tomohiro FURUKAWA[2], Mitsunori TARAO[3], Yoshiharu FUJII[3], Masayo KUSHIRO[2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology (TUAT), [2]National Agriculture and Food Research Organization (NARO), [3]TUAT)

イソチオシアネート（ITCs）は主にアブラナ科の植物に配糖体として含まれる含硫黄有機化合物で，ワサビの辛み成分であるアリルイソチオシアネートなどが知られている。抗菌作用や抗酸化作用を有することから，例えば ITCs を用いた抗菌シートの開発や，食品由来の ITCs による健康促進作用を評価する研究などが盛んに行われている。メチルイソチオシアネート（MITC）は燻蒸型土壌消毒剤としても利用される高い抗菌性と揮発性を有する物質で，フウチョウソウ科のケッパーやクレオメから生じることが報告されているが，その量を定量的に調べた研究例は限られている。そこで本研究では，クレオメ（*Tarenaya hassleriana*，別名：セイヨウフウチョウソウ）から生じる MITC の定量を試みた。MITC は植物の細胞が壊れると直ちに生じ揮発し始めるが，ビーズ破砕機で植物体を破砕後，速やかにアセトニトリルを加えることで揮発を最小限に防ぎ，MITC の生成量を定量することができた。クレオメの部位ごとに, 生じる MITC を HPLC で分析したところ, 茎部を除いたすべての部位から MITC が生じた。とくに葉部に多く含まれており，開花期の新鮮な葉では 1050 µg / g-flesh weight の MITC が生成された。この植物由来の MITC を農業に利用することができれば，例えばバイオフューミゲーションのような，化石燃料に依存しない食料生産につながることが期待されると考えられた。

Isothiocyanates (ITCs) are sulfur-containing organic compounds that are mainly found as glycosides in cruciferous plants. ITCs are known for their antibacterial and antioxidant properties, and many studies have been conducted to develop antibacterial sheets using ITCs and to evaluate health promotion effects with food-derived ITCs. Methyl isothiocyanate (MITC) has high antimicrobial activity and volatility and is used as a soil fumigant. It has been reported that MITC is generated from certain plants of the family Fagaceae and Fagaceae, but no study has quantitatively investigated the amount. In the present study, we attempted to quantify MITC generated from Cleome (*Tarenaya hassleriana*). MITC is highly volatile and begins to volatilize as soon as the cells are broken. Therefore, by adding acetonitrile immediately after crushing the plant material with a bead crusher, we were able to minimize volatilization and quantify the MITC. The amount of MITC produced at each part of the Cleome was analyzed by HPLC, and MITC was produced from all parts except the stem. It was especially abundant in the leaves, 1050 µg / g-flesh weight of MITC was detected in fresh leaves at the flowering stage. If this plant-derived MITC can be used in agriculture such as biofumigation, it is expected to lead to food production that does not depend on fossil fuels.

Methyl isothiocyanate, Cleome, botanical compound

発表責任者：晴山陽平（hy317.jemi@gmail.com）

講演番号：4I06-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

有機土壌と化学土壌における根系分布と肥料成分の溶出特性の関係解析

Analysis of the relation between root formation and elution pattern of fertilizer components in organic and chemical soils

○坪倉 美紗、Tran Quoc Thinh、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Misa TSUBOKURA, Quoc Thinh TRAN, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】近年，環境保全型農業が推進されており，省力的かつ安定した有機栽培技術の確立が急務である．栽培技術の評価は地上部に焦点を当てられることが多いが，土壌中での根系構造は作物の品質や収量にも関わるとされる．また，有機肥料は慣行農業で使用される化学肥料とは肥料成分の放肥パターンが異なるが，施肥方法の違いが作物の根系構造に及ぼす影響は不明な点が多い．本研究では，施肥資材の異なる 2 種類の土壌を用いて，肥料成分の溶出特性と根系分布の比較を行った．
【方法・結果】有機肥料もしくは化学肥料をそれぞれ施肥した土壌を作製し，透明な円筒容器に土壌を深さ 20 cm になるまで充填した．容器に *Brassica oleracea* var. *italica*（ブロッコリー）を植物育成室にて栽培し（23˚C，明 12 h / 暗 12 h，28 日間），定期的に地上部成長，側根の数と深度を計測した．同時に，土壌のみを充填した容器を一定期間静置し，深度別に土壌分析を行った．結果，地上部および側根の合計数に有意な差は見られなかった．しかし深度別に解析すると，地表から深度 5 cm 未満の側根の数が全体に占める割合は，有機土壌で平均 82.4%，化学土壌で 53.2%であった．また土壌成分は，硝酸態窒素の溶出が有機土壌で緩やかに進み，給水による移動も少なかった．以上より，肥料成分の形態による土壌環境の違いは地下部である根の伸長速度と位置に変化をもたらすことが示唆された．

【Background and aims】In recent years, sustainable and efficient agricultural systems are needed for protection of environment. While the plant of cultivation system often focuses on the above-ground, root system is should be also considered for the crop quality and yields. Although the elution patterns from nutrients are different between organic and chemical fertilizers, the effects of the elution patterns and root system are still unclear.
【Methods and results】In this study, the elution patterns and the root system using two types of soils with different fertilization were compared. *Brassica oleracea* var. *italica* were grown for 28 days in clear pots, and leaf area, number and depth of lateral roots were periodically measured. Elution patterns with chemical and organic fertilizers were also analyzed without plant. There was no significant difference in the total number of lateral roots and positions. However, the average ratios of lateral roots below 5 cm from the surface were 82.4 % in organic soil and 53.2 % in chemical soil. The elution of NO_3^--N in organic soil was slower than that in chemical soil. The results suggest that differences of soil environment by fertilizer led to cause formation of root.

Organic fertilizers, Root elongation, Soil environment

講演番号：4I06-11
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

イネ機動細胞に形成されるケイ酸体のナノ構造解析

Nanostructural analysis of silica bodies formed in rice motor cells

伴 勇希[1]、中村 江里[2]、緒明 佑哉[2]、今井 宏明[2]、○尾崎 紀昭[1] ([1]秋田県大生資科、[2]慶大理工)
Yuki Ban[1], Eri Nakamura[2], Yuya Oaki[2], Hiroaki Imai[2], ○Noriaki Ozaki[1] ([1]Akita Prefect. Univ., [2]Keio Univ.)

イネは根から能動的に吸収したケイ酸を葉身・籾殻などの地上部表層に輸送し，シリカ細胞内腔でケイ酸体（プラントオパール）と呼ばれる非晶質シリカの集積体を形成する。ケイ酸体の機能として倒伏を防ぐための骨格（支持体）としての役割，病原菌からの防御，光合成能を向上させるレンズとしての役割，などが考えられている。その形成過程とナノ構造の解明は農学から材料科学に至る様々な分野への応用につながることが期待される。このような重要性にも関わらず，高等植物におけるシリカ形成の分子メカニズムは，珪藻や海綿動物、細菌と比べて未解明の部分が多い。我々の研究グループは，イネ葉身の機動細胞内に形成されるファン型ケイ酸体に注目して研究を進め，植物防御タンパク質が含まれていることを報告している。今回，SEM および TEM を用いたナノ構造解析により，ケイ酸体は約 30nm のシリカナノ粒子とその周囲に存在する繊維状の有機基質から構成されることが明らかとなった。また，共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光抗体法により，ケイ酸体内部に存在する植物防御タンパク質の可視化にも成功した。以上の結果を踏まえ，本発表ではイネ・シリカ形成の分子メカニズムに関する現時点でのモデルを紹介したい。

The typical example of silicon accumulating higher plants, gramineous plants (rice plants), produces a large amount of biosilica (amorphous silica) in their leaf blades and rice husks. Although biosilicas deposited in rice plants play various important roles, such as enhancing mechanical strength, improving disease resistance and photosynthetic activity, information on the molecular mechanisms involved in the biosilica formation is very limited. In this study, we investigated the nano- and microstructure of biosilicas from rice plants (*Oryza sativa*) by using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). These analyses revealed that biosilicas in motor cells are composed of 30 nm silica nanoparticles and organic nanofibers. In addition, we extracted several plant defense proteins from biosilicas of rice plants and characterized by LC-MS/MS analysis. We have also succeeded in visualizing these defense proteins in biosilicas using immunofluorescence with a confocal laser microscopy. Based on these results, our current hypothesis on the molecular mechanism of silica formation in rice will be presented.

silica, biosilica, nanoparticle

発表責任者：尾崎　紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4I06-12
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 13:00～ ミーティングルーム I

ゲノム再シークエンシング解析によるムラサキ国内栽培品種・海外品種の比較
Genome-wide resequencing of a domestic red gromwell variety

○岡田 貴裕[1]、渡邉 啓一[2] ([1]佐大医、[2]九州栄養福祉大)
○Takahiro OKADA[1], Keiichi WATANABE[2] ([1]Saga Univ., [2]Kyushu Nut Welf Univ.)

ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）は日本、中国、朝鮮半島に分布する多年草であり、その根は草木染めの原料や生薬「紫根」として広く利用されてきた。また近年では、化粧品の原材料としても利用されており、その需要が高まりつつある。古来より、ムラサキは日本各地の山地草原に自生していたが、現在では野生種が激減し、環境省レッドリストで絶滅危惧種 IB に指定されている。その理由としては、明治時代以降より自然環境が激変するとともに栽培技術が途絶えてしまったこと、さらに、同属異種のセイヨウムラサキとの交雑により、純粋な在来種の維持が脅かされていることが挙げられる。

野生種の保存を進めていく上で、その判別、および特性（形態や品質、生産性など）の把握は欠かすことのできない研究課題である。その皮切りとして、私たちはドイツ・中国の保存株から構築された既報のリファレンス配列をもとに、ムラサキ在来種のゲノム解析を進めている。そのなかから、本演題では長野県原産の栽培株について全ゲノムの再シークエンシング解析を実施した結果を紹介する。

Lithospermum erythrorhizon (red gromwell) is a perennial plant widely distributed in East Asia countries. The root contains beneficial naphthoquinones such as Shikonin, and its extract have been used for fabric dye and medical treatments. In addition, the root is being utilized as a cosmetic material. In earlier times, red gromwell grew natural and was cultivated widely in Japan. However, the variety are now decreased due to the dramatic changes in natural environment and industrial demand. To date, wild red gromwell has been specified as an endangered species by Ministry of the Environment.

Several red gromwell have unique phenotypes, such as leaf form, indicating that genetic approach is indispensable for the identification of wild varieties. On the other hand, a reliable genomic data is necessary in order to understand the correlation between their biological nature and genetic diversity. Recently, we have conducted resequencing analysis using the draft assembly dataset constructed from foreign varieties. In this presentation, we show the genetic differences found in a variety originated from Nagano prefecture.

Lithospermum erythrorhizon, Whole-genome resequencing, NGS

発表責任者：岡田 貴裕（e7316@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：4J02-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

トマト葉緑体シグマ因子相互作用タンパク質 SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 のゲノム編集技術による改変と機能解明

Functional analysis of SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 in tomato

○宇津木 一陽[1]、安達 凛奈[1]、鳴坂 義弘[2]、鳴坂 真理[2]、山田 晃嗣[1]、刑部 敬史[1]、刑部 祐里子[3]
([1]徳島大・生物資源産業、[2]岡山生物研、[3]東工大・生命理工)
○Kazuaki Utsugi[1], Rinna Adachi[1], Yoshihiro Narusaka[2], Mari Narusaka[2], Kohji Yamada[1], Keishi Osakabe[1], Yuriko Osakabe[3] ([1]Fac. Biosci. Bioindust., Tokushima Univ., [2]RIBS, Okayama, [3]Sch. Life Sci. & Tech., Tokyo Tech.)

SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN1 (SIB1) は葉緑体シグマ因子 SIG1 の相互作用因子として単離された。シロイヌナズナ *SIB1* 遺伝子の機能を抑制することで種々の環境ストレスに対する耐性の増強と植物体の成長促進が示された一方で、SIB 1 の機能の詳細は明らかにされていなかった。本研究は、重要な園芸作物であるトマトにおいて同様の形質の付与を目的として *sib1* 変異体を作製すると共に、SIB の植物における機能解明を目指している。トマトゲノムには *SIB1* 関連遺伝子として *SlSIB1* と *SlSIB2* が存在し、アミノ酸配列にはシロイヌナズナの SIB1 と同様に VQ motif が高度に保存されていた。これまで、シロイヌナズナの SIB1 は、病害抵抗性や塩分ストレス応答に関与する転写因子 WRKY33 との相互作用が明らかにされている。我々は、Yeast Two-Hybrid システムを用いて、SlSIB1 と SlWRKY33 との相互作用について解析した。その結果、シロイヌナズナと同様に SlSIB1 と SlWRKY33 の相互作用することが明らかになった。SlSIB1 が SlWRKY33 の転写に関与することが示唆された。さらに我々は、*SlSIB1* を標的とした CRISPR/Cas9 をトマトに導入し *SlSIB1* への変異導入を試みた。本大会において *slsib1* 変異体作製の進捗を報告すると共に、*SlSIB* 遺伝子群の機能について議論する。

SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN1 (SIB1) has been isolated as an interacting factor with SIG1, a chloroplast sigma factor in Arabidopsis. Recently, it was shown that the Arabidopsis *sib1* mutant improves environmental stress tolerance and enhances leaf growth. This study aims to produce the *sib1* mutant in tomato, one of the important horticultural crops. *SlSIB1* and *SlSIB2* were identified in tomato, and their amino acid sequences contain a conserved VQ motif as in the Arabidopsis SIB1. Arabidopsis SIB1 also interacts with WRKY33, a transcription factor involved in disease resistance and salinity stress responses. We then analyzed the interaction of SlSIB1 with SlSIG1 or SlWRKY33 using yeast two-hybrid system. The results showed that SlSIB1 and SlWRKY33 interacted in yeast cells. We generated the knockout tomato mutants for *SlSIB1* by CRISPR/Cas9 and will perform phenotypic analysis of these *slsib1* mutants.

tomato, SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1, environmental stress tolerance

発表責任者：刑部祐里子（osakabe.y.ab@m.titech.ac.jp）

講演番号：4J02-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

光呼吸由来の H_2O_2 誘導性細胞死における葉緑体 GS-GOGAT サイクルの役割

Role of chloroplast GS-GOGAT cycle in the photorespiratory H_2O_2-induced cell death

○石橋 可菜[1]、丸田 隆典[1,2]、MHAMDI Amna[2]、BREUSEGEM Frank Van[2]（[1]島根大院・自然科学、[2]Plant Systems Biol., VIB-Ghent Univ.）
○Kana ISHIBASHI[1], Takanori MARUTA[1,2], Amna MHAMDI[2], Frank Van BREUSEGEM[2] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Plant Systems Biol., VIB-Ghent Univ.)

C3 植物の葉において、ペルオキシソームにおける光呼吸のグリコール酸酸化は主要な H_2O_2 の発生源である。H_2O_2 はシグナル分子として重要であるが、その過剰蓄積は細胞の酸化損傷および細胞死を引き起こす。そのため、ペルオキシソームにはカタラーゼ（CAT）が高濃度に存在し、生成された H_2O_2 を速やかに消去する。シロイヌナズナの主要 CAT 欠損株（*cat2*）は、光呼吸促進条件（強光など）では H_2O_2 蓄積に依存した明確な細胞死の表現型を示す。今回、H_2O_2 誘導性細胞死の分子機構の解明を目的として、細胞死の抑圧された *cat2* のサプレッサー変異株を単離し、その原因遺伝子の一つが葉緑体型グルタミン合成酵素（GS2）をコードする *GLN2* であることを見出した。GS2 は光呼吸におけるアンモニア再同化に不可欠な酵素である。より詳細な解析のために *cat2 gln2* 二重欠損株を作出した。強光照射下の *cat2* で生じる酸化型グルタチオンの蓄積と細胞死の両方が二重欠損株で顕著に回復することがわかった。また、同様の現象は GS2 と共役するグルタミン酸合成酵素（Fd-GOGAT）を欠損させた場合でも見られた。これらの結果から、葉緑体の GS-GOGAT サイクルを介した光呼吸フラックスの維持が *cat2* で起こる細胞死を促進することが明らかになった。

The photorespiratory glycolate oxidation process in peroxisome is the most significant source of hydrogen peroxide (H_2O_2) in C3 plant leaves. Although H_2O_2 plays a signaling role, its high accumulation causes severe oxidative damage and subsequent cell death. Peroxisomes accumulate catalases (CATs) at very high levels to restrict H_2O_2 levels. *Arabidopsis cat2* mutants lacking a major isoform of CATs show clear H_2O_2-dependent cell death phenotype under photorespiration-promoting conditions, such as high light. To clarify the molecular mechanisms underlying H_2O_2-induced cell death, we have isolated suppressor mutants that alleviate cell death in *cat2*. One of the suppressor genes was *GLN2* that encoded chloroplast glutamine synthetase (GS2), which is essential for ammonium reassimilation process in photorespiration. To address in more detail, we generated and analyzed *cat2 gln2* double mutant. Although *cat2* mutants showed a clear cell death phenotype under high light concurrently with accumulation of oxidized glutathione, these phenotypes were largely recovered in *cat2 gln2* double mutant. In addition, the lack of a chloroplast glutamate synthase, of which reaction is coupled with GS2, also suppressed the cell death phenotype of *cat2*. These findings indicate that the chloroplast GS-GOGAT cycle facilitates cell death in *cat2* by keeping the photorespiratory flux high.

Hydrogen peroxide, Catalase, Glutamine synthetase

講演番号：4J02-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナの葉緑体分裂位置異常変異体における孔辺細胞葉緑体の表現型解析

Microscopic characterization of guard cell chloroplasts in several chloroplast division mutants of Arabidopsis thaliana

○篠原 万由子[1]、宮﨑 梨菜[1]、サンジャヤ アルビン[1]、村松 亮輔[1]、安澤 愛[1]、名護 しほ[2]、伊藤 竜一[2]、藤原 誠[1] ([1]上智大理工、[2]琉球大理)
○Mayuko Shinohara[1], Rina Miyazaki[1], Alvin Sanjaya[1], Ryohsuke Muramatsu[1], Mana Yasuzawa[1], Shiho Nago[2], Ryuuichi Itoh[2], Makoto Fujiwara[1] ([1]Sophia Univ., [2]Univ. of Ryukyus)

【目的】葉緑体は対称二分裂によって増殖し，植物細胞内で均一な集団を形成する。従来，植物の葉緑体分裂は主に葉肉細胞を用いて解析されてきたが，近年その制御は組織に依存することが示唆されている。今回，私たちは気孔孔辺細胞の葉緑体に着目した。孔辺細胞はシュートの表皮で形態的均一性が高く，葉緑体の比較解析に優れている。本研究では，シロイヌナズナの代表的な葉緑体分裂位置異常変異体 *arc3* と *atminD1* について孔辺細胞の葉緑体形態を調べた。
【結果と考察】昨年度，野生型シロイヌナズナの孔辺細胞の葉緑体数はアクセッションと組織により影響を受けることが示された（村松ら，2021 年度本大会発表）。これを踏まえ，今回非交配型の *arc3-1*（L*er* 由来），*arc3-6*，*arc3-7*（Col 由来），*arc11-1*（L*er* 由来），*atminD1-1*（Ws 由来）を用い，それぞれ第 3, 4 葉の葉柄向軸面と葉身背軸面の 100 気孔（200 孔辺細胞）を生組織クロロフィル蛍光観察に基づき調べた。実験の結果，*arc3* については全ての変異アレルで一細胞中の葉緑体が野生型とほぼ同数であることが示された。*atminD1* については，*arc11-1* では野生型とほぼ同数の，*atminD1-1* では野生型よりも多くの葉緑体増殖が認められた。一方，*arc3* と *atminD1* ともに葉緑体の大きさは細胞内で野生型様のものから大小様々なものまで観察されたが，*atminD1* でのみ葉柄の孔辺細胞にミニ葉緑体が検出された。以上の孔辺細胞の葉緑体表現型は，分裂阻害を伴う葉肉の葉緑体表現型とは異なっており，葉緑体増殖制御の組織依存性が支持された。現在，私たちは他の葉緑体分裂変異体の解析も進めており，本発表ではその結果も併せて報告する。

In plant cells, chloroplasts proliferate by symmetric binary fission, which results in a homogeneous population of chloroplasts with respect to size and shape. In this study, we focused on the regulation of chloroplast proliferation in leaf guard cells of *Arabidopsis thaliana*. We examined the chloroplast number in guard cells of blades and petioles from *arc3* and *atminD1* mutants, which had defects in chloroplast division-site selection. By fluorescence microscopy analyses, we found that three loss-of-function mutants of *arc3* consistently exhibited the wild-type number of chloroplasts per cell. Two loss-of-function alleles of *atminD1* also exhibited either a normal or increased number of chloroplasts per cell. Nevertheless, all *arc3* and *atminD1* plants could produce a heterogeneous population of chloroplasts with respect to size within guard cells. Based on these data, we will discuss the tissue-dependent regulation of chloroplast division in plants.

Arabidopsis thaliana, guard cell, chloroplast

発表責任者：藤原　誠（mtf1@mac.com）

講演番号：4J02-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

シロイヌナズナの気孔形成過程における葉緑体の増殖・分配解析

Chloroplast proliferation and partitioning during guard cell formation of Arabidopsis

○宮﨑 梨菜[1]、名護 しほ[2]、窪園 雅人[1]、村松 亮輔[1]、伊藤 竜一[2]、藤原 誠[1] ([1]上智大理工、[2]琉球大理)
○Rina Miyazaki[1], Shiho Nago[2], Masato Kubozono[1], Ryohsuke Muramatsu[1], Ryuuichi Itoh[2], Makoto Fujiwara[1] ([1]Sophia Univ., [2]Univ. of Ryukyus)

【背景と目的】植物の気孔孔辺細胞は，孔辺母細胞を前駆体として対称分裂により形成される。孔辺細胞内には一般に葉緑体が発達する。孔辺細胞は比較的形態が均一で観察も容易であることから，その形成過程は，細胞分裂時の葉緑体の分配と増殖を解析する上で格好のモデル系となる。本研究では，シロイヌナズナの野生型および葉緑体分裂位置異常を示す *mcd1* 変異体を用いて，孔辺細胞形成時の葉緑体の数と形を追跡した。
【方法】葉の表皮特異的プロモーターによりトランジットペプチドを融合した GFP を発現する Col 形質転換体（FG13-16）を野生型のコントロールとして用いた。Col 由来の *mcd1-2* 変異体（T-DNA 挿入変異体）を FG13-16 と交配し，変異体の表皮色素体を GFP で特異的に蛍光標識した。FG13-16 および *mcd1-2*×FG13-16（以下，*mcd1* 変異体）の第 3,4 葉を用いて，葉柄向軸面の孔辺母細胞，初期孔辺細胞，および成熟孔辺細胞を蛍光顕微鏡で観察した。
【結果と考察】約 2 週間の実生の本葉葉柄部の蛍光観察を行った結果，野生型と *mcd1* 変異体ともに孔辺母細胞，初期孔辺細胞，成熟孔辺細胞の葉緑体数が明らかになった。野生型では，孔辺母細胞から成熟孔辺細胞に至るまでに一気孔レベルで葉緑体数は約 1.5 倍に増加した。また孔辺母細胞中の葉緑体は，細胞分裂の際，ほぼ等分配されることがわかった。*mcd1* 変異体においても，孔辺母細胞と成熟孔辺細胞のいずれもその葉緑体数は野生型とほぼ同数であり，孔辺母細胞の分裂の際は 2 つの娘細胞に等分配される傾向が示された。しかしながら今回の実験では，*mcd1* 変異体の初期孔辺細胞では葉緑体数が野生型の場合と比べて有意に増加していた。これより，*mcd1* の孔辺母細胞では葉緑体増殖の速度またはタイミングが変化している可能性が示唆された。

During leaf development, guard cells are differentiated through symmetric division of guard mother cells in the shoot epidermis. Guard cells generally contain chloroplasts, which may undergo proliferation and partitioning during stomatal development. In this study, we determined the number dynamics of chloroplasts during guard cell formation in Arabidopsis. Using leaves of wild type and *mcd1*, which was impaired in chloroplast division-site determination, we show that wild-type chloroplasts increase by 1.5-fold during the guard mother cell-guard cell differentiation. Unexpectedly, *mcd1* exhibited the normal number of chloroplasts per cell in both guard mother cells and mature guard cells.

Arabidopsis thaliana, guard cell, chloroplast

発表責任者：藤原 誠（mtf1@mac.com）

講演番号：4J02-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

低光強度下トマト根の伸長における希土類元素の影響

Effect of rare earth elements on tomato root elongation under low light intensity

○井口 翔[1]、徳永 達也[1]、竹中 悠人[1]、渡辺 正夫[2]、石水 毅[1] ([1]立命館大・生命、[2]東北大・院生命)
○ Sho IGUCHI[1], Tatsuya TOKUNAGA[1], Yuto TAKENAKA[1], Masao WATANABE[2], Takeshi ISHIMIZU[1] ([1]Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

スカンジウム、イットリウム、ランタンなどの希土類元素を植物に添加すると、成長・果実肥大に効果があることが知られている。しかし、さまざまな環境ストレス下での希土類元素添加の影響に関する知見は少ない。そこで本研究では低光強度ストレス下でトマトへの希土類元素添加の効果を観察した。

トマトが成長するために十分な光強度あるいは成長が半分程度になる低光強度で根の伸長に対する希土類元素の影響を調べた。15 種類の希土類元素のうち、ランタン(La^{3+})を添加した時の影響が最も大きかった。通常光強度で伸長した根の長さを 100 とすると、20 μM La^{3+}添加で 111 と若干の成長促進効果が見られた。根の伸長が 49 に低下する低光強度では、La^{3+}添加で 82 に回復することを見出した(右図)。この傾向は地上部の伸長・地上部の重量・クロロフィル量でも観察された。この現象の遺伝子・タンパク質レベルの分子機構に興味が持たれた。

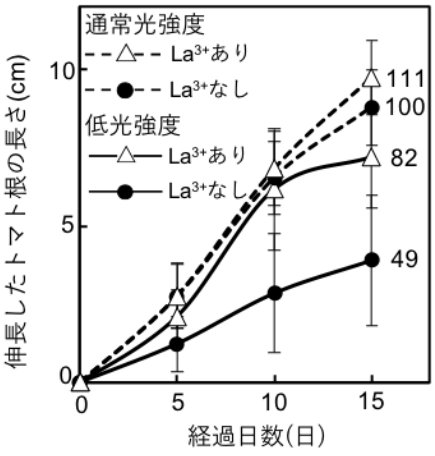


図. La^{3+}添加時のトマト根の伸長

Rare earth elements such as scandium, yttrium, and lanthanum are known to have an effect on plant growth and fruit enlargement. However, little knowledge is available on the effects of rare earth elements on plants under stress conditions. In this study, we observed the effect of rare earth element to tomato under low light intensity stress.

The effect of rare earth elements on root elongation was measured under normal or low light intensities. Among 15 rare earth elements, lanthanum (La^{3+}) showed the largest effect on root elongation. When the length of the root elongated under normal light intensity was 100, the addition of 20 μM La^{3+} had a slight growth promoting effect (111). We found that root elongation decreased to 49 at low light intensity but recovered to 82 with the addition of La^{3+} (Figure). This trend was also observed in stem elongation, weight, and chlorophyll content. We are interested in the molecular mechanism of this phenomenon at the gene and protein level.

Lanthanides, light stress, root growth

講演番号：4J02-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

有機合成したムギネ酸類アナログ「PDMA」のキレート鉄肥料としての効果実証

The demonstration of synthetic mugineic acid family phytosiderophore analog "PDMA" as Fe fertilizer

○鈴木 基史[1]、小林 高範[2]、村田 佳子[3]、中西 啓仁[4]、上野 大勢[5]、難波 康祐[6]([1]愛知製鋼、[2]石川県立大学、[3]サントリー生命科学財団、[4]東京大学、[5]高知大学、[6]徳島大学)

○Motofumi SUZUKI[1], Takanori KOBAYASHI[2], Yoshiko MURATA[3], Hiromi NAKANISHI[4], Daisei UENO[5], Kosuke NAMBA[6] ([1]AICHI STEEL CORPORATION, [2]Ishikawa Prefectural Univ., [3]SUNTORY FOUNDATION FOR LIFE SCIENCES, [4]The Univ. of Tokyo, [5]Kochi Univ., [6]Tokushima Univ.)

イネ科植物が分泌する「ムギネ酸類」は土壌中の鉄をキレートするファイトシデロフォアである。世界の３分の１を占めるアルカリ土壌では鉄が不溶化し、鉄欠乏が発生するため、効果的な鉄肥料が必要とされているが、一般的な合成鉄キレート肥料はイネ科植物への効果が薄く、また微生物に分解されにくいことから環境への悪影響が懸念されている。

ムギネ酸類は 1976 年に日本で発見されてから、その有用性が示されてきたが、土壌中で１日以内に分解され、作出コストも高いことから肥料として使われることはなかった。

本研究では、イネ科植物が共通して分泌する「デオキシムギネ酸(DMA)」の４員環部分を５員環に変換した「プロリンデオキシムギネ酸(PDMA)」を有機合成し、その特性を評価した。L-アゼチジン-2-カルボン酸の代わりに L-プロリンを原料とした PDMA は、DMA よりも安価に合成でき、微生物によって緩やかに分解された。Fe-PDMA 錯体はオオムギ、イネ、トウモコロシの YS1/YSL トランスポーターにより細胞内に取り込まれた。石灰質アルカリ土壌で栽培したイネに Fe-PDMA、または金属をキレートさせない PDMA を投与したところ、同濃度の従来の合成キレート鉄剤よりも鉄欠乏を回復させる効果が高かった。さらに、数十グラムスケールの中量合成法を開発し、屋外の石灰質アルカリ土壌で栽培評価を行い、移植後の１回の投与で４週間後まで健全に育つことを実証した。

イネ科植物以外の植物でも有効性を検討した。キュウリ・カボチャにおいても Fe-PDMA の投与が従来の合成キレート鉄よりも鉄欠乏の回復効果が高いことが明らかになった。

Mugineic acid family phytosiderophores (MAs) are ferric iron (Fe) chelators secreted by Poaceae plants for absorbing Fe. Fe deficiency occurs in alkaline soil where Fe is hardly soluble. General chelating agents are non biodegradable and insufficient for supplying Fe for Poaceae plants. MAs were found in 1976, and were characterized for several decades, but they have not been used as fertilizers because of their high biodegradability and costs.

In the present research, we have developed a synthetic MA analog named proline deoxymugineic acid (PDMA). PDMA was gradually biodegraded, and Fe-PDMA complex was taken up through YS1/YSL transporters. The applications of Fe-PDMA and PDMA into calcareous soil efficiently recovered Fe deficiency in rice. We also showed the efficacy of Fe-PDMA in non-Poaceae plants.

mugineic acid family phytosiderophore, iron fertilizer, biodegradative

発表責任者：鈴木　基史（motofumi-s@he.aichi-steel.co.jp）

講演番号：4J02-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

サトイモ科植物ザゼンソウの発熱期花序で発現する糖輸送体の局在および機能の解析

Possible roles of sugar transporter proteins, SrSTP1 and 14, in the development of heat-producing inflorescences of skunk cabbage

○小屋松 大輝[1]、大坪 雅[1]、増子（鈴木） 潤美[2]、渡辺 正夫[2]、稲葉 丈人[1]、稲葉 靖子[1,2] ([1]宮崎大・農、[2]東北大院・生命科学)
○Daiki KOYAMATSU[1], Miyabi OTSUBO[1], Hiromi MASUKO(SUZUKI)[2], Masao WATANABE[2], Takehito INABA[1], Yasuko INABA[1,2] ([1]Miyazaki Univ., [2]Tohoku Univ.)

ザゼンソウ（*Symplocarpus renifolius*）の花序は、氷点下を含む寒冷環境下でも発熱により体温を 20℃前後に保つことができる。植物の発熱/呼吸には、呼吸基質となる糖が多量に必要であるが、そうした糖の転流・輸送機構についてはほとんど解明されていない。これまでに、発熱期の花序で発現が上昇する糖輸送体として SrSTP1 および 14 が同定され、STP は複数の植物で花粉の成熟・発芽、花粉管の生育および気孔の開口などに関与することが報告されているが、発熱における役割は不明であった。STPs は単糖をアポプラストから細胞内へ取り込む役割を持つことから、本研究では、SrSTP1/14 が発熱に必要な糖を輸送する糖輸送体ではないかという仮説のもと、一連の実験を行った。まず、35S::*SrSTP1/14-GFP* をザゼンソウ葉由来プロトプラストで一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、SrSTP1/14-GFP は細胞膜および核膜周辺に局在することが示唆された。次に、ヘキソース輸送能を欠失した酵母 EBY.VW4000 株に *PMA1::SrSTP1/14-GFP* を導入して、炭素源としてグルコース及びガラクトースを 0.02、0.2、2% (w/v) 濃度で含む培地で生育の観察を行った。その結果、SrSTP1/14 を発現する酵母はともに低濃度のグルコース及び高濃度のガラクトース培地において生育が見られた。以上の結果から、SrSTP1/14 は、細胞膜上でグルコースおよびガラクトースを輸送することにより、発熱期ザゼンソウ花序での糖輸送機構に関与する可能性が示唆された。現在、*in situ* hybridization による花序組織内での局在解析を進めており、合わせて報告する。

Skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*) can keep the spadix temperature at around 20°C even if air temperature falls below freezing. Although thermorespiratory processes require a large amount of sugars as a substrate, the mechanism underlying sugar translocation and transport has not been elucidated. Therefore, in this study, we focused on the sugar transporter protein, SrSTP1 and 14, which transcriptional expression has increased during the processes from pre-thermogenic to thermogenic stage in the spadix. At first, *35S::SrSTP1/14-GFP* were transiently expressed in skunk cabbage leaf protoplasts, and GFP fluorescence was observed by confocal laser microscopy. The results indicated that SrSTP1/14-GFP were localized to the plasma membrane and around the nuclear membrane. Next, *PMA1::SrSTP1/14-GFP* were transformed into the hexose transporter-deficient yeast cells, EBY.VW4000, and the growth complementation assay on media containing 0.02, 0.2, and 2% (w/v) glucose or galactose was performed. As a result, yeasts expressing SrSTP1/14 grew on the medium containing low concentrations of glucose and high concentrations of galactose. These results suggest that SrSTP1/14 may play a role in transporting glucose and galactose across the plasma membrane in thermogenic spadices. Currently, tissue-specific localization of SrSTP1/14 is under investigation by *in situ* hybridization. Together with these data, the role of SrSTP1/14 in thermogenic spadices will be discussed.

sugar transporter, thermogenic plant, *Symplocarpus renifolius*

発表責任者：稲葉靖子（ykoina@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4J02-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

ソテツ球果の熱生産における脱共役タンパク質 UCP5 の役割に関する研究

Characterization of uncoupling protein 5 in the gymnosperm *Cycas revoluta*

○横田 圭馬、大畠 瑞希、稲葉 丈人、稲葉 靖子（宮崎大学農学部）
○Keima YOKOTA, Mizuki OHATA, Takehito INABA, Yasuko INABA (Miyazaki Univ.)

植物の発熱には、ミトコンドリアの余剰エネルギー解消に関わるタンパク質が役割を持つと推定されている。その一つが脱共役タンパク質 UCP であり、植物 UCP は、クレード I(UCP1;2)、クレード II(UCP3)、クレード III(UCP4;5)に分かれる。この中で、クレード I 型 UCP は、既に複数の発熱植物で研究されているが、発熱植物ソテツ(*Cycas revoluta*)の RNA-seq 解析で、発熱組織で発現が高くなる遺伝子の中にクレード III 型 UCP が含まれていた。そこで本研究では、ソテツ *C. revoluta* の *CrUCP5* の解析を行った。

まず、*CrUCP5* の単離・同定を行った。CrUCP1 との推定アミノ酸配列の相同性は 38%であった。次に、*C. revoluta* 雄花の光依存的体温振動に伴う CrUCP5 の発現変化を qPCR で解析した結果、雄花の主要組織である小胞子葉（発熱組織）と小胞子のう（非発熱組織）において、体温の変化と相関した発現変動が見られた。小胞子葉と小胞子のうにおける *CrUCP5* の発現量は、概ね小胞子のうで高かった。現在、*35S::CrUCP5-GFP* を、シロイヌナズナ葉由来プロトプラストに導入して発現・局在の解析を進めており、上記結果と合わせて報告したい。

Mitochondrial energy-dissipating proteins are proposed to play a role in plant thermogenesis. One typical example is an uncoupling protein (UCP), and plant UCPs are divided into clade I(UCP1;UCP2), clade II(UCP3), and clade III (UCP4;UCP5). Among these clades, expression as well as activity of clade I-type UCP in heat-producing plants has been extensively studied, but our recent RNA-seq analysis for the gymnosperm *Cycas revoluta* has revealed that clade III-type UCP was highly expressed in thermogenic tissues. Therefore, in this study, we analyzed CrUCP5 of *C. revoluta.* At first, we identified and isolated *CrUCP5*. CrUCP5 exhibited 38% sequence identity to CrUCP1. To analyze the expression change of *CrUCP5* in the light-dependent body temperature oscillation *of C.revoluta* male cones, qPCR analyses were carried out. As a result, the expression of *CrUCP5* was positively corelated with the cone temperature changes in two major tissues, microsporophylls (MS; thermogenic) and microsporangia (MG; non-thermogenic). However, the expression level of *CrUCP5* in MG was higher in MS. Currently, we are investigating the intracellular localization of *35S::CrUCP5-GFP* transferred into Arabidopsis leaf protoplasts. Taken together with the result, we would like to discuss the role of CrUCP5 in cycad thermogenesis.

Uncoupling protein, Cone thermogenesis, *Cycas revoluta*

発表責任者：稲葉靖子（ykoina@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4J02-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

ゼニゴケグルタミン合成酵素(GS)の細胞内局在性と光呼吸との関係の解明

Analysis of the localization of GS and the relationship between GSs and photorespiration in *Marchantia polymorpha*

○上田代 宙、和田 慎也、三宅 親弘（神大農）
○Hiro Kamitashiro, Shinya Wada, Chikahiro Miyake (Kobe Univ.)

光合成生物は、光エネルギー過剰となる環境下では、電子伝達系の光化学系 I (PS I)の反応中心クロロフィル P700 を酸化状態にすることで、活性酸素種(ROS)の発生を回避し、光化学系への酸化障害を回避する。P700 の酸化誘導には、本来光エネルギーを消費する CO_2 固定反応に加え、代替的な還元力の消費シンクが大きく貢献する。光合成生物にはこれまで、FLV と光呼吸の 2 つの代替的な電子シンクが確認されるが、被子植物はそれまでの光合成生物が利用した FLV を失い、光呼吸へと代替的電子シンクを進化させている。本研究では、FLV を保持し、光呼吸活性も有するゼニゴケを材料に P700 酸化誘導における光呼吸の役割を明らかにすることを目的とした。グルタミン合成酵素(GS)は光呼吸代謝の律速因子と言われ、被子植物には細胞質型と葉緑体型 2 つのアイソザイムが存在する。一方で、裸子植物では光呼吸経路に重要な葉緑体型 GS が存在せず、裸子植物以前の植物では光呼吸の代謝経路が異なることが想定される。そこで、ゼニゴケ GS の細胞内局在性を、YFP 融合タンパク質を用い確認した。その結果、ゼニゴケの 6 つの GS 遺伝子中、2 つの GS-YFP 融合タンパク質は葉緑体に局在することが確認された。現在、GS 阻害剤及び各 GS の欠損株を作製し、ゼニゴケの光呼吸への葉緑体型 GS との関係を解析している。

Under excess light conditions, photosynthetic organisms induce the oxidation of reaction center chlorophyll (P700) of photosystem I (PSI) to avoid the generation of reactive oxygen species (ROS) and maintain the PSI activity. Additional electron sinks to CO_2 assimilation, such as photorespiration and flavodiiron protein (FLV), contribute to the oxidation of P700 in these light stress conditions. In the evolution of photosynthetic organisms from cyanobacteria to angiosperms, angiosperms lose FLV and evolve photorespiration as the electron sink. A liverwort, *Marchantia polymorpha,* is an intermediate of the evolutional step of photosynthetic organisms and possess both FLV and photorespiration activity. Glutamine synthetase (GS) uses ATP for its reaction and is thought to be the rate-determining step in photorespiration. In angiosperms, chloroplastic GS2 functions for photorespiration, but gymnosperms do not possess GS2, and only cytosolic GS1. Thus, it is assumed that liverworts also do not have chloroplastic GS2 and have a different pathway of photorespiration. In this study, we analyzed the localization of GS in *Marchnatia polymoypha*, generating the transformants expressing GS-fluorescent protein (YFP) fusion protein. As the result, two of six GS-YFPs were localized in chloroplasts. Now, we are investigating the relationship between these GSs and photorespiration in *Marchantia polymorpha*.

photosynthesis, photorespiration, Glutamine synthetase

発表責任者：和田慎也（swada@penguin.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4J02-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 09:30～ ミーティングルーム J

シアノバクテリア *Nostoc* sp. PCC7120 における RuBisCO activase-like protein の機能の解析
Function of RuBisCO activase-like protein in cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC7120

○林 悠介[1]、得平 茂樹[2]、蘆田 弘樹[1] ([1]神戸大院・人間発達環境、[2]都立大院・理)
○Yusuke HAYASHI[1], Shigeki EHIRA[2], Hiroki ASHIDA[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Metropolitan Univ.)

光合成 CO_2 固定酵素 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（RuBisCO）は、基質 Ribulose-1,5-bisphosphate などの糖リン酸の活性部位への結合により不活性化型となる。これらを解離し、活性化を促すのが、RuBisCO activase（RCA）である。植物では、RCA は RuBisCO の機能発現を介して光合成に必須のタンパク質であるが、シアノバクテリアでは発見されてこなかった。興味深いことに、*Nostoc* sp. PCC7120 を含む一部のシアノバクテリアは、RCA と相同性を示す RCA-like protein（RCALP）を有している。今回、我々は RCALP が RuBisCO 活性化能を有することを明らかにした。また、RCALP が大腸菌内での RuBisCO 異所発現量を増加させることから、RuBisCO の蓄積量にも関わると考えられた。そこで、RCALP の生体内機能を明らかにするために、RCALP 遺伝子を破壊した *Nostoc* sp. PCC7120 株（ΔRCALP）を用いて実験を行った。その結果、ΔRCALP の生育は野生株（WT）よりも低下し、光合成酸素発生速度は WT の 10%に低下していた。さらに、ΔRCALP では、WT と比較して RuBisCO の蓄積量が増加しているものの、比活性が低下していた。これらの結果から、*Nostoc* sp. PCC7120 において、RCALP は RuBisCO の機能発現に寄与していることが示された。

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) catalyzes the CO_2-fixing reaction for ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) in the Calvin cycle. This enzyme is inactivated by tightly binding some sugar phosphates, including RuBP, to the active sites. RuBisCO activase (RCA) promotes activation of RuBisCO by removal of the inhibitory sugars from the RuBisCO active sites. RCA is an essential for the expression of RuBisCO function in plants. On the other hand, RCA has not been found in cyanobacteria. Some cyanobacteria, including *Nostoc* sp. PCC7120, have an RCA-like protein (RCALP) with homology to RCA. We found that RCALP has RCA activity to activate an inactive form of RuBisCO bound inhibitors. Accumulation of RuBisCO was increased by coexpression of RCALP in *Escherichia coli*, suggesting that RCALP was involved in RuBisCO expression. In order to clarify the in vivo function of RCALP, we analyzed the RCALP knockout mutant (ΔRCALP) of *Nostoc* sp. PCC7120. As a result, the growth rate of ΔRCALP was lower than wild type (WT), and the photosynthetic oxygen evolution rate of ΔRCALP was decreased by 10% of WT. The amount of RuBisCO in ΔRCALP was higher than that in WT but RuBisCO activity in ΔRCALP was low compared with WT. These results suggest that RCALP contributes to the expression of RuBisCO function in *Nostoc* sp. PCC7120.

RuBisCO, cyanobacteria, photosynthesis

発表責任者：林 悠介（189d842d@stu.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4J04-01
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

植物のフェノール基質プレニル化酵素の部位特異性を担うアミノ酸残基の同定
Identification of amino acid loci responsible for determination of regio-specificity of plant aromatic prenyltransferases

○韓 俊文[1]、棟方 涼介[1]、高橋 宏暢[2]、肥塚 崇男[3]、Alain HEHN[4]、矢崎 一史[1]（[1]京大・生存研、[2]徳島文理大・薬、[3]山口大院・創成科学、[4]仏 ロレーヌ大/INRA）
○JUNWEN HAN[1], Ryosuke Munakata[1], Hironobu Takahashi[2], Takao Koezuka[3], Alain HEHN[4], Kazufumi Yazaki[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokushima Bunri Univ., [3]Yamaguchi Univ . , [4]Univ. of Lorraine/INRA)

植物の膜結合型プレニル化酵素（PT）はフェノール類にプレニル基を転移させる反応を触媒し、転移されたプレニル側鎖は生理活性発現の鍵となる。個々の植物 PT は基質認識やプレニル化部位に対して高い特異性を示すが、この特異性を担う触媒機構は不明である。そこで本研究では、植物 PT のプレニル化部位特異性の解明を目的とし、セリ科パースニップ（*Pastinaca sativa*）由来の PsPT1 及び PsPT2 を実験材料として選定した。PsPT1 と PsPT2 はクマリン類を基質とし、その 6 位と 8 位にプレニル基を導入するが、部位特異性（8 位プレニル化体量/全生成物量）はそれぞれ 3%、83%と異なる。まず、両酵素を 5 つのドメインに分け、全組み合わせでスワップしたキメラ酵素群を作製した。これらの部位特異性を *Nicotiana benthamiana* 一過的発現系を用いた *in vitro* 解析により調べ、各ドメインの部位特異性への影響を調べた。次いで、最も影響が大きかったドメインについて、両酵素間のミスマッチ位置に対して､PsPT1 型のアミノ酸残基を PsPT2 に導入した点変異酵素群を作製した。それらの解析の結果、部位特異性に顕著な影響を及ぼすアミノ酸が見出され、その変異酵素の部位特異性は 41.5%であった。この位置は PT 活性に重要な既知の保存モチーフの外であったことから、特性制御を担う新領域の存在が示唆された。さらに、当該アミノ酸位置に対して PsPT1 型以外の 18 種のアミノ酸残基を PsPT2 に導入した際に、部位特異性約 92%と天然型を超える変異酵素が作出された。

Membrane-bound prenyltransferases (PTs) transfer prenyl moieties to phenolics in plants, with the prenyl moieties being often crucial for bioactivities. PTs show high specificity for both substrates and prenylation position, while underlying catalytic mechanisms are unknown. In this study, we aim to disclose regio-specificity of plant PTs using PsPT1 and PsPT2 from parsnip (*Pastinaca sativa*, Apiaceae) as experimental models. PsPT1 and PsPT2 both transfer prenyl moieties to 6 or 8 position of coumarins but with different regio-specificities each other. First, both enzymes were divided into five domains and shuffled. Resulting chimeric enzymes were analyzed by *in vitro* assay using *Nicotiana benthamiana* transient expression system, which highlighted a domain showing the highest impact on regio-specificity. Next, for each of mismatch sites within this domain, PsPT1-type amino acids were introduced to PsPT2. *In vitro* analysis of these point mutants revealed an amino acid position crucial for regio-specificity. Moreover, the remaining 18 amino acid residues were introduced into this position. of PsPT2, resulting in creation of an unnatural enzyme showing higher regio-specificity than the native PsPT2.

prenyltransferases, Apiaceae, regio-specificity

講演番号：4J04-02
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

植物細胞壁ペクチン RG-I:アラビノース転移酵素の活性検出

Detection of RG-I: arabinosyltrasferase involved in biosynthesis of plant cell wall pectin

○大山 菜緒、森井 裕子、石水 毅（立命館大・生命）
○Nao OYAMA, Yuko MORII, Takeshi ISHIMIZU (Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

植物細胞壁ペクチンの構成成分ラムノガラクツロナン I(RG-I)は、細胞接着や形態形成に関わるとされている。ラムノースとガラクツロン酸の二糖繰り返し構造の主鎖と、アラビノースやガラクトースが連なる側鎖を持つ構造をしている。アラビノースはアラビノフラノース（Ara*f*）とアラビノピラノース（Ara*p*）の 2 種類の構造をとるが、RG-I 主鎖には Ara*f* が連なったアラビナンが結合している。RG-I 主鎖に Ara*f* を転移する糖転移酵素 RG-I:Ara*f*T（右図）は、酵素活性が検出されたことがなく、当該遺伝子は未同定である。そこで本研究では、アズキ上胚軸粗酵素に含まれる本酵素活性の検出を試みた。アクセプター基質に蛍光標識 RG-I オリゴ糖、ドナー基質に UDP-Ara*f* または UDP-Ara*p* を用いて RG-I:Ara*f*T の活性検出を測定した。ドナー基質に UDP-Ara*p* を用いた場合のみ新規酵素反応生成物が定量的に生成した。この酵素反応生成物が RG-I 主鎖に Ara*p* が転移されたものか Ara*f* が転移されたものか、興味が持たれる。この活性は、ペクチン合成オルガネラのゴルジ体を含むミクロソーム画分には検出されず、可溶性画分に検出された。今後は、基質特異性などの生化学的解析を進め、本酵素遺伝子同定のための情報を得ていく。

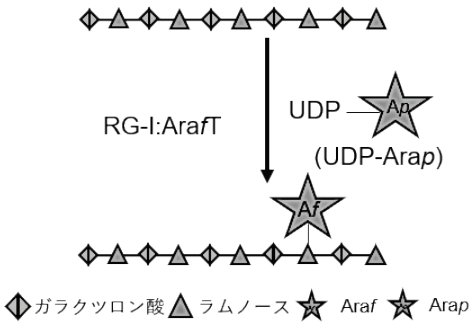


図. RG-I:Ara*f*T転移反応

Rhamnogalacturonan I (RG-I), a constituent of plant cell wall pectin, is involved in cell adhesion and morphogenesis. It has a repeating disaccharide main chain consisting of rhamnose and galacturonic acid, and side chains consisting of arabinose and galactose residues. RG-I: arabinofuranosyltransferase (RG-I:Ara*f*T), which transfers Ara*f* to the RG-I main chain, has never been detected and its gene has not been identified. In this study, we attempted to detect this enzyme activity from the crude enzyme of adzuki bean epicotyls using fluorescent-labeled RG-I oligosaccharide as acceptor substrate and UDP-Ara*f* or UDP-Ara*p* as donor substrate. Only when UDP-Ara*p* was used, novel enzyme product was quantitatively generated. It is interesting to know whether this enzyme reaction product is the RG-I oligosaccharide transferred Ara*f* or Ara*p* residue. This activity was not detected in containing microsomal fraction Golgi, the pectin synthesis organelle, but was detected in the soluble fraction. Its biochemical characterization such as substrate specificity will be carried out to obtain information for the identification of its corresponding gene.

plant cell wall, pectin, glycosyltransferase

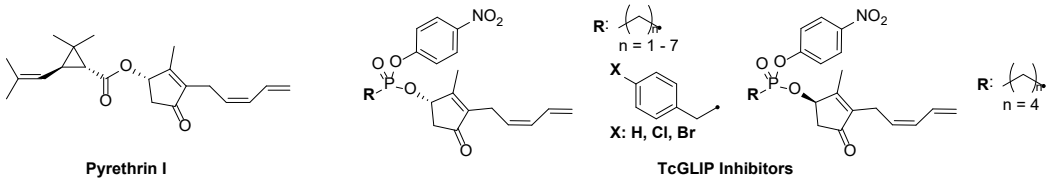
講演番号：4J04-03
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

ホスホン酸エステル化合物類の GDSL リパーゼ TcGLIP および除虫菊でのピレスリン生合成阻害活性

Inhibitory activities of phosphonates on the GDSL lipase TcGLIP and pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifoliun*

○杉坂 如水[1]、青山 詩織[1]、伊原 誠[1]、松尾 憲忠[2]、田辺 陽[2]、松田 一彦[1] ([1]近大農、[2]関学大理工)
○Yukimi SUGISAKA[1], Shiori AOYAMA[1], Makoto IHARA[1], Noritada MATHUO[2], You TANABE[2], Kazuhiko MATHUDA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Kwansei Gakuin Univ.)

ピレスリンはシロバナムシヨケギク（除虫菊; *Tanacetum cinerariifolium*）で生合成される天然殺虫剤である。ピレスリンはエステル化合物で、TcGLIP と命名した GDSL リパーゼにより酸部（第 I 菊酸、第 II 菊酸）とアルコール部（ピレスロロン、シネロロン、ジャスモロロン）がエステル化されることにより生成する。これまで我々は、ピレスリン生合成機構の解明を目的として、ホスホネート構造をもつ TcGLIP 阻害剤を数種合成し、それらの TcGLIP 阻害活性を報告してきた。今回、我々は本系統の阻害剤の R 部の構造やリン原子の立体配置の TcGLIP 阻害活性への影響のみならず、リン原子の絶対配置が *S* の場合についてピレスロロンの絶対配置の TcGLIP 阻害活性への影響についても検討した。さらに、除虫菊幼苗での化合物のピレスリン生合成阻害活性についても評価した。



TcGLIP 阻害活性を比較したところ、リン原子が *S* 配置をもつとき置換基 R として炭素数 5 程度の化合物が高い阻害活性を示した。それに対して、リン原子が *R* 配置をもつとき置換基 R が長ければ長いほど TcGLIP 阻害活性は増大した。ピレスロロン部の絶対配置については、*S* 配置をもつ化合物が *R* 配置をもつ化合物より高い阻害活性を示すことが明らかとなった。試験した化合物は、除虫菊幼苗でのピレスリン生合成を有意に阻害した。

The pyrethrum plant *Tanacetum cinerariifolium* biosynthesizes insecticides pyrethrins. To understand the mechanism of pyrethrin biosynthesis, phosphonate-type inhibitors were synthesized from substituted phosphonic dichlorides. The compounds were tested on the recombinant TcGLIP, a GDSL lipase underpinning the ester-forming step in pyrethrin biosynthesis. Among the alkyl-substituted phosphonates, compounds with C5 chains showed the highest TcGLIP inhibitory activity when the phosphorus configuration is *S*. By contrast, the activity increased with the alkyl chain length when the phosphorus configuration is *R*. The compound with *S*-pyrethrolone moiety showed higher inhibitory activity on TcGLIP than that with *R*. The TcGLIP inhibitors significantly inhibited pyrethrin biosynthesis in young seedlings of *T. cinerariifolium.*

pyrethrin, gdsl lipase, *Tanacetum cinerariifoliun*

発表責任者：杉坂如水（2133670014r@nara.kindai.ac.jp）

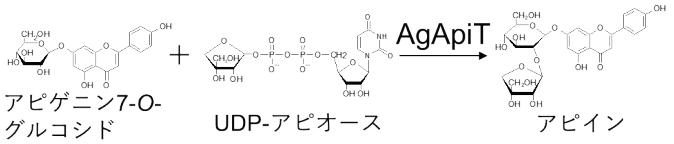
講演番号：4J04-04
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

セロリ由来フラボノイド配糖体アピイン生合成アピオース転移酵素の同定と基質認識

Identification and substrate recognition of the celery apiosyltransferase for biosynthesis of the flavonoid glycoside apiin

○山下 真穂[1]、藤森 多恵[1]、An Song[1]、竹中 悠人[1]、小林 優[2]、石水 毅[1] ([1]立命館大・生命、[2]京大・院農)
○Maho YAMASHITA[1], Tae FUJIMORI[1], Song AN[1], Yuto TAKENAKA[1], Masaru KOBAYASHI[2], Takeshi ISHIMIZU[1] ([1]Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ.)

フラボノイド配糖体は、植物の環境適応性を高めるために生産されていると考えられている。アピオースという単糖を含むフラボノイド配糖体アピインはセロリやパセリなどの特定の植物でのみ多く生産されている（植物体 1 g あたり 2.3 mg)。これまでアピイン生合成酵素に関して、アピゲニン 7-*O*-グルコシド生合成に関わる酵素遺伝子は同定されていたが、アピオース転移酵素遺伝子は未同定であった（右図)。本研究ではアピイン生合成時の RNA-Seq 解析結果を利用して、セロリ由来アピオース転移酵素 AgApiT を同定した。この AgApiT はドナー基質として UDP-アピオースを特異的に認識する酵素で、アピイン以外のアピオース含有フラボノイド配糖体生合成にも関与していた。類縁酵素の立体構造を参照し、それぞれの点変異酵素を解析することで、AgApiT の Ile139 と Leu356 が基質の UDP-アピオースを認識するアミノ酸であることを見出した。AgApiT は既存酵素の数カ所の点変異によりアピオース認識能を獲得した酵素であると考えられた。本研究結果とセロリゲノムを参照すると、AgApiT はセロリゲノムに存在する唯一のアピオース転移酵素であると推測された。



Plant flavonoid glycosides are thought to be defense metabolites against environmental stress. The flavonoid glycoside apiin, which contains the apiose residue, is abundantly produced only in certain plants such as celery and parsley. The genes encoding apigenin 7-*O*-glucoside biosynthetic enzymes have been identified, but the gene for apiosyltransferase has not yet been identified. In this study, we identified the celery apiosyltransferase AgApiT gene using RNA-Seq analysis of leaves during apiin biosynthesis. AgApiT had high specificity against UDP-apiose as a donor substrate and was also involved in the biosynthesis of apiose containing flavonoid glycosides other than apiin. We found that Ile139 and Leu356 of AgApiT were the key amino acids for UDP-apiose recognition. AgApiT was considered to be acquired apiose specificity by point mutations at these two amino acids residues. Referring to the nucleotide sequence information of celery genome, we speculated that AgApiT is the only apiosyltransferase present in the celery genome.

flavonoid, glycosyltransferase, glycoside

講演番号：4J04-05
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

シコニン／アルカニン生合成経路で働くデオキシシコニン水酸化酵素の機能解析

Functional characterization of deoxyshikonin hydroxylase in shikonin/alkannin biosynthetic pathway

○大塚 峻[1]、市野 琢爾[2]、吉村 和貴[1]、李 豪[2]、山本 浩文[3]、矢崎 一史[2]、高梨 功次郎[1,4] ([1]信州大院・総合理工、[2]京都大・生存研、[3]東洋大・生命科学、[4]信州大・理)
○Shun OTSUKA[1], Takuji ICHINO[2], Kazuki YOSHIMURA[1], Hao LI[2], Hirobumi YAMAMOTO[3], Kazufumi YAZAKI[2], Kojiro TAKANASHI[1,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]RISH, Kyoto Univ., [3]Fac. Life Sci., Toyo Univ., [4]Fac. of Sci., Shinshu Univ.)

薬用植物であるムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）は、根でシコニンおよびその光学異性体であるアルカニンを生産し、それらのほとんどをアシル化修飾して根皮に蓄積する。昨年、我々はシコニン／アルカニンのアシル基転移酵素（LeSAT1/LeAAT1）を報告し（Oshikiri, *et al.*, *Plant Physiol.* (2020) 184: 753-761）、続いて前駆体であるデオキシシコニンの 1' 位に水酸基を導入してシコニン／アルカニンを生産する酵素を探索している。これまでにデオキシシコニンの水酸基導入活性は、cytochrome P450（CYP）によって触媒されること、その CYP は LeSAT1 と相互作用することがそれぞれ示唆されていた。本研究では、まずムラサキのゲノム解析を行い、LeSAT1 および LeAAT1 の近傍に位置する機能未知の CYP を 1 分子種単離した。次に、この CYP を出芽酵母に異種発現させて酵素活性を測定したところ、シコニンのみが生産されたことから本 CYP はデオキシシコニン 1' 位への立体特異的な水酸基導入活性を有していることが分かった。本発表では、yeast two-hybrid 法や Co-IP 法を用いた、本 CYP と LeSAT1 および LeAAT1 の相互作用解析結果も併せて報告する。

Lithospermum erythrorhizon produces shikonin/alkannin derivatives in the root bark. Shikonin (*R*) is an enantiomer of alkannin (*S*), and most of these compounds are accumulated in the apoplast as the acylated derivatives mediated by shikonin- or alkannin-specific acyltransferases (LeSAT1/LeAAT1). These acyltransferases have been suggested to interact with a cytochrome P450 (CYP) that catalyze the hydroxylation of C-1' position in deoxyshikonin to produce shikonin and/or alkannin. In this study, we analyzed a CYP that co-localized with LeSAT1 and LeAAT1 on same contig in *L. erythrorhizon* genome. Enzyme assays using *Saccharomyces cerevisiae* showed that this CYP produces shikonin from deoxyshikonin with stereo-specific C-1' hydroxylase activity. The interactions between this CYP and LeSAT1/LeAAT1 are under investigation.

shikonin/alkannin derivatives, cytochrome P450, *Lithospermum erythrorhizon*

発表責任者：高梨 功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4J04-06
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

ブロッコリー由来 S-セラニル化 NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの酵素学的性質

Kinetic properties of S-selanylated NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from broccoli

○小嵜 光夏[1]、中谷 美有[2]、大沼 貴之[1,2,3]、武田 徹[1,2] ([1]近大院農、[2]近大農、[3]近大アグリ研)
○Mitsuka Kozaki[1], Miu Nakatani[2], Takayuki Ohnuma[1,2,3], Toru Takeda[1,2] ([1]Grad. Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]ATIRI)

植物にとってセレン（Se）は必須微量元素ではないが、いくつかの植物種において、微量の Se 付与は生育促進などの有用性を示すことが報告されている。当研究室ではこれまでに、Se 蓄積種であるブロッコリー（*Brassica oleracea* var. *italica*）において細胞質局在の NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPC）への Se 結合と、それに伴う酵素活性の上昇を確認しているが、それらの詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、GAPC および Se 結合のターゲットと推測される Cys 残基を Ser に変異した変異型 GAPC の組換え体を作製し、それらを用いて S-セラニル（S-SeH）化 GAPC を合成した後、酵素学的性質について検討した。

GAPC 遺伝子（Bo5g017500）を pRam N-His Kan ベクターに組み込み、大腸菌 10G 株で発現させることで組換え GAP を得た。また、156 および 160 番目の Cys 残基（C156、C160）を Ser に置換した変異型 $GAPC^{C156S}$・$GAPC^{C160S}$・$GAPC^{C156/160S}$ を作製した。それぞれの組換え酵素を精製し、その後、グルタチオンセレノトリスルフィドと反応させて S-SeH 化酵素を合成した。SeH 基と特異的に反応する蛍光プローブ（BES-Thio）を用いることで、触媒 Cys 残基に相当する C156 に SeH 基が生成していることが明らかになった。GAPC の酵素学的性質に及ぼす S-SeH 化の影響についてもあわせて報告する。

The binding of selenium to cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC) , and its associated the enhancement of enzymatic activity has been confirmed in the selenium-accumulating species broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). However, the detailed mechanism of these is unknown. In this study, we investigated the binding of selenium to the catalytic Cys residue (C156) using both recombinant GAPC and mutant enzymes to elucidate the mechanism of S-selanylated (S-SeH) GAPC formation by post-translational modification. Furthermore, the effect of S-selanylation on the kinetic properties of GAPC was analyzed. A recombinant GAPC was obtained by incorporating the GAPC gene (Bo5g017500) into the pRam N-His Kan vector and expressing it in *E. coli* 10G strain. In addition, mutant $GAPC^{C156S}$, $GAPC^{C160S}$, and $GAPC^{C156/160S}$ were prepared by substituting Ser for Cys residues at positions 156 and 160 (C156, C160). Each recombinant enzymes were purified and then reacted with GSSeSG to synthesize S-SeH enzyme. By using a fluorescent probe that specifically reacts with the SeH group, it was clarified that the SeH group was generated at C156.

selenium, NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, broccoli

講演番号：4J04-07
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

無細胞翻訳系を利用した完全長 Myb 様イネ転写因子の調製と機能解析

Full-length synthesis of Myb-like transcription factor and their characterizations based on a cell-free translation system

○黒田 隆司[1]、高荷 幸恵[1]、川岸 万紀子[2]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大院理工、[2]農研機構・生物機能部門)
○ Ryuji KURODA[1], Yukie TAKANI[1], Makiko KAWAGISHI[2], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Grad.sch,Saitama Univ, [2]NARO NIAS)

転写因子タンパク質は遺伝子発現制御の要であり，生物の成長・分化に必須な機能を有するものが多い．一方，組換え大腸菌による完全長タンパク質の調製および精製が著しく困難なケースが多く，生化学的機能解析に制約が残り，重要機能が見過ごされている可能性もある．我々は，これまでに遺伝学的解析の結果より，シロイヌナズナ Myb80 のイネオーソログ OsMyb80 が高温条件における花粉遺伝子の発現制御に深く関与していることを見出し，その生化学的機能解析を進めてきた．これまでに，コムギ胚芽抽出液（セルフリーサイエンス社）を用いて N 末端に His_6 タグ付加した完全長タンパク質 OsMyb80 の調製を試みて，可溶性の精製完全長 OsMyb80 を得ることに成功し，高温条件特異的に発現が抑制される遺伝子 *CYP703A3* の上流領域を含む DNA 断片に OsMyb80 が特異的に結合することを確認した．今回はさらにイネ特異的な MYB 転写因子 GAMYB の全長合成と精製にも成功した．同様の EMSA 解析の結果、*CYP703A3* の上流領域への GAMYB の結合を確認し，さらに OsMyb80 の結合領域との位置関係を解析している．本講演では，上記の研究結果とともに，他の転写因子の全長タンパク質の合成・精製，生化学的な機能解析の結果についても紹介したい．

Transcription factors (TFs) are crucial proteins for regulating gene expression in living species, and many of TFs are essential for growth and development. On the other hand, preparing full-length (FL) TF proteins by recombinant bacterial systems is often tricky and hinders further biochemical characterizations. We previously identified OsMYB80, a rice orthologue of Arabidopsis MYB80, as a transcription factor that regulates the expression of pollen genes in high-temperature conditions. To gain evidence that proves the function of OsMyb80 as a transcription factor in the regulation, we examined the binding ability of OsMyb80 protein to DNA fragments that include the upstream region of the genes. We synthesized an FL OsMyb80 by wheat-germ cell-free expression system and obtained purified OsMyb80 as a soluble form. Based on electrophoresis mobility shift assay (EMSA), we confirmed that the OsMyb80 binds to the upstream region of *CYP703A3*. Based on the cell-free system, we could also prepare soluble FL GAMYB, which is a rice-specific Myb-type transcription factor. Results from EMSA confirmed that GAMYB also binds to the upstream region of *CYP703A3*. We will present other examples of preparing FL TFs and some results from ongoing characterizations.

rice, transcription factor, cell-free translation system

発表責任者：戸澤　譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4J04-08
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

天然ゴム生合成マシナリーのコアサブユニットの解析

Analysis of core subunits of natural rubber biosynthetic machinery

○黒岩 風[1]、西野 輝[1]、本澤 正隆[1]、廣森 美樹[2]、モンドル 慶子[1]、山口 晴彦[3]、宮城 ゆき乃[3]、山下 哲[4]、高橋 征司[2]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大院理工、[2]東北大院工、[3]住友ゴム工業（株）、[4]金沢大理工)

○ Fu KUROIWA[1], Akira NISHINO[1], Masataka HONZAWA[1], Miki HIROMORI[2], Yasuko MANDAL[1], Haruhiko YAMAGUCHI[3], Yukino MIYAGI[3], Satoshi YAMASHITA[4], Seiji TAKAHASHI[2], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Sumitomo Rubber Industries, [4]Kanazawa Univ.)

主鎖骨格が *cis*-1,4-ポリイソプレンで構成されるパラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*) の天然ゴムは Isopentenyl pyrophosphate (IPP) の重合によって生合成される．我々は無細胞翻訳系にナノディスクを添加することで，翻訳と共役した膜タンパク質の脂質膜への再構成に成功し，HRT1 と HRBP との共発現がポリイソプレン合成活性を示すことが明らかにしてきた．従って，我々は HRT1 と HRBP の 2 つを天然ゴム合成マシナリーのコアとなる普遍的な必須サブユニットであると予想してきた．我々は今回, AlphaFold2 を用いて HRT1/HRBP ヘテロダイマーの立体構造モデルを構築した. このモデルは, HRT1 の N 末端側に両親媒性 α ヘリックスが存在し，脂質膜との相互作用に重要であることを示唆した．実際、N 末端を欠失した HRT1 変異体において脂質膜結合と酵素活性とが失われることを生化学的研究により明らかにした．また，HRT1 と HRBP との推定相互作用面が，ヒトのポリイソプレン合成酵素 DHHDS/NgBR のサブユニット会合面のアミノ酸領域に似ていることも予想され、両サブユニットが複合体形成していることを強く示唆している．本講演では，上記の研究結果とともに，現在進めている生化学的実験の結果についても紹介したい.

Natural rubber is *cis*-1,4-polyisopren, which is synthesized by polymerizing isopentenyl pyrophosphate (IPP) in para rubber tree (*Hevea brasiliensis*). We performed reconstitution of rubber-synthesis-related proteins on the nanodiscs and examined the polyisoprene synthesis activity of the protein-nanodisc complexes. We have previously clarified the reconstitution of the enzyme activity by co-expression of HRT1 and HRBP on the nanodiscs. Therefore, we have assumed that HRT1 and HRBP are essential subunits forming the core of natural rubber synthetic machinery. We built a three-dimensional structure model of HRT1/HRBP heterodimer using AlphaFold2. The model suggested that an amphipathic α-helix is present on the N-terminal side of HRT1 and is essential for its interaction with lipid membranes. We revealed that the HRT1 mutant, lacking the N-terminus, loses affinity to the lipid membrane based on the biochemical analysis. The model also predicted that amino acids of a putative binding-interface of HRT1 and HRBP resemble the binding regions of DSDDS and NgBR, human polyisoprene synthetase, suggesting that HRT1 and HRBP form a complex.

natural rubber, *Hevea brasiliensis*, *in vitro* translation

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4J04-09
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

紅藻類クビレオゴノリ由来ヘマグルチニンの分画法の改良

Improvement of the fractionation method of hemagglutinin derived from the red alga Gracilaria blodgettii

○緑川 英里香、黒須 泰行、本間 悠里、垣田 浩孝（日大院・総合基）
○Erika MIDORIKAWA, Yasuyuki KUROSU, Yuuri HONMA, Hirotaka KAKITA (NihonUniv. Graduate School of Integrated basic Sciences)

日本産の紅藻類オゴノリ科オゴノリのヘマグルチニンはすでに 4 種類が報告されている。しかし近縁種であるオゴノリ科クビレオゴノリに関してはその詳細が報告されていない。オゴノリヘマグルチニン分画法をクビレオゴノリヘマグルチニン分画法に適用できないことが問題である。そこで本研究ではクビレオゴノリのヘマグルチニンの特徴付けをする前段階として、ヘマグルチニンの分画法を改良することを目的とした。海藻は沖縄県本島西部沿岸沖で採取し、洗浄後、冷凍し、使用するまで-20 ºC で保管した。粗抽出液を Tris-HCl 緩衝液により海藻より抽出した。タンパク質含有量は Bradford 法で、糖含有量はフェノール硫酸法でそれぞれ測定した。硫酸アンモニウムによる塩析は 2 段階で行った。1 段階目の塩析は、飽和硫安濃度 20%、25%、30%、35%で行った。2 段階目の塩析は、飽和硫安濃度 70%で行った。1 段階目飽和硫安濃度 30%、2 段階目飽和硫安濃度 70%の条件が最も活性画分を得るために適していた。分画法が異なることはそれぞれの物理化学的性質が異なることを示唆している。

Four hemagglutinins derived from the red alga, *Gracilaria vermiculophylla* in Japan, have already been reported. However, the details of the hemagglutinin from that related species, *G. blodgettii*, have not been reported. The problem is that the fractionation method of *G. vermiculophylla* hemagglutinin cannot be applied to that of *G. blodgettii* hemagglutinin. Therefore, the purpose of this study was to improve the hemagglutinin fractionation method as a preliminary step to the characterization of hemagglutinins in *G. blodgettii*. Algal specimens were collected off the western coast of the main island of Okinawa, washed, froze, and stored at -20ºC until use. The crude extract was extracted from seaweed with Tris-HCl buffer. The protein and sugar contents were determined by the Bradford method and phenol - sulfuric acid method, respectively. Salting out with ammonium sulfate was performed in two steps. The first step of salting out was performed at saturated ammonium sulfate concentrations of 20%, 25%, 30% and 35%.The second step of salting out was performed at a saturated ammonium sulfate concentration of 70%. The hemagglutination activities of the first step precipitate, the second step supernatant and the second step precipitate were measured. The conditions of the first-stage saturated ammonium sulfate concentration of 30% and the second-stage saturated ammonium sulfate concentration of 70% were suitable for obtaining the most active fraction. The difference in each fractionation method suggests that the physicochemical properties of *G. vermiculophylla* hemagglutinin and *G. blodgettii* hemagglutinin may be different.

Seaweed, Hemagglutinin, Fractionation

講演番号：4J04-10
質疑応答日時、会場：3 月 18 日 10:30～ ミーティングルーム J

トマト由来ネリル二リン酸合成酵素 NDPS1 の X 線結晶構造解析

Structural insight into the neryl diphosphate synthase from tomato plant

○今泉 璃城[1]、三沢 柊人[1]、竹下 浩平[2]、坂井 直樹[2]、山口 晴彦[3]、宮城 ゆき乃[3]、片岡 邦重[1]、中山 享[4]、高橋 征司[4]、山下 哲[1]([1]金沢大・院・自然科学、[2]理研・SPring-8 センター、[3]住友ゴム工業(株)、[4]東北大・院・工)
○Riki Imaizumi[1], Syuto Misawa[1], Kohei Takeshita[2], Naoki Sakai[2], Haruhiko Yamaguchi[3], Yukino Miyagi-Inoue[3], Kunishige Kataoka[1], Toru Nakayama[4], Seiji Takahashi[4], Satoshi Yamashita[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Kanazawa Univ., [2]RIKEN, SPring-8 center, [3]Sumitomo Rubber Industries, LTD, [4]Grad. Sch. Eng. Tohoku Univ.)

イソプレノイドは，イソペンテニル二リン酸（IPP，C_5）をイソプレン単位とする化合物であり，天然に広く存在し，植物の適応代謝に関する二次代謝産物としても極めて多様である．シス型プレニルトランスフェラーゼ(cPT)は，直鎖状プレニル二リン酸をアリル性プライマー基質として用い，IPP をシス型に縮合する反応を触媒する酵素群であり，糖キャリア脂質や天然ゴムの生合成にも関与している．本研究で扱う *Solanum lycopersicum* （トマト)由来ネリル二リン酸合成酵素(NDPS1)は，ほとんどの cPT がアリル性プライマー基質として用いないジメチルアリル二リン酸(C_5)に対し，IPP を縮合することで，ネリル二リン酸(C_{10})を合成する．我々はそのユニークな基質特異性および生成物鎖長決定機構に興味を持ち，部位特異的変異導入などによってその決定因子を明らかにしてきた．本発表では，NDPS1 の 1.94 Å分解能の結晶構造について報告し，構造的特徴と触媒機構に関して議論する．特に，植物由来の一部の cPT が保持する特徴的に長い N 末端領域について，初めて電子密度を確認することができ，これまで知られていなかった複数のジスルフィド結合の形成が構造的に見出された．この N 末端領域の構造的特徴は，類似酵素でも保存されていることが示唆されたため，本領域の NDPS1 における構造・機能的意義を議論したい．

Isoprenoids are natural products consist of isopentenyl diphosphate (IPP, C_5) as the isoprene unit, and forming one of the largest groups in the secondary metabolites as well as the plant specialized metabolites for the adaptive mechanisms. *cis*-Prenyltransferases (cPT) catalyzes a condensation reaction of IPP by using all-*trans*-prenyl diphosphate as the allylic primer substrate, synthesizes sugar carrier lipids and natural rubbers. Neryl diphosphate synthase (NDPS1) from *Solanum lycopersicum* (tomato) accepts dimethylallyl diphosphate (C_5) as its allylic primer to synthesize neryl diphosphate (C_{10}), although most of other cPTs cannot accept it as a primer. Thus, we have been interested in the unique substrate specificity and the chain-length determination mechanism, and recently revealed the determination factor by a site-directed mutagenesis study.

In this presentation, we report the crystal structure of NDPS1 (1.94Å resolution) and discuss the structural detail and its catalytic mechanism.

Isoprenoid, *cis*-Prenyltransferase, Crystal structure

シンポジウムプログラム

3月16日（水）16:00〜18:30

2AS　後発酵茶：その魅力と可能性

3月16日（水）　16:00〜18:30
会　場：ミーティングルーム A
世話人：堀江 祐範（産総研健康医工学），岩橋 均（岐阜大応用生物）
座　長：堀江 祐範（産総研健康医工学），岩橋 均（岐阜大応用生物）

16:00　　はじめに……○堀江 祐範（産総研　健康医工学）
16:05　2AS-01　日本と世界の後発酵茶の製法とそこで働く微生物……○堀江 祐範（産総研　健康医工学）
16:20　2AS-02　日本の後発酵茶の機能性に関して……○内野 昌孝（東農大）
16:45　2AS-03　阿波晩茶の乳酸菌の地域性と利用について……○西岡 浩貴[1,2]（[1]徳島県工技セ，[2]岐阜大院・連合農学）
17:10　2AS-04　**Lactic acid bacteria in Miang and possibility to be used as probiotic**
……○Supatjaree Ruengsomwong
（Thailand Institute of Scientific and Technological Research（TISTR））
17:35　2AS-05　番茶のエスノグラフィ：四国における番茶の生産・流通・消費……○内藤 直樹（徳島大学）
18:00　2AS-06　新たな後発酵茶製造の試み……○岩橋 均（岐阜大学）
18:25　　おわりに……○岩橋 均（岐阜大　応用生物）

2BS　微小空間制御から見える新たな生命現象と規則

3月16日（水）　16:00〜18:30
会　場：ミーティングルーム B
世話人：竹下 典男（筑波大 MiCS），加藤 節（広島大院統合生命科学）
座　長：竹下 典男（筑波大 MiCS），加藤 節（広島大院統合生命科学）

16:00　2BS-01　時空間的な環境制御が解き明かす細菌細胞の新たな性質……○加藤 節（広島大院統合生命）
16:25　2BS-02　バクテリアの柔軟な細胞増殖形態の変化
……○塩見 大輔[1]，林 匡史[1]，近田 大基[1]，浪川 結衣[1]，高岡 ちぐさ[1]，大島 拓[2]
（[1]立教大理，[2]富山県立大工）
16:50　2BS-03　**Biofilm formation strategies: Sticking around without being stuck**
……○Andrew S. Utada（Tsukuba Univ.）
17:15　2BS-04　**Adaptive responses to chronic low-glucose environment in fission yeast**
……○Hidenori Nakaoka（Kyoto Univ.）
17:40　2BS-05　糸状菌の菌糸形態の可変性と伸長速度のトレードオフ……○竹下 典男（筑波大 MiCS）
18:05　2BS-06　狭小空間内における植物先端成長細胞の伸長制御……○佐藤 良勝（名大ITbM）

2CS 【BBB 連携シンポジウム】微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開

3 月 16 日（水） 16:00～18:30
後　援：一般財団法人バイオインダストリー協会（JBA）・新資源生物変換研究会・植物バイオ研究会
会　場：ミーティングルーム C
世話人：阪井 康能（京大農），矢崎 一史（京大生存研）
座　長：矢崎 一史（京大生存研），阪井 康能（京大農）

16:00　2CS-01　微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開：はじめに（1）炭素循環
……○阪井 康能[1]，矢崎 一史[2]（[1]京大農，[2]京大生存研）

16:10　2CS-02　微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開：はじめに（2）窒素循環
……○矢崎 一史[1]，阪井 康能[2]（[1]京大生存研，[2]京大農）

16:20　2CS-03　C1 微生物 - 植物間相互作用による炭素循環と作物増収……○由里本 博也，阪井 康能（京大農）

16:45　2CS-04　植物共生微生物による窒素循環……○南澤 究（東北大生命）

17:10　2CS-05　根から分泌されるサポニンが駆動する植物 - 根圏微生物叢相互作用
……○中安 大，矢﨑 一史，杉山 暁史（京大生存研）

17:35　2CS-06　植物 - 微生物相互作用から拡張する農業環境エンジニアリングの未来像……○市橋 泰範（理研BRC）

18:00　2CS-07　マメ科植物 - 根粒菌共生における新規共生経路の解明
……○岡崎 伸[1]，ラトゥ サフィラ[1]，下田 宜司[2]，田淵 光昭[3]，安田 美智子[1]
（[1]東京農工大・農，[2]農研機構，[3]香川大農）

本シンポジウムは，日本農芸化学会の英文誌 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry（BBB）と連携し，演者が BBB に Minireview を寄稿することで BBB に特集を組むシンポジウムです。

2DS 新・代謝制御ストラテジー

3 月 16 日（水） 16:00～18:30
後　援：東大微生物連携機構
会　場：ミーティングルーム D
世話人：千葉 洋子（理研 CSRS），亀谷 将史（東大院農，東大微生物連携機構）
座　長：千葉 洋子（理研 CSRS），亀谷 将史（東大院農，東大微生物連携機構）

16:00　はじめに……○亀谷 将史（東大院農，東大微生物連携機構）

16:10　2DS-01　機能未知代謝酵素ホモログが関与する短鎖アシル CoA 代謝調節機構
……○吉田 彩子[1,2]，西山 真[1,2]（[1]東大院農生科，[2]東大微生物連携機構）

16:35　2DS-02　メガデヒドロゲナーゼ複合体（MDC）が仕切るバクテリアの異化代謝……○田中 寛（東工大化生研）

17:00　2DS-03　酵素ミカエリスメンテン定数（K_m 値）による代謝制御
……○千葉 洋子，大岡 英史，ウィンザー マリ，常松 奈緒，中村 龍平（理研）

17:25　2DS-04　出芽酵母における代謝酵素集合体 G-body 形成を介した代謝制御とその展開
……○三浦 夏子（阪府大院・生命環境）

17:50　2DS-05　光合成 CO_2 固定酵素 RuBisCO の環境適応……○蘆田 弘樹（神戸大学）

18:15　総合討論

2ES 農芸化学若手シンポジウム：天然物化学の新時代を拓く各界の若手研究者たち ―機能性分子の創製を指向した単離・合成・機能解明―

3 月 16 日（水） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム E
世話人：斉藤 竜男（東農大生命），塚野 千尋（京大院農），増田 唯（長谷川香料（株））
座　長：斉藤 竜男（東農大生命），塚野 千尋（京大院農），増田 唯（長谷川香料（株））

16:00　はじめに……○斉藤 竜男（東農大生命）

16:05　2ES-01　香料化学における有機合成の役割
……○増田 唯，坂巻 憲佐，原口 賢治，田中 尚子，川口 賢二（長谷川香料）

16:33　2ES-02　出芽酵母の形態情報を基にした新規抗真菌剤の作用機序の解明……○一刀 かおり（東大新領域）

17:01　2ES-03　1, 4- ナフトキノン二量体天然物の全合成研究：生合成仮説に基づく合成戦略……○加茂 翔伍（星薬大）

17:29　2ES-04　イオンモビリティ質量分析を用いる生体内極微量成分の超高感度分析
……○謝 肖男（宇都宮大学・バイオ）

17:57　2ES-05　二量体型アルカロイドの収束的合成に向けた合成戦略……○植田 浩史（東北大院薬）

18:25　おわりに……○塚野 千尋（京大院農）

3月17日（木）16:00 ～ 18:30

3AS　酵母に学ぶ細胞の寿命・老化メカニズム ～制御機構・生理機能から産業利用まで～

3月17日（木） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム A
世話人：高木 博史（奈良先端大バイオ），水沼 正樹（広島大院統合生命科学）
座　長：高木 博史（奈良先端大バイオ），水沼 正樹（広島大院統合生命科学）

16:00　はじめに……○高木 博史（奈良先端大バイオ）
16:05　3AS-01　出芽酵母のリン酸飢餓応答系が関与する分裂寿命決定機構
……○向 由起夫，梅田 知晴，中島 俊雄（長浜バイオ大・バイオサイエンス）
16:33　3AS-02　出芽酵母のメチオニン代謝による細胞寿命制御と生理機能……○水沼 正樹（広島大・院統合生命）
17:01　3AS-03　出芽酵母のプロリン代謝による細胞寿命制御と生理的役割
……○西村 明，高木 博史（奈良先端大・バイオ）
17:29　3AS-04　定常期の生理応答から理解する出芽酵母の寿命維持戦略……○松浦 彰（千葉大院理）
17:57　3AS-05　分裂酵母における細胞寿命の制御基盤……○饗場 浩文（名大創薬）
18:25　おわりに……○水沼 正樹（広島大院統合生命科学）

3BS　機能性核酸の創製と生命科学応用に向けた新展開

3月17日（木） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム B
世話人：村上 一馬（京大院農），大坪 嘉行（東北大院生命科学）
座　長：村上 一馬（京大院農），大坪 嘉行（東北大院生命科学）

16:00　3BS-01　二価サブライブラリ構築による新型コロナウィルスに結合する DNA アプタマーの取得と展開
……○大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院生命）
16:25　3BS-02　DNA アプタマーセンサの可能性と展望……○堀井 克紀（NECソリューションイノベータ（株））
16:50　3BS-03　アミロイドタンパク質を認識する核酸アプタマーの創製と応用……○村上 一馬（京大院農）
17:15　3BS-04　RNA アプタマーの構造・抗プリオン活性・抗アミロイドβ活性及びヒト細胞中における核酸の in-cell NMR……○片平 正人（京大エネルギー理工学研究所）
17:40　3BS-05　核特異的コファクターによるヒト RNA エキソソーム複合体の活性および基質特異性の制御
……藤原 奈央子[1]，藤田 賢一[1,2]，瀬尾 茂人[3]，○増田 誠司[1,4]
（[1]京大生命，[2]藤田医科大総合医科学，[3]大阪大情報科学，[4]近大農）
18:05　3BS-06　**The role of extracellular vesicles in diagnostics and therapeutics for neurological diseases**
……○Andrew F. Hill（La Trobe Univ.）

3CS　ポリフェノール機能性研究の新展開：生体が備える代謝応答機構の重要性と機能発現メカニズムを考える

3月17日（木） 16:00～18:30
後　援：内外環境応答・代謝酵素研究会
会　場：ミーティングルーム C
世話人：黒木 勝久（宮崎大農），西川 美宇（富山県立大工）
座　長：黒木 勝久（宮崎大農），西川 美宇（富山県立大工）

16:00　はじめに……○黒木 勝久（宮崎大農）
16:10　3CS-01　可逆的な抱合スイッチ反応を介したポリフェノールの新たな作用制御機構
……○黒木 勝久，中野 悠，水光 正仁，榊原 陽一（宮崎大・農・応生科）
16:35　3CS-02　**Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols *via* hormesis**
……○Akira Murakami, Akari Ishisaka, Satoki Suihara, Shiho Kawaguchi, Nao Fujiwara（Univ. Hyogo）
17:05　3CS-03　ポリフェノール抱合代謝物の調製技術開発と機能発現解明への応用
……○生城 真一[1]，西川 美宇[1]，栗原 新[2]（[1]富山県大工，[2]近畿大生物理工）
17:35　3CS-04　フラボノイドの代表格ケルセチンは摂取後どのような抱合体として全身をめぐるのか？
……○田中 誠也（東京海洋大・食品）
18:05　3CS-05　生体応答によるポリフェノールの機能性変化：抱合代謝物の生理作用
……○西川 美宇，生城 真一（富山県大・工）

3DS　味覚研究が拓く食品開発イノベーション

3 月 17 日（木） 16:00～18:30
後　援：科学技術研究機構
会　場：ミーティングルーム D
世話人：朝倉 富子（東大院農），三坂 巧（東大院農），成川 真隆（京都女子大家政）
座　長：朝倉 富子（東大院農））

16:00　はじめに……○朝倉 富子（東大院農）
16:05　3DS-01　Transmembrane like channel 4 を介した新規塩味受容メカニズム……○成川 真隆（京都女子大家政）
16:25　3DS-02　電気生理学的手法を用いた新規クロライドチャネル TMC4 の分子機能解析……○笠原 洋一（東大院農）
16:50　3DS-03　新規 Cl^- チャネル TMC4 の味細胞活動電位における役割に関する数理モデル解析
……○竹内 綾子[1,2]（[1]福井大医統合生理学，[2]福井大ライフセンター）
17:15　3DS-04　味覚受容体を用いた細胞アッセイによる呈味評価とその応用……○三坂 巧（東大院農）
17:40　3DS-05　味機能ペプチド解析への合成ライブラリーの活用……○伊藤 圭祐（静岡県大食栄）
18:05　3DS-06　スーパーコンピュータによる呈味物質と受容分子の作用機序とその応用
……○益田 勝吉（サントリーグローバルイノベーションセンター（株））

3ES　イソプレノイド生合成機構解明のその先へ ～代謝工学系デザインから新規生物活性発見まで～

3 月 17 日（木） 16:00～18:30
後　援：イソプレノイド研究会
会　場：ミーティングルーム E
世話人：佐藤 努（新潟大院自然科学・農），川向 誠（島根大生物資源科学），高橋 征司（東北大院工）
座　長：佐藤 努（新潟大院自然科学・農），川向 誠（島根大生物資源科学），高橋 征司（東北大院工）

16:00　3ES-01　*trans*- ポリイソプレン合成酵素の発見とそれを用いた脂肪滴上でのポリマー合成
……○高橋 征司（東北大・院・工）
16:25　3ES-02　植物サポニン生合成に関わる新たな糖転移酵素の発見と組換え酵母でのサポニン生産
……○關 光[1,2]（[1]阪大院・工・生物工学，[2]阪大・先導的学際研究機構）
16:50　3ES-03　超天然イソプレノイド生合成の進化デザイン
……○梅野 太輔[1]，尾島 匠[2]，関 貴洋[2]，大谷 悠介[2]，河合 繁子[2]
（[1]早稲田大応化，[2]千葉大工）
17:15　3ES-04　なぜ植物は多くの specialized metabolites をつくるのか？モミラクトンが持つ幅広い生物活性の謎にせまる
……○岡田 憲典（東大農アグテック）
17:40　3ES-05　生合成経路の再構築と再設計による多様なメロテルペノイド天然物の創製研究
……○浅井 禎吾（東北大院薬）
18:05　3ES-06　龍涎香主成分アンブレインの人工生合成系構築と生物活性解析……○佐藤 努（新潟大院自然）

3FS　アグリケミカルバイオロジー：植物圏を支配する化学信号とその応用

3 月 17 日（木） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム F
世話人：松田 一彦（近大院農），杉山 暁史（京大生存圏研）
座　長：松田 一彦（近大院農），杉山 暁史（京大生存圏研）

16:00　3FS-01　メタボローム解析により同定した根圏化学信号の機能……○杉山 暁史（京大生存研）
16:25　3FS-02　植物間接防衛物質のターゲット蛋白質の再構築と応用……○松田 一彦（近大農）
16:50　3FS-03　植物耐病性に関わる植物 - 微生物相互作用分子……○小鹿 一（名大院生命農）
17:15　3FS-04　植物に含まれるポリアミン誘導体の生理活性……○浅見 忠男（東大院農）
17:40　3FS-05　フェアリー化合物 ICA が関与する新しいメチル化機構の可能性……○河岸 洋和（静大グリーン研）
18:05　3FS-06　イモチ病菌 *Pyricularia oryzae* における二次代謝産物の生産に関する研究
……○長田 裕之（理研CSRS）

3月18日（金）16:00 ～ 18:30

4AS　深掘り新技術－開発・実用化・応用展開－

3月18日（金） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム A
世話人：高野 和文（京府大院生命環境），松村 浩由（立命大生命），安達 宏昭（(株）創晶・(株）dotAqua）
座　長：高野 和文（京府大院生命環境），松村 浩由（立命大生命）

16:00　4AS-01　科学研究における新技術開発……○高野 和文（京府大生環）

16:03　4AS-02　リアルタイム電気泳動可視化装置の研究開発
……○村上 聡[1,2]，安達 宏昭[2,5]，松村 浩由[3,2]，高野 和文[4,2]，井上 豪[5,2]，森 勇介[6,2]
（[1]東工大生命理工，[2]株式会社創晶，[3]立命大生命科学，[4]京都府大生命環境，[5]阪大薬，[6]阪大工）

16:27　4AS-03　新規消毒薬 MA-T の開発……○安達 宏昭[1,2]（[1]株式会社創晶，[2]株式会社dotAqua）

16:51　4AS-04　光活性化二酸化塩素を用いた酸化反応による有用化成品の製造……○淺原 時泰（阪大院薬）

17:15　4AS-05　除菌消臭剤 MA-T の酸化制御技術を駆使したクライオ電顕用ツールの開発
……○井上 豪[1]，藤田 純三[2]，牧野 文信[3]，淺原 時泰[1]，森口 舞子[1]，熊野 翔太[1]，
安齋 樹[4]，岸川 淳一[5]，松浦 善治[6]，加藤 貴之[5]，難波 啓一[2]
（[1]阪大薬，[2]阪大生命機能，[3]日本電子YOKOGUSHI協働研究所，
[4]阪大微研，[5]阪大蛋白研，[6]阪大感染症総合教育研究拠点）

17:39　4AS-06　X 線小角散乱と計算科学を用いた統合的解析による天然変性タンパク質の動的構造と機能の理解
……○小田 隆[1]，大井 里香[2]，古寺 哲幸[3]，安藤 敏夫[3]，小沼 剛[2]，菅瀬 謙治[4]，苣口 友隆[5]，
井上 倫太郎[6]，杉山 正明[6]，石野 園子[7]，石野 良純[7]，佐藤 衛[2]
（[1]立教大理，[2]横市大生命医科，[3]金沢大・WPI NanoLSI，
[4]京大工，[5]慶應理，[6]京大複合研，[7]九大農）

18:03　4AS-07　日本電子 - リガク電子回折統合プラットフォーム XtaLAB Synergy-ED が拓くナノクリスタルの世界
……○松本 崇（株式会社リガク）

18:27　4AS-08　新技術がもたらす今後の研究展開……○松村 浩由（立命館大生命）

4BS　複合的アプローチで拓く新規フードサイエンス

3月18日（金） 16:00～18:30
共　催：日本学術会議農芸化学分科会
会　場：ミーティングルーム B
世話人：熊谷 日登美（日大生資科），裏出 令子（京大複合研）
座　長：竹中 麻子（明治大），飯嶋 益巳（東京農大），熊谷 仁（共立女大），
太田 ゆかり（群馬大），裏出 令子（京大），熊谷 日登美（日大）

16:00　はじめに……○熊谷 日登美（日大生資科）

16:03　4BS-01　フードナノバイオサイエンスで拓く食の安全の可視化……○飯嶋 益巳（東農大・応生・健康）

16:27　4BS-02　植物由来芳香族化合物を分解する酵素と微生物の解析：農業加工残渣の高付加価値化に向けて
……○大田 ゆかり（群大食健康）

16:51　4BS-03　量子ビーム小角散乱解析による食品タンパク質のナノ構造の解明……○裏出 令子（京大複合研）

17:15　4BS-04　移動現象論に基づく水溶性食物繊維への低分子の吸着挙動の解析……○熊谷 仁（共立女子大）

17:39　4BS-05　化学工学的なアプローチを用いた脂質の酸化・抗酸化メカニズム解析
……○北川 尚美，高橋 厚（東北大）

18:03　4BS-06　近赤外非侵襲イメージングのフードサイエンスへの応用
……○三輪 佳宏[1,2,3]，逆井 智貴[4]，番 奏絵[4]，木嶋 順子[3]
（[1]理研BRC，[2]筑波大LSI，[3]筑波大医，[4]筑波大人間総合）

18:27　おわりに……○裏出 令子（京大複合研）

4CS　新規酵素の探索と産業応用利用

3 月 18 日（金） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム C
世話人：尾仲 宏康（東大院農），山口 庄太郎（天野エンザイム（株）），松井 知子（ノボザイムズジャパン（株））
座　長：尾仲 宏康（東大院農），山口 庄太郎（天野エンザイム（株）），松井 知子（ノボザイムズジャパン（株））

16:00　はじめに……○尾仲 宏康（東大院農）
16:04　4CS-01　ノボザイムズにおける新規な酵素応用例と新規酵素の開発
……○倉方 悠馬（ノボザイムズジャパン株式会社）
16:28　4CS-02　花王における産業用酵素開発とその展開……○川原 彰人（花王株式会社）
17:02　4CS-03　ナガセの放線菌大量発現システム（N-STePP（R））を活用した産業用酵素の開発
……○廣瀬 修一（長瀬産業株式会社）
17:31　4CS-04　微生物由来シトクロム P450 の探索とその利用
……○阪本 剛（三菱ケミカル株式会社 Science & Innovation Center）
18:00　4CS-05　天野エンザイムにおける酵素探索と応用開発……○山口 庄太郎（天野エンザイム株式会社）
18:24　おわりに……○山口 庄太郎（天野エンザイム株式会社）

4DS　植物特化代謝産物の空間的な局在性とダイナミクス

3 月 18 日（金） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム D
世話人：棟方 涼介（京大生存研），山田 泰之（神戸薬大医薬細胞生物），肥塚 崇男（山口大院創成科学研）
座　長：棟方 涼介（京大生存研），山田 泰之（神戸薬大医薬細胞生物）

はじめに……○棟方 涼介（京大生存研）
16:05　4DS-01　植物の化学防御物質フラノクマリンの生合成・蓄積の空間的局在性……○棟方 涼介（京大生存研）
16:25　4DS-02　進化の過程で最適化された植物揮発性化合物の生成制御機構：代謝工学による人為的改変は可能か？
……○肥塚 崇男（山口大院創成）
16:50　4DS-03　１細胞オミクスが明らかにした細胞横断型アルカロイド生合成機構
……○山本 浩太郎[1,2]，高橋 勝利[3]，水野 初[4]，山崎 真巳[1]，三村 徹郎[5,6]
（[1]千葉大・院・薬，[2]マックスプランク化学生態学研究所，[3]産総研・創薬基盤研究部門，
[4]静岡県立大・薬，[5]國立成功大學・生科・科技，[6]東京大・院・農学生命）
17:15　4DS-04　薬用植物ムラサキにおける脂溶性代謝産物シコニンの細胞外分泌機構
……○巽 奏（フランス国立科学研究センター）
17:40　4DS-05　植物のオルガネラ機能の多様性 ~ 特化代謝産物を蓄積するゼニゴケ油体の形成メカニズム ~
……○金澤 建彦[1,2]（[1]基生研，[2]総研大）
18:05　4DS-06　輸送工学を用いた植物有用アルカロイドの効率的微生物生産系の開発
……○山田 泰之（神戸薬大・医薬細胞）

4ES　グライコミクスとマイクロバイオーム　～ムチンと腸内細菌のかかわり～

3 月 18 日（金） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム E
世話人：片山 高嶺（京大院生命科学）
座　長：加藤 紀彦（京大院生命科学），片山 高嶺（京大院生命科学）

16:00　4ES-01　腸内細菌によるムチン型糖鎖の分解は宿主の健康・疾患に関わる……○片山 高嶺（京大生命）
16:10　4ES-02　酵素特性から視る腸内細菌によるムチン糖鎖分解の異なる２様式……○加藤 紀彦（京大院生命）
16:45　4ES-03　Bacterial-surface protein and gut colonization……○Keita Nishiyama（Keio Univ. Sch. Med.）
17:20　4ES-04　内因性発酵基質としてのムチン糖鎖：潰瘍性大腸炎との病理学的関連
……○長谷 耕二[1]，山田 恭央[1]，日野 真吾[2]，森田 達也[2]（[1]慶大薬，[2]静大農）
17:55　4ES-05　ムチン糖鎖関連データを統合化した基盤開発：データベース化および生合成シミュレーション
……曽我部 勇，菊地 美幸，荒川 康一，○木下 フローラ聖子（創価大糖鎖研）

4FS　誰がためにつくられる：天然物が切り拓くケミカルバイオロジーとケミカルエコロジー最前線

3 月 18 日（金） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム F
世話人：臼井 健郎（筑波大生命環境），西村 慎一（東大院農）
座　長：臼井 健郎（筑波大生命環境），西村 慎一（東大院農）

16:00　4FS-01　糸状菌における複数シデロフォアの産生……○西村 慎一[1,2]（[1]東大院農，[2]東大CRIIM）
16:25　4FS-02　陸上テトロドトキシンの生合成解明を目指した有毒イモリ由来の新規化合物の探索
……○工藤 雄大[1,2]，山下 まり[2]（[1]東北大学際研，[2]東北大院農）
16:50　4FS-03　不安定なため長い時間見落とされてきた細菌ポリイン類……○甲斐 建次（阪府大院生命環境）
17:15　4FS-04　鳥類卵殻由来イノシトールリン酸の機能……○犀川 陽子（慶大理工）
17:40　4FS-05　なぜネコはマタタビに反応するのか？　その意外な生物学的機能について……○宮崎 雅雄（岩大農）
18:05　4FS-06　天然物を用いた非侵襲的薬剤投与法の開発……○南雲 陽子，向山 海凪，臼井 健郎（筑波大生命環境）

4GS　食品成分を輸送する運び屋達とその制御

3 月 18 日（金） 16:00～18:30
会　場：ミーティングルーム G
世話人：松尾 道憲（京女子大家政）、薩 秀夫（前橋工科大工）
座　長：松尾 道憲（京女子大家政）、薩 秀夫（前橋工科大工）

16:00　はじめに……○松尾 道憲（京女子大家政）
16:05　4GS-01　ABC トランスポーターによるコレステロール排出と脂溶性ビタミン排出
……○松尾 道憲（京女大家政）
16:25　4GS-02　ポリフェノールが腸管胆汁酸再吸収トランスポーターの輸送に与える影響……○小林 彰子（東大農）
16:50　4GS-03　腋臭症リスク因子 ABCC11 の機能を阻害する食品成分の探索・解析
……○豊田 優[1,2]，齋藤 弘貴[3]，平田 拓[3]，紺谷 愛美[3]，土屋 陽一[3]，高田 龍平[1]，鈴木 洋史[1]
（[1]東大病院薬剤部，[2]防衛医大分子生体制御学講座，[3]サッポロホールディングス（株））
17:15　4GS-04　シフォナキサンチンの消化管吸収における NPC1L1 の寄与……○真鍋 祐樹，菅原 達也（京大農）
17:40　4GS-05　消化管における亜鉛吸収を制御する亜鉛トランスポーター
……○橋本 彩子[1]，神戸 大朋[2]（[1]京女大・家政・食物栄養，[2]京大院・生命）
18:05　4GS-06　腸管における尿酸排出トランスポーター ABCG2 を亢進するポリフェノールの解析
……○薩 秀夫[1]，榎本 泰大[1]，堀 友稀[1]，近藤 泰嗣[1]，豊田 優[2,3]，高田 龍平[2]，鈴木 洋史[2]
（[1]前橋工大工生物工学，[2]東大病院薬剤部，[3]防衛医大分子生体制御学講座）
18:25　おわりに……○薩 秀夫（前橋工科大工）

講演番号：2AS-01
講演日時、会場：3 月 16 日 16:05～ ミーティングルーム A

日本と世界の後発酵茶の製法とそこで働く微生物

Japanese and world's Post-fermented tea: fermentation process and microorganisms

○堀江 祐範 (産総研　健康医工学)
○Masanori Horie (AIST)

後発酵茶は、製造に微生物による発酵が関与する茶で、世界では東南アジアと日本の２つの地域でつくられている。東南アジアは中国雲南省からミャンマー、タイ及びラオスの北部かけた地域で、日本では四国と富山県で伝統的につくられている。これらの地域は、いずれも山地であることが共通するが、それぞれの後発酵茶の製法は共通する部分と異なる部分とがある。本発表では、これらの後発酵茶の製造方法と発酵に関与する微生物の概要を見てゆきたい。後発酵茶の製造に関わる主要な微生物として、真菌と乳酸菌が挙げられる。中国のプーアル茶と日本の碁石茶および石鎚黒茶、バタバタ茶では主にアスペルギルス属の真菌が重要な役割を果たす。また、タイのミャンやミャンマーのラペソー、日本の碁石茶、石鎚黒茶、阿波晩茶では乳酸菌による乳酸発酵が重要である。中でも、高知県の碁石茶と愛媛県の石鎚黒茶は、真菌と乳酸菌による２段階発酵によってつくられる。このような製法はほかの後発酵茶では見られない。なぜこのような複雑な製造法となったのか、それぞれの発酵にどのような意味があるのかを、石鎚黒茶の製造工程における微生物の動きを中心に、微生物の視点から考察する。

Post-fermented tea is tea that has been fermented by microorganism. In the world, post-fermented teas have been produced at two areas: One is area of southern China, Northern Thailand, Laos, and Myanmar. And the other is Japan. In Japan, post-fermented teas are produced at Shikoku (Ehime, Tokushima and Kochi) and Toyama. The process for production of these post-fermented teas is different. Among the Japanese postfermented teas, *Aspergillus* sp. is important for fermentation in Ishizuchi-kurocha (Ehime), Goichi-cha (Kochi) and Batabata-cha (Toyama). The process of Ishizuchi-kurocha (Ehime), Goichi-cha (Kochi) and Awa-bancha (Tokushima) are including lactate fermentation. *Lactiplantibacillus plantarum* and *L. pentosus* is important as dominant species of the lactate fermentation. Interestingly, Ishizuchi-kurocha and Goishi-cha are produced by two-step fermentation. In this presentation, change of microorganisms during the process of Ishizuchi-kurocha is explained. And the process of post-fermented teas is reviewed.

post-fermented tea, Ishizuchi-kurocha, lactic acid bacteria

講演番号：2AS-02
講演日時、会場：3 月 16 日 16:20～ ミーティングルーム A

日本の後発酵茶の機能性に関して

Function of post fermented tea in Japan

○内野 昌孝（東農大）
○Masataka Uchino (Tokyo Univ. Agric.)

後発酵茶はチャノキの茶葉を微生物により発酵させて製造するお茶の総称であり、海外ではプーアル茶（中国)、ミヤン（タイなど)、ラペソー（ミャンマーなど）が有名であるが、日本で代表的なものは碁石茶（高知)、石鎚黒茶（愛媛)、バタバタ茶（富山)、阿波晩茶（徳島）の４種である。それぞれ製造する時期は初夏～夏と時期は近いものの、その製造法が異なり、自然発酵により発酵が進むため発酵に関与する微生物も異なっている。主に糸状菌、酵母、乳酸菌が単独または複合的に働き独特の風味を形成し、独特の酸味や苦み、香りなどを形成している。加えて風味に関して年度間差や製造者による違いも出ている。

複数の機関から健康機能に関する報告もある。食品の機能性は栄養（一次機能)、嗜好性（二次機能)、健康（三次機能）に分かれている。そのため、これらの３つの機能性にどのような物質が影響を与えているかを複数の報告の紹介とともに考察を深めていきたい。また、その機能が原材料による茶葉によるものか、微生物の代謝物（分泌物、変換物）なのか、菌体そのものに由来するかのなども含めて考えたい。

Post-fermented tea is a general term for tea produced by fermenting tea leaves of tea plant with microorganisms. Pu'er tea (China), Miyan (Thailand, etc.), Lahpet (Myanmar, etc.) are famous in the world. There are four types of tea: Goishi-cha (Kochi), Ishizuchikuro-cha (Ehime), Batabata-cha (Toyama), and Awaban-cha (Tokushima). Although the time of production is close to early summer to summer, the production method is different, and the microorganisms involved in fermentation are also different because fermentation proceeds by natural fermentation. Mainly filamentous fungi, yeasts, and lactic acid bacteria work alone or in combination to form a unique flavor, and form a unique acidity, bitterness, and aroma. In addition, there are differences in flavor between years and by manufacturer.

There are also reports on health function from various institutions. The functionality of food is divided into nutrition (primary function), palatability (secondary function), and health (tertiary function). Therefore, I would like to deepen my consideration of what kind of substances affect these three functions with the introduction of multiple reports. In addition, we would like to consider whether the function is due to tea leaves made from raw materials, metabolites (secretions, transformants) of microorganisms, or whether they are derived from the bacterial cells themselves.

post-fermented tea, food function, traditional fermented food

講演番号：2AS-03
講演日時、会場：3 月 16 日 16:45～ ミーティングルーム A

阿波晩茶の乳酸菌の地域性と利用について

Regional characteristics and utilization of lactic acid bacteria in Awa-bancha

○西岡 浩貴 [1,2] ([1] 徳島県工技セ、[2] 岐阜大院・連合農学)
○Hiroki NISHIOKA[1,2] ([1]Tokushima Prefectural Industrial Technology Center, [2]United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ.)

乳酸菌は様々な環境に生息しており、生息源や生息地域ごとに独自の特徴を持つ菌株が存在していることが考えられる。乳酸菌の生息源の一つとして，後発酵茶の阿波晩茶がある。阿波晩茶は徳島県の那賀町と上勝町を中心につくられる他、近年は西部の三好市でもつくられている。乳酸菌を中心とした嫌気発酵により茶葉成分が変化し、特に乳酸等の有機酸が生成することにより、酸味のある独特の風味を有する。阿波晩茶の風味は生産者により差異があることが知られているが、この要因の一つとして、発酵に関与する乳酸菌の特性がそれぞれで異なる可能性が考えられる。また、阿波晩茶の乳酸菌にヒトに有益な効果を持つ菌株が確認されれば、地域の乳酸菌として利用できる可能性を秘めている。これまで演者は、那賀町、上勝町、三好市でつくられる阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉から乳酸菌を分離し、遺伝子解析により同定を行ってきた。また、阿波晩茶の乳酸菌について人工消化液耐性等の様々な特性を評価してきた。本シンポジウムでは、阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の地域性と地域資源としての利用について考察したい。

Lactic acid bacteria live in a variety of environments, and it is likely that each habitat source and habitat region has its own strains with unique characteristics. One of the habitat sources of lactic acid bacteria is the post-fermented tea, Awa-bancha. Awa-bancha is produced mainly in Naka and Kamikatsu, in the Tokushima Prefecture of Japan, and recently also in Miyoshi, in the western part of Tokushima. The anaerobic fermentation of Awa-bancha, mainly by lactic acid bacteria, changes the components of the tea leaves to produce organic acids like lactic acid, which gives it a unique sour flavor. The flavor of Awa-bancha is well-known to be unique to each producer, and one of its contributing factors is possibly the characteristics of fermenting lactic acid bacteria differing from one producer to another. In addition, if the lactic acid bacteria from Awa-bancha are also found to be beneficial for humans, it may be potentially useful. Therefore, in this symposium, I would like to discuss the regional characteristics of lactic acid bacteria involved in the fermentation of Awa-bancha and how we can use them as a regional resource.

Lactic acid bacteria, Awa-bancha, Post-fermented tea

講演番号：2AS-04
講演日時、会場：3 月 16 日 17:10～ ミーティングルーム A

Lactic acid bacteria in Miang and possibility to be used as probiotic

○ Supatjaree Ruengsomwong (Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR))

Fifty two samples of miang were collected from three provinces in the northern part of Thailand and used for isolating Lactic acid bacteria. A total of 1,181 purified isolates were obtained and identified using MALDI-TOF MS. The most abundance found in miang samples was *Lactobacillus pentosus* (889 isolates), followed by *L. plantarum* (136 isolates), *L. brevis* (59 isolates), *L. suebicus* (39 isolates), *L. pantheris* (25 isolates), *L. collinoides* (21 isolates), *L. acidifarinae* (4 isolates), *L. paracasei* (3 isolates), *L. vaccinostercus* (3 isolates), *L. parabuchneri* (2 isolates), respectively. Then, 187 randomly selected isolates were firstly screened for antibiotic susceptibility according to EFSA, 2012. Of 187 isolates tested, 103 isolates showed resistance to clindamycin indicating a risk of antibiotic resistance gene transfer. Hence only 84 isolates were further determined for antimicrobial activity against certain pathogens. Thirty-one isolates exhibited inhibition zones with different sizes to *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Salmonella* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *Listeria monocytogenes, Propionibacterium acnes* and *Streptococcus mutans*. It should be noted that all 31 isolates were non-hemolytic and well tolerated to simulated gastric juice pH 3 and simulated intestinal juices pH 8. These 31 isolates belong to 6 species including *L. pentosus* (21 isolates), *L. pantheris* (4 isolates), *L. plantarum* (2 isolates), *L. paracasei* (2 isolates), *L. collinoides* (1 isolate) and *L. brevis* (1 isolate). To be able to be registered as probiotic for human food, these lactic acid bacteria will be further characterized, especially in safety aspect.

Miang, Lactic acid bacteria, Probiotic

講演番号：2AS-05
講演日時、会場：3 月 16 日 17:35～ ミーティングルーム A

番茶のエスノグラフィ：四国における番茶の生産・流通・消費

An ethnography of local tea (bancha) production, distribution and consumption in Shikoku, Japan

○内藤 直樹（徳島大学）
○Naoki Naito (Tokushima Univ.)

本発表における問いは「なぜ四国は、多様な番茶とりわけ後発酵茶生産の中心なのか？」である。四国は「国内でも茶の製法のもっとも多彩なところであり、地方茶の中心地（大石 2004:68）」である。とくに後発酵茶のほとんどは四国に分布する。後発酵茶の製法は中国南部～東南アジアと酷似しているため、四国の番茶生産についての理解を深めることは、日本～東南アジアにおける茶生産の関係解明に欠かせない。東アジア～東南アジア地域の茶利用は、「飲むもの」と「食べるもの（食材にする・そのまま食べる）」に大別できる。「庶民が日常的に利用する茶」である番茶は、食事と同一視されたり、茶粥にされるなど「食べるお茶」としての性格を有している。だが番茶文化は「飲むお茶」である煎茶の普及により消滅の危機にある。同時に健康食やエキゾチックな嗜好品としての新たな価値づけもおこなわれている。発表者は、四国における番茶生産の規定要因は、①東西に走る中央構造線等の地質的条件、②近世の焼畑農耕や山地利用の特徴、③外部への商品流通であるという仮説をたてている。本発表では、この仮説をもとに、フィールドワークと文献調査にもとづき四国４県全域における番茶生産を網羅的に把握し、類型化する。

The research question is: "Why is Shikoku the center of various *bancha*, especially post-fermented tea production?　Shikoku is "the center of local tea production in Japan (Oishi 2004:68). Most of the post-fermented teas are distributed in Shikoku. Since the production process of post-fermented tea is like that of Southeast Asia, understanding bancha production in Shikoku is essential to elucidate the historical relationship between tea production in Japan and Southeast Asia. The use of tea in East and Southeast Asia can be divided into two categories: drinking tea and eating tea. Bancha, which is "tea used by the local people on a daily basis" has been regarded as "tea to be eaten". However, bancha culture is at risk of disappearing due to the spread of *sencha,* a drinkable tea. At the same time, new values are being placed on bancha as a healthy food and an exotic delicacy. The author hypothesizes that the determinants of bancha production in Shikoku are (1) geological conditions, (2) characteristics of slash-and-burn agriculture and mountain land use in the early modern period, and (3) the distribution of commodities to the outside. Based on these hypotheses, this paper presents a comprehensive understanding and typology of bancha production in all four prefectures in Shikoku based on fieldwork and literature review.

Cultural Anthropology, Landscape, Entanglement

講演番号：2AS-06
講演日時、会場：3 月 16 日 18:00～ ミーティングルーム A

新たな後発酵茶製造の試み

Manufacturing of new type of brewing tea

○岩橋 均 (岐阜大学)
○Hitoshi Iwahashi (Gifu University)

茶は，発酵度合いの違いによって，不発酵茶，半発酵茶，発酵茶，後発酵茶の大きく 4 種に分類される。半発酵茶(ウーロン茶)および発酵茶(紅茶)における発酵は，茶に含まれる酵素反応によるもので，微生物の作用を介さないため，いわゆる発酵ではない。一方，後発酵茶では，微生物の働きによって発酵・熟成が行われる。この茶は特有の風味を呈す。日本には 4 種類の後発酵茶があり徳島県では阿波晩茶，高知県では碁石茶，愛媛県では石鎚黒茶，富山県ではバタバタ茶が生産されている。これらの一部は，*Lactiplantibacillus* 属を中心とする乳酸菌の発酵が関与している。また、これら乳酸菌はプランタリシンと呼ばれる抗菌物質を生産する遺伝子を保持している。

一方、岐阜県揖斐川町では農薬を使わない茶葉の生産が行われている。もっぱら一番茶が出荷され煎茶に適さない番茶の多くが廃棄されており，番茶の利用法が模索されていた。そこで，岐阜県揖斐川町オリジナルな後発酵茶 (乳酸菌発酵茶) の創製を目指すことにした。揖斐川町の茶畑の野草から，プランタリシン遺伝子を持つ *Lactiplantibacillus plantarum* S13-02 株が分離できた。S13-02 株は，バクテリオシンに分類される細菌の増殖阻害物質生産遺伝子プランタリシン *plnA* および *plnEF* を保持していた。本乳酸菌を用いて番茶を発酵させたところ 4 日間で充分な量の乳酸を生産した。さらに NGS 解析と 16SrRNA 遺伝子の相対量比較を行ったところ，S13-02 株を添加した群では *L. plantarum* が優占種となり，危惧される程度の雑菌汚染は観察されなかった。岐阜県揖斐川町上ヶ流地区オリジナルな後発酵茶として生産が期待される。

Four types of brewing tea are known in Japan: Awa-bancha, Goishi-cha, Ishizuchi-kurocha, and Batabata-cha in Tokushima, Kochi, Ehime, and Toyama prefectures, respectively. Brewing teas are produced by fermentation using lactic acid bacteria that belong mainly to the genus *Lactiplantibacillus*. On the other hand, in Kamigare district of Ibigawa Town, Gifu Prefecture, tea is cultivated using organic methods, although the first harvest tea shipment is limited and coarse tea leaves are discarded. Therefore, we isolated lactic acid bacteria from the same area and aimed at creating a novel brewing tea in the Kamigare district using coarse tea leaves. It is expected to be produced as an original brewing tea in the Kamigare district of Ibigawa Town, Gifu Prefecture.

Brewing tea, Lactic acid bacteria, Fermentation

講演番号：2BS-01
講演日時、会場：3 月 16 日 16:00～ ミーティングルーム B

時空間的な環境制御が解き明かす細菌細胞の新たな性質

Spatial and temporal control of bacterial culture environments in microfluidic devices

○加藤 節（広島大院統合生命）
○Setsu Kato (Hiroshima Univ.)

同一な遺伝情報を持つ細胞集団であっても、個々の細胞が異なる表現型を示すことはよく知られている。集団としての挙動を「すべての細胞挙動の平均値」として捉えることが重要であるのはもちろんだが、平均化により隠されてしまうような挙動を示す少数の細胞の特性を知ることもまた、微生物の性質を理解し制御するためには必要である。集団中の個細胞の挙動を解析するためには 1 細胞レベルでの観察が必須である。細胞密度に依存せず培養環境を一定に制御できること、また培養液の組成を時間的・空間的に制御できることから、1 細胞レベルでの観察、特に経時的な観察を行う場合にはマイクロ流体デバイスを用いた培養が有効である。近年はマイクロ流体デバイスを用いた細菌細胞の培養と 1 細胞定量解析を組み合わせた研究が盛んに行われており、その成果として集団レベルでの解析では明らかにできなかった細菌の新たな性質・生命規則が多く報告されてきている。本講演ではマイクロ流体デバイスの基本的な特性から、細菌研究分野における研究課題・目的に合わせた多様なデバイスデザインを、細胞増殖、走化性、ストレス応答といったキーワードに関連した講演者の研究成果を含めた実例とともに紹介する。また、デバイスの短所も考慮しながらこのような培養デバイスが私たちの研究の発展にどう貢献しうるかを議論したい。

It is well known that individual cells display phenotypic diversity even if they are originated from a clonal population. Single cell observation and quantitative analysis have an advantage to identify such diversity in the population. However, tracking single cells' behavior over time is often challenging because cell growth and cellular activities affect the culture environments in an undesirable way. Use of microfluidic devices is suitable to overcome the problem because they can keep the culture environments stable over time with continuous flow of the culture medium. The device also enables the spatial and temporal control of the environments to observe bacterial response to the changing environments. In this talk, the characteristics of the microfluidic device, and a variety of the device design will be introduced and discussed.

Microfluidic devices, Single cell analysis, Bacteria

講演番号：2BS-02
講演日時、会場：3 月 16 日 16:25～ ミーティングルーム B

バクテリアの柔軟な細胞増殖形態の変化

Flexible changes of cell proliferation modes in bacterial cells

○塩見 大輔[1]、林 匡史[1]、近田 大基[1]、浪川 結衣[1]、高岡 ちぐさ[1]、大島 拓[2]([1]立教大理、[2]富山県立大工)
○Daisuke Shiomi[1], Masafumi Hayashi[1], Taiki Chikada[1], Yui Namikawa[1], Chigusa Takaoka[1], Taku Oshima[2] ([1]Rikkyo Univ., [2]Toyama Pref. Univ.)

多くの細菌は細胞壁に覆われており、ペニシリンなどの抗生物質により細胞壁合成が阻害されると溶菌する。しかし、細菌集団の一部は、細胞壁が無くても増殖可能になり生存する。このような状態のバクテリアを L-form という。L-form は細胞壁合成を再開し、元の細菌に戻ることができる。L-form の増殖は通常の細菌の様に FtsZ によって制御されておらず、原始的な細胞の増殖モデルとして捉えられている。我々は、大腸菌をモデルに、L-form への変換機構と L-form からの回復機構を明らかにしたい。とくに、これらの変換過程をリアルタイムで観察することにより、理解したい。寒天培地上では 1,000 から 10,000 細胞に 1 つ程度の細胞が L-form に変換するが、顕微鏡下で観察するためには非常に効率が悪い。我々は、液体培地灌流装置を用い、ペニシリン存在下で 10 細胞に 1 つ程度の細胞が効率良く L-form に変換し、ペニシリン除去により、これらの細胞が元の細胞に戻る実験系を構築した。本シンポジウムでは、マイクロ流体デバイスを用いて我々が明らかにしてきた L-form の増殖機構について紹介する。

Many bacteria are surrounded by a cell wall. When cell wall synthesis is inhibited by antibiotics such as penicillin, bacteria lyse. However, a portion of the bacterial population is able to grow and survive without cell wall. Such bacteria are called L-form, which can resume cell wall synthesis and return to the original walled state. Division of L-form is not regulated by FtsZ as in walled bacteria, and it can be regarded as a model of primitive cell proliferation. Using *E. coli* as a model, we would like to clarify the conversion mechanism to L-form and the recovery mechanism from L-form by observing them in real time. On agar pad, about one cell in every 1,000 to 10,000 cells converts to L-form, but this is very inefficient for observation under a microscope. Using a liquid medium perfusion system, we built an experimental system in which about one in ten cells efficiently converts to L-form in the presence of penicillin, and these cells return to walled state when penicillin is removed. In this symposium, I will discuss the growth mechanism of L-form that we have clarified using microfluidic devices.

peptidoglycan, L-form, FtsZ

講演番号：2BS-03
講演日時、会場：3 月 16 日 16:50～ ミーティングルーム B

Biofilm formation strategies: Sticking around without being stuck

○Andrew S. Utada (Tsukuba Univ.)

Bacteria exist either freely or as members of surface-adhered 3D communities, encased in a slimy extracellular matrix; these aggregates are actually social groups called biofilms. The biofilm lifestyle is fundamental to bacteria biology and ecology, but in many instances the drivers of biofilm formation are unclear. Thus developing tools to aid in the analysis of biofilm formation may enable control and, ultimately, suppression on unwanted surfaces. We describe the development of different biofilms under different environmental conditions that are controlled using microfluidics. We discuss the role of adhesion and compare different strategies of environmental bacteria in their different biofilm formation strategies.

biofilm, interface, order

講演番号：2BS-04
講演日時、会場：3 月 16 日 17:15～ ミーティングルーム B

Adaptive responses to chronic low-glucose environment in fission yeast

○Hidenori Nakaoka (Kyoto Univ.)

Natural environments can often be tough for living organisms. Understanding adaptive responses towards environmental stressors, therefore, are one of the most important goals in biology. Although a number of studies have revealed key stress responsive genes and molecular mechanisms that ensure cellular survival, most of our knowledge comes from cellular responses towards acute and severe stress. In contrast, we know little about physiology of the cells exposed to mild and chronic environmental stress, which would be more realistic situation in wild life.

To investigate how cells adapt to chronic low-nutrition environments, we have developed a microfluidic device combined with a perfusion system that allows us to keep external environments and cell density constant. Long-term live imaging of fission yeast cells cultured in low-glucose medium (= carbon-limited environment) revealed that the cells needed at least several days to reach a steady state (of some measured parameters) in the new environment. During the course of the long adaptation, cells showed extensive accumulation of model fluorescent proteins and increase in dry mass density. Interestingly, protein aggregation, one of the hallmark events in acute-starved cytoplasm, is suppressed in the low-glucose adapted cells. We also found that cytoplasmic fluidity was maintained in the low-glucose adapted cells, which is in stark contrast against acute-starved cells whose cytoplasm is known to undergo immediate “freezing”. We would like to discuss how these physiological changes contribute to cellular survival under the poor nutrition conditions.

environmental stress, adaptation, fission yeast

講演番号：2BS-05
講演日時、会場：3 月 16 日 17:40～ ミーティングルーム B

糸状菌の菌糸形態の可変性と伸長速度のトレードオフ

Trade-off between Plasticity and Velocity in Mycelial Growth

○竹下 典男（筑波大 MiCS）
○Norio Takeshita (Tsukuba Univ.)

糸状菌（カビ）は菌糸と呼ばれる管状の細胞から成り、宿主細胞などの基質に、菌糸の先端を侵入させて生長・分岐し、バイオマスの分解や動植物への寄生・共生、発酵などに関わります。その際、自身の直径よりも狭い空間に入るには、その形態を変化させる必要があります。しかしこれまで、数 μm という小さな菌糸細胞の可変性（あるいは柔軟性）を解析することは困難でした。
本研究では、菌糸直径より細い、幅 1 μm の流路を持つマイクロ流体デバイスを作製し、そこに菌糸を生育させて菌糸細胞の可変性を解析しました。顕微鏡によるライブイメージング解析の結果、糸状菌の中には、細い流路を通過して生長を続けるものと、そうではないものがあることが分かりました。そこで、異なる系統の 7 種の糸状菌について、同様の解析を行ったところ、細い流路を通過できるかどうかは、菌糸幅や系統分類上の近さではなく、菌糸の生長速度と相関があることを発見しました。つまり、生長の遅い菌糸は、可変性が高く細胞の形を変えて流路を通過できるのに対して、生長の速い菌糸は、細胞の膨圧が高いために可変性が低く、細い流路を通過しにくくなります。このことは、生長が速いと、新たな栄養源や空間を素早く占領できる一方、微小空間への侵入が難しくなるという、細胞形態の可変性と生長速度の間のトレードオフ関係を示唆しています。

Fungi are a vital part of nature’s recycling system of decay and decomposition. Filamentous fungi spread over and penetrate surfaces by extending fine threads known as hyphae. Fungi that cause disease within living organisms can penetrate the spaces between tightly connected plant or animal cells, but how their hyphae do this, and why the hyphae of other fungal species do not, has been unclear. We compared seven fungi from different taxonomic groups, including some that cause disease in plants. We tested how the fungi responded when presented with an obstruction that meant they had to pass through very narrow channels. At only 1 micron wide, the channels were narrower than the diameter of fungal hyphae, typically 2–5 microns in different species. Some species grew readily through the narrow channels, maintaining similar growth rates before meeting the channel, while extending through it, and after emerging. In contrast, other species were seriously impeded. The hyphae either stopped growing or grew very slowly through the channel. After emerging, the hyphae sometimes developed a swollen tip and became depolarized so that they did not maintain their previous direction of growth. Species with faster growth rates and higher pressure within the cell were more prone to disruption.

Fungi, microfluidic, imaging

講演番号：2BS-06
講演日時、会場：3 月 16 日 18:05～ ミーティングルーム B

狭小空間内における植物先端成長細胞の伸長制御

Analysis of apical growth regulation in a narrow space in plants

○佐藤 良勝（名大 ITbM）
○YOSHIKATSU SATO (ITbM, Nagoya Univ.)

細胞が伸長する様式には細胞先端のごく一部のみが伸長する伸長様式があり、このような伸長をする細胞を先端成長細胞と呼ぶ。植物では被子植物の花粉管、根毛などが典型的な例である。これらの細胞は組織内部あるいは土壌中で自身の細胞サイズよりも小さな隙間に遭遇するが、狭小空間に対してどのように振る舞うのかは知られてこなかった。そこで我々はマイクロ流体デバイスを用いて、人工的な狭小空間を用いて先端成長細胞の応答を解析している。マイクロ流体デバイスは、無色透明のポリマーであり生体適合性もあるため、スライドガラスとカバーガラスに縛られない自由自在なプレパレーションとして注目されている。本発表では、花粉管、根毛に加えて、コケ植物原糸体の応答について紹介したい。

The tip-growing cell, in which only a small part of the cell is elongated, is commonly found in land plants. Pollen tubes and root hairs in angiosperms are typical examples of tip-growing cells. These cells are thought to encounter gaps smaller than their own cell size inside tissues or in soil, but how they behave in such narrow spaces has not been elucidated. Therefore, we are using microfluidic devices to analyze the response of tip-growing cells in artificial narrow spaces. Since microfluidic devices are colorless polymers and biocompatible, they are attracting attention as flexible preparations that are not limited by glass slides and cover glasses. In this presentation, we would like to introduce the response against the narrow space including the moss protonemata as well as pollen tubes and root hairs.

Tip growth, Microfluidic device, Fluorescent imaging

講演番号：2CS-01
講演日時、会場：3 月 16 日 16:00～ ミーティングルーム C

微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開： はじめに（1）炭素循環

New aspect of global material cycles driven by plant-microbe interaction : (1) Introduction to carbon circulation

○阪井 康能[1]、矢崎 一史[2] ([1]京大 農、[2]京大 生存圏)
○Yasuyoshi SAKAI[1], Kazufumi YAZAKI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Ress. Inst. Sustain. Humanosphere, Kyoto Univ.)

地球規模での炭素や窒素などの物質循環は、植物、微生物、動物の相互作用によって駆動され、生態系や地球環境の維持において極めて重要な役割を果たしている。SDGs 達成や脱炭素・資源循環型社会の実現のためには、このような物質循環における個々の生物や生物間相互作用が果たす役割を解明し、これを高度に活用する必要がある。

本シンポジウムは、微生物と植物およびその相互作用が駆動する物質循環について、特に炭素と窒素の循環に焦点を当て、最新の研究成果や国際動向を紹介する。植物の地上部表面（葉圏）や地下部（根圏）には多様な微生物が棲息しており、植物と微生物との生物間相互作用は、温室効果ガスであるメタン-CO_2 間の地球規模での炭素循環（メタンサイクル）や、植物の栄養源として不可欠な窒素の循環において生成・消失する温室効果ガス N_2O（一酸化二窒素）が重要な役割を果たしている。本シンポジウムでは、最近の研究成果から明らかとなってきた新しい物質循環像を提示するとともに、資源環境問題の解決や農業への展開も含めた今後の展望について議論し、微生物や植物を用いて循環的に物質生産を行うバイオエコノミーの推進のためのコミュニティ形成の一助としたい。
なお、本シンポジウムは、一般財団法人バイオインダストリー協会（JBA）新資源生物変換研究会・植物バイオ研究会との共催、BBB 連携シンポジウムとして開催する。

Global carbon- and nitrogen- circulations are driven by all organisms and human social activities, and also by their interactions. They influence much on maintenance of ecosystem and global environment. This symposium focuses on these circulation systems driven by microbes, plants, and their interactions, and try to display new images of such global material cycles. Understanding of these mechanisms will facilitate innovations of new technologies for food production and mitigation of greenhouse gases.

carbon circulation, nitrogen circulation, plant-microbe interaction

講演番号：2CS-02
講演日時、会場：3 月 16 日 16:10～ ミーティングルーム C

微生物と植物が駆動する新しい物質循環像とバイオ分野への展開：はじめに（2） 窒素循環

New aspect of global material cycles driven by plant-microbe interaction : (2) Introduction to nitrogen circulation

○矢崎 一史[1]、阪井 康能[2]（[1]京大生存研、[2]京大農）
○Kazufumi Yazaki[1], Yasuyoshi Sakai[2] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

地球規模での炭素や窒素などの物質循環は、植物、微生物、動物の相互作用によって駆動され、生態系や地球環境の維持において極めて重要な役割を果たしている。SDGs 達成や脱炭素・資源循環型社会の実現のためには、このような物質循環における個々の生物や生物間相互作用が果たす役割を解明し、これを高度に活用する必要がある。

本シンポジウムは、微生物と植物およびその相互作用が駆動する物質循環について、特に炭素と窒素の循環に焦点を当て、最新の研究成果や国際動向を紹介する。植物の地上部表面（葉圏）や地下部（根圏）には多様な微生物が棲息しており、植物と微生物との生物間相互作用は、温室効果ガスであるメタン-CO_2 間の地球規模での炭素循環（メタンサイクル）や、植物の栄養源として不可欠な窒素の循環において生成・消失する温室効果ガス N_2O（一酸化二窒素）が重要な役割を果たしている。本シンポジウムでは、最近の研究成果から明らかとなってきた新しい物質循環像を提示するとともに、資源環境問題の解決や農業への展開も含めた今後の展望について議論し、微生物や植物を用いて循環的に物質生産を行うバイオエコノミーの推進のためのコミュニティ形成の一助としたい。

なお、本シンポジウムは、一般財団法人バイオインダストリー協会（JBA）新資源生物変換研究会・植物バイオ研究会との共催、BBB 連携シンポジウムとして開催する。

Global carbon- and nitrogen- circulations are driven by all organisms and human social activities, and also by their interactions. They influence much on maintenance of ecosystem and global environment. This symposium focuses on these circulation systems driven by microbes, plants, and their interactions, and try to display new images of such global material cycles. Understanding of these mechanisms will facilitate innovations of new technologies for food production and mitigation of greenhouse gases.

carbon circulation, nitrogen circulation, plant-microbe interaction

講演番号：2CS-03
講演日時、会場：3 月 16 日 16:20～ ミーティングルーム C

C1 微生物-植物間相互作用による炭素循環と作物増収
Carbon cycle mediated by the interaction between C1-microorganisms and plants, and its application to improvement of crop yield
○由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

メタンやメタノールなどの C1 化合物を炭素源として利用できる微生物（C1 微生物）は自然界に広く棲息し、CO_2 を固定する植物とともに地球上の大規模な炭素循環を担っている。C1 微生物の中でも *Methylobacterium* 属に代表されるメタノール資化性細菌（Pink-pigmented facultative methylotroph; PPFM）は、植物葉面微生物の 10-20%をも占める優占種である。PPFM は植物細胞壁成分であるペクチンに由来するメタノールを葉面での生存のための主要な炭素源としながら、植物ホルモンやその他の化合物を合成して植物生長促進効果をもたらす相利共生系を構成し、植物光合成・炭素固定能に多大な影響を与えている。C1 微生物と植物との相互作用メカニズムについては未解明な点が多く残されており、共生原理の解明とその高度活用による温室効果ガス排出削減技術や作物増収技術の開発が進められている。本シンポジウムでは、我々が行ってきた C1 微生物の葉面での生存戦略や PPFM 葉面散布による酒造好適米の増収技術に関する研究成果を紹介し、植物が生産する C1 化合物の固定と植物による CO_2 固定に影響を及ぼす C1 微生物–植物間相互作用による新しい炭素循環像について議論したい。

C_1-microorganisms which can utilize one-carbon (C_1) compounds, such as methane and methanol, are ubiquitous in nature and contribute to the global carbon cycle together with plants. Among C_1-microorganisms, pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) are dominant colonizers of the phyllosphere. They utilize methanol originated from plant cell wall pectin and have the ability to promote plant growth. In this symposium, we will introduce our recent studies on survival strategy of C_1-microorganisms in the phyllosphere and improvement of crop yield by foliar spraying of PPFM, and discuss new perspective of carbon cycle mediated by the interaction between C_1-microorganisms and plants.

methylotroph, methanol, plant-microbe interaction

講演番号：2CS-04
講演日時、会場：3 月 16 日 16:45～ ミーティングルーム C

植物共生微生物による窒素循環
Biogeochemical cycling of nitrogen by plant-associated microbes
○南澤 究（東北大生命）
○Kiwamu Minamisawa (Tohoku Univ.)

20 世紀初頭の実用化された Harbor-Bosh 法による化学的窒素固定は世界の食料生産を増やし、世界の人口増加を支えたが、同時に反応性窒素の大気・土壌・水系への放出などの地球環境の悪化を起こしてきた。温室効果ガスである一酸化二窒素(N_2O)は、主に窒素肥料の農業利用から排出され地球温暖化の原因となっている。一部の根粒菌には N_2O 還元酵素も含む脱窒酵素系があり、それを利用することにより、マメ科作物根圏からの N20 発生を制御することが可能である。また、Type II 型のメタン酸化細菌は水稲根のエンドファイトであり、メタンをエネルギー源として窒素固定を行っている。このように植物共生微生物と土壌微生物は窒素循環に深く関わるが、古典的な窒素固定・硝化・脱窒という概念のみでは捉えきれない無機窒素の形態変化が土壌植物系では起っている。上記の演者らの根粒菌とメタン酸化窒素菌の研究を紹介し、微生物による窒素循環制御と地球環境問題の解決の方向性について考えてみたい。

Chemical nitrogen fixation by the Harbor-Bosh method, which was put into practical use in the early 20th century, increased the world's food production and supported the world's population growth, but at the same time, released reactive nitrogen into the atmosphere, soil, and water systems of the earth. Nitrous oxide (N_2O), a greenhouse gas, is mainly emitted from agricultural use of nitrogen fertilizer and is a cause of global warming. Some rhizobia have a denitrifying enzyme system including N_2O reductase, and by using this, it is possible to control the generation of N_2O from the rhizosphere of legumes. Type II methane-oxidizing bacteria are endophytes in paddy rice roots and fix N_2 using methane as an energy source. Plant-associated microorganisms are deeply involved in the nitrogen cycle as soil microbes, but the microbial transformation processes of inorganic nitrogen cannot be fully understood only by the classical concepts of nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in plant and soil systems. I would like to introduce our research of rhizobia and methane oxidation, and discuss about the direction of nitrogen cycle control by microorganisms and the solution of global environmental issues.

Bradyrhizobium, nitrous oxide, methanotroph

講演番号：2CS-05
講演日時、会場：3 月 16 日 17:10～ ミーティングルーム C

根から分泌されるサポニンが駆動する植物-根圏微生物叢相互作用

Saponins secreted from roots drive the interaction between plant and rhizosphere microbiota

○中安 大、矢﨑 一史、杉山 暁史（京大生存研）
○Masaru Nakayasu, Kazufumi Yazaki, Akifumi Sugiyama (RISH, Kyoto Univ.)

植物の根や根近傍の根圏領域には微生物の集団（微生物叢）が存在する。植物の根から分泌される代謝物は根圏微生物の栄養源やシグナル分子としてはたらき、根圏微生物叢は植物の生長や防御に影響を与える。近年、根圏微生物叢形成に関わる植物特化代謝物（二次代謝産物）が複数報告されている。植物特化代謝物の 1 グループであるサポニンはトリテルペノイドあるいはステロイド骨格に糖が結合した天然の界面活性物質である。私たちはトマトとダイズがそれぞれの根からトマチン、ソヤサポニンを分泌し、根圏細菌叢を変化させ、特にスフィンゴモナス科細菌を増加させることを明らかにした。続いて、複数のサポニン標品添加土壌の比較により、サポニンの化学構造の違いが細菌叢形成に異なる影響を与えることを見出した。スフィンゴモナス科について、ステロイド型はスフィンゴビウム属を、オレアナン型はノボスフィンゴビウム属をそれぞれ増加させた。また、トマト根圏から単離したスフィンゴビウム属はステロイド型を特異的に分解したことから、根圏微生物のサポニン分解能が菌叢形成に寄与することが示唆された。植物特化代謝物を介した植物−根圏微生物叢相互作用の知見は、各作物に適した微生物資材の選択を可能にし、持続可能な農業の発展につながると考えられる。

Plants harbor a population of microbes called microbiota in the rhizosphere. Metabolites secreted from roots serve as nutrients and signals for rhizosphere microbes, and rhizosphere microbiota plays important roles in plant growth and health. Recently, several plant specialized metabolites (PSMs) have been reported to be involved in rhizosphere microbiota formation. Saponins are a group of PSMs composed of a triterpenoid or steroid skeleton bound to saccharides. We demonstrated that tomato and soybean secrete tomatine and soyasaponin from their roots, respectively and that these saponins modulate the bacterial communities in the rhizosphere and increase Sphingomonadaceae. We also found that steroid- and oleanane-type saponins specifically enriched *Sphingobium* and *Novosphingobium*, respectively. *Sphingobium* isolated from tomato rhizosphere specifically degraded steroid-type saponins, suggesting that saponin metabolism by microbes contributes to microbiota formation. The findings of the plant-rhizosphere microbiota interaction driven by PSMs can select suitable agricultural inoculants for crop production, leading to the development of sustainable agriculture.

saponin, rhizosphere, microbiota

講演番号：2CS-06
講演日時、会場：3 月 16 日 17:35～ ミーティングルーム C

植物-微生物相互作用から拡張する農業環境エンジニアリングの未来像
Future vision of agroecosystem engineering extended from plant-microbe interaction

○市橋 泰範（理研 BRC）
○Yasunori Ichihashi (RIKEN BRC)

植物は多様な微生物を体内外に保持している。この植物と微生物群集の集合体である植物ホロビオントの振る舞いを農業生態系の文脈において理解することは、生態系機能を活用した環境負荷の少ない農業生産システムの確立に必要である。私たちは農業現場でのマルチオミクス解析により植物ホロビオントとそれを取り巻く土壌環境を包含した農業生態系のデジタル化を試みた。その結果、農業生態系は作物が示す収量や品質などの特定の形質と特定の微生物種や土壌成分で構成されたモジュールが複数組み合わさってネットワークを形成していることが明らかになった。また、有機農法の一つである太陽熱処理により植物根圏に特徴的な細菌叢が形成され、土壌中に蓄積する有機態窒素が作物の生育促進に関与していることが見い出された。マルチオミクス解析による農業生態系のデジタル化は、農作物と微生物と土壌の複雑な相互作用から重要な関係性を見出す有効な手法である。本研究成果から発展して、現在私たちが取り組む、農業を工業的センスで推進する「農業環境エンジニアリング」の未来像について紹介する。
本研究（の一部）は、戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「スマートバイオ産業・農業基盤技術」および内閣府ムーンショット型農林水産研究開発 事業（管理法人:生研支援センター）によって実施されました。
Plants harbor a wide diversity of microbes inside and outside their tissues, forming an assemblage of plant and its microbes as plant holobiont. Elucidation of plant holobiont in the context of agroecosystem is crucial to provides a solution to make crop production more sustainable. We digitalized an agroecosystem where plant holobiont behave on agricultural field using a multiomics approach. Our multiomics and integrated informatics revealed complex interactions in the agroecosystem showing multiple network modules represented by plant traits heterogeneously associated with microbes, soil metabolites and minerals. In addition, we identified soil organic nitrogen induced by environmentally friendly soil solarization as one of the key components to increase crop yield. Thus, digitalizing agroecosystems using multiomics is a powerful tool for extracting key information from complex interaction among crop, microbes, and soils in agroecosystem. Today I will talk about our current research activity to introduce our future vision of agroecosystem engineering.

Multiomics, Agroecosystem, Plant holobiont

講演番号：2CS-07
講演日時、会場：3 月 16 日 18:00～ ミーティングルーム C

マメ科植物-根粒菌共生における新規共生経路の解明

Novel symbiotic pathway by rhizobial effector proteins in legume-rhizobium symbiosis

○岡崎 伸[1]、ラトゥ サフィラ[1]、下田 宜司[2]、田淵 光昭[3]、安田 美智子[1]([1]東京農工大・農、[2]農研機構、[3]香川大農)
○Shin Okazaki[1], サフィラ ラトゥ[1], Yoshikazu Shimoda[2], Mitsuaki Tabuchi[3], Michiko Yasuda[1]([1]Tokyo U. Agr. Tech., [2]NARO, [3]Kagawa Univ.)

マメ科植物と根粒菌の共生は相利共生の例としてよく知られている。根粒菌はマメ科植物の根に根粒という器官を形成し、大気窒素をアンモニアに固定して植物に供給する。一方、植物は光合成産物を根粒菌に供給し、その生育を助けている。近年、ゲノム解析や分子遺伝学的解析により、共生成立に関わるマメ科植物と根粒菌それぞれの遺伝子やシグナル分子についての理解が進んできた。私たちは、根粒菌が病原菌と類似した分泌タンパク質（III 型エフェクター）を利用して根粒形成を誘導するという新規共生経路を発見した。根粒菌の III 型エフェクターは病原菌に由来すると考えられるが、一方で病原菌のものにはみられない特殊な構造があり、根粒共生用に進化してきたことが窺える。
本講演では、根粒菌の III 型エフェクター研究から得られた知見を中心に、病原性から共生への進化的考察や、根粒菌エフェクターを利用した共生制御技術への展開について発表する。

Rhizobia is a group of soil bacteria that induce the formation of nitrogen-fixing nodules on the roots of legumes. Recently, we revealed that a rhizobium uses the type III secretion system (T3SS), which functions in virulence-protein (T3 effector) delivery by pathogenic bacteria, to hijack leguminous nodulation signaling. The type III effector of rhizobia is thought to be derived from the pathogen, while it has a unique structure not found in that of the pathogen, suggesting that it has evolved for symbiosis with legumes. In this presentation, we will present the evolutionary aspects of the rhizobial T3 effector from pathogenicity to symbiosis and the development of symbiosis control technology using the rhizobial effectors.

legume-rhizobium symbiosis, effector protein, plant-microbe interactions

講演番号：2DS-01
講演日時、会場：3 月 16 日 16:10～ ミーティングルーム D

機能未知代謝酵素ホモログが関与する短鎖アシル CoA 代謝調節機構

Regulation of acyl-CoA metabolism using enzymatically inactive enzyme homologs

○吉田 彩子[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大院農生科、[2]東大微生物連携機構)
○Ayako Yoshida[1,2], Nishiyama Makoto[1,2] ([1]GSALS, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

アセチル CoA などの短鎖アシル CoA は脂肪酸やアミノ酸をはじめとした様々な化合物のビルディングブロックとして機能するなど生体内で重要な役割を持つ。そのため、アシル CoA 生成反応やその調節機構を明らかにすることは重要な生体反応の理解につながることが期待される。またアシル CoA は、近年新たな代謝調節機構として注目されるタンパク質の短鎖アシル化修飾の基質としても働く。アシル CoA 生成に関わるアシル CoA 合成酵素（ACS）がタンパク質アセチル化によりフィードバック的に制御されることがよく知られている。我々は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を対象にタンパク質アセチル化研究を進める過程で、本菌で高度にアセチル化されるタンパク質としてアシル CoA 生成に関わる CoA 転移酵素（CoAT）を同定した。CoAT はアセチル化修飾を受けるだけでなく、「酵素活性を示さない酵素ホモログ」と相互作用することで、複雑に活性が調節されることを見出している。また、*T. thermophilus* においてアセチル CoA 生成に関わる ACS についても、「酵素活性を示さない ACS ホモログ」が ACS 遺伝子の転写制御に関わることを見出している。本発表では、*T. thermophilus* において酵素活性を示さない酵素ホモログが関わるユニークなアシル CoA 生成に係わる代謝酵素制御機構について紹介する。

Short-chain acyl-CoA, such as acetyl-CoA, plays an important role in the various biosynthetic pathways as a building block. Therefore, the elucidation of the mechanism of acyl-CoA formation and its regulation will lead to the understanding of the metabolism in a cell. Acyl-CoA also functions as a substrate for protein acyl-modification, such as protein acetylation, which has been known as a new metabolic regulatory mechanism recently. Acyl-CoA synthetase (ACS) is well-known to be regulated by protein acetylation in a feedback manner. We are interested in the protein acetylation in a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, and identified CoA transferase (CoAT) as a protein that is highly acetylated in this bacterium. We have found that CoAT also interacts with “enzymatically inactive” enzyme homolog to regulate its activity in combination with protein acetylation. We are also interested in ACS involved in acetyl-CoA production in *T. thermophilus* and revealing that “enzymatically inactive” ACS homolog is involved in the transcriptional regulation of ACS genes. In this presentation, we will introduce a unique regulatory mechanism of enzymes functioning in acyl-CoA production in *T. thermophilus*.

short-chain acyl-CoA, protein acetylation, Thermus thermophilus

講演番号：2DS-02
講演日時、会場：3 月 16 日 16:35～ ミーティングルーム D

メガデヒドロゲナーゼ複合体（MDC）が仕切るバクテリアの異化代謝

Roles of Mega-Dehydrogenase Complexes to control dissimilatory metabolism in bacteria

○田中 寛（東工大化生研）
○Kan Tanaka (Tokyo Tech. CLS)

解糖系やTCA回路は生物に普遍的な中央代謝系であり、それらを構成する酵素がこれまでに同定され、詳細な性質が明らかにされていることは言うまでもない。それならば、個々の酵素反応を合わせてシミュレートすれば細胞内の代謝の動きは完全に予測できそうだが、実際には説明できない現象も頻繁に起きる。そのような謎を丹念に追いかけることから我々は理解を深めることができる。大腸菌を限定量のグルコースとカザミノ酸存在下で培養すると、グルコースがまず消費され、その後はアミノ酸にエネルギー源がシフトする。この間に培地中には酢酸オーバフロー代謝により酢酸が蓄積、最終的にはこの酢酸がエネルギー源として使われる。このような代謝遷移は如何にも古典的なカタボライト抑制やアセテートスイッチで説明できそうだが、私たちは酢酸オーバーフローの経路の破壊株では、グルコース枯渇後に強烈な増殖阻害（ジオキシー）が生ずることを見出した。その後の解析で、この直接的な原因はピルビン酸の過剰な蓄積であり、それがピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDHc）と2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDHc）の活性調節に影響している実体が見えてきた。PDHcとOGDHcはどちらも３種サブユニットからなる巨大複合体（メガデヒドロゲナーゼ複合体：MDC）であり、同様の作用機作をもつ姉妹酵素。本発表では、好気的な異化代謝における競合的なMDC活性調節の重要性、その進化などについて議論したい。

When *Escherichia coli* cells are cultivated in the presence of limited amounts of glucose and casamino acids, glucose is first consumed and then the energy source shifts to amino acids. During these periods, acetate accumulates in the medium due to the overflow metabolism, and finally this acetate is used as an energy source. These metabolic transitions appear to be easily explained by classical catabolite repression and acetate switch, but we found that in strains deficient in the acetic acid overflow pathway, intense growth inhibition (diauxie) occurs after glucose depletion. Subsequent analyses revealed that this is directly caused by the excessive accumulation of pyruvate, which in turn affects the regulation of the activity of pyruvate dehydrogenase (PDHc) and 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDHc). Both PDHc and OGDHc are huge complexes (Mega-Dehydrogenase Complexes: MDCs) composed of three subunits and are sister enzymes sharing similar mechanism of action. In this presentation, I would like to discuss the importance and evolution of competitive MDCs in aerobic catabolic metabolism.

Escherichia coli, Dissimilatory metabolism, Mega-Dehydrogenase Complex

講演番号：2DS-03
講演日時、会場：3 月 16 日 17:00～ ミーティングルーム D

酵素ミカエリスメンテン定数（K_m 値）による代謝制御

Metabolic control based on Michaelis-Menten constant (K_m value) of enzymes

○千葉 洋子、大岡 英史、ウィンザー マリ、常松 奈緒、中村 龍平 (理研)
○Yoko Chiba, Hideshi Ooka, Marie Wintzer, Nao Tsunematsu, Ryuhei Nakamura (RIKEN)

酵素学においては、ミカエリスメンテン定数（K_m 値）が小さく、k_{cat}（代謝回転数）値が大きい酵素が優れていると一般に考えられている。なぜなら、K_m 値が小さい酵素ほど、低い基質濃度でその酵素の有する最大反応速度（V_{max}, k_{cat}）に近い能力を発揮できるからである。K_m と k_{cat} は相互依存性のパラメータであるため、k_{cat} / K_m 値が酵素の能力を表す指標として使われてきた。

ところで、生物は自身が有する各酵素の動力学パラメータが最適となるように進化してきたと考えられる。そうであれば、同一反応を触媒する酵素の k_{cat} / K_m 値は、その酵素が理論上達成できる最大値に収束するのだろうか？また、どのように K_m 値と k_{cat} 値を振り分けるのだろうか？

これらの問いに答えるため、我々は phosphoserine phosphatase (PSP)を例にとり、様々な生物種由来の PSP を大腸菌発現・精製して、各動力学パラメータを求めた。結果、各種生物由来の PSP の K_m、k_{cat} 値は多様であり、k_{cat} / K_m 値に 2 桁もの違いがあることがわかった。これらデータを触媒化学の手法（volcano plot）を用いて詳細に解析したところ、K_m 値が大きくかつ k_{cat} 値が小さい酵素が存在することが明らかとなった。このような一見非効率的に見える酵素の存在意義としては、同一基質を用いる競合酵素の K_m 値とのバランスが考えられる。実際、我々が行った数理計算予測において、競合反応において得られる生成物の割合には、それぞれの反応を触媒する酵素の K_m 値が強く影響することが示された。

以上の結果から、酵素の K_m 値は必ずしも小さいものが好ましいのではなく、宿主生物や反応条件ごとに最適値があると考えられる。すなわち、代謝制御においては各酵素に適切な K_m 値を与える必要がある。

An enzyme with low K_m and high k_{cat} values is believed to be good in general because it shows high activity. However, we found that some organisms seem to prefer “inefficient” phosphoserine phosphatase (PSP) which have large K_m and low k_{cat} comparing to that in other organisms. The metabolic network comparison and numerical calculation suggested that the balance with the K_m value of the competing enzyme using the same substrate may cause the large K_m (and low k_{cat}) PSP. In summary, a small K_m value of an enzyme is not necessarily desirable, and there is an optimal value for each host organism or reaction condition.

enzyme kinetics, metabolism, numerical calculation

講演番号：2DS-04
講演日時、会場：3 月 16 日 17:25～ ミーティングルーム D

出芽酵母における代謝酵素集合体 G-body 形成を介した代謝制御とその展開

Metabolic regulation through spatial reorganization of metabolic enzymes

○三浦 夏子（阪府大院・生命環境）
○Natsuko Miura (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ.)

多段階の酵素反応を効率よく進めたり、細胞にとって有害な代謝産物を隔離したりするために、生物は細胞内でさまざまな代謝酵素の区画化戦略をとることが明らかになってきた。従来知られていた脂質膜やタンパク質の殻を用いた酵素の区画化・隔離と異なり、液−液相分離による酵素の区画化は、細胞に多大な翻訳負荷をかけることなく「膜のないオルガネラ」を生成するための効率的な方法として注目を集めつつある。2013 年に我々が初めて報告した代謝酵素の集合体は、解糖系酵素を中心とした 20 以上の代謝酵素群が集い、低酸素条件下でグルコース代謝のターンオーバーを一部上昇させる効果がみられ、2017 年にはアメリカの別グループにより追試が行われて「Glycolytic body (G−body)」と名付けられた。近年ではより多くの代謝酵素が低酸素条件下で集合することが明らかになり、酵素の集合体形成が細胞内で当初の予想よりもはるかに大規模に、かつ普遍的に利用されていることが示唆されつつある。我々は低酸素条件下におけるタンパク質集合体を包括して「META body」と名付け、その形成原理を探るとともに、現在研究の過程で見出した集合体形成ドメインを利用して様々な代謝反応が効率化できないか検討しているところである。本シンポジウムではその一端について最近の状況を報告する。

Compartmentalization of metabolic enzymes is considered to be important for effective enzyme cascade reactions or exclusion of toxic intracellular products and intermediates. Unlike previously known compartments with lipid layers or protein capsules, compartmentalization with liquid-liquid phase separation does not seem to require production of biomolecules other than enzymes. Currently, the construction of “membraneless organelles” by liquid-liquid phase separation is attracting attention as a means of promoting enzymatic reactions while suppressing the translation load on cells. Previously, we reported that more than 20 metabolic enzymes coalesce in the budding yeast cells under hypoxia and increase the turnover of carbon metabolism. This phenomenon was later confirmed by two groups of other scientists, and the enzyme aggregate was named "glycolytic body (G-body)". The number of enzymes reported to form soluble aggregates in cells under hypoxia is increasing; it has been suggested that the formation of enzyme aggregates is used in cells on a much larger scale and more universally than previously expected. We have collectively named the protein aggregate under hypoxia "META body". Here, we report recent attempts to accelerate some metabolic reactions using the mechanism of META body formation.

glycolytic enzyme, hypoxia, META body

講演番号：2DS-05
講演日時、会場：3 月 16 日 17:50～ ミーティングルーム D

光合成 CO_2 固定酵素 RuBisCO の環境適応

Environmental adaptartion of photosynthetic CO_2-fixing enzyme, RuBisCO.

○蘆田 弘樹（神戸大学）
○Hiroki Ashida (Kobe Univ.)

光合成生物のカルビンサイクルにおいて、リブロース 1,5-ビスリン酸に CO_2 を固定するカルボキシラーゼ反応を触媒するのが、リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)である。RuBisCO の CO_2 固定反応の CO_2 特異性は低く、O_2 を CO_2 と誤認識して起こる O_2 固定反応であるオキシゲナーゼ反応も触媒する。カルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応は、同一基質、同一触媒部位で起こるため、カルボキシラーゼ反応はオキシゲナーゼ反応により拮抗的に阻害される。このため、O_2 を大量に含む現地球環境下では様々な局面で RuBisCO が光合成生物の CO_2 固定の律速となっている。RuBisCO の酵素特性は、光合成生物の生育 CO_2 濃度環境に適応進化しており、生物間で大きく異なっている。我々は、これまで RuBisCO 酵素特性の環境適応進化を解析し、いくつかの酵素特性を決定する構造を明らかにしてきた。一方で、RuBisCO のカルボキシラーゼ反応を効率化するための、RuBisCO 機能環境の適応進化も起こってきた。シアノバクテリアなどでは、この酵素のオキシゲナーゼ反応を抑制するために CO_2 濃縮機構を利用している。CO_2 濃縮機構では、無機炭素トランスポーターにより細胞内に無機炭素を重炭酸イオンとして濃縮し、タンパク質シェルから構成されるカルボキシソームと呼ばれる細胞小器官内で CO_2 へ変換する。カルボキシソーム内には、RuBisCO が高密度にパッキングされており、高濃度 CO_2 濃度環境下でほとんど O_2 に阻害されることなく、カルボキシラーゼ反応を行うことが可能である。我々は、シアノバクテリアにおける RuBisCO とカルボキシソームの量的関係性を解析し、RuBisCO の機能環境適応進化を研究してきた。本発表では、これらの RuBisCO 酵素特性と機能環境の適応進化研究に関する結果を発表し、議論したい。

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) is the important CO_2-fixing enzyme for the Calvin cycle in photosynthetic organisms. However, RuBisCO is not an efficient enzyme – it sometimes mistakes oxygen for CO_2. This poor discrimination of CO_2 severely limits the photosynthetic CO_2 fixation. Interestingly, enzymatic properties of RuBisCO diversify to be adapted to CO_2 conditions among photosynthetic organisms. On the other hand, intracellular environment for CO_2 fixation of RuBisCO is optimized. In cyanobacteria, the CO_2 concentrating mechanism can provide high CO_2 condition for RuBisCO in carboxysomes composed of protein shells. We would like to discuss the adaptation of enzymatic properties and functional environment of RuBisCO.

RuBisCO, CO_2 fixation, photosynthesis

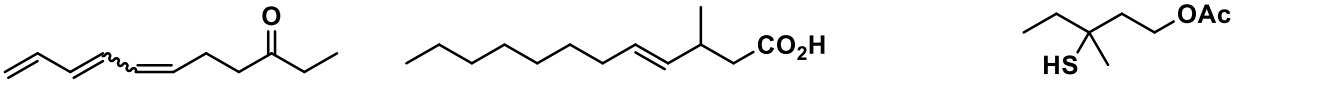
講演番号：2ES-01
講演日時、会場：3 月 16 日 16:05～ ミーティングルーム E

香料化学における有機合成の役割

Introduction to aroma chemistry

○増田 唯、坂巻 憲佐、原口 賢治、田中 尚子、川口 賢二 (長谷川香料)
○ Yui Masuda, Kensuke Sakamaki, Kenji Haraguchi, Naoko Tanaka, Kenji Kawaguchi (T.HASEGAWA)

香料化学は面白い。単離・合成・機能解明に関わる研究者がそのチカラを結集させて自然から有用な機能性分子を見出し、それを活用することで世界の豊かさ向上を目指す天然物化学の魅力がまさに精油の様に高密度に濃縮されているからだ。天然物化学の枠組みの中で揮発性を持つ魅力的な機能性分子を研究対象とするのが香料化学である。香料化学において結集すべきは単離・合成・調合に関わる研究者たちのチカラであるが、この協働がうまく機能して初めて成果が得られてくる。



YUZUNONE® (2007, from yuzu)　(*E*)-3-Methyl-4-dodecenoic acid (2017, from ginger)　3-Mercapto-3-methylpentyl acetate (2019, from lemon oil)

<New natural aroma compounds isolated by our team>

香料化学研究を推し進めるにあたって最も重要なのは「嗅覚」である。この嗅覚には第六感を働かせるといったニュアンスの中に、文字通り第五感的なものが含まれる。香料化学に携わる研究者はすべからく自分の嗅覚を磨くために努力すべきだが、その嗅覚を最大限に活用する必要があるのは調合に関わる調香師と言われる役割を担う研究者達である。彼らは香料化学が世界を豊かにするための成果物である「香料」を作り出す最終工程を担っているが、その作業において自分達の感性を最大限に発揮している姿は化学者というよりは芸術家に近いかもしれない。そのような観点から香料化学を俯瞰すると単離、合成に関わる研究者の化学的な成果を調香師がその感性で芸術へと昇華させたものが香料であるという見方が可能であり、この「感性と化学の融合」こそが香料化学の最大の魅力である。本シンポジウムにおいては香料化学における有機合成化学者の役割に関して詳細に触れつつ、その面白さの一端でも皆様にお伝えすることができれば本望である。

Our team collaborated to isolate, synthesize, and then formulate new flavors from these three previously unidentified natural aroma compounds we discovered. The chemists who engineer the organic synthesis of such innovative aroma compounds collaborate with flavorists and perfumers, who are more olfactory artists than traditional chemists, to constantly identify new areas of research, so please consider a career in flavor and fragrance chemistry.

aroma chemistry, organic synthesis

講演番号：2ES-02
講演日時、会場：3 月 16 日 16:33～ ミーティングルーム E

出芽酵母の形態情報を基にした新規抗真菌剤の作用機序の解明

Elucidation of the mechanism of action of novel antifungal agents based on yeast morphological profiling

○一刀 かおり（東大新領域）
○Kaori Itto-Nakama (Univ. Tokyo GSFS)

真菌による感染症は、ヒトに対して重篤な侵襲性真菌症、植物や作物に対して伝染性病害を引き起こし深刻な影響を及ぼすことが知られている。しかし、ヒトや植物病原性真菌に有効な抗真菌剤の数は非常に限られており、薬剤耐性真菌の出現が急増していることから、新しい作用機序を有する薬剤開発が急務である。真菌は真核生物であるため新規薬剤には真菌特異的に作用することが強く求められているが、それを調査する手法は少ない。私たちは、真菌の代表的なモデル生物である出芽酵母を用いて化合物スクリーニングを行い、抗真菌活性を示した数種の新規骨格化合物を発見した。真菌特異的な作用を含めた作用機序解明は重要な課題であるが、私たちは出芽酵母の形態情報を用いた薬剤標的予測方法を確立した。今回、リグノセルロース加水分解産物であるフェルラ酸二量体ポアシン酸とポアシジエン、ジャーベラトラム型ステロイドアルカロイドであるジェルビンを研究対象として薬剤標的予想とその検証を行った。本講演では、新規抗真菌剤として有望なこの３つの化合物について詳細を紹介する。

Fungal infections are known to cause serious invasive fungal diseases in humans and infectious diseases in plants and crops and have serious effects. However, the number of effective antifungal agents against human and phytopathogenic fungi is very limited, and the emergence of drug-resistant fungi is increasing rapidly, so there is an urgent need to develop a drug having a new mechanism of action. Since fungi are eukaryotes, there is a strong demand for new drugs to act specifically on fungi, but there are few methods to investigate this. We conducted compound screening using *Saccharomyces cerevisiae*, which is a representative model organism of fungi, and discovered several novel skeletal compounds showing antifungal activity. Although elucidation of the mechanism of action including fungal-specific action is an important issue, we have established a drug target prediction method using yeast morphological profiling. Herein, we conducted drug target prediction and verification of ferulic acid dimer poacic acid and poacidiene, which are lignocellulosic hydrolysis products, and jervine, which is a jerveratrum-type steroid alkaloid, as research subjects. In this talk, we will introduce the details of these three promising new antifungal agents.

antifungal agents, mode of action, yeast morphological profiling

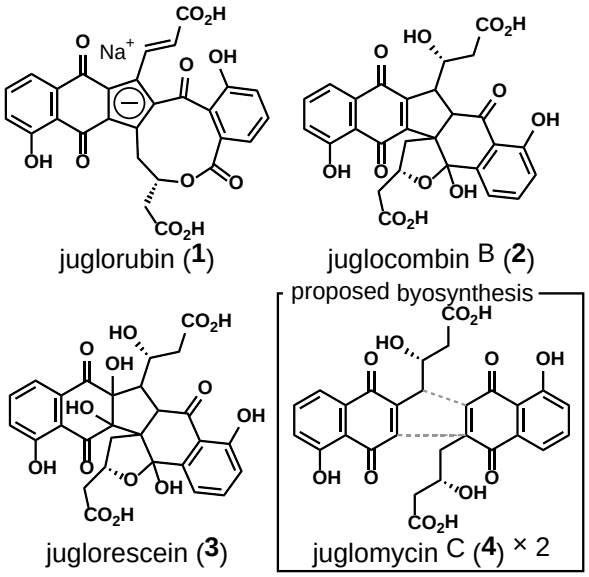
講演番号：2ES-03
講演日時、会場：3 月 16 日 17:01～ ミーティングルーム E

1,4-ナフトキノン二量体天然物の全合成研究：生合成仮説に基づく合成戦略

Synthetic Studies on Juglorubin and Related Naphthoquinone Dimers

○加茂 翔伍（星薬大）
○Shogo Kamo (Hoshi Univ.)

Juglorubin (**1**) は 1993 年に放線菌 *Streptomyces* sp. から単離された赤色イオン性有機色素であり、1,4-ナフトキノン、シクロペンタジエニルアニオン、および九員環ラクトンを含む 6/6/5/9/6-員環縮環構造を有する [1]。また juglocombin B (**2**) と juglorescein (**3**) は 2005 年に同種の放線菌から単離された化合物である。これら天然物の生合成に関して、ナフトキノン天然物 juglomycin C (**4**) が二量化することで化合物 **2** 及び **3** を与え、さらに **2** の酸化的骨格変換により **1** が生合成されるという仮説が提唱されている。本シンポジウムでは、生合成仮説に基づく合成戦略を基軸とした、juglorubin (**1**)、juglocombin B (**2**) および juglorescein (**3**) の全合成について紹介する。本研究により、これまで不明であった化合物 **2** と **3** の相対および絶対立体配置を明らかにすることができた。また、juglomycin C (**4**) を酸素存在下リン酸緩衝液で処理すると、juglorubin (**1**) 骨格が一挙に構築されることを見出し、**1** が非酵素的に生産される可能性を見出した。



Juglorubin (**1**) is a red dye isolated from *Streptomyces* sp. in 1993.[1] This compound has an unusual 6/6/5/9/6-fused pentacyclic ring system containing a cyclopentadienyl anion and a nine-membered lactone. Juglocombin B (**2**) and juglorescein (**3**), isolated from the same *Streptomyces* strains in 2005, have highly oxygenated 6/6/5/6/5/6-fused hexa-cyclic skeleton. It has been proposed that compounds **1**–**3** might be biogenetically synthesized *via* dimerization of juglomycin C (**4**). In this presentation, total syntheses of juglorubin (**1**), juglocombin B (**2**), and juglorescein (**3**) by a strategy inspired by the biosynthetic hypothesis will be described.

Ref. 1) Lessmann, H.; Krupa, J.; Lackner, H. et al. *Z. Naturforsch.* **1993**, *48b*, 672. 2) Kamo, S.; Yoshioka, K.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10317. 3) Kamo, S.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1082. 4) Kamo, S.; Saito, T.; Kuramochi, K. et al. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 13957.

1,4-naphthoquinone, dimerization, total synthesis

講演番号：2ES-04
講演日時、会場：3 月 16 日 17:29～ ミーティングルーム E

イオンモビリティ質量分析を用いる生体内極微量成分の超高感度分析

High-sensitivity analysis of hormones by LC-MS/MS with differential mobility separation

○謝 肖男 (宇都宮大学・バイオ)
○Xiaonan Xie (Utsunomiya Univ.)

生物が極微量に分泌する種々のホルモンなどの低分子化合物は、伝える情報によって生体中の機能を発現させ、生体の正常な状態を支えながら、日頃の恒常性を維持するなど、重要な役割を果たしている。しかし、ホルモンは生体内の特定の器官の働きを調節するための情報伝達を担う物質であり、アミノ酸や糖などの栄養分とは違って、非常に微量でその作用を発揮するようにできており、血液などの体液あるいは植物の組織の中での濃度も極めて低い。

これまでは特定の生体内ホルモンを抗原抗体反応とラジオアソトープなどを利用したイムノアッセイで測定されているが、ホルモンは極微量のため、分析に必要な試料などは非常に多く要求される。近年、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）による分析が主流になり、動・植物ホルモンの高感度かつ多検体・一斉分析が可能になり、生物の生長に関わる生理活性物質の作用発現機構、生合成や代謝経路などの研究が飛躍的に進展した。しかし、ホルモンその物質としての性状から他の物質と分離・精製するのは一般に困難である。また、多数の類縁体が存在する物質など、立体異性体も含む多種多様な構造を有する。そのため、LC では完全に分離できず、全てのホルモンを同時に識別することは難しい。また、抽出物には目的物以外に大量の不純物が含まれているため、サンプルを精製せずに高感度かつ高精度で分析することは不可能である。

生物の生体内組織や小器官、ないしは一細胞からホルモンなどの極微量生理活性成分を簡便に、高感度かつ高精度に分析できれば、分子レベルで生物全般の生理・生態現象を解明できるだけでなく、医学、農業技術と生物科学の革新をもたらすことが期待される。本発表では、簡便かつ高精度の生体内極微量成分の高感度分析、を目的として、従来の分析技術をふまえ、イオンモビリティスペクトロメトリー質量分析（IM-MS）による動・植物ホルモンなど極微量低分子活性成分の簡便かつ超高感度分析法について紹介する。

Hormones are signaling compounds which regulate growth and development at low concentrations. Recently, microanalysis by using LC-MS/MS has been carried out frequently. However, crude samples should be purified prior to the analysis not to suppress the ionization in LC-MS/MS. In this study, LC-ESI-MS/MS with differential mobility separation (DMS) was used to analyze hormones in crude extracts with high specificities and sensitivities.

hormone, Ion mobility, Mass spectrometry

講演番号：2ES-05
講演日時、会場：3 月 16 日 17:57～ ミーティングルーム E

二量体型アルカロイドの収束的合成に向けた合成戦略

Synthetic strategies for convergent synthesis of dimeric alkaloids

○植田 浩史（東北大院薬）
○Hirofumi Ueda (Tohoku Univ.)

天然には、二つの同じあるいは類似の母骨格からなる二量体型天然物が、数多く存在する。これら二量体型天然物は、その多くが単量体に比べて優れた生物活性を示すため [1)]、創薬研究において魅力的なリード化合物の一つである。特に二量体型アルカロイドでは、その有用な生物活性のみならず、両ユニットを繋ぐ結合様式が多岐にわたっており、構造的にも興味深い化合物群と言える。

二量体型化合物の効率的な合成経路を確立するためには、いかに両ユニットを合成終盤で連結するか、すなわち合成の収束性が重要である。収束性のみを考慮すると、合成の最終段階でのカップリングが理想とされるが、合成終盤に向けてより構造が複雑化する単量体同士のカップリングは、立体的な要因や化学選択性の観点から容易でない。これらの二量体型化合物の収束的合成を実現するためには、骨格様式や共存する官能基に制限を受けない、汎用性に優れたカップリング法の開発が求められている。今回の講演では、最近我々が取り組んでいる二量体型アルカロイドの収束的合成に向けた酸化的カップリング反応の開発や単量体の効率的合成を目指した合成戦略について紹介する。

In nature, a large number of dimeric natural products composed of two same or similar core skeletons have been found to date. Interestingly, many of these dimeric compounds exhibit superior biological activities compared to the corresponding monomers.[1)] In particular, since dimeric alkaloids possess architectural diversities and fascinating biological activities, development of new synthetic strategies for construction of these complicated structures has been one of the important topics in synthetic chemistry and pharmaceutical sciences.

In the synthesis of dimeric compounds, it is important how to connect two units at the late stage of the synthesis. In consideration of convergency, coupling at the last stage of synthesis is ideal timing, but coupling of structurally complicated monomers is difficult task from the viewpoint of steric factors and chemoselectivity. Therefore, in order to establish an efficient and convergent synthetic route for dimeric compounds, development of a versatile coupling methodology, which is applicable to various bond formations and possesses high functional group compatibility, is required. In this presentation, our recent researces involving development of oxidative coupling reaction for a convergent synthesis of dimeric alkaloids and synthetic approaches toward efficient synthesis of monomer units will be discussed.

Ref 1) G. Bérubé, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 131-154.

alkaloid, dimeric natural compound, coupling reaction

講演番号：3AS-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:05～ ミーティングルーム A

出芽酵母のリン酸飢餓応答系が関与する分裂寿命決定機構
The mechanism of replicative lifespan determination involving the phosphate starvation response in budding yeast
○向 由起夫、梅田 知晴、中島 俊雄（長浜バイオ大・バイオサイエンス）
○Yukio Mukai, Chiharu Umeda, Toshio Nakajima (Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は 1 個の細胞が死ぬまでに生む細胞の数（分裂寿命）を測ることができ、細胞レベルの老化・寿命研究モデルとして分裂寿命を決定する環境因子や遺伝子の発見に貢献してきた。本発表では、出芽酵母のリン酸飢餓応答系が関与する分裂寿命決定機構について紹介する。出芽酵母の分裂寿命は環境中の無機リン酸濃度の影響を受けなかったが、リン酸飢餓により転写誘導される遺伝子を高発現させると分裂寿命が短くなった。この原因遺伝子の一つが液胞でポリリン酸（polyP）を合成する polyP ポリメラーゼ複合体遺伝子であることを見出した。そこで、polyP を高度に蓄積させると分裂寿命が短くなった。細胞質に局在する polyP ホスファターゼが存在すること、細胞質 polyP を増加させると短寿命となることから、細胞質 polyP が分裂寿命に悪影響を与えるモデルを考えた。さらに、リン酸あるいはチアミンの飢餓により誘導される 4 つすべての分泌型酸性ホスファターゼ（APase）遺伝子を破壊すると分裂寿命が短くなった。この原因が細胞内イノシトール 6 リン酸の増加であること、環境中への過剰なチアミン添加により APase 四重破壊株の寿命が回復することから、リン酸化合物およびチアミンが分裂寿命の決定にかかわる機構について考察する。

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a useful eukaryotic model organism for a replicative lifespan defined as the number of cells produced by a cell before dying. In this presentation, we show the mechanism of replicative lifespan determination involving the phosphate starvation response in budding yeast. Environmental phosphate did not affect the replicative lifespan. However, high expression of the inorganic polyphosphate (polyP) polymerase complex genes, which synthesize polyP in the vacuole, highly accumulated polyP and shortened the lifespan. Because there is a polyP phosphatase localized in the cytoplasm, and increasing cytoplasmic polyP shortened the lifespan, we propose a model in which cytoplasmic polyP negatively affected the replicative lifespan. Additionally, disruption of all four secreted acid phosphatase (APase) genes, induced by starvation of phosphate or thiamine, resulted in a short lifespan. The shortened lifespan was caused by an increase in intracellular inositol 6-phosphate and restored to normal by the excess thiamine in the environment. We discuss how phosphate compound and thiamine are involved in determining replicative lifespan in yeast.

Yeast, Lifespan, Phosphate

講演番号：3AS-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:33～ ミーティングルーム A

出芽酵母のメチオニン代謝による細胞寿命制御と生理機能

Regulation of lifespan and physiological function by methionine metabolism in budding yeast

○水沼 正樹（広島大・院統合生命）
○Masaki Mizunuma (Hiroshima Univ.)

アミノ酸は単なる生体分子としてのみならず、発生、代謝、ストレス耐性、老化・寿命など多彩な生理機能を有することが分かってきた。また、最近、必須アミノ酸であるメチオニンを制限するとモデル生物の寿命が延長するなど、生物種を問わずその作用機構など共通点が多いことがわかった。しかし、実際にヒトで実践できるような簡単なメチオニン制限の方法はない。我々は、出芽酵母を用いた解析から寿命延長にアミノ酸の一種であるメチオニン代謝産物・*S*-アデノシルメチオニン(SAM)が関与することを世界に先駆けて見出した。具体的には、SAM の合成を促進させると、AMP 依存性キナーゼ AMPK が活性化し寿命延長する、これまでにない寿命延長メカニズムを提唱した。興味深いことに、SAM の拮抗阻害物質である *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)を添加しただけでも、先と同様のメカニズムにより寿命延長することが分かった。さらに、SAH は細胞内メチオニンを減少させ、メチオニン制限と同様な表現型を示すことを見出した。酵母で見出された SAH の効果は線虫でも保存されていたことから、他の高等生物でも同様の効果が期待できる。とりわけ、SAH は生体の代謝産物であるため、SAH は安全安心なメチオニン制限模倣化合物だと期待している。

Methionine restriction (MetR) extends lifespan in diverse model organisms. However, there is no simple method of MetR that can be practiced in humans. *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) is a central coenzyme in the metabolism that occurs in the majority of biological methylation reactions. In transmethylation reactions, SAM is converted to *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH), an inhibitor of methyltransferases. Previously, we show that stimulating SAM synthesis turned on a metabolic switch that led to enhanced stress resistance and longevity of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Stimulating SAM synthesis activated the universal energy-sensing regulator AMP-activated protein kinase (AMPK), resulting in lifespan extension. Interestingly, supplementing the medium with SAH contributed to an extended lifespan with a higher accumulation of SAM than of SAH. Further, we discovered that intake of SAH is sufficient to reduce intracellular Met and induces benefits that mimic MetR, including extends lifespan in yeast and nematode. In particular, since SAH is a metabolite of organisms, we expect SAH to be a safe and secure MetR mimetic compound.

Budding yeast, Methionine, Lifespan

講演番号：3AS-03
講演日時、会場：3 月 17 日 17:01～ ミーティングルーム A

出芽酵母のプロリン代謝による細胞寿命制御と生理的役割

Longevity regulation mediated by proline metabolism in yeast

○西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Akira Nishimura, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

近年、アミノ酸はタンパク質の構成成分のみならず、それ自体に多彩な生理機能があることが知られてきた。特に、プロリンは他のアミノ酸と比較して様々な生理機能を有しており、細胞の恒常性維持に極めて重要である。細胞の恒常性が破綻すると老化を引き起こすことから、我々はプロリンが細胞寿命・老化の制御因子である可能性を考えた。まず、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、細胞内プロリン含量が増減した変異株を準備し、これらの株の細胞寿命を測定した。その結果、分裂寿命はプロリン含量に相関して延長することが判明した。細胞分裂の過程では、細胞膜が薄くなることで起こる浸透圧ストレスや物理的な機械ストレスなどのストレスが細胞に負荷されるため、プロリンはこれらのストレスを直接軽減していることが示唆された。一方で、興味深いことに、経時寿命は細胞内プロリン含量とは無関係であり、プロリンの酸化酵素であるプロリンオキシダーゼ Put1 をコードする遺伝子（*PUT1*）を破壊したところ、経時寿命は短縮され、プロリンの酸化が酵母の経時寿命を制御することを見出した。また、プロリンの培地への添加は野生型株の寿命を有意に増加させたが、*PUT1* 破壊株ではその効果が見られなかった。さらに、ミトコンドリアのエネルギー代謝を解析した結果、Put1 が老化期におけるミトコンドリアの膜電位と ATP 産生の維持に寄与することが判明した。以上の結果から、Put1 によるプロリンの酸化がミトコンドリアのエネルギー代謝の維持に関与し、酵母の経時寿命を制御していることが示唆された。Put1 のホモログ遺伝子はヒトを含むほとんどの生物で保存されているため、Put1 とエネルギー代謝、寿命の関係が解明されることで老化防止や健康長寿、エネルギー代謝不全で引き起こされる難治性の呼吸器系・循環器系の疾患予防・治療法の開発に繋がることが期待される。本講演では、プロリンによる細胞寿命制御の生理的意義やその応用展開に関しても議論したい。

Proline is a pivotal and multifunctional amino acid that is used not only as a nitrogen source but also as a stress protectant and energy source. Therefore, proline metabolism is known to be important in maintaining cellular homeostasis. Our recent studies using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* showed that mitochondrial energy metabolism is maintained through oxidative degradation of proline and that this process is important for yeast cells to regulate the longevity.

proline, longevity, energy metabolism

講演番号：3AS-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:29～ ミーティングルーム A

定常期の生理応答から理解する出芽酵母の寿命維持戦略

Strategies to maintain the lifespan of *S. cerevisiae* during the stationary phase

○松浦 彰 (千葉大院理)
○Akira Matsuura (Chiba Univ.)

微生物の回分培養では、対数増殖期の後に細胞数の増加が止まる定常期を迎え、その後集団中の細胞が徐々に死滅していく過程が観察される。定常期以降の細胞集団が徐々に生存能を失っていく過程は経時老化と呼ばれ、これまで非分裂細胞の老化過程のモデルとして多くの研究がなされてきた。酵母の経時老化過程は培地条件や実験室酵母が有する栄養要求性変異などの遺伝的背景により影響を受けることが知られており、このことは定常期以降の細胞の生存が栄養利用能と密接に関係していることを示唆している。

我々は、定常期における細胞の生理応答と経時老化との関係を解析する過程で、培地に存在する特定のアミノ酸が細胞の生存率低下を遅延させ、この作用は定常期突入時の培地環境の悪化を抑制することによること、さらに経時老化が遅延する培養条件では、定常期以降にも細胞分裂がおきていることを見出した。本発表では、これまでの我々の研究結果から明らかになりつつある、栄養制限状態にある出芽酵母が細胞集団として生存を維持するための戦略を議論したい。

Chronological senescence is the process in which *Sacccharomyces cerevisiae* cells gradually lose their viability after passing the stationary phase in batch culture, and has been analyzed as a model for non-dividing cell senescence. In this presentation, I would like to present our results concerning the relationship between medium compositions and chronological lifespan, and discuss the strategy how yeast cells survive under nutrient-limited conditions.

Saccharomyces cerevisiae, chronological lifespan, amino acid metabolism

講演番号：3AS-05
講演日時、会場：3 月 17 日 17:57～ ミーティングルーム A

分裂酵母における細胞寿命の制御基盤

Regulatory basis of cell lifespan in fission yeast

○饗場 浩文 (名大創薬)
○Hirofumi Aiba (Nagoya Univ.)

健康長寿社会の確立には、寿命・老化研究の進展が重要である。ヒトを始めとした高等動物の寿命を理解するためには、細胞レベルで寿命を理解することが重要であるとの考えに立ち、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）を用いて、経時寿命の解析を進めている。経時寿命とは、非分裂状態の細胞の生存期間と定義され、我々は、SD 液体培養を用いて定常期に進入後のコロニー生成率 (CFU) を求めて解析している。

本発表では、高発現すると経時寿命を延ばす遺伝子として見出した Ecl1 ファミリー因子、ならびにスクリーニングにより取得した長寿命変異株について、最近の知見を紹介する。

Ecl1 ファミリー因子は *ecl1*$^+$, *ecl2*$^+$, *ecl3*$^+$の 3 つからなり、それぞれ、硫黄枯渇、熱ストレス、リン酸枯渇により発現誘導されることがわかった。また、硫黄枯渇は、新規な寿命延長シグナルとして機能し、Ecl1 ファミリー因子依存的にオートファジーを誘導することも見出した。他方、長寿命変異株の原因因子として見出していた P 型 ATPase・Pma1 に特異的な阻害剤を開発し、これが分裂酵母、出芽酵母共に経時寿命を延ばす寿命延長薬として機能することを見出した。これらに関連した成果も合わせて紹介し、分裂酵母の寿命制御基盤の現状と将来を議論したい。

Understanding of life span and aging is important for the establishment of a healthy and long-lived society. Because we think that the understanding of lifespan at the cellular level is prerequisite for understanding of the lifespan of humans, we have been analyzing cellular lifespan using fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*). To analyze the chronological lifespan, we calculate the colony forming unit (CFU) after entry into the stationary phase using SD liquid culture. In this presentation, we will introduce our recent findings on Ecl1 family genes, which we have identified as genes that prolong lifespan when highly expressed, and long-lived mutant strains that we have obtained by screening. The Ecl1 family genes, *ecl1*$^+$, *ecl2*$^+$, and *ecl3*$^+$, are induced by sulfur depletion, heat stress, and phosphate depletion, respectively. We also found that sulfur depletion induces autophagy in an Ecl1 family genes-dependent manner. We developed a specific inhibitor of Pma1, and found that this inhibitor functions as a life-elongating drug in both fission yeast and budding yeast. In addition to these findings, I would like to introduce our findings on the basis of lifespan regulation in fission yeast.

S. pombe, lifespan, aging

講演番号：3BS-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:00～ ミーティングルーム B

二価サブライブラリ構築による新型コロナウィルスに結合する DNA アプタマーの取得と展開

Aptamer DNA; development via divalent sublibrary construction and potential utilization schemes

○大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院生命）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

DNAアプタマーは、特定の対象に結合させることを目的にした機能性核酸である。特定の対象に結合するDNAアプタマーを得るには、ランダムな一本鎖DNA配列プールから対象に結合するものを選び出せば良い。本発表では、新型コロナウィルスのS-タンパク質に結合するアプタマーDNAの取得について、発表者が経験した苦労と工夫について発表する。当初、強い結合性能を持つアプタマーDNAはなかなか得られなかったが、ある程度の弱い結合能を有するDNAプールを得たあとで、このDNAプール内の2分子をランダムに組み合わせ、さらなる選択と増幅を行う方法を構築した。これによって、S-タンパク質にゲルシフトアッセイで結合が確認できる結合能を持ったDNAアプタマーを得ることができた。この方法は一般的に有用な方法となる可能性がある。
また本発表では、アプタマー利用について将来考えられる応用展開について述べる。例えばアプタマーDNAを多数(100から数千分子)装荷した微小ビーズを作製し、これによって結合対象に強く結合させる方法の構築である。新型コロナウィルスのS-タンパク質に結合するアプタマーを装荷した微小ビーズは、新型コロナウィルスと混ぜ合わせることで凝集体を形成した。課題はあるが、検出対象を迅速に検出する方法となることが期待される。

DNA aptamer is a single-strand DNA capable of binding to a specific target. In general, a pool of random DNAs is subjected to selection and amplification cycles to obtain DNA aptamer. Despite our considerable efforts, our initial attempt to obtain aptamer DNA that binds to the S-protein of SARS-CoV-2 was unsuccessful. As we struggled, we came up with a new method. In the method, two DNAs in a library after numerous rounds of selection and amplification were randomly combined to generate a divalent library. The divalent library was used for the selection and amplification cycles, and we obtained DNA aptamers that bind to the S-protein of SARS-CoV-2 with affinities detectable by gel shift assay. In the presentation, we discuss potential usages of aptamer DNAs. That is the loading of numerous aptamer DNAs onto microbeads, which should immediately form a visible aggregate upon mixing with the target.

aptamaer, SARS-CoV-2, probiotics

講演番号：3BS-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:25～ ミーティングルーム B

DNA アプタマーセンサの可能性と展望

Potential and prospects for DNA aptamer sensors

○堀井 克紀（NEC ソリューションイノベータ（株））
○Katsunori Horii (NEC Solution Innovators, Ltd.)

新型コロナウイルス感染症が世界的に流行し、家庭や職場、密閉空間でウイルスを簡易測定したいというニーズが増えてきた。また、家庭での健康管理や未病予防に対する関心も高まり、セルフメディケーションに向けた簡易検査が重要になっている。標的分子の検出には、イムノクロマト法に代表されるように抗体が使わることが多かったが、品質管理やストレージの面で課題があった。その一方、抗体と同様に三次構造を認識し標的分子と結合できるアプタマーは、比較的製造が容易、常温保存でも安定しているといった特徴があり、抗体に代わるプローブとして期待されている。

これまで NEC ソリューションイノベータでは、群馬大学と共同開発した Base Appended Base (BAB) を用いた修飾核酸ライブラリーからウイルスやバイオマーカーなどの標的分子に強く結合する複数アプタマー開発に成功している。さらに、ラベルフリーの簡易検出法の検証を行ってきた。本シンポジウムで、BAB アプタマーとアプタマーを用いた簡易検査の現状と今後の展望について発表する。

With the worldwide epidemic of the new coronavirus infection, the needs for easy measurement of the virus on the spot have increased. In addition, as an increasing interest in home health management and prevention of illness, highly accurate simple tests for self-medication are becoming important.

Antibodies have been widely used to detect target proteins like an immunochromatography test but there are some restrictions on quality control and storage. On the other hand, aptamers are expected to replace antibodies as bio-sensing probes, because they are relatively easy to manufacture by chemical synthesis and are stable for long-term at room temperature.

Our group has succeeded in developing aptamers that bind strongly to virus proteins and biomarkers from modified nucleic acid libraries including base appended base (BAB) modification collaborated with Gunma University. Furthermore, we have studied label-free detection methods with the aim to realize a society where anyone can easily measure infectious virus or bacteria and health information. In this symposium, I will present the current status and future prospects of BAB aptamers and easy detection method using aptamers.

aptamer, biosensor, modified DNA

講演番号：3BS-03
講演日時、会場：3 月 17 日 16:50～ ミーティングルーム B

アミロイドタンパク質を認識する核酸アプタマーの創製と応用

Development and application of nucleic acid aptamers targeting amyloidogenic proteins

○村上 一馬（京大院農）
○Kazuma Murakami (Grad. Agri., Kyoto Univ.)

近年，CRISPR や mRNA ワクチンなど核酸関連分野の進展は目覚ましい．神経変性疾患の治療において，機能性核酸による分子標的治療は新しい創薬モダリティとして注目されている．アミロイド β (Aβ)，αシヌクレイン，タウ，プリオンなどのアミロイドタンパク質の凝集は，神経変性疾患の病態に関わっており，特に Aβ や αシヌクレインは凝集中間体のオリゴマーが病因本体とされている．核酸アプタマーは標的分子に対して高い結合能と選択性をもつ．これまでにアミロイド凝集体に結合する核酸アプタマーの開発研究が進められているが，標的となるアミロイド凝集体の準安定性や不均一性から，オリゴマー等の特定の凝集体への選択性が低いことは長年の課題である．さらに，治療や診断に応用するためには，脳輸送に適したナノキャリアの開発が不可欠である．本発表では，これらの課題に対する解決策を開発事例を交えて紹介するとともに,[1] 演者らによる Aβ オリゴマーに対する RNA アプタマー[2-4] の診断応用についても議論したい．

The progress in nucleic acid-related fields such as CRISPR and mRNA vaccine has been remarkable, and molecular-targeted therapy using functional nucleic acids is attracting attention as a new drug discovery. Aggregation of amyloidogenic proteins such as amyloid β (Aβ), α-synuclein, tau, and prions is relevant to neurodegenerative diseases, and especially amyloid oligomers as metastable intermediates are responsible for neuronal damages. Nucleic acid aptamers have high binding ability and selectivity to targets. Aggregates of amyloidogenic proteins are among the most challenging targets for aptamer development due to their conformational instability and heterogeneity, the same characteristics that make drug development against amyloids difficult. Recently, chemical tethering of target molecules and advances in high throughput *in silico* studies have been used to overcome some of these challenges. In addition, internalization technologies using fusion to cellular receptors and extracellular vesicles have facilitated brain delivery of aptamers. Here we overview the development of aptamers against amyloids,[1] and discuss with potential utility of RNA aptamers targeting Aβ oligomer for treatment of Alzheimer's disease.[2-4]

1) JBC **2022** (doi: 10.1016/j.jbc.2021.101478); 2) JBC **2020**, *295*, 4870-4880; 3) ACS Omega, **2020**, *5*, 21531-21537; 4) 化学と生物, **2021**, *59*, 216-218.

amyloid, aptamer, nucleic acid

講演番号：3BS-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:15～ ミーティングルーム B

RNA アプタマーの構造・抗プリオン活性・抗アミロイドβ活性及びヒト細胞中における核酸の in-cell NMR

Structure, anti-prion activity and anti-amyloid ß activity of RNA aptamer, and in-cell NMR of nucleic acids in human cells

○片平 正人（京大エネルギー理工学研究所）
○Masato Katahira (Kyoto Univ.)

狂牛病等を引き起こすプリオンタンパク質に対して高い親和性を示す RNA アプタマーが、試験管内分子進化法によって得られた。その立体構造を NMR 法によって決定したところ、4 重鎖構造を骨格とする特異な構造である事が分かった。得られた構造に基づいて、高い親和性がもたらされるメカニズムを説明する事ができた。また、この RNA アプタマーが抗プリオン活性有する事を、細胞を用いてアッセイによって実証した。さらに、これらの結果に基づいて、より高い抗プリオン活性を有する RNA アプタマー(IC_{50}: 100 nM)を創出する事にも成功した(Nucleic Acids Res., 2013 & 2014; Sci. Rep., 2020; Nucleic Acid Therapeutics, 2020)。

プリオンタンパク質は神経細胞表面でアミロイド β タンパク質オリゴマーの受容体として機能し、病因性シグナルを細胞内に伝達してアルツハイマー病を引き起こす事が示唆されている。我々は上記の RNA アプタマーによって、プリオンタンパク質とアミロイドβタンパク質オリゴマーの相互作用を遮断する事ができる事を見出した(FEBS J., 2019)。

我々は、核酸のヒト生細胞中における NMR スペクトルを観測する事に初めて成功し、生細胞中における核酸の構造と相互作用に関する情報を、分子・原子レベルの分解能で直接取得する事を可能とした(PCCP, 2018; Biophys. Rev., 2020; Chem. Commun., 2021)。

We determined the structure of an RNA aptamer that strongly binds to prion protein. The aptamer exhibited a unique quadruplex structure. The high affinity was rationally interpreted on the basis of the structure. Cell-based assay demonstrated anti-prion activity of the aptamer. Furthermore, we succeeded in developing the aptamer with even higher anti-prion activity (IC_{50}: 100 nM).

Prion protein on the neural cell surface is suspected to function as a receptor of the amyloid β oligomer and transmit the disease-related signal into cells. We demonstrated that the RNA aptamer described above can cut the interaction between prion protein and amyloid β oligomer.

We demonstrated the first successful observation of in-cell NMR signals of nucleic acid in living human cells. With this method, the structure and interaction of nucleic acids in human cells can be directly examined at atomic resolution.

RNA aptamer, prion, amyloid ß

講演番号：3BS-05
講演日時、会場：3 月 17 日 17:40～ ミーティングルーム B

核特異的コファクターによるヒト RNA エキソソーム複合体の活性および基質特異性の制御

Activity and substrate preference of the human nuclear exosome complex is modulated via association with specific cofactors

藤原 奈央子[1]、藤田 賢一[1,2]、瀬尾 茂人[3]、○増田 誠司[1,4] ([1]京大生命、[2]藤田医科大総合医科学、[3]大阪大情報科学、[4]近大農)

Naoko Fujiwara[1], Ken-ichi Fujita[1,2], Shigeto Seno[3], ○Seiji Masuda[1,4] ([1]Kyoto Univ., [2]Fujita Health Univ., [3]Osaka Univ., [4]Kindai Univ.)

機能性核酸が生体内でその効能を発揮するためには、安定に存在して生体内分子との相互作用を維持することが必要である。生体内での安定性への最初の障壁となる自然免疫については塩基修飾などである程度の回避に成功しており、このような工夫で分解を免れた分子は、細胞表面あるいは細胞質や細胞核といった細胞内部に取り込まれてその機能を発揮する。一方、細胞内には自己由来の核酸に対する代謝機構も存在しており、導入した外来核酸はここでも分解活性に晒されることが予想される。しかし、高等真核生物では産生される核酸の種類や形態の多様さを反映し、その核酸の代謝機構は複雑化しておりその全容は未だ明らかではない。細胞内での核酸分解の分子メカニズムについてその詳細を明らかにすることができれば、導入した外来核酸の運命にどのように影響するかを予測でき、より効果的な分子開発への展開が期待できる。

本講演では、真核細胞において主要な 3'-5'エキソヌクレーアゼ活性を担うエキソソーム複合体が核内において複数の複合体を形成し、多様な基質核酸分子に対応する分子メカニズムについて紹介する。

The functional RNA molecules, such as antisense oligonucleotides, small interfering RNAs, microRNAs, and aptamers, are now widely used in research and medical fields. To exert their functions efficiently, these RNA molecules need to avoid in vivo decay activity and stably form complexes with endogenous target molecules. In the cells, the RNA decay machinery function on the endogenous transcripts to achieve the exquisite control of gene expression. Once taken up into the cells, exogenously introduced RNA molecules also should be exposed to such machinery. Therefore, understanding the molecular mechanism of the intercellular RNA decay system will enable us to predict and manipulate the fate of RNAs and facilitate the development of RNA molecules with ideal bioactivity. In eukaryotes, a macromolecular complex called RNA exosome is responsible for a major 3'–5' exoribonuclease activity. This section will focus on the function of RNA exosome in the human nucleus and introduce how it forms different complexes with associated factors to deal with various endogenous RNA substrates.

RNA exosome, nuclear RNA decay, poly(A)$^+$ RNA

講演番号：3BS-06
講演日時、会場：3 月 17 日 18:05～ ミーティングルーム B

The role of extracellular vesicles in diagnostics and therapeutics for neurological diseases

○Andrew F. Hill (La Trobe Univ.)

The field of Extracellular vesicle (EV) research has exploded in the last decade and as we learn more about their biology, their translation potential into disease therapy and diagnosis is being rapidly developed. One area of research in which EVs play are role are in neurodegenerative diseases which associate with the deposition of misfolded proteins in the brain. These include Alzheimer's, Parkinson's, prion, and Motor Neuron disease. Our group has shown that EV's contain distinct processed forms of these proteins and that, in the case of prion disease, they contain the transmissible form of the misfolded protein. In addition to their protein content these vesicles have recently been shown to contain genetic material in the form of protein coding (mRNA) and noncoding RNA species. This presentation will discuss some current trends in EV research and outline work in our laboratory in developing EV based biomarkers for neurodegenerative diseases as well as strategies for loading EVs and mimetic nanovesicles with miRNA cargoes as potential therapeutics.

Related articles

Commun. Biol. **2021**, *4*, 411 (doi: 10.1038/s42003-021-01868-x).
J. Extracell. Vesicles **2020**, *10*, e12034.
J. Extracell. Vesicles **2020**, *9*, 1766822.
J. Neurosci. **2019**, *39*, 9269-9273.

extracellular vesicle, exosome, prion

講演番号：3CS-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:10～ ミーティングルーム C

可逆的な抱合スイッチ反応を介したポリフェノールの新たな作用制御機構

New regulation mechanism of polyphenols controlled by conjugation switch

○黒木 勝久、中野 悠、水光 正仁、榊原 陽一 (宮崎大・農・応生科)
○Katsuhisa Kurogi, Yu Nakano, Masahito Suiko, Yoichi Sakakibara (Univ. Miyazaki)

機能性食品成分として注目されているポリフェノールは生体外異物であるため、体内で吸収されると、硫酸基やグルクロン酸基などが付与された抱合体に代謝され、体内を循環する。体内に吸収される多くのポリフェノール種は、この抱合体として主に血中に存在している。これまで、ポリフェノール抱合体は不活性かつ不可逆的な代謝物として認識されてきている。しかし、抱合体の機能やグルクロン酸抱合体の脱抱合などが明らかにされつつある現在では、ポリフェノールの生体調節機能を考える上で、可逆的な抱合代謝は無視できない生体反応である。本発表では、ポリフェノールの可逆的な抱合代謝の機構と機能概念(Conjugation switch)を紹介すると共に、当研究室で最近明らかになったポリフェノール硫酸抱合体の脱抱合反応に関する研究を紹介したい。

ステロイドを除く硫酸抱合体は哺乳動物の脱硫酸化酵素(サルファターゼ)では脱抱合されないと考えられてきた。そこで、我々は 2 種類のサルファターゼに着目して、その酵素諸性質を再検討し、daidzein や genistein 硫酸抱合体に対する脱抱合反応を解析した。その結果、ポリフェノール硫酸抱合体も脱硫酸化を受けること、そして基質特異性が異なることなどが明らかになった。今後の更なる研究を展開することで、生体内でのポリフェノール硫酸抱合体の生理的意義と脱硫酸抱合経路が明らかになるものと考えている。

Polyphenols, functional food ingredients, are typical xenobiotics and metabolized to conjugates by sulfation and glucuronidation. Polyphenols, absorbed in the body, are mainly present as the sulfate/glucuronide conjugates in the blood. Polyphenol conjugates have been recognized as inactive and irreversible metabolites. However, recent studies have suggested that the conjugates may exert the physiological activity and the glucuronide conjugates are deconjugated in body. Therefore, reversible conjugation may play a pivotal role in the regulation of polyphenol-bioactivity. In this session, we would like to introduce the mechanism and functional concept, conjugation switch, of reversible conjugation metabolism of polyphenols, as well as the research on the deconjugation reaction of polyphenol sulfate conjugates, recently observed in our laboratory.

Deconjugation, Sulfatase, Polyphenol

講演番号：3CS-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:35～ ミーティングルーム C

Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols *via* hormesis
○Akira Murakami, Akari Ishisaka, Satoki Suihara, Shiho Kawaguchi, Nao Fujiwara (Univ. Hyogo)

Polyphenols are known to exhibit versatile bioactivities as demonstrated by rodent and human studies, while the mechanisms of action underlying those beneficial functions remain to be fully elucidated. It should be pointed out that phytochemicals, including polyphenols, are substantially recognized to be xenobiotics to animals, and thus they induce protective or adaptive responses in animal cells. We have previously uncovered that zerumbone exhibited the anti-inflammatory effects through the hormesis-related mechanisms (1). Subsequently, we have attempted to identify the initial event which triggers the lipolysis by phytochemicals because there have so far been reported only down-stream responses, *e.g.*, up-regulation of the genes involved in beta-oxidation of fatty acids. Curcumin markedly decreased the amount of triglyceride (TG) in differentiated Huh7 cells, which was accompanied with activation of adipose triglyceride lipase (ATGL) (2). After Huh7 cells were treated with curcumin, the cellular proteins were extracted by using two kinds of lysis buffers with different detergency for dividing them into soluble and insoluble fractions. As the results, curcumin significantly increased the rate insoluble proteins, and 4-phenylbutyric acid, known as a chemical chaperone, diminished the lipolysis effects of curcumin. Those results strongly suggest that protein stress by curcumin plays significant roles in those effects. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which also promoted lipolysis in differentiated Huh7 cells, induced oxidative and protein stresses, leading to the expression of anti-oxidant and phase-2 detoxifying enzymes, and heat shock proteins (3). On the other hand, EGCG decreased the level of intracellular ATP, while glucose uptake from culture media was promoted possibly for energy homeostasis. EGCG also up-regulated the protein expression of ATGL and AMPK. These results suggest that EGCG induces lipolysis to compensate for ATP reduction derived from activation of stress defense systems against its oxidative and protein stresses. Taken together, phytochemicals may partially exhibit their bioactivities through hormesis-related mechanisms, and this hypothesis is supported by the fact that they often exert side-effects when given at high doses.
References: (1) Igarashi Y, et al. PLoS One. 2016;11:e0161282. (2) Valentine C, et al. J Clin Biochem Nutr. 2019; 65:91-98. (3) Suihara S, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2021;85:411-420.

polyphenol, catechin, hormesis

講演番号：3CS-03
講演日時、会場：3 月 17 日 17:05～ ミーティングルーム C

ポリフェノール抱合代謝物の調製技術開発と機能発現解明への応用

Development of enzyme-based synthetic platform of polyphenol conjugates for elucidation of molecular mechanism of functional foods in physiological process

○生城 真一[1]、西川 美宇[1]、栗原 新[2] ([1]富山県大工、[2]近畿大生物理工)
○Shinichi Ikushiro[1], Miyu Nishikawa[1], Shin Kurihara[2] ([1]Toyama.Pref.Univ., [2]Kindai Univ.)

食品中機能性成分であるポリフェノール化合物は複数の水酸基を有しており、肝臓や小腸上皮における異物代謝酵素（UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）や硫酸転移酵素（SULT）など）によってグルクロン酸や硫酸基が転移された抱合体に変換され、胆汁や尿中に排泄される。特に胆汁中へ排泄された抱合体は腸管に排出された後、腸内細菌由来の加水分解酵素によって脱抱合を受けて再吸収（小腸下部から大腸）によって生体内へ移行する（腸肝循環）。機能性成分の代謝による構造変換は自身が有する機能性にも大きく影響を及ぼすことが明らかにされており、そのグルクロン酸抱合や硫酸抱合の位置によって抗酸化能が大きく変動することが知られており、異物代謝酵素による変換反応が機能性を評価する上でも重要であるとの認識が高まっている。さらに消化管における機能性成分の吸収代謝および腸内細菌による脱抱合過程を含めて総合的に評価する必要性があるとの報告がなされている。本シンポジウムでは生体に取り込まれた機能性成分の代謝物を同定および定量するために異物抱合酵素発現酵母を用いた代謝物の網羅的な合成プラットフォームの確立とともに、抱合代謝物を用いた腸内細菌による脱抱合能評価により機能性成分動態に対する腸肝循環の寄与を明らかにする取り組みについて述べる。

Xenobiotic compounds including drugs or dietary chemicals are conjugated by xenobiotic phase II enzymes, UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and sulfotransferases (SULTs) isoforms, and its biological effects depend, in partly, on the formation of the conjugates. Most of functional ingredients out of the food are confined to the living body as some metabolites, which were transformed by UGT and/or SULT, but the details of the onset of function mechanism as the metabolites are not clarified. Enzyme-based synthetic platform of polyphenol conjugates was established using xenobiotic metabolizing enzymes-expressing budding yeast cell. Conjugates of several polyphenol were synthesized to glucuronides, sulfates, and methyl conjugates necessary for elucidation of molecular mechanism of functional foods in physiological process via conjugation-deconjugation process of dietary compounds. Using synthesized conjugates of several polyphenols, microbiota-dependent deconjugation in entero-hepatic circulation were evaluated to contribution of bioavailability of polyphenols in vivo.

polyphenol, xenobiotics, microbiota

講演番号：3CS-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:35～ ミーティングルーム C

フラボノイドの代表格ケルセチンは摂取後どのような抱合体として全身をめぐるのか？
What is a major quercetin-conjugate in plasma and urine after quercetin ingestion?

○田中 誠也（東京海洋大・食品）
○SEIYA TANAKA (Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.)

ポリフェノールの一種フラボノイドは、体内で抗がん作用、抗動脈硬化作用、抗酸化作用など多数の生理作用を有する。しかし、摂取されたフラボノイドは生体内でどのような形態に代謝され、生理作用を発揮しているかは明らかでない。フラボノイドが体内に吸収されると、薬物代謝反応である抱合化やメチル化を受ける。ケルセチンは 5 つの水酸基のうち主に 4 つの水酸基で代謝反応が起こるため、生体内で多種多様な抱合体が存在する。過去の研究でこれら抱合体の種類および異性体により生理作用が異なることが報告されており、抱合体を個別に測定し解析することが求められている。

これまでの血中ケルセチン抱合体の分析は、脱抱合酵素を用いてアグリコンへと加水分解し、抱合体全量として定量する手法が広く用いられてきた。しかしこの手法では脱抱合処理により抱合化の種類や位置が把握できず、生理活性を有するケルセチン抱合体を特定することはできない。そこで我々は酵素処理を用いずに LC/MS/MS を用いて直接ケルセチン抱合体を測定する手法を確立した。この分析法を用いて、ケルセチン配糖体摂取ラットの血中抱合体を詳細に解析した。血中の主要な代謝物は、グルクロン酸抱合と硫酸抱合を共に持つ“ヘテロ抱合体”であり、その抱合化部位を初めて同定し、血中および尿中のヘテロ抱合体を定量した。また門脈および頸静脈にカテーテルを留置したラットを用いて、それぞれの血中ケルセチン抱合体を *in vivo* でモニターすることで、腸における抱合化反応の解析も行った。本シンポジウムでは、ケルセチン配糖体摂取後ラットにおける血中ケルセチン関連物の存在形態、およびフラボノイド抱合体の分析手法について最新の研究結果も含めて紹介する。

Quercetin has numerous physiological properties, such as anticancer, anti-arteriosclerotic and antioxidant activities. The absorbed quercetin is metabolized to glucuronides and sulfates by phase II metabolizing enzymes in small intestine, liver and kidney. We established a direct analysis method of quercetin conjugates using LC/MS/MS to identify type and position of conjugation. Hetero-conjugates of quercetin, which have both glucuronide and sulfate conjugates, are major metabolites in rat plasma after quercetin ingestion. We firstly identified the hetero-conjugates, which are quercetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate and isorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate in rat plasma. These two hetero-conjugates were accumulated in plasma compared to urine after quercetin administration. We will show the conjugation profiles of quercetin in plasma and urine after quercetin ingestion including latest research results.

Quercetin, Conjugates, LC/MS/MS

講演番号：3CS-05
講演日時、会場：3 月 17 日 18:05～ ミーティングルーム C

生体応答によるポリフェノールの機能性変化：抱合代謝物の生理作用

Changes of functional properties of polyphenols by biological responses: Biological activities of conjugated metabolites

○西川 美宇、生城 真一（富山県大・工）
○Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro (Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

食事由来のポリフェノールは抗酸化、抗炎症、および高肥満作用など多岐にわたる健康作用を示す一方で、我々の生体はこれらの非栄養性食品因子を異物として認識し体外へ排泄するための機構を備えている。摂取したポリフェノールは代表的な異物代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）や硫酸転移酵素（SULT）によってグルクロン酸や硫酸基が付加された抱合代謝物に変換され、一般的にこれらの抱合代謝物は親化合物と比較して生理活性が低下するとともに、極性を増すことで体外へ排泄されやすくなると考えられている。しかし一部のポリフェノール代謝物は体内に留まりやすいことも報告されており、ポリフェノールの機能発現メカニズムを解明するためにはアグリコンのみならず抱合代謝物の体内動態および機能性評価が重要となる。

演者らは、ヒト体内で生じるポリフェノール抱合代謝物の合成法を確立し、種々の抱合代謝物を用いて代謝動態運命や機能性を評価してきた。ポリフェノールは化学構造上、抱合代謝物の位置異性体を生じるが、これらの異性体間で生理活性や安定性が異なることを見出している。本演題では、抱合代謝物の動態運命に基づいてポリフェノールの機能発現メカニズムを考察するとともに、本来は生体外異物であるポリフェノールに対する生体応答が機能発現にどのように関わっているのか、その生理的意義について考えたい。

While dietary polyphenols exhibit a wide range of health effects, our body recognizes these non-nutritive food factors as xenobiotics, which leads conversion into conjugated metabolites by xenobiotic metabolizing enzymes such as UGTs and SULTs. In general, these conjugated metabolites are less biologically active and more water soluble than the parent compound for rapid excretion from the body. On the other hand, it has been reported that some polyphenol metabolites are stably present as major forms of systemic circulation. Thus, it is important to evaluate the pharmacokinetics and functionality of conjugated metabolites in order to elucidate the mechanism of functional expression of polyphenols.

In this presentation, I would like to talk about pharmacokinetic profiles and biological activities of conjugated polyphenol metabolites, and to consider the physiological significance of biological response to dietary polyphenols, which brings us consequent health beneficial effects.

polyphenols, xenobiotic　metabolism, conjugated metabolites

講演番号：3DS-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:05～ ミーティングルーム D

Transmembrane like channel 4 を介した新規塩味受容メカニズム

Transmembrane like channel 4 is involved in salty taste reception

○成川 真隆（京都女子大家政）
○Masataka Narukawa (Kyoto Women's Univ.)

塩味は主に Na^+によって引き起こされる。しかし、Cl^-も味質に影響するため、純粋な塩味を呈する物質は NaCl のみである。塩味は食事から得る満足感に大きく寄与する一方で、塩分の過剰摂取は様々な疾病の原因となってしまう。そのため、減塩に対する取り組みが広く実施されている。しかし、単純な食塩使用量の低減では食事の満足感も低下してしまう。そのため、有効な減塩法は未だ確立できていない。その理由として、塩味の受容機構の詳細が不明であることがあげられる。

塩味は利尿薬アミロライドに対する感受性の違いから、アミロライド感受性（AS）と非感受性（AI）成分に分けられる。このうち、AS 成分の受容には上皮性 Na チャネルを介した分子機構が関与すると考えられている。一方、多くの研究が実施されているものの、AI 成分の受容機構には不明な点が多い。

最近、我々は機能未知であった膜タンパク質 Transmembrane channel-like 4（TMC4）が AI 塩味受容に関わる分子であることを見出した。AS と AI 塩応答にはそれぞれ茸状乳頭を支配する鼓索神経、有郭と葉状乳頭を支配する舌咽神経が関与することが知られている。舌において TMC4 は有郭・葉状乳頭で強く発現していた。また、TMC4 を欠損させたマウスで塩味応答を観察したところ、舌咽神経において有意にその応答が低下した。この結果は TMC4 が AI 塩応答で機能する分子であることを示唆する。

興味深いことに、ヒトの塩味感覚では AI 成分が占める割合が AS 成分よりも高い。そのため、減塩という観点からも AI 塩味受容メカニズムの全容解明が待たれている。TMC4 は AI 塩味受容メカニズム、ひいては塩味受容機構の全容を解明する上で Key molecule になる可能性がある。なお、動物を用いた実験は 2017 年以前に実施した。

Salty taste is a basic taste evoked when both sodium and chloride ions are present in the oral cavity. Salty taste is an important contributor to a satisfying sense from eating. Salty taste comprises amiloride-sensitive (AS) and amiloride-insensitive (AI) components based on the difference in amiloride sensitivity. Although epithelial sodium channel is known to participate in the reception of AS salty taste, the molecule involved in AI salt taste detection has been unknown. We have identified this molecule to be transmembrane channel-like 4 (TMC4). In this symposium presentation, I will discuss the expression of TMC4 and its role in the detection of salty taste.

Salty taste, Transmembrane like channel 4, Tmc4 knock-out mice

講演番号：3DS-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:25～ ミーティングルーム D

電気生理学的手法を用いた新規クロライドチャネル TMC4 の分子機能解析

Analysis of molecular function of new chloride channel, TMC4

○笠原 洋一（東大農）
○Yoichi Kasahara (Tokyo Univ.)

Transmembrane channel-like（TMC）ファミリーは、細胞内カルシウム感受性クロライドチャネルである Ano1 に代表されるアノクタミンスーパーファミリーに属する。哺乳類では TMC1-8 の 8 種が確認されている。近年の遺伝子解析研究から TMC ファミリーは、生理的に重要な役割を持つことが示唆されている。しかしながら TMC1 と TMC2 が難聴に関与する機械刺激性陽イオンチャネルであるという報告を除き、その他の TMC ファミリーの分子機能は不明であった。本研究では、電気生理学的手法を用いて塩味受容に関与することが示唆された TMC4 分子の機能解析を行った。

結果、TMC4 は電位依存性クロライドチャネルであることが示された。また TMC4 のユニークな機能として、グルコン酸イオンも透過する程の大きなポアを持つことや TMC4 の活性化の駆動力は、細胞の脱分極であり、細胞内 Ca^{2+}濃度に影響を受けないことが示唆された。ヒトの TMC4 も同様の機能を持つことがから、さらに研究を行った結果、TMC4 は“塩味と温度”、“塩味と酸味”、“塩味と非ステロイド性抗炎症薬”との関係においてヒトの官能と一致することが示唆された。

以上のことから TMC4 は、塩味受容に関与する初めてのクロライドチャネルであり、減塩効果を持つ物質のスクリーニングをはじめ食品開発における新たなツールとして期待される。

Transmembrane channel-like (TMC) refers to a family belonging to the anoctamine(ANO) superfamily. One of the representative molecules of this family is ANO1, which is an intracellular calcium-sensitive chloride channel. Eight species of TMC1-8 have been identified in mammals. In recent years, genetic analysis has suggested that the TMC family has a physiologically important role. However, the molecular functions of the other TMC families were unknown, except for reports that TMC1 and TMC2 are mechanosensitive cation channels involved in deafness. In our study, we analyzed the molecular function of TMC4 using the whole-cell patch-clamp method and found that TMC4 is a voltage-dependent chloride channel. Also, TMC4 was involved in human salt taste reception of temperature, acid, and drug effects. Thus, TMC4 is the first chloride channel involved in salt taste reception, and is expected to be newly contribute to taste science in general.

Taste receptor, Salty taste, Ion channel

講演番号：3DS-03
講演日時、会場：3 月 17 日 16:50～ ミーティングルーム D

新規 Cl^-チャネル TMC4 の味細胞活動電位における役割に関する数理モデル解析

A simulation analysis of the role of a novel Cl^- channel, TMC4, in action potential generation of taste cells

○竹内 綾子 [1,2] ([1] 福井大医　統合生理学、[2] 福井大　ライフセンター)
○Ayako Takeuchi[1,2] ([1]Integr. Physiol. Fac. Med. Sci. Univ. Fukui, [2]Life. Innov. Univ. Fukui)

Transmembrane channel-like 4（TMC4）は、有郭乳頭ならびに葉状乳頭の味蕾に発現する電位依存性 Cl^-チャネルであり、外向き整流性を示す。*Tmc4* 欠損マウスでは高濃度の NaCl および KCl 刺激に対する舌咽神経応答が減弱することから、TMC4 は高濃度の塩味受容に関与することが強く示唆される。本研究では、TMC4 による塩味受容のメカニズムを明らかにするために、味細胞活動電位数理モデルを構築し、TMC4 の寄与を解析した [1]。

Kimura らによる Type II 味細胞数理モデル [2] をベースとして、実験データをもとに各イオンチャネルの数式を精緻化するとともに、新たに TMC4 を数式化し統合した。得られたモデルは味細胞活動電位など種々の実験データ [2, 3] を良く再現できた。TMC4 の発現量を段階的に変化させたシミュレーション解析から、TMC4 が活動電位の再分極速度を加速させること、これによって発火頻度を増大させることが予測された。従って、TMC4 は発火頻度を増大させることで、塩味受容を増強させると考えられた。

Transmembrane channel-like 4 (TMC4) is a voltage-dependent Cl^- channel with outward rectification, which is expressed in circumvallate and foliate papillae. Since glossopharyngeal nerve response to high-concentration of NaCl and KCl was attenuated in *Tmc4* deficient mice, it was suggested that TMC4 is involved in high-concentration salt taste reception. In order to clarify the mechanism underlying TMC4-mediated salt taste reception, we developed a mathematical model of action potential of taste cell and analyzed the role of TMC4 in the action potential generation[1].

Based on the Type II taste cell model by Kimura et al.[2], equations for several ion channels were modified according to experimental data and an equation for TMC4 was newly implemented. The model well reproduced various electrophysiological experimental data[2, 3]. The simulation analyses with various expression levels of TMC4 showed that TMC4 accelerated the action potential repolarization, thereby increasing the firing frequency. Therefore, it was suggested that TMC4 contributes to salt taste reception by accelerating firing rate.

References

1. Kasahara et al., *J Physiol Sci*, 71, 23, 2021
2. Kimura et al., *Eur J Neurosci*, 39, 24-34, 2014
3. Ma et al., *J Neurophysiol*, 117, 1865-1876, 2017.

TMC4, simulation, taste cell

講演番号：3DS-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:15～ ミーティングルーム D

味覚受容体を用いた細胞アッセイによる呈味評価とその応用

Taste evaluation systems by the cell-based assay using human taste receptors and those application

○三坂 巧（東大院農）
○Takumi Misaka (The Univ. Tokyo)

G タンパク質共役型受容体に属する甘味・うま味・苦味受容体のリガンド同定や機能解析においては、培養細胞発現系を用いたアッセイ法が汎用されている。この解析では、哺乳類培養細胞に味覚受容体およびキメラ G タンパク質を一過的・安定的に発現させ、受容体活性化に伴って生ずる細胞内カルシウム濃度上昇を、蛍光指示薬・発光タンパク質等により検出する。この手法により、官能評価に依らない呈味強度の評価が可能となるだけでなく、受容体に点変異を導入した変異体を用いた解析を実施することで、味物質受容における詳細な分子メカニズムも明らかになってきた。

このような解析を効率的に実施するためには、高感度で安定性の高い味覚受容体アッセイ技術が必須となる。我々はこれまでに、ヒト甘味受容体を安定発現する甘味センサー細胞の構築（*Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 2010）を端緒とし、甘味増強物質・抑制物質の同定とその作用メカニズム（*Food Chem.,* 2012; *PLoS One,* 2019; *Chem. Senses,* 2020）、人工甘味料の受容メカニズムの構造学的な理解（*PLoS One,* 2012）などの成果を挙げてきた。また、うま味受容体の応答測定法に独自の工夫を加え、高感度な検出法を確立しただけでなく、うま味受容体のリガンド選択性を規定する複雑な分子メカニズムや、動物種間におけるリガンド多様性も明らかにできた（*J. Biol. Chem.,* 2013; *Curr. Biol.,* 2021）。本演題では一連の解析で得られた知見を紹介するとともに、このような技術を食品開発へ適用する可能性についても発表する。

After mammalian taste receptors belonging to GPCR family (for sweet, umami, and bitter tastes) have been identified, progress has been made in developing effective methods of functional characterization of the receptors. The responses of cultured cells expressing human taste receptors are broadly applicable indicators in evaluating gustatory intensities for basic tastes. Effective usage of such evaluation systems should not only provide information regarding taste intensities as perceived by humans, but also make possible the characterization of detailed molecular mechanisms for tastant recognition. In this session, the recent progress in our research group for these taste receptors will be introduced. The objective quantification system of taste intensities would also be useful for product development and quality control in the food industry.

taste receptor, cell-based assay, umami

講演番号：3DS-05
講演日時、会場：3 月 17 日 17:40～ ミーティングルーム D

味機能ペプチド解析への合成ライブラリーの活用

Application of a synthetic peptide library for the analysis of taste-function peptides

○伊藤 圭祐（静岡県大食栄）
○Keisuke Ito (Univ. Shizuoka)

ペプチドはその構造的多様性から潜在的に多くの機能を持つことが期待でき（例：5 アミノ酸から構成されるペプチドは 3,200,000 通り以上存在する）、実際に食品中では栄養、感覚、生体調節などの様々な機能に寄与している。ペプチドの特徴として化学合成法が確立されていることが挙げられる。この優位性を生かして任意の合成ライブラリーを構築することで、望む機能を持つペプチドの効果的な探索が可能となる。本発表では、味機能ペプチドの探索に関する合成ペプチドの活用例を紹介する。

タンパク質は一般的に味を持たないが、最近我々は、甘味タンパク質であるリゾチームやソーマチンがコク味受容体（CaSR）を活性化することを発見した。タンパク質性の CaSR 活性化成分は報告されていないことから、CaSR 活性化メカニズムの解析を進めた。まず初めに、リゾチームの全アミノ酸配列を網羅する合成ペプチドライブラリーを構築し、カルシウムイメージング法により CaSR 応答を評価した。1 アミノ酸レベルの精密スクリーニング、及び続く Deletion 解析により、リゾチームよりも 12 倍高活性な分子表面ペプチドを見出した。Alanine-scanning により CaSR 活性化に寄与するアミノ酸残基を特定し、さらに各アミノ酸の Site-saturation 解析によって、リゾチームよりも 80 倍高活性な新規ペプチドの創製にも成功した。興味深いことに、本ペプチドは甘味受容体（T1R2/T1R3）に対しては阻害剤として作用したことから、Class C GPCR である CaSR と T1R2/T1R3 に対して共通するメカニズムによって結合するものの、その作用詳細は異なることが示唆された。タンパク質の機能は立体構造に依存することが多いが、一連の研究結果は、ペプチド領域を網羅的に精査することで、元の機能を超える新たな分子の創出も可能であることを示している。このような網羅的合成ペプチドを活用した相互作用解析は、様々なタンパク質に適用できる。

本発表では、機能性食品成分と結合するペプチドや、苦味受容体（TAS2Rs）の働きを抑制するペプチドなど、苦味マスキングペプチドの開発例も併せて紹介したい。

Peptides have many potential functions due to the structurally diversity. Since peptides can be chemically synthesized, a synthetic library can be easily constructed and functional peptides can be effectively screened. In this presentation, we will introduce the application of synthetic peptides related to the screening for taste-functional peptides.

taste, peptide, screening

講演番号：3DS-06
講演日時、会場：3 月 17 日 18:05～ ミーティングルーム D

スーパーコンピュータによる呈味物質と受容分子の作用機序とその応用

Interaction mechanism between ligand and receptor molecules by supercomputer

○益田 勝吉（サントリーグローバルイノベーションセンター（株））
○Katsuyoshi Masuda (SIC)

我々は *in silico* screening によって、味覚受容体のアゴニスト候補を天然物ライブラリーから探索した。さらにこれらの候補化合物について、カルシウムイメージングによるアゴニスト活性評価を行った。本シンポジウムでは、新規アゴニストを見出したので紹介したい。

In this study, in silico screening was used to explore natural products that may be agonists of taste receptor activation. Furthermore, we evaluated the taste receptor agonist activity of these compounds by calcium imaging. In this symposium, we would like to introduce a novel agonist that we found.

in silico screening

講演番号：3ES-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:00～ ミーティングルーム E

trans-ポリイソプレン合成酵素の発見とそれを用いた脂肪滴上でのポリマー合成

Identification of *trans*-polyisoprene synthase and its application for the ultralong-chain trans-polyisoprene biosynthesis on lipid droplets

○高橋 征司（東北大・院・工）
○Seiji Takahashi (Tohoku Univ.)

カーボンニュートラル社会の実現に向け，ポリマー材料の生物生産系の開発が期待されている．植物による天然ゴム（*cis*-1,4-ポリイソプレン）生産は，産業的に確立された機能性ポリマー生物生産系の代表格である．また，植物が生産する *trans*-1,4-ポリイソプレンも熱可塑性材料として産業利用の歴史を有する．我々はこれまでに天然ゴム生合成酵素の同定と生合成機構解明に成功しているが，最近，*trans*-1,4-ポリイソプレン合成酵素（tPT）の同定にも成功し，組換え型酵素を用いて分子量 10^4 を超える超長鎖ポリマーを合成できることを初めて実証した．これらの酵素遺伝子の異種発現により代替生物内におけるポリイソプレノイド合成が可能となると考えられるが，一般に，疎水性化合物の高蓄積は細胞機能に悪影響を与える．そこで我々は，真核生物が普遍的に有する脂質一重層膜オルガネラである脂肪滴（lipid droplet，LD）の膜上に外来酵素を導入する手法を開発し，疎水性生成物を LD 内部に隔離貯蔵させることを試みた．LD に導入することで，tPT の反応生成物の平均分子量は約 9 倍に増大したことから，生成したポリイソプレノイドが LD 内部に取り込まれることで縮合反応の持続性が向上したと考えられる．これは熱可塑性炭化水素ポリマーの *in vitro* 酵素合成の初めての報告例である．また，LD への酵素導入手法は多様な疎水性有用化合物の高生産に広く適用可能である．

Toward realization of a carbon neutral society, development of biological production systems for polymer materials is desired. Production of natural rubber (*cis*-1,4-polyisoprene), in plants is representative of the biological production system of functional polymers at industry level. In addition, *trans*-1,4-polyisoprene from plants also has a history of industrial use as a thermoplastic material. We have successfully identified natural rubber biosynthetic enzymes. Recently, we have also succeeded in identification of *trans*-1,4-polyisoprene synthase (tPT), demonstrating *in vitro* synthesis of ultralong-chain polymers with a molecular weight of $>10^4$ using a purified recombinant enzyme. To overproduce polyisoprenoids in alternative organisms by heterologous overexpression of the tPT, avoiding cellular dysfunctions, we have developed a method to introduce a foreign enzyme onto lipid droplets (LDs) which enable to accommodate the hydrophobic products. The average molecular weight of the reaction products of the tPT introduced into LDs were about 9 times higher than those of the purified enzyme, suggesting that the products were incorporated into the LD, which might improve the sustainability of the condensation reaction. This method to assembly external proteins on LDs is anticipated to be widely applicable for overproduction of various hydrophobic high-valued compounds.

polyisoprenoid, lipid droplet, natural rubber

講演番号：3ES-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:25～ ミーティングルーム E

植物サポニン生合成に関わる新たな糖転移酵素の発見と組換え酵母でのサポニン生産

Biosynthesis of a sweet triterpenoid saponin - gene discovery and pathway reconstruction in yeast

○關 光[1,2] ([1]阪大院・工・生物工学、[2]阪大・先導的学際研究機構)
○Hikaru Seki[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol. Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., [2]OTORI, Osaka Univ.)

植物は多様なトリテルペン配糖体（サポニン）を生産し、それらの中には生薬の主活性成分とされる化合物も多い。グリチルリチンは生薬「甘草」に含まれる主活性成分であり、抗炎症、肝庇護作用など多様な薬理作用を持つサポニンである。グリチルリチンはまた、砂糖の 150 倍以上の甘さを持つことから天然甘味料としても使用される。

最近私達は、グリチルリチン生合成経路において唯一未同定となっていた糖転移酵素を同定した。これまでの数多くの研究から、トリテルペンを含む多様な植物低分子化合物の配糖体化は、UDP 糖依存型配糖体化酵素（UGT）と呼ばれる一群の酵素ファミリーが触媒することが定説となっていたが、トリテルペン骨格にグルクロン酸（単糖の一種）を転移する配糖化酵素については未解明だった。今回私達は、UGT とは全く異なるセルロース合成酵素スーパーファミリーに属する機能未知タンパク質が多くのサポニンの生合成において鍵となるトリテルペン骨格にグルクロン酸を転移する配糖化酵素であることを初めて明らかにした[1,2)]。さらに、本遺伝子を含む 7 個の植物遺伝子を出芽酵母に導入することで、グリチルリチンの *de novo* 合成が可能であることを示した。組換え酵母におけるサポニンの生産性向上に向けたアプローチについても議論したい。

Triterpenoid glycosides (saponins) are a structurally diverse class of plant-specialized (secondary) metabolites consisting of one or more sugar moieties attached to triterpenoid scaffold. Several triterpenoid saponins act as economically important molecules that are used as pharmaceuticals and food additives. Glycyrrhizin is a saponin derived from licorice roots (*Glycyrrhiza* spp. in the family Fabaceae) that is used as a natural sweetener and as a crude drug. In this talk, I will present recent progress in the discovery of glycyrrhizin biosynthetic genes, including a cellulose synthase superfamily-derived glycosyltransferase (CSyGT) as a newly discovered class of triterpenoid glycosyltransferase. Finally, reconstruction of the whole glycyrrhizin synthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* will also be introduced.

1) Chung SY. and Seki H. *et al.*, Nature Communications. 11, 5664 (2020).
2) 關ら, ファルマシア 57, pp710-714 (2021).

saponin, natural sweetener, glycosyltransferase

講演番号：3ES-03
講演日時、会場：3 月 17 日 16:50～ ミーティングルーム E

超天然イソプレノイド生合成の進化デザイン

Laboratory evolution of biosynthetic routes for "ex-natural" terpenoids

○梅野 太輔[1]、尾島 匠[2]、関 貴洋[2]、大谷 悠介[2]、河合 繁子[2] ([1]早稲田大応化、[2]千葉大工)
○Daisuke Umeno[1], Takumi Ojima[2], Takahiro Seki[2], Yusuke Otani[2], Shigeko Kawai[2] ([1]Waseda Univ., [2]Chiba Univ.)

イソプレノイドは生物相で様々な生理活性を担うが, これらの産業利用においては, 香料, 潤滑油, 化粧品ベース材料, 樹脂材料, 燃料, 光学デバイス素材など, これらの特殊物性に依るものが多い. 私たちは, イソプレノイドがカバーする物理物性を拡張すること，すなわち，自然界のイソプレノイドにはない各種物性（分光特性，油質，レオロジー，燃料特性など）をもつ非天然骨格イソプレノイド分子の生合成に取り組んできた. なかでも分子骨格サイズは炭化水素の物性に特に大きな影響を与える．これまでに，天然のカロテノイドやスクアレン，ボトリオコッセンなどの生合成経路を C50～C60 の骨格サイズにまで定向進化させることに成功している．本報告では，これら不揮発テルペンの骨格形成経路を新たに実験室内進化させ，骨格サイズの小さい方向への拡張，さらには分岐や非対称性の導入によって，イソプレノイドの物性空間を人工的に拡張する試みについて紹介したい．最後に，こうして生み出した人工イソプレノイド生合成経路を共存させることによって，タンパク質のデバイス特性を拡張する試みについても報告する.

Isoprenoids offer a variety of physiological activities in biota, but many of their industrial applications are not limited by them; there are huge demands on isoprenoid molecules as fragrances, lubricants, cosmetic base materials, resins, fuels, and optical devices. We have been expanding the physical properties covered by isoprenoids. Here, isoprenoid pathways are laboratory-evolved into those with non-natural skeletal structures (e.g., spectroscopic properties, oil quality, rheology, fuel properties) not found in natural isoprenoids. Previously, we have created non-natural pathways toward Squalene, Botryococcus, and carotenoid with C50-C60 backbones. Finally, we report our recent attempt to extend the device properties of the protein by co-expressing the artificial isoprenoid biosynthetic pathways with different skeletal size (i.e. physical properties).

carotenoid, device genetics, synthetic biology

講演番号：3ES-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:15～ ミーティングルーム E

なぜ植物は多くの specialized metabolites をつくるのか？モミラクトンが持つ幅広い生物活性の謎にせまる

Impacts of bioactive terpenoids of rice on living companions in phytobiomes

○岡田 憲典（東大農アグテック）
○KAZUNORI OKADA (UTokyo AgTECH)

植物は動物と違って動けない。そこで、自らの生存に有利に働くような多種多様な二次代謝産物（Specialized metabolites）を生産し巧みに生き延びている。ジテルペン化合物のモミラクトン（momilactone A、B）もその一つであり、病原菌感染時の化学防御物質として、また、近傍の植物の生育を妨げるアレロパシー物質として、さらには動物細胞における細胞増殖抑制物質としても機能する。興味深いことに、モミラクトンを生産する植物（イネ、イヌビエ、ハイゴケ）は全て momilactone A 生合成関連遺伝子をクラスターとして維持しており、同調的な発現制御を受けている。このような背景のもと、これまで遺伝子クラスターの起源や発現制御機構に興味を持ち研究を進めてきたが、植物にとってモミラクトンを持つことにどれだけメリットがあり、周辺の生物群集に対してどれだけのインパクトをもっているのか？ という疑問を抱くようになった。*In vitro* での実験では確かに抗菌活性やアレロパシー活性が認められるが、実環境レベルではどうなのか、という応用面を考える上で本質的な問いである。本発表では、植物、動物、微生物に対する momilactone B の生物活性とその作用機作の解明に向けた最近の研究について紹介し、phytobiome でのモミラクトンの機能について考えてみることで、次世代を見据えるイソプレノド研究の可能性について議論を深めたい。

Plants cannot escape from the complex environmental threats consist of both biotic and abiotic stresses. Therefore, they are skillfully surviving by producing and utilizing a variety of beneficial secondary metabolites called “Specialized metabolites”. Momilactones (momilactone A and B) is a diterpene compounds known as a chemical defense substance against pathogenic microorganisms during infection, as an allelopathic substance preventing the growth of neighboring plants, and as a substance that induces inhibition of mammalian cells proliferation. Momilactones is produced in the genus *Oryza* and one types of barnyardgrass and moss. Interestingly, these different plants all maintain the momilactone A biosynthetic genes as a functional gene cluster on their chromosomes, holding synchronous transcriptional expression. We have focused on the evolutionary trajectory of the clustered genes and its regulation, but also interested in the mode of action and impact of momilactones in phytobiomes. Although *in vitro* effects of momilactones are evident, simple questions remain: what is happening under environmental conditions, and how much of impact would momilactones give to the surrounding biological communities? Here, I would like to introduce the bioactivities of momilactones on various organisms and discuss its mode of action and the possibility of introducing it into eco-friendly agricultural systems.

momilactones, allelopathy, defense

講演番号：3ES-05
講演日時、会場：3 月 17 日 17:40～ ミーティングルーム E

生合成経路の再構築と再設計による多様なメロテルペノイド天然物の創製研究

Production of structurally diverse meroterpenoids through biosynthetic pathway engineering

○浅井 禎吾（東北大院薬）
○Teigo Asai (Grad. Sch. Pharma. Sci., Tohoku Univ.)

糸状菌が生産するメロテルペノイドは、構造多様性に富み、また、有用な薬理活性天然物の宝庫であり、重要な医薬資源である。メロテルペノイドの生合成経路は、イソプレンユニットの付加と環化による骨格形成段階と、様々な酵素による修飾段階からなる。また、骨格形成段階を共有していても、修飾段階の違いから多様な構造が生み出される。このような生合成的な特徴は、生合成経路の再設計による人工生合成経路の構築や″天然にはプログラムされていない天然物″の創出に適していると考えられる。そこで、我々は、糸状菌のデカリン含有ジテルペノイドピロン（DDP）類に着目し、ゲノムマイニング と麹菌異種発現系を用いた生合成経路の再構築と再設計により、構造多様な DDP 類の創製を目指した。ゲノムマイニングにより 5 属の糸状菌ゲノム上に DDP 類の推定生合成遺伝子クラスター（生合成経路）を見出し、それらを材料として、5 つの天然型経路および 5 つの人工経路を麹菌内に構築し、合計 22 種（新規類縁体 15 種）の DDP 類の創製に成功した。創製した DDP 類について、それぞれ抗ウイルスや各種がん幹細胞の増殖抑制等、種々の薬理活性を評価し、強力な活性物質を発見するとともに、簡単な構造活性相関を見出した[1]。本発表では、上記の研究結果の詳細を発表するとともに、異種発現系を用いて構築した化合物ライブラリーの特徴や、創薬研究における可能性についても議論したい。

Decalin containing diterpenoid pyrone (DDP) is a fungal natural product family including a wide range of bioactive compounds such as immunosuppressive subglutinol A. We focused on DDPs as a useful source for drug discovery. In this study, we constructed 5 natural and 5 artificial biosynthetic pathways from 5 DDP biosynthetic gene clusters in model host, *Aspergillus oryzae* and successfully generated 22 (15 new analogs) DDP natural products. We evaluated their biological activities and found various potent compounds such as anti-viral compounds. This result suggests that meroterpenoid is an attractive target to generate pharmaceutical important natural product library by redesign of biosynthetic pathways.

1) Tsukada, K., *et al*., *Nature Commun.* 11, Article number: 1830 (2020).

Meroterpenoid, Biosynthesis, Genome mining

講演番号：3ES-06
講演日時、会場：3 月 17 日 18:05～ ミーティングルーム E

龍涎香主成分アンブレインの人工生合成系構築と生物活性解析

Construction of an artificial system for ambrein biosynthesis and investigation of some biological activities of ambrein

○佐藤 努（新潟大院自然）
○Tsutomu Sato (Niigata Univ.)

マッコウクジラから得られる龍涎香（りゅうぜんこう）は、香料や伝承医薬として紀元前の昔から用いられてきた。龍涎香はクジラの中でも極わずかの個体でしか得られないことや、商業捕鯨の対象となっていない中にあって、入手が極めて困難な幻の香料・伝承医薬として珍重されている。龍涎香の香気成分は古くから研究がなされ、トリテルペンであるアンブレインの酸化分解物であることが調べられている。香り以外での生物活性もいくつか調べられてはいるが、龍涎香そのものが手に入らないために、龍涎香に秘められた香りと生物活性についての研究は遅々としているのが現状である。

これまでに、我々は細菌由来の酵素を改変することによって、アンブレインを生合成する酵素を作り出すことに成功した[1-3]。そのアンブレインを利用して、香気化合物への変換を達成するとともに、これまでに見出されていないアンブレインの生物活性も明らかにした[2,3]。さらに、酵素の立体構造・触媒機構の解明を行うことで、生合成によるアンブレインの量的供給経路を確立しつつある[4]。現在、酵素改変等によって、天然を凌ぐ香り・生物活性を持つ人工龍涎香（非天然アンブレイン類縁体とその分解香気化合物）を創出することを目指した研究を行っている。これにより、「イソプレノイドの生合成機構解明からその先へ」進めたいと考えており、ご討論頂ければ幸いである。

Ambergris, a sperm whale metabolite, has long been used as a fragrance and traditional medication, but it is now rarely available. The odor components of ambergris result from the photooxidative degradation of the major component, ambrein. The pharmacological activities of ambergris have also been attributed to ambrein. However, efficient production of ambrein and odor compounds has not been achieved. Recently, we constructed a system for the synthesis of ambrein and odor components. We created a new triterpene synthase, “ambrein synthase,” for mass production of ambrein by redesigning a bacterial enzyme.

1) Ueda, D. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335-8.
2) Yamabe, Y. *et al*. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 19643.
3) 佐藤努, *化学と生物*, 2021, 59(5), 222-4.
4) 亀谷ら, *本農芸化学会一般講演*.

isoprenoid, terpenoid, biosynthesis

講演番号：3FS-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:00～ ミーティングルーム F

メタボローム解析により同定した根圏化学信号の機能

Functions of rhizosphere chemical signals identified from metabolomic analysis

○杉山 暁史（京大生存研）
○Akifumi Sugiyama (Kyoto Univ.)

根近傍の土壌領域である根圏には、植物や微生物が生産する多様な代謝物が存在する。これら代謝物は根圏での生物間相互作用を支配する化学信号としても機能する。例えば、ダイズ根から分泌されるイソフラボンであるダイゼインは根粒菌の nod 遺伝子群を誘導し根粒形成を開始するシグナルとなる。さらに、ダイゼインはダイズ根圏微生物叢の形成にも関与する。演者らは、未解明の化学信号を探索することを目的に、様々な圃場で取得した根圏土壌を用いて、メタボローム解析を行った。トマト根圏のメタボローム解析では、根圏にトマチジンやその誘導体が検出された。トマトの水耕栽培ではトマチンの分泌も検出できたことから、トマトは細胞内での主要な蓄積形態であるトマチンを根から分泌し、根圏でアグリコンに変換されることが示唆された。トマチンやトマチジンは根圏において、トマト根圏微生物叢の形成に関与することも明らかになった。また、ヘアリーベッチ根圏のメタボローム解析により、オカラミン類を同定した。オカラミンはペニシリウム属の菌が生産する殺虫活性物質として知られていたが、自然界で発見されたのはこれが初めてである。ヘアリーベッチの後作でダイズを栽培したところ、ダイズの根圏においてもオカラミンが検出されたことから、オカラミンは次の作物へと受け渡される化学信号である。発表では、これら根圏代謝物が植物生育にどのように影響を与えるのかについても考察する。

The rhizosphere contains a wide variety of metabolites produced by plants and soil microbes. These metabolites function as chemical signals that govern the biological communications in the rhizosphere. We conducted metabolomic analysis using rhizosphere soils obtained from various fields. In tomato rhizosphere, tomatidine and its derivatives were detected in the rhizosphere. Tomatine secretion was also detected in hydroponic culture of tomato, suggesting that tomato roots secrete tomatine. In addition, okaramines were identified by metabolomic analysis of the hairy vetch rhizosphere. Okaramines are produced by Penicillium spp. grown in okara medium, and has insecticidal activities, but had not been found in nature. When soybean was grown as a post crop of hairy vetch, okaramines were also detected in the rhizosphere of soybean, indicating that okaramines are a chemical signal that is passed to the next crop as a legacy. In the presentation, we will also discuss how these rhizosphere metabolites affect plant growth.

Rhizosphere, Okaramine, Tomatine

講演番号：3FS-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:25～ ミーティングルーム F

植物間接防衛物質のターゲット蛋白質の再構築と応用

Reconstitution of target proteins of plant indirect defence weapons and its application

○松田 一彦（近大農）
○Kazuhiko Matsuda (Kindai Univ.)

植物根圏では，地上部と同様に，植物は昆虫，線虫，微生物あるいは雑草による攻撃から身を守るために，実に多様な防御システムを採用している．演者らはこれまでに，植物が直接食植者あるいは雑草に対して防御物質を生産するのみならず，根圏微生物に防御物質を生産させる「間接誘導防衛機構」をもつことを提唱し，実証した．本機構は，農作物の有機栽培を可能にする概念であるが，その実体は植物が微生物に農薬の散布を委託するということである．そこで生じる疑問は，間接誘導防衛機構により誘導される微生物二次代謝物質の選択毒性の有無である．その問いに答えるために必要なことが，ターゲット蛋白質での活性（相互作用）の解析である．

当該物質のセンサーであるターゲット蛋白質はしばしば哺乳動物も共有する．故に哺乳動物の前例に従って行えばそのようなターゲット蛋白質の機能的発現（再構築）は容易と思うかもしれない．しかし実際には，動物細胞のみならず昆虫細胞を用いても，昆虫のターゲット蛋白質の再構築が難しい場合がある．そのような例を取り上げながら，これからの展望について紹介したい．

In the rhizosphere and on the above ground, plants exploit a wide array of defence weapons to prevent attacks of insects, nematodes, weeds, and microorganisms. The author proposed that ‘Indirect Defence”, in which plants induce rhizosphere microorganisms to produce defence compounds in addition to making weapons on their own. This system enables organic crop production where plants employ microorganisms as pesticide sprayers. A question is as to whether indirect defence products have selectivity to target organisms. To address this, analysis of the weapon-target protein interactions are essential.

Insects often share the same target proteins with mammals. Hence, it may appear feasible to reconstitute the target proteins in cell lines according to preceding methods employed for ectopic expression of mammalian proteins. However, it was not easy to functionally reconstitute some insect proteins. The author will show a breakthrough in the ectopic expression of a target protein and perspective of the achievement.

Plant indirect defense, Target protein, Reconstitution

講演番号：3FS-03
講演日時、会場：3 月 17 日 16:50～ ミーティングルーム F

植物耐病性に関わる植物-微生物相互作用分子

Plant-microbe interaction molecules involved in plant disease resistance

○小鹿 一（名大院生命農）
○Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

植物と微生物の相互作用（寄生、共生等）に関与する物質を明らかにし、相互作用を分子レベルで理解することは、農業における作物増産等につながる重要な課題である。本発表では、作物に感染して農業に損害を与える *Phytophthora* 属糸状菌（疫病菌）と、牧草などに共生して双利的関係を築く *Epichloë* 属内生菌に焦点を当て、これらが生産する生物活性分子について紹介する。

疫病菌がジャガイモ等の宿主作物に感染すると、宿主は疫病菌の化学成分（エリシター）を検知して直ちに防御応答反応を起こす。エリシター分子としてこれまで様々な分子が同定されてきたが今回、２つのタイプの新たなエリシターを同定した。興味深いことに一方は宿主防御応答の初期段階でみられる活性酸素種の生成を誘導し、別のタイプは抗菌性物質ファイトアレキシンの生成を誘導する。これらの脂質は農作物の耐病性向上に応用できる可能性を秘めている。

内生菌は宿主植物の組織内に共生し、宿主のストレス耐性、生育促進等に関与する。実際、人工接種により耐虫性を持たせたイネ科牧草に応用されている。我々は真菌内生菌の一種 *Epichloë festucae* が抗菌性物質を生産していることから、活性本体の探索を行った。その結果、ε-ポリリジンを単離するとともに、その生合成遺伝子も同定した。ε-ポリリジンは防腐剤として食品添加物にも応用されていることから、本菌を耐病性植物の作成に応用できる可能性が示唆される。

Investigation of the bioactive substances that are involve in plant-microbe interaction is an important issue leading to increased crop production in agriculture. This presentation focuses on *Phytophthora* filamentous fungi that infect crops and damage agriculture and *Epichloë* endophytes that symbiotically live with grasses.

On infection by *Phytophthora*, the host plant recognizes fungal chemicals (elicitor) and causes defense responses. Two types of new elicitors have been identified: ROS and phytoalexin production inducers. Endophytes coexist in the tissues of host plants and are involved in host stress tolerance, etc. Since the fungal endophyte *Epichloë festucae* produces antifungal activity, we searched for the active substances, resulting in the isolation of ε-polylysine and its biosynthetic gene. The *phytophthora* elicitors and the endophyte fungus have potential for developing disease-resistant plants.

Phytophthora, endophyte, elicitor

講演番号：3FS-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:15～ ミーティングルーム F

植物に含まれるポリアミン誘導体の生理活性
Biological activities of polyamine derivatives in plants

○浅見 忠男（東大院農）
○Tadao Asami (The Univ. of Tokyo)

イネアクチベーションタギングラインから見出された *Spotted leaf 18*（*Spl18*）は、一定の生育ステージになると自発的に疑似病斑を生成するラインであり、この *Spl18* の原因遺伝子であるアシルトランスフェラーゼをコードする *OsAT1* 遺伝子を過剰発現させたイネでは、*Spl18* と同じ疑似病斑を生成する。予備試験において *OsAT1* 過剰発現体中にポリアミンの一種であるスペルミジン(Spd)の数種類の誘導体が蓄積することを確認したので、LC-MS/MS にてその構造解析を行った。その結果、これらは N^4-(10-hydroxylauroyl)- spermidine (4N10HydLau)と N^4-(11-hydroxylauroyl)spermidine (4N11HydLau)という 2 種のアシル化スペルミジンであると推定された。

ポリアミン類が植物の生理やストレス応答に関与していることは広く知られている。アシル化スペルミジンの植物内での役割はわかっていないが、これらがポリアミン類の役割の一部を担っている可能性がある。このような状況下、我々のグループではアシル化スペルミジンとして構造推定した 4N10HydLau と 4N11HydLau を投与したイネ中で病害抵抗性が誘導されることを見出している。そこでこれら化合物の生理活性の詳細ならびにこれらアシルスペルミジン類の誘導体に加えて、水酸化経皮酸スペルミジン誘導体とその生理活性についても紹介する。

Spotted leaf 18 (spl18), found in rice activation tagging lines, is a line that produces lesion mimics at a certain growth stage. OsAT1 gene encoding acyltransferase is the gene responsible for spl18. Rice, in which OsAT1 is overexpressed, produces the same lesion mimics as spl18. We confirmed that several derivatives of spermidine (Spd), a type of polyamine, accumulated in the OsAT1 overexpressor, and we analyzed their structures by LC-MS/MS. As a result, we revealed that they were acylated spermidines, N4-(10-hydroxylauroyl)-spermidine (4N10HydLau) and N4-(11-hydroxylauroyl)spermidine (4N11HydLau).

It is widely known that polyamines are involved in plant physiology and stress responses. Although the role of acylated spermidine in plants has been not investigated, it is possible that they play a part in the role of polyamines. We have found that disease resistance was induced in rice plants treated with 4N10HydLau and 4N11HydLau. In addition to the bioactivity of these compounds and other acyl spermidine derivatives, we are studying bioactivities of the hydroxylated cinnamic acid-spermidine conjugates.

acyl polyamine, spermidine, disease resistance

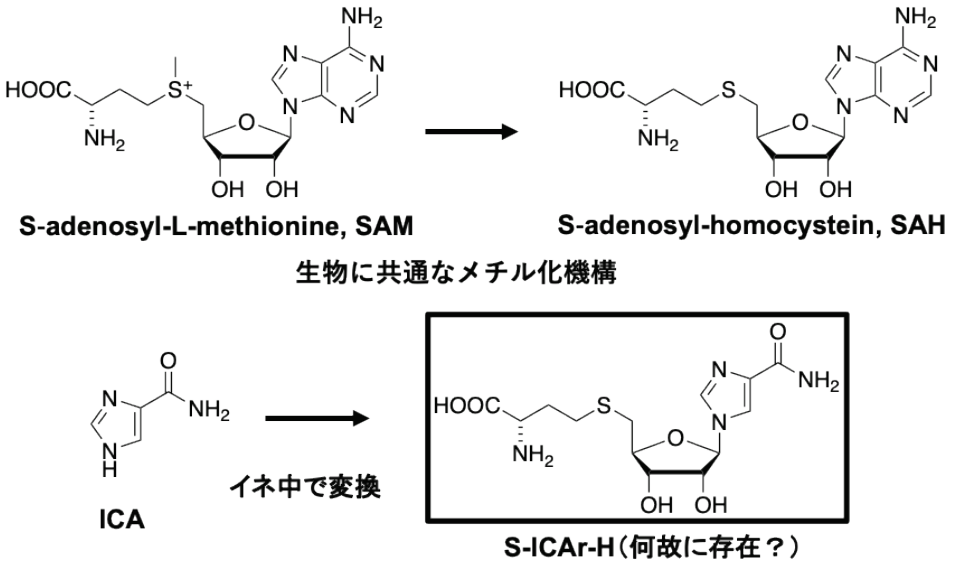
講演番号：3FS-05
講演日時、会場：3 月 17 日 17:40～ ミーティングルーム F

フェアリー化合物 ICA が関与する新しいメチル化機構の可能性

Possibility of a new methylation mechanism involving one of fairy chemicals ICA

○河岸 洋和（静大グリーン研）
○Hirokazu Kawagishi (Shizuoka Univ.)

フェアリーリングを引き起こすフェアリー化合物（fairy chemicals, FCs)の一つ imidazole-4-carboxamide (ICA) の代謝産物を探索し，L-ホモシステインが付加した S-ICA-ribonucleoside-L-homocysteine (S-ICAr-H) を発見した（図)。その後，この化合物はイネ等に内生することが明らかになった。この構造が，生物のメチル化機構に関与する S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) の構造と非常に類似していることに注目した（図)。生物におけるメチル化は生体内唯一のメチル基供与体の S-adenosyl-L-methionine (SAM) によって進行する（図)。SAM はタンパク質や DNA，脂質などをメチル化し自身は SAH となり，SAH はメチル化の阻害剤として蓄積することが知られている。そこで、ICA も同様に S-ICA ribonucleoside-L-methionine (S-ICAr-M) を経由して S-ICAr-H に代謝されると推定し，ICA 代謝産物が生物のメチル化機構に関与する可能性を考えた。本シンポジウムでは，この研究の現況を報告する。



SAM plays as the methyl donor in various biological and biochemical events, and SAH is formed as the product after the donation of the methyl group of SAM to a methyl acceptor. Previously, S-ICAr-H was isolated from ICA-treated rice and its structure is similar to SAH. Therefore, research on the significance of the existence of S-ICAr-H was performed. We presumed that S-ICAr-H was derived from S-ICAr-M like SAM and that S-ICAr-M may act as another methyl donor. In this symposium, I will report the current status of this research.

fairy chemicals, ICA, methylation mechanism

講演番号：3FS-06
講演日時、会場：3 月 17 日 18:05～ ミーティングルーム F

イモチ病菌 *Pyricularia oryzae* における二次代謝産物の生産に関する研究

Studies on the production of secondary metabolites in *Pyricularia oryzae*

○長田 裕之（理研 CSRS）
○Hiroyuki Osada (RIKEN CSRS)

植物病原糸状菌 *Pyricularia oryzae* は、自然環境では、イネを宿主として感染増殖するが、土壌中では、放線菌など他の微生物と関わりながら生存している。*P. oryzae* が生産する二次代謝化合物（化学シグナル）の視点から *P. oryzae* の生存戦略について考察する。

１）*P. oryzae* において、テヌアゾン酸（TA）生合成遺伝子 TAS１を同定した。TAS１は、ユニークな PKS-NRPS 融合酵素をコードしており、TA の生産はグローバルレギュレーターの PoLAE1 と $Zn(II)_2$-Cys_6型転写因子 TAS２によって制御されている。*P. oryzae* のイネへの感染実験において、TAS1 の過剰発現株は、イネのジャスモン酸情報伝達系を活性化し、病原性が低下することを見出した。イネへの感染初期では TA の生産は抑制されており、感染が成立した後、TA の生産が活発になりイネを枯死させることが示唆された。

２）*P. oryzae* の二成分情報伝達系の OSM1 と PoYPD1 を破壊するとネクトリアピロン（NP）が生産誘導されることを見出し、さらに NP 生合成遺伝子クラスターを同定した。NP の過剰生産株、非生産株の比較から、NP 類は *P. oryzae* のイネへの感染には必要ないことが示唆された。一方、NP 類は *Streptomyces griseus* に対する生育阻害活性と色素生産阻害活性を示した。

In the natural environment, the phytopathogenic filamentous fungus *Pyricularia oryzae* infects and grow in rice as a host and survives in the soil interacting with other microorganisms such as actinomycetes. Survival strategy of *P. oryzae* will be discussed from the viewpoint of secondary metabolites (chemical signals) produced by *P. oryzae*.

1) The tenuazonic acid (TA) biosynthetic gene TAS1 was identified in *P. oryzae*. TA is produced by a unique PKS-NRPS fusion enzyme, the production of which is controlled by the global regulator PoLAE1 and the $Zn(II)_2$-Cys_6 transcription factor TAS2. In a rice infection experiment of *P. oryzae*, an overexpressing strain of TAS1 induced activation of the jasmonic acid signaling system of rice and reduced pathogenicity. It was suggested that TA production was suppressed in the early stage of rice infection, and that TA production became active after the infection was established and killed rice.

2) We found that disruption of OSM1 and PoYPD1 in the two-component signal transduction system of *P. oryzae* induces production of nextriapyrone (NP). As a result of comparing the overproducer and non-producer strains of NP, it was suggested that NP is not necessary for the infection of *P. oryzae* to rice. On the other hand, NP inhibited the growth of *S. griseus* and the pigment production in *S. griseus*.

secondary metabolite, plant pathogenic fungus, *Pyricularia oryzae*

講演番号：4AS-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:00～ ミーティングルーム A

科学研究における新技術開発
Development of new technologies in scientific research

○高野 和文（京府大生環）
○Kazufumi Takano (Kyoto Pref. Univ.)

研究における新技術の導入・駆使は、最先端研究の推進に欠くことのできないものと言ってもよく、また自ら新技術を開発できればオリジナルな研究を有利に展開できる。新しい技術には、ある分野の実験操作の改良的なモノから新たなイノベーション・研究領域を生み出すノーベル賞級のモノまでさまざまある。本シンポジウムでは農芸化学・生命科学に関連する種々の分野・次元の多くの新しい技術の中からいくつかについて、単なる技術の紹介に留まらず、着想・原理から研究開発・実用化・応用展開にわたり深く紹介いただく。前半は、個々の新技術について、後半は、構造生物学に関連する有望な手法やそれに関わる新技術について取り上げる。

本シンポジウムでは、今回取り上げた新しい技術の情報を求める方だけでなく、実用化に取り組む研究者、またこれから公的機関や民間企業で技術開発を目指す若い研究者から、基礎研究に従事の中で何らかの技術的問題や新しい技術アイデアを持つ研究者に、技術開発現場からのメッセージを堪能し、さらなる研究のヒントとなり、進展につながることを期待する。

It can be said that the introduction and use of new technologies in research is indispensable for the promotion of advanced research, and if we can develop new technologies ourselves, we can conduct original research to our advantage. There are various new technologies, from improved experimental operations in a certain field to Nobel Prize-class ones that create new innovations and research areas. In this symposium, several new technologies from various fields related to life science will be introduced in depth about ideas, principles, development, and practical application. The first half of the symposium will focus on individual new technologies, and the second half on promising methods related to structural biology.

At this symposium, not only researchers who are seeking information on the new technologies, but also young researchers who are aiming to develop technologies at academia or companies, and researchers who are at basic research with some technical problems or new technical ideas will enjoy messages from the field of technology development, which will provide hints for further research and lead to progress.

new technology, research development, practical application

講演番号：4AS-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:03～ ミーティングルーム A

リアルタイム電気泳動可視化装置の研究開発

R&D of the Real-time monitoring of polyacrylamide gel electrophoresis by the shadowgraph technique.

○村上 聡[1,2]、安達 宏昭[2,5]、松村 浩由[3,2]、高野 和文[4,2]、井上 豪[5,2]、森 勇介[6,2]（[1]東工大生命理工、[2]株式会社創晶、[3]立命大生命科学、[4]京都府大生命環境、[5]阪大薬、[6]阪大工）
○Satoshi Murakami[1,2], Hiroaki Adachi[2,5], Hiroyoshi Matsumura[3,2], Kazufumi Takano[4,2], Tsuyoshi Inoue[5,2], Yusuke Mori[6,2] ([1]Tokyo Inst. Technol., [2]Sosho Inc., [3]Ritsumeikan Univ., [4]Kyoto Pref. Univ., [5]Osaka Univ., [6]Osaka Univ.)

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)電気泳動とそれに続くクーマシーブリリアントブルー(CBB)染色は、生物科学研究分野で最も広く用いられている分析手法の一つである。ゲル内を電気泳動する蛋白質バンドはほとんどの場合目に見えないため、電気泳動～染色～脱染が終了するまで結果を観察することができず時間を要する工程となっている。そこで、我々は電気泳動中の蛋白質などの生体分子のリアルタイム検出を目的とし、シャドウグラフによる光学的検出装置を開発した。簡単でハンディな光学系とカメラにより、電気泳動中の蛋白質バンドのゲル中での移動と分離の様子を染色することなく、リアルタイムに観察することが可能となった。CBB 染色と同様の高い視認性を有し、蛋白質だけで無く DNA などの物質も可視化できる。この装置により、電気泳動の初期段階でのプロファイル確認が可能となり、クロマトグラフィによる画分確認に要する時間を短縮させることで、蛋白質分子の鮮度の向上が見込めるほか、研究者の労働環境の改善にも繋がることが期待できる。また、ゲルからバンドを切り出す際にも染色による影響が無くなる利点もあり、さらに、染色や脱染の工程が不要になることで、合成色素を含む廃液の発生を抑えることができ、環境負荷の軽減にも貢献できる。

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with sodium dodecyl sulfate (SDS) and Coomassie brilliant blue (CBB) staining is widely used in protein research and requires time for electrophoresis, staining and destaining. Since the protein bands electrophoresed in the gel are invisible in most cases, the results cannot be observed until the whole process is complete. In our study, shadowgraph was applied to detect biomolecules such as proteins during electrophoresis. A simple optical system and camera enabled real-time monitoring of migration and separation of individual protein bands in polyacrylamide gels without staining. The visibility was high enough that it was possible to visualize substances other than proteins, such as DNA. This method provides protein profiles instantly in the early stage of electrophoresis. The elimination of the staining and destaining steps will help save researchers' time. The method is also environmentally friendly and will help reduce the generation of waste solutions containing synthetic dyes. Polyacrylamide gel electrophoresis,

SDS-PAGE, shadowgraph, real-time monitoring

講演番号：4AS-03
講演日時、会場：3 月 18 日 16:27～ ミーティングルーム A

新規消毒薬 MA-T の開発

Development of new disinfectant MA-T

○安達 宏昭[1,2] ([1]株式会社創晶、[2]株式会社 dotAqua)
○Hiroaki Adachi[1,2] ([1]SOSHO, Inc., [2]dotAqua, Inc.)

MA-T（エム・エー・ティー）はMatching Transformation systemの略であり、日本で開発された酸化制御システムを意味し、活性化の強弱を制御することで、広範な応用展開が期待できる。本シンポジウムでは新規消毒剤の開発について概説する。

MA-T のメカニズムは、2015 年に大阪大学で解明され、水溶液中で必要な時に必要な量だけ水性のラジカル活性種が生成される仕組みであることが分かり、要時生成型亜塩素酸イオン水溶液と命名された。MA-T は無色透明で無臭、およびガス化しないことを特長とする水溶液であり、化学平衡によりラジカル活性種の生成を制御する仕組みである。ウイルスや細菌、ニオイ物質に作用して、ラジカル活性種が消費されると、すぐさま亜塩素酸イオンが化学反応により、水性のラジカル活性種に変化することで補充される。この絶妙なバランスで化学平衡を維持する仕組みにより、従来の除菌消臭剤・消毒剤ではトレードオフの関係であった効果と安全性を両立することができるようになった。

MA-T により生成される水性のラジカル活性種は、強い酸化力を持ち、ウイルスや細菌に作用して、不活化や殺菌を実現する。新型コロナウイルス SARS-Cov-2 に対する効果も大阪大学微生物病研究所にて検証済みで、50 ppm（0.005%）の MA-T を 1 分間、接触させることで 99.98%不活化できることが分かった。

一方、安全性を最も重視して開発された MA-T は、第三者機関による急性経口毒性試験やヒトパッチ試験、眼刺激性試験などの各種安全性試験をクリアーしている。また、金属やプラスチックに対しても腐食性がなく、安心して使用できる。

MA-T achieves a compatibility between bactericidal effects and safety, which have been trade-offs in conventional disinfectants. The mechanism of MA-T was clarified at Osaka University in 2015. We call MA-T on-demand chlorite ion solution because of a new mechanism for generating aqueous radicals in the required amount when needed.

As a result of the demonstration test for the Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) at the research institute for microbial diseases in Osaka University, 99.98% inactivation was confirmed at a concentration of 50 ppm (0.005%) MA-T aqueous solution. Highly effectiveness against various viruses and bacteria has been shown despite the low concentration of MA-T.

disinfectant, SARS-CoV-2, on-demand chlorite ion solution

講演番号：4AS-04
講演日時、会場：3 月 18 日 16:51～ ミーティングルーム A

光活性化二酸化塩素を用いた酸化反応による有用化成品の製造

Production of useful chemical products by oxidation reaction using photoactivated chlorine dioxide

○淺原 時泰（阪大院薬）
○Haruyasu Asahara (Osaka Univ.)

炭素-水素（C-H）結合は有機化合物にあまねく存在し、その酸化は基本的で極めて重要な化学反応である。C-H 結合の中でもアルカン（sp^3 C-H）や芳香環（sp^2 C-H）は不活性 C-H と呼ばれる安定性の高い結合であり、その直接的酸化は現在においてもチャレンジングな化学変換として盛んに研究が行われている。

これに対し、我々のグループでは二酸化塩素（$ClO_2^{\bullet}$）への光照射活性化をカギとする不活性 C-H 結合の酸化反応の開発に取り組んでいる。$ClO_2^{\bullet}$ は 360 nm 付近に極大吸収を有する黄色の気体であり、古くからパルプの漂白や水の消毒に用いられてきた。我々は $ClO_2^{\bullet}$ に対し光照射による活性化を行うと塩素ラジカルと一重項酸素が生成し、それぞれ C-H 結合からの水素引き抜き剤および酸化剤として働き不活性 C-H 結合の酸化が可能であることを見出した。本法を用いることで、メタン（CH_4）の酸化によるメタノールとギ酸の常温・常圧での高効率生成反応 [1]、ポリプロピレンなどの汎用プラスチックの酸化による表面改質 [2]、クロロホルムの酸化による系中でのホスゲン発生法の開発を達成している。本シンポジウムではこれらの成果について紹介する。

1) Ohkubo, K.; Hirose, K. *Angew. Chem., Int. Ed*. **2018**, *57*, 2126. 2) Ohkubo, K.; Asahara, H.; Inoue, T. *Chem. Commun*. **2019**, *55*, 4723.

Carbon-hydrogen (C-H) bonds are ubiquitous in organic compounds, and their oxidation is a fundamental and extremely important chemical reaction. In particular, both alkanes (sp^3 C-H) and aromatic compounds (sp^2 C-H) are stable C-H bonds, and their direct oxidation is still a challenging chemical transformation and actively studied.

On the other hand, our group has been developed the oxidation reaction of C-H bond using photo-activated chlorine dioxide ($ClO_2^{\bullet}$), a yellow gas with a maximum absorption around 360 nm. $ClO_2^{\bullet}$ can be activated by light irradiation to produce chlorine radicals and singlet oxygen, which act as a hydrogen withdrawing agent and an oxidizing agent, respectively. By using this method, we have achieved 1) highly efficient methane (CH_4) oxidation giving methanol and formic acid at room temperature under normal pressure, 2) surface modification of plastics such as polypropylene by oxidation, and 3) *in situ* phosgene generation by oxidation of chloroform.

In this symposium, we will introduce these achievements.

Chlorine dioxide, Photoreaction, Organic Synthesis

講演番号：4AS-05
講演日時、会場：3 月 18 日 17:15～ ミーティングルーム A

除菌消臭剤 MA-T の酸化制御技術を駆使したクライオ電顕用ツールの開発

Development of a tool for CryoEM using the oxidation control technology of MA-T, a bactericidal and deodorant

○井上 豪[1]、藤田 純三[2]、牧野 文信[3]、淺原 時泰[1]、森口 舞子[1]、熊野 翔太[1]、安齋 樹[4]、岸川 淳一[5]、松浦 善治[6]、加藤 貴之[5]、難波 啓一[2]([1]阪大薬、[2]阪大生命機能、[3]日本電子 YOKOGUSHI 協働研究所、[4]阪大微研、[5]阪大蛋白研、[6]阪大感染症総合教育研究拠点)

○Tsuyoshi Inoue[1], Junso Fujita[2], Fumiaki Makino[3], Haruyasu Asahara[1], Maiko Moriguchi[1], Shota Kumano[1], Itsuki Anzai[4], Jun-ichi Kishikawa[5], Yohiharu Matsuura[6], Takayuki Kato[5], Keiichi Namba[2] ([1]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. of Front. Biosci., Osaka Univ., [3]JEOL YOKOGUSHI Research Alliance Laboratories, Osaka Univ., [4]Res. Inst. for Microbial Diseases, Osaka Univ., [5]Inst. for Protein Res., Osaka Univ., [6]CiDER, Osaka Univ.)

MA-T は除菌・消臭剤のカテゴリー名称の 1 つであり、「要時生成型亜塩素酸イオン水溶液（Matching Transformation System）」の略称である。日本の航空機のほぼ全てで採用されるなど高い安全性を保持しながら、様々な細菌のほか、SARS、MERS、SARS-CoV-2 などのウイルスに対しても有効に働くことが判明している（*BPB Reports*, 4(3), 78-84 (2021)）。

我々は、この MA-T の作用メカニズムの解明を機に超高難度のメタン酸化の反応を発見した。本反応では、気体燃料であるメタンガスを、光で活性化した二酸化塩素を用いて酸化すれば、常温・常圧下で全て液体燃料であるメタノールとギ酸に変換できるほか、様々なプラスチック材料の表面を酸化できることも判明した。また、導入された酸素や塩素などの官能基を基点に様々な化学修飾が可能であることも判った。プラスチックのほか炭素材料にも適用可能であり、様々に高機能化できることから、我々はグラフェンに酸素官能基を導入して化学修飾を行うことによってタンパク質を固定化し、クライオ電顕の単粒子解析に用いるツールの開発に着手した。EG-Grid（Epoxidized Graphene Grid）と名付けたツールを用いれば、試料調製に要する時間を大幅に効率化できるだけでなく、データの質も向上すること明らかとなった（*bioRxiv*,11.17.468963(2021), *bioRxiv*,10.25.465714(2021)）。

MA-T is the name of a category of disinfectants and deodorants, which stands for "Matching Transformation System". It has a high safety profile, being used in almost all Japanese aircraft, and is effective against bacteria and viruses such as SARS, MERS and SARS-CoV-2 (*BPB Reports*, 4(3), 78-84 (2021)). The elucidation of the MA-T mechanism led to the discovery of a very difficult methane oxidation reaction, and it was found that all gaseous methane gases could be converted into liquid fuels such as methanol and formic acid at room temperature and pressure by photo-oxidation using chlorine dioxide. It was also found to be applicable to the surface oxidation of various polymeric materials. In this study, we have succeeded in developing a grid (EG-Grid) for Cryo-electron microscopy, which can immobilise proteins by introducing oxygen functional groups into graphene and chemically modifying it (*bioRxiv*,11.17.468963(2021), *bioRxiv*,10.25.465714(2021)). Some examples of how the time required for sample preparation has been greatly reduced will be presented.

CryoEM, graphene grid, immobilization

講演番号：4AS-06
講演日時、会場：3 月 18 日 17:39～ ミーティングルーム A

X 線小角散乱と計算科学を用いた統合的解析による天然変性タンパク質の動的構造と機能の理解
Integrated approach using small angle X-ray scattering and computational analysis for understanding dynamic structure and function of intrinsically disordered protein.
○小田 隆[1]、大井 里香[2]、古寺 哲幸[3]、安藤 敏夫[3]、小沼 剛[2]、菅瀬 謙治[4]、苣口 友隆[5]、井上 倫太郎[6]、杉山 正明[6]、石野 園子[7]、石野 良純[7]、佐藤 衛[2]([1]立教大理、[2]横市大生命医科、[3]金沢大・WPI NanoLSI、[4]京大工、[5]慶應理、[6]京大複合研、[7]九大農)
○Takashi Oda[1], Rika Oi[2], Noriyuki Kodera[3], Toshio Ando[3], Tsuyoshi Konuma[2], Kenji Sugase[4], Tomotaka Oroguchi[5], Rintaro Inoue[6], Masaaki Sugiyama[6], Sonoko Ishino[7], Yoshizumi Ishino[7], Mamoru Sato[2] ([1]Rikkyo Univ, [2]Yokohama City Univ, [3]Kanazawa Univ, [4]Kyoto Univ, [5]Keio Univ, [6]KURNS, [7]Kyushu Univ)

タンパク質はポリペプチド鎖が一定の構造に折れたたまることで機能するとされてきた。しかし、生体内のタンパク質の多くには折れたたまっていない領域(天然変性領域;IDR、天然変性タンパク質;IDP)があることが分かってきた。天然変性タンパク質は折れたたまったかたい構造を持つタンパク質とは異なり、柔らかい構造が機能に重要と考えられるが、結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡などの構造生物学的手法の適用が困難である。X 線小角散乱(Small angle X-ray scattering；SAXS)はタンパク質などの水溶液に X 線を照射し、得られる散乱パターンから溶液中での構造情報を取得する手法である。タンパク質の溶液中での動的な構造情報が得られるため、天然変性タンパク質の解析に有効と考えられる。しかし、SAXS は分解能が低く、また得られる構造情報の解釈に任意性があり動的構造を一義的に決定できないなどの問題もある。一方、IDP の動的構造を計算科学的に再現すれば原子レベルで解析できるため、SAXS の分解能の低さを補うことができる。本セッションでは DNA 修復にかかわる Hef タンパク質の動的構造を SAXS、計算科学その他の手法を合わせた統合的解析について発表する。

For a long time, it is believed that protein function depends on its ordered three-dimensional structure. However, the discovery of intrinsically disordered proteins or intrinsically disordered regions (IDPs / IDRs) that lacks an ordered three-dimensional structure has challenged the traditional protein structure paradigm. Dynamic structure of IDP is closely related to its function. However, the methods available for determination of the dynamic structure of IDP are limited. Small-angle X-ray scattering (SAXS) can provide dynamic structural information of IDP, but it is in a low resolution, and it is difficult to interpret SAXS data without arbitrariness. Therefore, we cannot determine the dynamic structure of IDP using only SAXS data. Computational analysis can simulate dynamic structures of IDP with atomic resolution, and it can compensate for the low resolution of SAXS. In this session, we report dynamic structure of Hef protein, which is associated with DNA repair, using an integrated approach of SAXS, computational analysis, and other methods.

intrinsically disordered protein (IDP), Small-angle X-ray scattering (SAXS), DNA repair

講演番号：4AS-07
講演日時、会場：3 月 18 日 18:03～ ミーティングルーム A

日本電子-リガク電子回折統合プラットフォーム XtaLAB Synergy-ED が拓くナノクリスタルの世界
The integrated MicroED/3DED platform, the XtaLAB Synergy-ED, opens a new era of nanocrystals

○松本 崇（株式会社リガク）
○Takashi Matsumoto (Rigaku Corporation)

近年、X線構造解析に見合うサイズの結晶作成が困難な新規物質の分子構造を決定するために、ナノクリスタルからの構造決定に対する関心が高まっています。ナノクリスタルの構造解析は電子回折（MicroED/3DED）を用いる事で可能となります。これは、電子線がX線と比較して物質とより強く相互作用するためです。しかしながらこれまでは、ナノクリスタルが得られたとしても、“電子回折の専門知識”が必要であることに加え、運良く測定できたとしても、“回折イメージの処理・構造解析の経験がない”いう理由でMicroED/3DEDを断念されている方も多いのではないでしょうか。

日本電子-リガク電子回折統合プラットフォーム XtaLAB Synergy-ED は、電子回折用に最適化した電子線源、ハイブリッド型電子計数検出器、及びこれらのコア技術を結合しシナジー効果を最大化するソフトウェア、電子回折用 CrysAlis^{Pro} for ED から成り立っています。CrysAlis^{Pro} for ED は、単結晶X線構造解析分野で定評のある CrysAlis^{Pro} をベースに、電子回折に特化したソフトウェアとして新たに開発しました。測定・処理・自動構造解析の同時進行はもとより、CrysAlis^{Pro} の強みである困難な試料に対応するためのツールも、そのまま利用することが可能です。本講演では、Synergy-ED のワークフロー及び測定例についてご紹介いたします。

Recently, there has been an increasing interest in determining the structure from nanocrystals in order to avoid the difficulty of glowing a large crystal sufficient for single crystal X-ray analysis. The structure of nanocrystals can be analyzed using electron diffraction methods (MicroED/3DED). This is because electrons interact more strongly with materials than X-rays do. However, some of you may have an experience giving up on MicroED/3DED because of the necessity of expertise in electron diffraction or lack of experience in diffraction image processing and structural analysis.

The integrated MicroED/3DED platform, the XtaLAB Synergy-ED, was jointly developed by JEOL and Rigaku, and consists of a TEM based electron source optimized for electron diffraction, a hybrid photon counting detector, and CrysAlis^{Pro} for ED that combines these core technologies to maximize synergy effects. CrysAlis^{Pro} for ED is based on CrysAlis^{Pro}, which has an established its reputation in the field of single crystal X-ray structure analysis, and has been newly developed as a specialized software for electron diffraction. In this presentation, we will introduce the workflow and measurement examples of the Synergy-ED.

electron diffraction, MicroED/3DED, nanocrystals

講演番号：4AS-08
講演日時、会場：3 月 18 日 18:27～ ミーティングルーム A

新技術がもたらす今後の研究展開

Potential future studies proceeded by new technologies

○松村 浩由（立命館大生命）
○Hiroyoshi Matsumura (Ritsumeikan Univ.)

昨今、生命科学分野では様々な新技術が開発されてきており、例えば、構造生物学分野だけでも、今回のシンポジウムで紹介されたリアルタイム可視化電気泳動、Cryo 電子顕微鏡、MD-SAXS、MicroED などの新技術が開発され、それらを用いた研究も実際に多く見られるようになってきた。また、このシンポジウムで紹介されていない関連技術として、例えば、タンパク質立体構造予測プログラム AlphaFold2 も挙げられる。このようにこれからも新技術が精力的に開発されると予想されるなか、研究者はどのような方向性で研究を進めたら良いのかという点については、それぞれ意見の分かれるところと思われる。ここでは、最近の自身の研究例も含め、今後の研究の進め方の可能性について情報を共有する場としたい。

Recently, various new technologies have been developed in the field of biosciences. For example, speakers in this symposium introduced real-time visualizable electrophoresis, Cryo electron microscopy, MD-SAXS, and MicroED, which have been used for many studies in the field of structural biology. Another new technology in the field of structural biology, which is not presented at this symposium, is the 3D protein structure prediction program AlphaFold2. Given the situation where new technologies should be developed aggressively in the future, researchers need to have different views on how to conduct their research. In this session, I would discuss potential future studies, including my recent research.

New technologies, Biosciences, Structural biology

講演番号：4BS-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:03～ ミーティングルーム B

フードナノバイオサイエンスで拓く食の安全の可視化

Visualization of food safety through food nanobiosciences

○飯嶋 益巳（東農大・応生・健康）
○Masumi IIJIMA (Dept. Nutr. Sci. Food Saf., Fac. Appl. Bioci., Tokyo Univ. Agric.)

近年、新しい機能性をもつ次世代食品の出現や、食品に由来するアレルギー疾患等の健康被害の増加が、人々の食品の安全に対する不安を増大させる社会的・科学的問題として取り挙げられている。これらの問題解決には、特に「検査法や分析法」の研究開発が重要視されており、食の安全・安心を実現するためには、科学的根拠に基づく食品の検証が必要不可欠なだけではなく、簡便かつ高感度に、さらに可視化して検証できることが重要となる。我々はこれまでに、ナノ表面で抗体等のバイオセンシング分子の向きを揃えて整列提示できるバイオナノカプセル足場分子を開発し、ELISA や水晶発振子微量天秤等のバイオセンサーの高感度化を可能にし、さらに原子間力顕微鏡を用いて抗体の整列提示をナノレベルで観察し実証してきた。本講演では、独自の足場分子を用いて食品中の危害因子を簡単に、感度良く検出するフードバイオセンサー技術や、食品の機能性のナノレベル評価技術、さらに食品の新しい品質評価技術等、食品分野とナノバイオテクノロジー分野を融合したフードナノバイオサイエンスによる、食の安全性評価の可視化への取り組みを紹介する。

The development of next-generation foods having new function and the increase in health hazards caused by foods are social and scientific issues that raise people's concerns against food safety. In order to solve these concerns, research and development of methods for inspection and analysis of foods are considered important. Moreover, the verification of foods based on scientific evidence is essential for realizing food safety and security, and this verification needs to be simple, highly sensitive, and visualizable. We have developed bio-nanocapsule (BNC) scaffolds that can display biosensing molecules on nanosurfaces in an oriented immobilization manner, enabling highly sensitive detection of target molecules in various biosensors. Furthermore, we have also succeeded to visualize the oriented immobilization of antibodies on ZZ-tag displaying BNC (ZZ-BNC) scaffolds by high-speed atomic force microscopy. In this symposium, we will introduce our efforts to visualize food safety evaluation by “food nanobiosicence”, which is an integration of the food and nanobiotechnology fields. Specifically, it will include an introduction to “Food biosensor technology” which uses a unique ZZ-BNC scaffolds to simply and sensitively detect hazards in food, “Nano-visualization technology for evaluating food functionality”, as well as “Novel technology for quality evaluation of food”.

Food safety, Food nanobiosicence, Visualization

講演番号：4BS-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:27～ ミーティングルーム B

植物由来芳香族化合物を分解する酵素と微生物の解析：農業加工残渣の高付加価値化に向けて
Analysis of enzymes and microorganisms that decompose plant-derived aromatic compounds: Toward valorization of residues from agricultural product processing
○大田 ゆかり (群大食健康)
○Yukari Ohta (Gunma Univ.)

農業や農産物加工食品の製造工程で生じる残渣は複雑な植物成分が混在するバイオマス資源であり、これらに含まれるリグニンやフェルラ酸などは再生可能な芳香族化合物資源と位置付けることができる。高度にヘテロな構造を持つため、有効利用のためには一定基準内の化学的特性を示す分子に選択的に変換することが望ましい。リグニン内の最も主要な結合はβ-O-4 エーテル結合であり、リグニン変換の重要なターゲットとなる。本結合を特異的に切断する酵素に glutathione-S- transferase (GST) があり、グルタチオンの還元力を補酵素として利用する特異的酸化還元反応である。本反応に限らず、GST は広範な生物が利用する普遍的な酵素であり、酸化ストレスに対する生体防御や解毒機構に関与することで広く知られている。我々は、海底沈木や堆積物を分離源として植物由来の低分子芳香族を代謝する細菌を探索し、これらの細菌が持つ芳香族低分子分解酵素や代謝応答について研究している。本講演では、リグニンのβ-O-4 エーテル結合開裂酵素群や本反応に伴う代謝応答、さらに非分泌型フェルラ酸エステラーゼによる稲わら成分の分解について、最近得られた知見を紹介する。
また上記とは全く異なるが、食に関する異分野（異業種）連携の 1 つの出口として、群馬県開発品種「上州地鶏」の加熱調理による成分と食感変化解析から「温泉×上州地鶏」健康志向観光企画への展開についても触れる。

Residues produced in the food manufacturing process of agricultural products are considered to be biomass resources. Complex plant components such as lignin and ferulic acid can be renewable aromatic compounds. Since they are highly heterogeneous, selective conversion into molecules within a certain chemical property is desirable for effective utilization. The most predominant bond in lignin is the β-O-4 ether linkage, which is an important target for lignin conversion. Glutathione-S-transferase / GST is an enzyme that specifically cleaves this linkage. We are searching for bacteria that metabolize plant-derived low-molecular-weight aromatics from seafloor sediments and sunken wood, and are conducting research on their enzymes and metabolic responses. In this talk, we will introduce the recent findings on the β-O-4 ether-binding cleaving enzymes and the metabolic response, as well as the decomposition of rice straw components by non-secretory ferulic acid esterase.

In addition, as one example of cooperation between different fields (different industries) related to food, we will talk about the health-oriented tourism "Onsen×Joshu Jidori" developed from the analysis of cooking effects on the component and texture of the intrinsic chicken of Gunma.

lignin degradation, glutathione-S- transferase, ferulic acid esterase

講演番号：4BS-03
講演日時、会場：3 月 18 日 16:51～ ミーティングルーム B

量子ビーム小角散乱解析による食品タンパク質のナノ構造の解明

Nano-structure Analysis of Food Proteins by Small-angle Scattering

○裏出 令子（京大複合研）
○Reiko Urade (Kyoto Univ.)

タンパク質は、生体内では天然構造を介して機能を発揮している。タンパク質の天然構造は、X 線回折、NMR スペクトル、クライオ電顕などの解析手法が確立されており、機能との相関に関する知見が急速に集積されつつある。いっぽう、加工食品のタンパク質は、加工のプロセスで組織の破壊・混合による他の成分との相互作用および物理的・化学的環境変化にさらされるため、構造が変化（変性）し凝集不溶化している。たとえば、重要な植物性食品タンパク質源である大豆および小麦粉から生産される豆腐や饂飩、パンなどでは、これらに含まれる種子貯蔵タンパク質が加工によりナノスケールの凝集体を形成しており、これがそれぞれの食品に特有の物性を生み出している。しかし、不溶性の凝集体の構造は上記のような構造解析法で解明することが困難である。そこで演者らは、比較的構造規則性の低いナノ材料の強力な構造解析手法である量子ビーム小角散乱解析法を食品タンパク質の凝集体構造の解析に取り入れ、研究を行った。本講演では、塩の存在や化学的修飾によるグルテンタンパク質凝集体の物性の変化と、X 線小角散乱解析で明らかにした凝集体構造の変化との相関関係を論じる。また、放射光施設の高輝度 X 線を用いた小角散乱解析により初めて明らかとなった経時的な食品タンパク質凝集体の構造変化の例として、大豆タンパク質の加熱変性と凝集に関する知見を紹介する。

The natural structures of proteins have been analyzed by X-ray diffraction, NMR spectroscopy, and cryo-electron microscopy *etc*. On the other hand, proteins in processed foods are subjected to structural changes (denaturation) and aggregation-induced insolubilization due to interaction with other components and physical and chemical environmental changes. For example, in tofu, bread, and noodles produced from soybeans and wheat flour, the proteins in these products form nanoscale aggregates by processing, which give rise to the unique physical properties of each food. However, it is difficult to clarify the structure of insoluble aggregates by the structural analysis methods described above. Therefore, we have applied small-angle scattering (SAS) with quantum beams, which is a powerful structural analysis method for nanomaterial, to the analysis of aggregate structures of food proteins. In this talk, I will discuss the correlation between the changes in the physical properties of gluten protein aggregates due to the presence of salt or chemical modification and the changes in the aggregate structure revealed by small-angle X-ray scattering analysis (SAXS). Also, as an example of the structural change of food protein aggregates over time, I will introduce our findings on the heat denaturation and aggregation of soy proteins.

Nonoscale structure, Small-angle scattering, Food proteins

講演番号：4BS-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:15～ ミーティングルーム B

移動現象論に基づく水溶性食物繊維への低分子の吸着挙動の解析

Analysis of behavior of glucose adsorbed on water-soluble dietary fibers on the basis of transport phenomena

○熊谷 仁（共立女子大）
○Hitoshi Kumagai (Kyoritsu Women’s University)

食物繊維が食後の血糖値上昇を抑制することは知られており、そのメカニズムは、高分子による糖の吸着あるいは食物繊維添加による粘度の上昇により、血中に取り込まれるグルコース量が食物繊維の存在しない場合と比較して減少することに起因していると考えられている。グルコース吸着量の測定は、不溶性食物繊維に関しては遠心分離を使用した方法が用いられるが、水溶性食物繊維に関しては、この方法が適用できないため、Ou らが提唱した透析システムを使用した方法により、グルコースの吸着性が定性的に評価される。我々は、透析システムを用いて透析膜中のグルコースの拡散速度の差を測定し、構築した透析膜中のグルコース拡散方程式を適用することにより、水溶性食物繊維へのグルコースの吸着挙動の解析を行った。溶液中のグルコース濃度の経時変化は、構築した透析膜中のグルコース拡散方程式により良好に回帰できた。また、透析膜中のグルコースの拡散係数 *D* はグルコースの濃度によらず，ほぼ一定だった．さらに、CMC、Guar gum，Xanthan gum などのグルコースの吸着量を算出することができた。水溶性食物繊維へのグルコースの吸着量は、グルコース濃度の増加に伴って増加した（Henry 型吸着）。水溶性食物繊維の食後血糖値上昇抑制は溶液粘度には起因しないことが示された。本研究は、化学工学の基盤である移動現象論を用いることにより、水溶性高分子への低分子の吸着特性を解析したことに特徴がある。講演では、移動現象論および分子吸着モデルと食品科学・工学との関わりについても概説する予定である。

Soluble dietary fibers such as carboxymethyl cellulose (CMC) and xanthan gum are known to suppress the elevation in postprandial blood glucose level by the adsorption of glucose on them. The glucose adsorption on the soluble dietary fibers has been qualitatively discussed from the measurement of diffusion rate of glucose through a dialysis membrane. The amount of glucose adsorbed on soluble dietary fibers, however, has not been quantitatively evaluated. We developed a model for describing the rate of glucose diffusion through a dialysis membrane. The diffusion coefficient of glucose in the dialysis membrane, *D*, was constant, regardless of the glucose concentration. The data on the diffusion rate of glucose both in the presence and absence of water-soluble dietary fibres were well described by the model, and the amounts of glucose adsorbed on different fibres were evaluated. The amount of adsorbed glucose increased linearly with an increase in the glucose concentration. A decrease in diffusion rate was caused by adsorption of glucose on water-soluble dietary fibre but not by viscosity.

dietary fiber, adsorption, glucose

講演番号：4BS-05
講演日時、会場：3 月 18 日 17:39～ ミーティングルーム B

化学工学的なアプローチを用いた脂質の酸化・抗酸化メカニズム解析

Analysis of oxidation and antioxidation mechanisms of lipids by chemical engineering approach

○北川 尚美、高橋 厚（東北大）
○Naomi Shibasaki-Kitakawa, Atsushi Takahashi (Tohoku Univ.)

β-カロテンなどの天然抗酸化剤は、生活習慣病の要因といわれる生体膜脂質の酸化を抑制することから、疾病予防のための積極的な摂取が推奨されている。健康食品中では、主にエマルションの形で利用されており、経口摂取までの活性維持のため、複数の脂溶性・水溶性抗酸化剤が添加されている。しかし、これらの抗酸化剤は、自身が酸化してラジカル発生源となり、予防するはずの疾病を誘発するという報告も多い。そのため、食品の消費期限などに応じた適切な添加条件を決める必要があり、それには抗酸化機構の解明が重要となる。食品分野では、脂質の酸化・抗酸化に関する研究が古くから継続的に行われ、様々なメカニズムが提案されているものの、非常に複雑で特定は困難といわれていた。そうした中、演者らは新たに化学工学的なアプローチを用いて、実験と理論の両面からメカニズムの解明に取り組むこととした。そして、*β*-カロテン、ビタミン E、ビタミン C が共存する油水二相系に着目し、どのようなメカニズムで酸化・抗酸化が進行するのかを検討した。そして、最終的に、相間物質移動と各相および界面での反応を考慮することで、各抗酸化剤濃度の変化挙動を定量的に表現できる速度論モデルを構築した。このモデルによって、どのような添加条件で酸化促進効果が発現するのかも明らかとなり、保存条件や期間に応じた適切な抗酸化剤添加量が予測可能となった。本講演では、これらの研究成果を紹介する。

Natural antioxidants, such as *β*-carotene, prevent the oxidation of biomembrane lipids, reported to be a factor in lifestyle-related diseases. In healthy foods, carotene exists mainly in the form of emulsions, to which several lipophilic and hydrophilic antioxidants are added to maintain its activity. However, there are many reports that these antioxidants oxidize themselves and become a source of radicals, triggering diseases that should be prevented. It is necessary to determine the appropriate addition amounts of antioxidants according to the consumption period of the food. For this purpose, it is important to elucidate the oxidation and antioxidation mechanisms. In the food field, research on lipid oxidation and antioxidation has been conducted continuously for a long time, and various mechanisms have been proposed, but the mechanisms were considered to be very complex and difficult to identify. We newly used a chemical engineering approach to elucidate the mechanism from both experimental and theoretical perspectives. We focused on the oil-water biphasic system in which *β*-carotene, vitamin E, and vitamin C coexist, and investigated the mechanism of oxidation and antioxidation. A kinetic model well predicting the appropriate amount of antioxidant under various conditions was developed.

lipids, oxidation and antioxidation, kinetic model

講演番号：4BS-06
講演日時、会場：3 月 18 日 18:03～ ミーティングルーム B

近赤外非侵襲イメージングのフードサイエンスへの応用

Application of NIR non-invasive imaging for food sciences

○三輪 佳宏[1,2,3]、逆井 智貴[4]、番 奏絵[4]、木嶋 順子[3]（[1]理研 BRC、[2]筑波大 LSI、[3]筑波大医、[4]筑波大人間総合）
○Yoshihiro MIWA[1,2,3], Took SAKASAI[4], Kanae BAN[4], Junko KIJIMA[3] ([1]RIKEN BRC, [2]Univ. Tsukuba T-LSI, [3]Univ. Tsukuba Med, [4]Univ. Tsukuba CHS)

生物個体中で起こる高次生命現象を捉えるためには動物個体を用いた実験が必要であり、詳細な解析をするためには、生きたままの動物の生体内環境を乱すことなく、より深部まで観察できる実験系が必須となる。そこで当研究室では、哺乳動物体内への吸収が少なく、マウスの体厚を容易に透過できる 650～900 nm の近赤外光に着目し、2011 年 Verkhusha らのグループから報告された近赤外蛍光タンパク質 iRFP を用いて、非侵襲 in vivo 近赤外蛍光イメージング手法の確立を進めてきた。これまでに、iRFP 全身発現 Tg マウス、ROSA26 領域に CAG-loxP-HaloTag-loxP-iRFP からなる DNA 断片を挿入し、Cre リコンビナーゼ存在下でタグタンパク質 HaloTag から iRFP に発現が切り替わる iRFP-flox マウスを作製した。このマウスは組織特異的・細胞種特異的に Cre が発現するマウスと交配することで、特定の臓器、組織、細胞で iRFP を発現させることができ、生きたマウスを非侵襲に体外からイメージングできる。
本講演では、動脈硬化、炎症、線維症など、具体的な疾患を簡便にモニタリングするモデルを紹介し、非侵襲イメージング技術のフードサイエンスへの応用と展開について議論する。

Animal experiments are required to analyze systemic biological phenomena, and especially non-invasive imaging techniques for observing deeper tissues are essential for precise analyses the phenomena in living animals. It is well known that Near Infra-Red (NIR) light of 650-900 nm can propagate by multiple scattering through several centimeters of mammalian tissues, because of the low absorbance of tissue chromophores such as oxy- and deoxy-hemoglobin, melanin and fat. Verkhusha's group reported iRFPs the NIR fluorescent proteins with higher intensity. We have tried to develop non-invasive *in vivo* NIR imaging methods and have already established transgenic mouse expressing iRFP whole body and iRFP-flox mouse by knocking in a DNA fragment composed of CAG-loxP-HaloTag-loxP-iRFP into ROSA26 region. Using this iRFP-flox mouse you can rapidly establish cell type-specific, tissue-specific and organ-specific iRFP-expressing mouse lines by mating restricted cre-expressing mice and easily visualize cell type, tissue, organ and various biological phenomena of interest.
In this talk, I will introduce mouse models for analyzing atherosclerosis, inflammation and fibrosis, and discuss applications of NIR non-invasive imaging of living mice for food sciences.

Near Infra-Red, imaging, fluorescence

講演番号：4CS-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:04～ ミーティングルーム C

ノボザイムズにおける新規な酵素応用例と新規酵素の開発例

New enzyme applications and enzyme development in Novozymes

○倉方 悠馬（ノボザイムズジャパン株式会社）
○Yuma KURAKATA (Novozymes Japan Ltd.)

既存の酵素応用分野においても、また、既知の種類の酵素においても、そこでの“新規”酵素開発は可能である。最近の弊社における新規酵素開発の例として、1)バイオ燃料、洗剤、飼料向け酵素の開発、2)バイオ燃料やデンプン工業における既存酵素の高機能化、3)コーンウェットミリングへのセルラーゼ系酵素の新規応用などを幅広く紹介したい。また具体的な開発手法や実際の開発例もいくつか紹介する。例えば 2)のバイオ燃料分野においては、液化に用いられる酵素は現在では液化型アミラーゼだけでなく、様々な種類の耐熱性酵素がタンパク質工学の手法などを用いて開発され利用されている。さらに耐熱性酵素の開発の具体例のひとつとして、プルラナーゼの耐熱化を紹介したい。弊社でよく用いられる酵素の熱安定化（分子動力学法や Ancestral sequence reconstruction など）の手法を用いて決定した変異導入部位のライブラリーからスクリーニングされた変異体を精製、評価し、さらに耐熱性の向上に寄与するアミノ酸変異を組み合わせることで、基のプルラナーゼから 13℃以上高い Td 値をもつ変異体を得た。この変異体は、基質濃度の高い条件下では液化が行われる 80℃が至適温度であった。このような高い耐熱性をもち、高温条件下でも作用する酵素は、様々な産業分野への応用が期待される。

There is still a lot of space to develop "new" enzymes in existing enzyme application fields, as well as in known types of enzymes. As examples of our recent development of new enzymes, we would like to introduce 1) the development of enzymes for biofuels, detergents, and animal feed, 2) the functionalization of existing enzymes in the biofuel and starch industries, and 3) the new application of cellulase-based enzymes for corn wet milling. We will also introduce some specific development methods and actual development examples. For example, in the biofuel field (2), not only liquefied amylase but also various kinds of thermostable enzymes have been developed and used by using protein engineering methods etc.. As a specific example of a thermostable enzyme, we would like to introduce pullulanase stabilization. We have constructed a library of mutation sites determined using some enzyme thermostabilization methods often we use (molecular dynamics method, Ancestral sequence reconstruction, etc.), purified and evaluated the screened mutants from the library. By combining effective amino acid mutations that contribute to the thermostability improvement, we obtained a mutant with a Td value more than 13°C higher than that of the underlying pullulanase, and this mutant showed an optimum temperature of 80°C under liquefaction conditions. Such a stable enzyme which act under high temperature conditions can be applied to various industrial fields.

enzyme

講演番号：4CS-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:28～ ミーティングルーム C

花王における産業用酵素開発とその展開

Development and utilization of industrial enzymes in Kao

○川原 彰人（花王株式会社）
○Akihito Kawahara (Kao Corporation)

花王では、衣料用洗剤用途として酵素を 30 年以上にわたり産業的に活用してきた。我々は、木綿繊維の非結晶領域に作用し、閉じ込められた落ちにくい汚れを放出させるという新しい機構で洗浄力の飛躍的向上に寄与する「アルカリセルラーゼ」を開発した。更にタンパク汚れの除去効果が高く、酸化剤耐性を有する分子質量約 43kDa の「アルカリプロテアーゼ」を新しいズブチリシンファミリーとして取得し、衣料用洗剤酵素として活用してきた。本発表では、衣料用洗剤酵素の絶えざる革新に向けて、飽くなき挑戦を続けているプロテアーゼの開発事例を中心に技術紹介をするとともに、プロテアーゼが持つ基質特異性を活用した衣料用洗剤用途以外への応用検討事例についても紹介する。

また、我々は衣料用洗剤酵素開発・生産研究を通し、タンパク質生産に有用な枯草菌育種技術を蓄積するとともに、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のプロジェクトへの参画などから、多様な性質を持つ改変枯草菌ライブラリーについても整備してきた。後半では、花王が有する枯草菌によるタンパク質生産システムの応用展開に関して、中期経営計画や社会貢献の観点を交えつつ、現在進めている低分子抗体など感染症対策に役立つタンパク質生産への応用を目指す新たな取組みについても紹介する。

Kao has incorporated enzymes into laundry detergents for over 30 years. We have developed "Alkaline Cellulase", which contributes to a dramatic improvement in detergency with a new mechanism. The cellulase acts on the non-crystalline region of cotton fibers and releases stains that are difficult to remove. And, we have acquired an "alkaline protease" with a molecular mass of about 43 kDa, which has a high effect of removing protein stains and is resistant to oxidants, as a new family of subtilisin. We will introduce the development process of Kao's proteases. In addition, we will also introduce studies aimed at applications other than laundry detergent.

Through the development and production of enzymes for detergents, we have accumulated *Bacillus subtilis* breeding technology useful for protein production, and have also developed a modified *B. subtilis* library with various properties. In the second half, regarding the application of the protein production system by *B. subtilis*, we will also introduce new efforts aimed at producing proteins that are useful for infectious disease control such as antibody fragments.

detergent enzyme, protease, *Bacillus subtilis*

講演番号：4CS-03
講演日時、会場：3 月 18 日 17:02～ ミーティングルーム C

ナガセの放線菌大量発現システム（N-STePP（R））を活用した産業用酵素の開発

Development of industrial enzymes by NAGASE's Streptomyces overexpression system 'N-STePP(R)'

○廣瀬 修一（長瀬産業株式会社）
○Shuichi Hirose (NAGASE ＆CO., LTD.)

日本には味噌や醤油に代表されるような豊かな発酵文化があり、微生物を利用した発酵食品加工は世界に誇れる日本を象徴する技術の１つである。酵母やカビ等の多様な微生物が発酵生産に利用される中、長瀬産業は遺伝子リソースが豊富であるという理由から、放線菌に着目してきた。しかしながら、大腸菌や酵母等の汎用宿主に比べて取扱いが非常に難しく、誰もが身近に使える微生物ではなかった。この課題をクリアするため、基礎的な学術レベル段階から、生産性向上を目的とした開発を進めてきた。具体的には、プロモーターの開発、ｔＲＮＡの高発現化、生産に適した宿主改良等に取り組み、他の宿主に比肩するタンパク質発現量を達成した。また、この技術をもとに、ナガセケムテックスでは、これまでに多数の製品を上市してきた。例えば、製パン用途のＰＬＡ２やキチナーゼ、調味料用途のグルカナーゼ、肉軟化用途のプロテアーゼ、ホスホリパーゼがある。我々は、放線菌の包括的な物質生産技術を「Ｎ－ＳＴｅＰＰ®」と名付け、更なるレベルアップを目指して活動している。最後に、昨今の環境配慮型の持続可能な社会の実現が世界的な課題となる中、今後微生物発酵が大きな脚光を浴びることは疑いの余地はないと予想され、長瀬産業は、Ｎ－ＳＴｅＰＰ®を礎にし、これからも産業用酵素開発で社会へ貢献していきたい。

Japan has a rich fermentation culture represented by miso and soy sauce. Nagase has focused on *Streptomyces* as a host for production among a wide variety of microorganisms because of their rich genetic resources. However, they are very difficult to handle, therefore people have been refrained from using it for industrial purpose. In order to overcome those problems, Nagase has been challenging to develop technologies for improving productivity. So far, we have achieved high protein expression comparable to those of other hosts. Based on this technology, Nagase ChemteX has already launched several enzymes in food processing such as PLA2 and chitinase for baking. Recently, we named comprehensive Streptomyces technology ″N-STePP®″. Finally, there is no doubt that microbial fermentation will be in the spotlight since the achievement of a sustainable society becomes a global issue in the future. Nagase will continue to contribute to society with sustainable productions using N-STePP®.

Streptomyces, Enzyme, Industrial production

講演番号：4CS-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:31～ ミーティングルーム C

微生物由来シトクロム P450 の探索とその利用

The search for microbial cytochrome P450 and the application thereof

○阪本 剛（三菱ケミカル株式会社 Science & Innovation Center）
○Takeshi SAKAMOTO (Mitsubishi Chemical Corporation Science & Innovation Center)

テルペノイドはイソプレンを基本構成単位とする天然物化合物群の総称である。その中でもトリテルペノイドには医薬品の原料又はそれ自体が原体として利用されているものが少なくない。こうした化合物は植物から抽出したトリテルペノイドを原料にマルチステップの化学反応により合成されるものが多いが、近年の気候変動により安定的な原料調達への懸念が高まりつつある。その対策の一つとして、目的とするトリテルペノイドを生産しない微生物において、動物又は植物に存在する生産経路を合成生物学的に構築し、それらの微生物菌体を用いたバイオ合成プロセスにより目的物質を生産する手法に関心が高まっている。本演題では、医薬領域で有用なトリテルペノイドの合成手法構築において重要な酸化反応を触媒する 3 種類の微生物由来シトクロム P450 を紹介する。まず、バクテリアより見出したコレステロールの側鎖切断酵素として CYP204A1 とそのホモログを紹介する。次いで、カビから見出したシトクロム P450 として、11-デオキシコルチゾールの 11β-水酸化酵素、及び、抗炎症作用を有するグリチルレチン酸の生合成において重要な 11-オキソ-β-アミリンの 30 位酸化酵素、並びにそれらを利用したバイオ合成手法開発の取り組みを報告する。

The terpenoids are a large class of naturally occurring organic chemicals which are structurally composed of 5-carbon compound isoprene as the building unit. Of them, the triterpenes are utilized industrially as the pharmaceuticals or raw materials for their synthesis. Many of those pharmaceuticals are produced from the plant-derived triterpenes through multi-step organic synthesis. However, there is increasing concerns that stable procurement of those triterpenes may be hampered by drastic climate change. As one of promising solutions to them, the biosynthetic processes for those compounds using microorganisms in which the metabolic pathway existed only in animal or plant cells are installed by recombinant DNA technology are paid more attention. In this presentation, three of unique microbial cytochrome P450s catalyzing hydroxylation/oxidation reaction important in the biosynthetic pathway for triterpenes in animal or plant cells are reported. First, the bacterial cytochrome P450, CYP204A1 and its homolog, are shown to catalyze side-chain-cleaving. In addition to these proteins, the cytochrome P450 catalyzing 11-beta-hydroxylation of 11-deoxycortisol, and the cytochrome P450 oxidizing C-30 of 11-oxo-beta-amyrin in the biosynthesis pathway for glycyrrhetinic acid are reported. Finally, the attempts to develop the production process for the triterpenes useful in medical field using those enzymes are described.

cytochrome P450, triterpene, hydroxylation

講演番号：4CS-05
講演日時、会場：3 月 18 日 18:00～ ミーティングルーム C

天野エンザイムにおける酵素探索と応用開発

Enzyme exploration and application development in Amano Enzyme

○山口 庄太郎 (天野エンザイム株式会社)
○Shotaro Yamaguchi (Amano Enzyme Inc.)

天野エンザイムは、創業 122 年、酵素の製造を始めて 73 年の歴史を持つ。事業領域である食品分野とメディカル分野の融合と相乗作用を生かし、酵素を中心とした醗酵産物の価値創造とその提供に尽力している。事業ビションは“World No.1 Speciality Enzyme Producer”である。

酵素は言うまでもなく、古くからエネルギー多消費で副反応が伴う化学法に変わる物質変換用触媒として産業界で利用されてきた。今後も、持続可能な循環型社会に貢献する触媒として益々注目を浴び続けると考えられる。

当社では企業理念の一つとして「自然との共生」を掲げ、伝統技術と先端技術のシナジーを追及するため、最新のバイオテクノロジー技術ばかりでなく、伝統的に日本の酵素研究が得意とする自然界からのスクリーニングにも注力している。

本講演では、酵素探索と応用開発における当社の取り組みについて、いくつか紹介する。

Amano Enzyme has a history of 122 years from its establishment, and of 73 years since it was founded and started as an enzyme manufacturer. Taking advantage of the fusion and synergistic effects of the food and medical fields, both are the business areas, Amano Enzyme are making efforts to create and provide the value of fermented products centered on enzymes. The business vision is "World No. 1 Specialty Enzyme Producer".

Needless to say, enzymes have been used in the industry for a long time as catalysts for substance conversion to replace chemical methods that consume high energy with side reactions. Enzymes are attracting more and more attentions as catalysts that contribute to a sustainable and recycling society in recent years. This would obviously continue in the future.

Amano Enzyme have set "coexistence with nature" as one of our corporate philosophies, and in order to pursue synergies between traditional and advanced technology, we are dedicating not only advanced biotechnology but also enzyme screening from nature that traditional Japanese enzyme research has advantage.

In this talk, I would like to introduce some of our research on enzyme exploration and application development.

Enzyme, Screening

講演番号：4DS-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:05～ ミーティングルーム D

植物の化学防御物質フラノクマリンの生合成・蓄積の空間的局在性

Spatial localization of biosynthesis and accumulation of plant allelochemical furanocoumarins

○棟方 涼介（京大生存研）
○Ryosuke Munakata (RISH, Kyoto Univ.)

植物の生産する特化代謝産物は医薬品原料や染料、香辛料など多様な形で我々の生活に取り入れられてきた。しかし、100 万種にも及ぶとされる植物特化代謝産物の多くが未活用である。この現状を打破するためには、植物特化代謝の大きな特徴の 1 つである空間的な局在性を、生合成から蓄積までの一連の現象について理解するのが重要と考えられる。本発表では初めに、植物の化学防御物質フラノクマリン（FC）類を例にとり、植物系統間で多様なその生合成部位と蓄積組織を紹介する。次に、ミカン科柑橘類に焦点を当て、FC 生合成の局在性について自身の最近の成果を基に議論する。FC 類の一種ベルガモチンは柑橘外果皮の分泌腔と呼ばれる細胞外区画に蓄積し、人が摂取した際に薬物動態かく乱を引き起こすことが知られている。しかし、ミカン科においてベルガモチン生合成を担う遺伝子は不明であった。そこで、演者らはグレープフルーツ（*Citrus* × *paradisi*）の外果皮トランスクリプトームデータを取得し、それを基にベルガモチン生合成最終段階の *O*-プレニル化反応を担う酵素遺伝子（*C.* × *paradisi prenyltransferase 1*, *CpPT1*）を同定した。器官毎の *CpPT1* 発現パターンはベルガモチンの蓄積パターンとリンクしていた。さらに、細胞内局在解析により、CpPT1 はプラスチドで機能することが強く示唆され、これによりベルガモチン生合成中間体がサイトゾル-プラスチド間を移動している可能性が示唆された。

The diversity of phytochemicals is estimated to reach one million species, while most of them have remained unexploited. To overcome this situation, we need to further understand spatial localization of biosynthesis and accumulation in plant specialized (secondary) metabolism. Firstly, I will introduce the diversities of biosynthesis and accumulation sites of furanocoumarins (FCs) among plant taxa. Next, I will focus on localization of FC biosynthesis in *Citrus* (Rutaceae). Bergamottin, a FC molecule, is highly accumulated in oil cavities in the citrus outer pericarp. This citrus constituent is known to disturb pharmacokinetics in the human body, whereas bergamottin biosynthetic genes in Rutaceae have been unknown so far. Here, based on a transcriptome data of the outer pericarp of grapefruit (*Citrus* × *paradisi*), we identified *C.* × *paradisi prenyltransferase 1* (*CpPT1*) that is located at the last biosynthetic step. Spatial expression pattern of *CpPT1* matches with accumulation pattern of bergamottin. Subcellular localization analysis suggested that CpPT1 functions in the inner envelope of plastids, posing the possibility that biosynthetic intermediates are moved between cytosol and plastids.

Plant specialized (secondary) metabolism, Spatial localization, Furanocoumarins

講演番号：4DS-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:25～ ミーティングルーム D

進化の過程で最適化された植物揮発性化合物の生成制御機構：代謝工学による人為的改変は可能か？
Evolutionarily optimized regulatory mechanisms for the production of plant volatile organic compounds: Can we modify them by metabolic engineering?

○肥塚 崇男（山口大院創成）
○Takao Koeduka (Yamaguchi Univ.)

植物は、生育する環境に適応するため、多様な特化代謝産物（二次代謝産物）を作り出すことで巧みに生きている。特に、香り（揮発性化合物）は他の代謝産物とは異なり、空間的に離れた生物間のコミュニケーション媒体として知られ、その成分組成や生成される時間帯を変えることで特定の受粉媒介者や植食者の天敵を誘引するなど情報化学物質として機能する。一方、揮発性化合物が葉表面のトライコームなどで高濃度に蓄積および隔離されると、食害時に拡散性の化学防衛物質として機能するだけでなく、自己への毒性回避が可能となる。しかしながら、細胞内で生合成された揮発性化合物がどのようにして大気中へと放散されるのか、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。

演者らは、植物揮発性化合物が部位特異的に蓄積する、また、日周リズムに従って生成されるという特徴に着目し、その生合成に関わる酵素遺伝子の同定を行ってきた。本発表では、植物揮発性化合物が生合成された後、どのように蓄積、輸送、放散されるのか、最近の知見を紹介する。さらに、ナス科植物を実験材料として、演者が取り組んでいる芳香族香気成分の生成に関するトランスクリプトーム解析や代謝工学的アプローチを踏まえ、揮発性化合物を含めた有用成分における、植物を発現ホストとした物質生産への人為的制御に向けた道筋についても議論したい。

Plants adapt to the environment in which they grow by producing a variety of specialized metabolites. In particular, volatile compounds (VOCs), unlike other metabolites, is known as a communication medium between spatially separated organisms, and functions as signaling molecules that attract specific pollinators and natural enemies of vegetation by changing its composition and the time of day those are produced. On the other hands, when VOCs are accumulated in high concentrations in leaf surface trichomes, they not only function as chemical defense, but also enable the plant to avoid toxicity to itself. However, the detailed mechanism of how VOCs biosynthesized in cells are released into the atmosphere is still unclear.

We have focused on the spatio-temporal accumulation of plant VOCs, and have identified the genes involved in their biosynthesis. In this presentation, we will summarize and introduce recent findings on how plant VOCs are accumulated, transported, and emitted after biosynthesis. In addition, based on our transcriptome analysis and metabolic engineering in Solanaceae plants for the production of aromatic VOCs, we would like to discuss the strategy toward bio-production of plant specialized metabolites via genetic engineering in transgenic plants.

Plant specialized metabolism, Volatile organic compounds, Genetic engineering

講演番号：4DS-03
講演日時、会場：3 月 18 日 16:50～ ミーティングルーム D

１細胞オミクスが明らかにした細胞横断型アルカロイド生合成機構

Intercellular alkaloid biosynthesis revealed by single-cell omics

○山本 浩太郎[1,2]、高橋 勝利[3]、水野 初[4]、山崎 真巳[1]、三村 徹郎[5,6]([1]千葉大・院・薬、[2]マックスプランク化学生態学研究所、[3]産総研・創薬基盤研究部門、[4]静岡県立大・薬、[5]國立成功大學・生科・科技、[6]東京大・院・農学生命)
○ Kotaro Yamamoto[1,2], Katsutoshi Takahashi[3], Hajime Mizuno[4], Mami Yamazaki[1], Tetsuro Mimura[5,6] ([1]Chiba Univ., [2]MPICE, [3]AIST, [4]University of Shizuoka, [5]National Cheng Kung Univ., [6]UTokyo)

ニチニチソウ（*Catharanthus roseus*）は、Vinblastine や Vincristine などの抗がん剤となる Terpenoid indole alkaloid（TIA）をはじめとして、様々な二次代謝産物を生産することで著名な薬用植物である。ニチニチソウの TIA 合成は、一連の生合成過程が茎や葉組織において葉肉細胞、表皮細胞など様々な細胞を経由して進むことが酵素の発現場所の解析などから報告されている。特に異形細胞（Idioblast cell）が TIA 代謝の重要な過程に関与すると考えられているが、これらの細胞内や細胞間における二次代謝過程の分子機構は十分には理解されていない。

我々は、ニチニチソウ茎や葉組織における細胞レベルでのアルカロイドの分布を解明するために、一細胞質量分析技術や質量顕微鏡を用いたメタボローム解析を試みた。その結果、Vindoline や Serpentine などの異形細胞で合成されると推測される TIA はもとより、表皮細胞で合成されると考えられている Strictosidine のような TIA も異形細胞に多く蓄積されていることが明らかになった。さらに、茎組織と葉組織の細胞レベルでの比較メタボローム解析より、組織特異的な異形細胞の TIA 代謝分化が起きている可能性が示された。今回はこれらの成果と共に、細胞を横断しながら行われる TIA 代謝機構の詳細について発表する。

Catharanthus roseus (L.) G. Don is a famous medicinal plant producing antitumor drugs, such as vinblastine and vincristine, which are classified as terpenoid indole alkaloid (TIA). It has been supposed that TIA synthesis in both stem and leaf tissues of *C. roseus* starts from internal phloem associated parenchyma cells (IPAP cells), and intermediates of TIA move from IPAP cells to epidermal cells. TIAs are finally accumulated in idioblast cells. TIA metabolic pathway, however, has not been clarified in detail, yet. Especially, it still remains unknown how TIAs are synthesized and accumulated in the idioblast cells.

We used novel metabolome analyses, that is Imaging MS and Single cell MS, in order to detect what kinds of TIAs localize in idioblast cells. In our measurement, the idioblast cells contain various kinds of alkaloids including strictosidine, vindoline and serpentine. We discuss a new possibility of TIA synthesis in the idioblast cells of *C. roseus* plants.

Alkaloid, Single-cell omics, Idioblast cell

講演番号：4DS-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:15～ ミーティングルーム D

薬用植物ムラサキにおける脂溶性代謝産物シコニンの細胞外分泌機構

Research on transport mechanism of specialized lipophilic compounds using shikonin production system

○巽 奏（フランス国立科学研究センター）
○Kanade Tatsumi (CNRS, IBMP)

植物は自らをとりまく環境に適応し、個々の戦略に基づいて生存するために、極めて多様な化学構造を有する特化代謝産物を進化させてきた。これら代謝産物が的確にその生理機能を発揮するためには、厳密な時空間的制御が重要であり、多くの植物において、特化代謝産物は決められた細胞・組織に輸送、分泌されるよう高度にプログラムされている。アントシアニンなどの多くの水溶性の特化代謝産物は液胞に蓄積される一方で、脂溶性の特化代謝産物についてはプラスチドやアポプラストに蓄積することがこれまでに知られている。特に、動くことのできない植物にとっては外界からのストレスにさらされる最外層に脂溶性のポリマーや低分子生理活性物質などをバリアとして蓄積することは生存戦略として重要である。陸上植物が一般にアポプラストに分泌するクチンやスポロレニンをはじめ、植物種によっては特殊な脂溶性特化代謝産物を生合成し、細胞外スペースに蓄積する。このように脂溶性物質が細胞外に分泌される例は陸上植物に普遍かつ、化合物としては多様でありながら、細胞内で生合成されたのちにどのような分子機構により輸送されているのか、そのメカニズムは不明な点が多い。近年、この現象を分子レベルで解明するためにムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）が生産するナフトキノン系赤色色素シコニンを分泌型脂溶性代謝産物のモデルとした研究が国内外で展開されてきた。本シンポジウムではシコニンを含む細胞外スペースへ分泌される脂溶性物質の輸送機構に関する最先端の研究成果を紹介する。

Plants produce a broad array of specialized lipophilic compounds. Most of them are transported into their extracellular spaces to protect themselves from UV radiation and pathogen attack, and so on. More specifically, all land plants produce lipophilic polymers, including cutin and sporopollenin, and transport them into apoplastic spaces of proper tissues. Not only these apoplastic barriers, some plants produce a distinct set of specialized lipophilic compounds depending on plant lineage. Although intensive studies have identified their biosynthetic pathway, it is still unknown how these lipophilic compounds are transported into the accumulation site.

Shikonin derivatives are red pigments produced in the root of a medicinal plant (*Lithospermum erythrorhizon*). Recently, researches on the transport mechanism using shikonin derivatives have been conducted intensively. This presentation will introduce our recent findings and discuss the state-of-the-art transport molecular mechanism of lipophilic compounds.

specialized lipophilic compounds, transport mechanism, shikonin

講演番号：4DS-05
講演日時、会場：3 月 18 日 17:40～ ミーティングルーム D

植物のオルガネラ機能の多様性 ~特化代謝産物を蓄積するゼニゴケ油体の形成メカニズム~
Secretory activity is required for the biogenesis of the oil body in *Marchantia polymorpha*
○金澤 建彦[1,2] ([1]基生研、[2]総研大)
○Takehiko Kanazawa[1,2] ([1]NIBB, [2]SOKENDAI)

植物は、様々な特化代謝産物を合成・蓄積しており、その中には植物自身に毒性を示す化合物も存在する。植物は進化の過程で、植物自身への細胞毒性を回避するメカニズムも発達させてきた。コケ植物苔類も特有の特化代謝産物を合成しており、これらの細胞毒性の高い化合物は「油体」と呼ばれる苔類独自のオルガネラに蓄積することで、その毒性を回避していると考えられている。油体は今から 180 年以上前の文献に既に記述があるものの、その形成機構は未解明であった。真核生物の内膜系オルガネラへの物質輸送機構は、膜交通と呼ばれ、膜で囲まれた輸送中間体を介して、タンパク質や膜脂質、多糖類などが正しいオルガネラへと輸送される。我々の研究グループでは、オルガネラと膜交通経路の多様化機構の解明を目指し、ゼニゴケの油体を系統独自に獲得されたオルガネラのモデルとして研究を行っている。分泌経路の積み荷がゼニゴケの油体へ輸送されることを見出し、分泌経路が細胞内へ方向転換し、分泌小胞が細胞内で融合を繰り返すことにより油体が形成されることを明らかにした。また、分泌経路における主要因子の変異体が油体形態異常を引き起こすことも明らかになり、分泌経路が油体形成において重要な役割を担っていることを支持している。本発表では、これらの研究成果とともに、膜交通経路の多様性と植物の内膜系オルガネラの機能分化についてディスカッションする。

Plants produce a variety of cytotoxic specialized metabolites, and have developed mechanisms of resistance to self-produced cytotoxic specialized metabolites as well. Liverworts in bryophytes also produce cytotoxic compounds, some of which are accumulated in the oil body, a unique organelle to liverworts. Membrane traffic accomplishes the delivery and localization of the various substances among single membrane-bounded organelles. We aim to elucidate the detailed molecular mechanisms and physiological functions of membrane trafficking in the oil body biogenesis. Our group discovered that secretory cargos are targeted to the oil body in oil body cells in the liverwort, *Marchantia polymorpha*, which indicated that the oil body is formed by the redirection of the secretory pathway followed by fusion of secretory vesicles inside the cell. In addition, we also isolated mutants with abnormal morphology of the oil body, one of which was caused by a mutation in a key machinery component of secretory trafficking. These findings suggested that secretory activity is required for the biogenesis of the oil body in *M. polymorpha*.

membrane traffic, organelle, *Marchantia polymorpha*

講演番号：4DS-06
講演日時、会場：3 月 18 日 18:05～ ミーティングルーム D

輸送工学を用いた植物有用アルカロイドの効率的微生物生産系の開発

Transport engineering for improving the production of plant valuable alkaloids in microorganisms

○山田 泰之（神戸薬大・医薬細胞）
○Yasuyuki YAMADA (Kobe Pharma. Univ.)

近年、生合成工学の発展により多様な植物特化代謝産物の微生物生産が可能となってきている。しかし、生産化合物の生物活性（毒性）などによる収率の低下も報告されており、それらをいかに回避するかが課題の 1 つと考えられた。我々は、この課題克服のために、植物が独自に有する生産化合物への耐性・輸送機構に着目した。本研究では、モルヒネなどに代表されるベンジルイソキノリンアルカロイド（BIA）の中間体を生産する大腸菌やメタノール資化性酵母（ピキア酵母）をモデルに、植物のアルカロイド輸送体の微生物への導入による、化合物の生産効率への影響を検証した。

生体異物排出輸送体であるシロイヌナズナの AtDTX1、タバコのアルカロイド輸送体である NtJAT1 を、BIA の重要中間体である reticuline 生産性大腸菌に導入したところ、いずれも reticuline 生産量が顕著に増大した。AtDTX1 導入大腸菌について、生産効率向上のより詳細なメカニズム解明を目的に RNA-seq 解析などを行ったところ、大腸菌内在のアミノ酸代謝等に関わる遺伝子群の大きな発現変動が認められた[1]。また、BIA の中間体である stylopine を生産するピキア酵母に NtJAT1 を導入した場合も、stylopine 生産量の有意な増加が認められた。以上の結果から、生合成工学に輸送工学を組み合わせることで、微生物における植物有用分子のさらなる高生産が期待できると考えられる。

Recently, the biosynthetic pathway of plant specialized metabolites has been reconstructed in microorganisms for efficient production. In some cases, however, growth retardation and low productivity have been reported, which is probably due to the cytotoxicity of products. In this study, we introduced alkaloid transporters into engineered *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, which can produce intermediates of benzylisoquinoline alkaloids, and assessed the productivity.

Introduction of AtDTX1 and NtJAT1, which are alkaloid transporters in *Arabidopsis* and tobacco, respectively, into reticuline-producing *E. coli* highly improved reticuline production and led to the efflux of reticuline to the medium. AtDTX1 expression affected expression profiles of endogenous genes involved in various metabolic pathways for reticuline biosynthesis[1]. Introduction of NtJAT1 into stylopine-producing *P. pastoris* also improved stylopine production. These findings suggest that transport engineering is a powerful tool to enhance the productivity of plant valuable metabolites in microorganisms.

1 Yamada et al., *Metab Eng Commun.* 2021, 13:e00184. DOI: 10.1016/j.mec.2021.e00184.

Transport engineering, Alkaloid, Metabolic engineering

講演番号：4ES-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:00～ ミーティングルーム E

腸内細菌によるムチン型糖鎖の分解は宿主の健康・疾患に関わる
Microbial decomposition of mucin O-glycans in the health and diseases

○片山 高嶺（京大生命）
○Takane Katayama (Kyoto Univ.)

腸内細菌叢が宿主の健康や疾患に大きな影響を与えることが明らかになって以降、腸内細菌が如何にして腸管内で生息し、その生理機能を発揮しているかを分子レベルで理解することの重要性が増している。近年、腸内細菌はその栄養源として食餌由来の糖質を利用するのみならず、宿主由来の糖質も利用していることが明らかとなってきた。本シンポジウムでは、腸管に多量に分泌される糖タンパク質ムチンに着目し、腸内細菌によるムチン分解が宿主の健康や疾患にどのように関わっているかについて、第一線で活躍する研究者から情報提供を頂くこととした。また、ヒューマングライコームプロジェクトの一環としてムチン糖鎖の構造や合成遺伝子のデータベース化を行っているインフォマティシャンにも講演頂き、腸内細菌研究との連携を探る予定である。まずは講演に先立ち、講演者の紹介とムチン研究の概要について簡単に紹介する。

Gut microbiota has a significant impact on human health and diseases; therefore it is important to understand at the molecular level how gut microbes colonize and persist in intestines, thereby exerting its physiological effects to the host. Recent studies have revealed that gut microbes not only utilize diet-derived nondigestible glycans to proliferate in the guts but also utilize host-derived glycans as carbon sources to produce compounds that are beneficial and/or harmful to the host cells. In this symposium, we will try to uncover how gut microbial decomposition of “mucin O-glycans” in intestines influences and mediates symbiosis/dysbiosis between gut microbiota and the host. We will have lectures from four prestigious researchers who have significantly contributed to the field. I will start the symposium by shortly introducing current perspectives of mucin-related studies.

gut microbes, mucin O-glycan, symbiosis and dysbiosis

講演番号：4ES-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:10～ ミーティングルーム E

酵素特性から視る腸内細菌によるムチン糖鎖分解の異なる２様式

Distinct two modes of mucin glycan degradation by gut microbes from the view of enzymatic characteristics

○加藤 紀彦（京大院生命）
○Toshihiko Katoh (Kyoto Univ.)

腸内細菌の一部の菌種は、ムチン型糖鎖を分解するムチン資化性菌として知られる。宿主腸管から分泌されるムチンのこれらムチン資化性菌による分解には、ヒトにとって正負両面の影響がある。すなわち、ムチン粘液層の過剰な分解は病原性微生物への感受性を高めてしまうが、その適度な分解は健全な腸内環境や粘膜免疫恒常性の維持に重要な短鎖脂肪酸の産生を促す。我々はこのムチン分解バランスを司るメカニズムについて明らかにするため、ムチン資化性菌によるムチン糖鎖分解機構についての研究を進めている。

プロバイオティクスとして知られるビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* はムチン糖鎖分解特性を有する。本菌由来のムチンに作用する糖質分解酵素群の共通の特徴として、膜表層結合型細胞外酵素であること、また反応触媒ドメインに付随して carbohydrate-binding module（CBM）等の糖鎖結合ドメインを有することが挙げられる。β-6-Sulfo-*N*-acetylglucosaminidase（BbhII）や 1,2-α-L-fucosidase（AfcA）の CBM および糖鎖結合ドメインを欠失させた変異体解析の結果、遊離糖基質に対する分解活性には大きな影響がないが、ムチンに対する分解活性が著明に低下することが示され、これらの糖鎖結合ドメインが本菌のムチン分解において重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方で、*Akkermansia* 属や *Bacteroides* 属のムチン資化性菌由来酵素群における糖鎖結合ドメイン保持率は非常に低く、酵素も分泌型である場合が多い。さらにこれらの菌ではムチン型糖鎖に対するエンド型酵素を有することが報告されている。これらの菌は *B. bifidum* とは異なる様式でムチン糖鎖を分解することが推察され、ムチン資化性菌のムチン分解には少なくとも二つの様式が存在すると考えられる。

Mucin degradation by mucin-degrading gut microbes has both positive and negative effects on humans. To elucidate the underlying mechanisms to balance of mucin degradation, we have characterized the enzymes targeting mucin *O*-glycans of mucin degraders. *Bifidobacterium bifidum* degrades mucin *O*-glycans by membrane-anchored extracellular glycosidases which are commonly associated with glycan-binding domains. Our study demonstrated that lack of those glycan-binding domains lead to decreased mucin degrading activities, indicating its importance in mucin degradation. Comparison of domain prevalence and enzyme repertoire in other mucin degraders further revealed that there are at least two distinct modes of mucin glycan degradation by mucin-degrading gut microbes.

Mucin, Mucin-degrading bacterium, Glycoside hydrolase

講演番号：4ES-03
講演日時、会場：3 月 18 日 16:45～ ミーティングルーム E

Bacterial-surface protein and gut colonization
○Keita Nishiyama (Keio Univ. Sch. Med.)

A large number of bacteria reside within the mammalian gastrointestinal tract. Among intestinal bacteria, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and *Ruminococcus* are capable of closely interacting with the intestinal mucus layer, and are therefore, known mucosal bacteria. Importantly, host or dietary glycans are used by mucosal bacteria for colonization purposes via adhesion; of note, they are also used as carbon sources. The cell-surface proteins (such as fimbriae and glycosidase), extracellular vesicles (EVs), and polysaccharides been shown to be linked with microbe-host interactions. We recently found that co-existing intestinal bacteria potently induces *Bifidobacterium* fimbriae elongation and EVs production. Interestingly, the resulting EVs export several mucin-binding moonlighting proteins, which may facilitate bifidobacterial colonization. These discovered colonization processes are important for the understanding of the survival of bifidobacteria in the gut. I will describe the colonization properties of mucosal bacteria, especially focusing on the roles of the cell-surface proteins in the context of *Bifidobacterium*.

Bifidobacterium, colonization, mucin

講演番号：4ES-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:20～ ミーティングルーム E

内因性発酵基質としてのムチン糖鎖：潰瘍性大腸炎との病理学的関連

Mucin O-glycan as an endogenous fermentation source: Pathological relevance to ulcerative colitis

○長谷 耕二[1]、山田 恭央[1]、日野 真吾[2]、森田 達也[2] ([1]慶大薬、[2]静大農)
○Koji Hase[1], Takahiro Yamada[1], Shingo Hino[2], Tatsuya Morita[2] ([1]Keio Univ., [2]Shizuoka Univ.)

腸内細菌叢の異常は、炎症性腸疾患の発症に関与していると考えられているが、そのメカニズムはまだ解明されていない。ムチンは病原体に対する第一線のバリアーであると同時に、微生物の増殖のためのニッチとして機能している。ムチンの利用異常と微生物代謝異常の関係を明らかにするために、日本人の健常者、潰瘍性大腸炎（UC）患者、クローン病（CD）患者の便サンプル中の代謝物とムチン成分を解析した。その結果、 CD 患者および UC 患者の便中では、酪酸の濃度が健常者の便中より有意に低かった。また UC 患者では、ムチン糖鎖レベルと酪酸などの SCFAs 産生の間に逆相関があり、ムチン糖鎖が酪酸産生のための内因性発酵基質として機能することが示唆された。実際、実験動物にムチンを給餌投与すると、盲腸内酪酸産生が亢進した。また、酪酸は免疫修飾作用を示すことから、大腸固有層の免疫担当細胞を調べたところ、ムチン投与群では制御性 T 細胞や IgA 産生細胞の増殖が観察された。UC 患者ではムチン糖鎖の利用能が低下しており、特に便中酪酸未検出の UC 患者で著しく減少していた。以上の結果より、ムチン糖鎖は、腸内細菌叢によって資化され、酪酸の産生を促すことが判明した。UC 患者では本経路の異常が酪酸産生の低下に繋がり、病態の増悪に繋がっている可能性が示唆された。

The dysbiosis of gut microbiota has been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases; however, the underlying mechanisms have not yet been elucidated. Heavily glycosylated mucin establishes a first-line barrier against pathogens and serves as a niche for microbial growth. To elucidate relationships among dysbiosis, abnormal mucin utilisation, and microbial metabolic dysfunction, we analysed short-chain fatty acids (SCFAs) and mucin components in stool samples of healthy subjects, ulcerative colitis (UC) patients, and Crohn’s disease (CD) patients from Japan. Levels of *n*-butyrate were significantly lower in stools of both CD and UC patients than in stools of healthy subjects. In UC patients, there were inverse correlations between mucin *O*-glycan levels and the production of SCFAs, such as *n*-butyrate, suggesting that mucin *O*-glycans serve as an endogenous fermentation substrate for *n*-butyrate production. Indeed, microbial utilisation of mucin-associated *O*-glycans was significantly reduced in *n*-butyrate-deficient UC patients. Thus, Mucin *O*-glycans facilitate symbiosynthesis of *n*-butyrate by gut microbiota. Abnormal mucin utilisation may lead to reduced *n*-butyrate production in UC patients.

mucin, commensal microbiota, ulcerative colitis

講演番号：4ES-05
講演日時、会場：3 月 18 日 17:55～ ミーティングルーム E

ムチン糖鎖関連データを統合化した基盤開発：データベース化および生合成シミュレーション

Development of an integrated foundation for mucin glycan-related data: database development and biosynthesis simulation

曽我部 勇、菊地 美幸、荒川 康一、○木下 フローラ聖子（創価大糖鎖研）
Isami Sogabe, Miyuki Kikuchi, Koichi Arakawa, ○Kiyoko F. Aoki-Kinoshita (GaLSIC, Soka Univ.)

我々は糖鎖に関連するオミクスのデータを統合化したウェブポータルとして、GlyCosmos Portal (https://glycosmos.org)を開発してきた。本ポータルは、糖鎖構造、糖鎖遺伝子、タンパク質、脂質、関連パスウェイや疾患情報を一度に閲覧・検索できるようになっている。ムチン糖鎖に関しての構造や遺伝子情報も格納されており、ムチン型糖鎖をはじめ、ヒトにおける多くの糖鎖生合成パスウェイも解析できるウェブツール GlycoMaple も利用可能である。なお、微生物に関連する糖鎖遺伝子、糖鎖構造や生合成に関するパスウェイを統合化する MicroGlycoDB も開発しており、これらのデータも GlyCosmos に統合化する予定である。更に、未知の糖鎖遺伝子の同定や糖鎖合成の予測のために、糖鎖の生合成プロセスをシミュレーションできるウェブツール GlycoSim も開発しており、ムチン糖鎖の生合成情報を用いて検証を行なっている。これらのデータベースやツールについて紹介する。

We have been developing a Web portal called the GlyCosmos Portal (https://glycosmos.org) which aims to integrate glycan-related omics data. This portal allows users to browse and search glycan structures, glycan-related genes, proteins, lipids, related pathways and diseases from a single interface. Data regarding mucin glycan structures and genes are also stored, along with a Web tool called GlycoMaple, which allows users to analyze biosynthesis pathways, including mucin glycan biosynthesis, in human. We are also developing a database of microbial glycans, glycogenes and pathways, called MicroGlycoDB, whose data will be integrated into GlyCosmos. Moreover, in order to identify unknown glycogenes and synthesized glycans, we are developing a Web tool called GlycoSim, which can simulate glycan biosynthesis processes. We are validating this tool using mucin glycan biosynthesis pathway information. All of these databases and tools will be introduced.

bioinformatics, database, glycoinformatics

講演番号：4FS-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:00～ ミーティングルーム F

糸状菌における複数シデロフォアの産生

Production of multiple siderophores in fungi

○西村 慎一[1,2] ([1] 東大院農、[2] 東大 CRIIM)
○Shinichi Nishimura[1,2] ([1]Dept Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

鉄はほとんどの生物にとって必須元素であり、微生物や植物は環境中から鉄を獲得するために複数のシステムを有する。そのうちのひとつに、シデロフォアと呼ばれる二次代謝物をもちいた取り込み経路がある。シデロフォアは鉄飢餓環境下で産生・分泌され、水溶性の低い水酸化鉄（III）にキレートすることで可溶化し、トランスポーターにより細胞内に取り込まれる。あるいは細胞内に蓄積し、鉄の隔離を行う。糸状菌 *Acremonium persicinum* MF-347833 が産生する AS2488053 は環状ヘキサペプチドであり、その化学構造は真菌が産生するフェリクローム型シデロフォアに酷似している。本化合物やアルミニウムをキレートさせた ASP2397 は病原性真菌のシデロフォア輸送システムをハイジャックすることで細胞内に取り込まれ、強力な抗真菌活性を示す。ところが生産者自身も真菌であり、その生産調節機構や生理機能に興味が持たれる。我々は AS2488053 を産生する非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）をコードする遺伝子の同定を目的に *A. persicinum* MF-347833 のゲノム解析を行い、目的とする推定生合成遺伝子 Sid1 ともう一つのフェリクローム型シデロフォアの推定生合成遺伝子 Sid2 を見出した。Sid2 は代謝物の解析から、糸状菌によくみられるフェリクロシンの生合成遺伝子であった。各種の培養条件や遺伝子破壊株を用いた解析から、ASP2488053 は鉄飢餓条件下で産生され、ディフェンス化合物として働くこと、フェリクロシンは鉄過剰条件において産生され過剰な鉄を隔離する可能性が明らかとなってきた。本シンポジウムではそれらの詳細を紹介する。

Iron is an abundant element of the earth. However, iron exists as $FeOH_3$ with poor water solubility on the earth. To handle iron, microbes and plants use siderophores that can solubilize $FeOH_3$ by chelation. Ferrichromes are cyclic hexapeptide siderophores produced by fungi. Recently, we discovered that *Acremonium persicinum* MF-347833, the producing organism of the Trojan horse antifungal ASP2397, has two ferrichrome-type siderophores, ASP2397/AS2488053 and ferricrocin. Unexpectedly, two siderophores showed distinct production patterns. ASP2397/AS2488053 is produced and secreted in an iron-starved condition. In contrast, ferricrocin is produced in an iron-replete condition and resided inside cells. In this symposium, the production and functions of the ferrichrome-type siderophores in *A. persicinum* will be introduced.

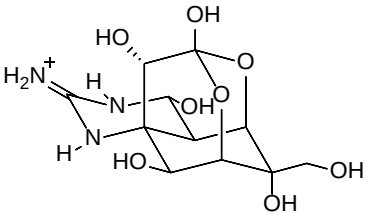
siderophore, iron, fungi

講演番号：4FS-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:25～ ミーティングルーム F

陸上テトロドトキシンの生合成解明を目指した有毒イモリ由来の新規化合物の探索

Identification of new compounds from the toxic newts aimed at elucidating the biosynthesis of terrestrial tetrodotoxin

○工藤 雄大[1,2]、山下 まり[2] ([1]東北大学際研、[2]東北大院農)
○Yuta Kudo[1,2], Mari Yotsu-Yamashita[2] ([1]Tohoku Univ. FRIS, [2]Tohoku Univ. Agr.)



tetrodotoxin (TTX, **1**)

テトロドトキシン (tetrodotoxin, TTX, **1**) は強力かつ特異的な電位依存性ナトリウムチャネル阻害活性と高度に架橋した複雑な化学構造を有する神経毒である。フグ毒として有名だが、イモリやヤドクガエルといった陸棲両生類も TTX を保有し、化学防御物質として利用する。フグやイモリは人工飼育環境下では TTX を生産せず、投与された毒を蓄える能力を持つ。一方で TTX の起源 (生産者) は不明瞭で、生合成に関わる酵素や出発物質も未同定である。代表的な自然毒でありながら、TTX の生合成経路は長年の謎となっている。このような状況のもと、演者らは TTX 類縁体と TTX 関連化合物を有毒イモリから探索することで、陸上における TTX の生合成経路の解明への糸口を模索してきた。顕著な生理活性を示さない、および天然に微量にしか存在しない成分も解析可能な質量分析器 (LC-MS) による新規化合物の探索を実施し、有毒イモリから新規 TTX 類縁体を複数発見した。類縁体の構造から生合成経路の仮説を立て、予想される生合成関連物を更に探索することで、環状グアニジノ化合物群の発見に至った。得られた化合物はバリエーションに富みながらも、グアニジンと C-10 単位から成る構造を共通して有しており、陸上の TTX がモノテルペンに由来する可能性が考えられた。本発表では最近報告した化合物の構造解析を含め、陸上 TTX の生合成と起源に関する一連の研究成果を紹介する[1–4]。

Tetrodotoxin (TTX, **1**), a potent neurotoxin, possesses the complex and rare chemical structure. TTX is distributed in a wide range of marine animals and terrestrial amphibians, and used as a chemical defense. Despite of the high interest in this unique toxin, the biosynthesis of TTX is still enigmatic. The enzymes and building blocks related to the biosynthesis of TTX have not been determined so far. With a mass-spectrometry (MS) guided screening methods, we have identified a number of new TTX analogs and TTX-related guanidino compounds from the toxic newts. Based on these chemical structures, we proposed the biosynthetic and shunt pathways of TTX in terrestrial organisms.[1–4]

[References] (1) Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728–8731. (2) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1656–1663. (3) Kudo, Y.; Hanifin, C. T.; Kotaki, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 2706–2717. (4) Kudo, Y.; Hanifin, C. T.; Yotsu-Yamashita, M. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 3513–3517.

tetrodotoxin, newt, biosynthesis

講演番号：4FS-03
講演日時、会場：3 月 18 日 16:50～ ミーティングルーム F

不安定なため長い時間見落とされてきた細菌ポリイン類
Unstable bacterial polyynes overlooked for a long time

○甲斐 建次 (阪府大院生命環境)
○Kenji Kai (Osaka Pref. Univ.)

C≡C 結合が共役したポリイン類は植物や真菌類を中心に広く認められるが、末端アセチレンから共役したポリイン類は一部の細菌類においてのみ産生される珍しい天然物である。細菌ポリイン類は発見から 30 年以上、ほとんど研究が進展していない「珍しい」天然物でもあった。本化合物は、光と濃縮操作に弱く、取り扱いを誤ると重合して不溶性ポリマーへと変化してしまう。そのため、これまでに幾人もの研究者の手からするりと抜け落ち、細菌ポリインは研究対象でなくなっていたのではないかと思われる。細菌ゲノムが積極的に配列解読されるようになり、2014 年に細菌ポリインの生合成遺伝子クラスターが初めて見つかった。ほぼ同時期に、真菌・卵菌類に対して強い拮抗性を示す拮抗細菌類の多くが、ポリイン様の天然物を産生・分泌している可能性も見出された。我々は、このような珍しい天然物が介在する生命現象に興味を持っている。本講演では、細菌ポリイン類の発見（約 30 年ぶり！）、単離・構造決定、生物活性（化学生態学的解析を含む）、生合成について、最新の知見を交えて紹介する。

Bacterial polyynes are natural products that had been forgotten for more than 30 years and had not benefited much from recent innovations in natural products chemistry. Polyyne compounds with a conjugated C≡C bond from the terminal end are susceptible to light and concentration manipulation, and if mishandled, most compounds will polymerize into insoluble polymers. Therefore, bacterial polyynes may have slipped through the hands of many researchers and disappeared from the research scene. In this lecture, the discovery, isolation, structure determination, biological activities, and biosynthesis of polyynes will be introduced with the latest findings.

natural products chemistry, polyynes, chemical communication

講演番号：4FS-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:15～ ミーティングルーム F

鳥類卵殻由来イノシトールリン酸の機能

Investigation of inositol phosphates isolated from avian eggshell

○犀川 陽子（慶大理工）
○Yoko Saikawa (Keio Univ.)

鳥類の卵殻は胚を保護し、成長させる巧みなしくみをもった培養器と言える。炭酸カルシウムの積層構造が胚を保護しつつ、無数の気孔は外界とのガス交換を容易にする。また、卵殻の内側が溶解した卵殻カルシウムを胚が吸収して雛の骨が形成される。胚の骨形成におけるカルシウム吸収については、ニワトリやウズラの卵殻外培養を用いて研究されてきたが、単なる炭酸カルシウムを添加してもうまく吸収されず、骨形成が進まないと報告されている。そこで、卵殻の内側には、特にカルシウムが溶解・吸収されやすいしくみがあると考えた。卵殻内側の構造や成分を調べたところ、ダチョウ卵殻の内側は炭酸カルシウムが小さな粒子になっており、この領域では結晶性の炭酸カルシウムよりも溶解しやすい非晶質の炭酸カルシウムが検出された。さらに、卵殻内側のみに存在するイノシトールリン酸を発見し、このリン酸エステル存在下で炭酸カルシウムを生成させると非晶質に保たれることがわかった。イノシトールリン酸のこのような作用が卵殻カルシウムのスムーズな溶解・吸収をアシストしていると考えられる。この仮説を実証するため、化学合成したイノシトールリン酸を用いて非晶質炭酸カルシウムを作製し、ニワトリ胚の卵殻外培養に添加したところ、市販の炭酸カルシウムよりも胚の成長が進むという結果が得られた。現在はイノシトールリン酸がカルシウムと共に胚に吸収されるかを調べるため、イノシトール骨格に重水素を標識したイノシトールリン酸を合成している。

Calcium carbonate in avian eggshell is used as a calcium source for bone formation during embryogenesis. From the observation of the ostrich eggshell with the scanning electron microscope, we found the inner eggshell includes nano-granules comprising amorphous calcium carbonate. We then investigated organic compounds which induce amorphous calcium carbonate from the inner eggshell to give inositol phosphates. Indeed, the inositol phosphates stabilized amorphous calcium carbonate, suggesting contribution to smooth dissolution of eggshell. Furthermore, we revealed that inositol phosphates-containing calcium carbonate was smoothly absorbed by chicken embryo in shell-less culture. We also synthesize doubly deuterated inositol phosphates to examine whether the inositol phosphates could be absorbed by chicken embryo.

avian eggshell, amorphous calcium carbonate, inositol phosphates

講演番号：4FS-05
講演日時、会場：3 月 18 日 17:40～ ミーティングルーム F

なぜネコはマタタビに反応するのか？　その意外な生物学的機能について

The biological significance of the silver vine inducing response of domestic cats

○宮崎 雅雄（岩大農）
○MASAO MIYAZAKI (Iwate Univ.)

ネコにマタタビを与えると、なめたり、においを嗅いだりした後に、まるで陶酔しているように地面にゴロゴロ転がる。同様の反応は、西洋ハーブのキャットニップに対しても観察される。これらの植物に対する特異な反応は、ライオンなど大型ネコ科動物でも見られ、ネコ科動物に共通している。1950 から 60 年代には、この特異な反応を引き起こす活性物質の探索が盛んに行われ、マタタビからイリドミルメシン、ジヒドロネペタラクトンなど通称「マタタビラクトン」が、キャットニップからネペタラクトンが単離、構造決定された。これらの活性物質は、炭素 5 員環と酸素を含む 6 員環構造が特徴的なイリドイド化合物に分類される。しかし、なぜネコ科動物だけがイリドイドに特異な反応を示すか、その目的はなんであるのか、この有名な生物現象の謎は全く解明されていないままであった。そこで我々は、ネコのマタタビ反応の本質に迫るべく、活性物質の再探索から研究に取り組み、最終的にネコのマタタビ反応が蚊の防虫効果に効果的であるという意外な結論に至ることのできたので、これまでの研究過程を紹介させていただく。

Domestic cats (*Felis silvestris catus*) and other felids show a characteristic response to certain plants such as catnip (*Nepeta cataria*) and silver vine (*Actinidia polygama*), which comprises licking and chewing the plants, face and head rubbing to the plants, and rolling on the plants. This response is induced by plant iridoids, nepetalactone (catnip) and dihydronepetalactone, iridomyrmecin, and isomers (silver vine), but its biological significance and underlying mechanism remain undetermined. Here, we introduce our studies uncovering the neurophysiological mechanism and behavioral significances of this feline response.

iridoid, cat, mosquito

講演番号：4FS-06
講演日時、会場：3 月 18 日 18:05～ ミーティングルーム F

天然物を用いた非侵襲的薬剤投与法の開発

Development of non-invasive drug administration method using natural products

○南雲 陽子、向山 海凪、臼井 健郎（筑波大生命環境）
○Yoko NAGUMO, MINAGI MUKAIYAMA, Takeo USUI (Univ. Tsukuba)

動物の上皮組織は体内と体外を隔てて外界からの異物の侵入を防ぐとともに、体内の物質の漏出を防ぐバリアとしてはたらく生体恒常性維持に重要な組織である。一方、抗体等のバイオ医薬品は上皮組織を透過することが出来ないため、その投与には注射等の侵襲的な手段に頼らざるを得ない。上皮組織のバリア機能は静的バリアと動的バリアに大別され、動的バリアの本体がタイトジャンクション（TJ）である。我々は TJ バリアを薬剤投与時のみ短時間・可逆的に開口させることで、バイオ医薬品を安全な貼付薬や経口薬等に出来ると考え、可逆的 TJ 開口剤の研究開発を進めている。

唐辛子の辛み成分であり、TRP チャネルの一つである TRPV1 の強力なアゴニストとして知られる capsaicin は、腸管上皮細胞層の TJ を可逆的に開口させることが報告されていた。そこで capsaicin による可逆的 TJ 開口機構を検討したところ、TRPV1 とは別の TRP チャネルである TRPA1 の活性化を介して TJ 開口を誘導することが明らかとなった。また TRPV4 のアゴニストも可逆的 TJ 開口を誘導することを見出し、TRP チャネルが可逆的 TJ 開口剤の標的になりうることが示された。

MA026 は *Pseudomonas* 属細菌が産生する環状デプシペプチドであり、VFDSLL 配列と結合することが報告されている。同一配列が TJ タンパク質の claudin-1 に存在することから、MA026 の TJ 開口活性を検討したところ、30 分後に TJ バリア機能が顕著に低下し、5 時間後には約 80%まで回復することが明らかになった。さらに構造活性相関や X 線結晶構造解析の結果、疎水性アミノ酸クラスターが活性に重要なことが示され、ヒト 3 次元培養表皮モデルでも物質透過促進活性が確認された。

本発表では、解析を通して見えてきた非侵襲的投与法への展開について紹介したい。

Tight junctions (TJ) are intercellular barriers between epithelial cells that separate the internal and external environments of cellular sheets, and control invasion of foreign substances and a diffusion of solutes and water across the epithelium. Biologics with high molecular weight and hydrophilicity are unable to diffuse through the lipid bilayer of the cell membrane. Control of TJ opening by attenuating the barrier function of TJ has proved to be attractive because it could allow safe and controllable transdermal administration of biologics.

Here, we show our recent progress in investigations and developments of reversible TJ openers, capsaicin and MA026. Our results not only reveal the new targets of TJ regulators with novel mechanisms but also might be useful for transdermal administration of large hydrophilic biologics.

natural products, non-invasive drug administration, tight junction

講演番号：4GS-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:05～ ミーティングルーム G

ABC トランスポーターによるコレステロール排出と脂溶性ビタミン排出

Efflux of cholesterol and fat-soluble vitamins by ABC transporters

○松尾 道憲（京女大家政）
○Michinori Matsuo (Kyoto Women's Univ.)

ABC(ATP-binding cassette)トランスポーターは、ATP 加水分解のエネルギーを利用して様々な基質を輸送する膜タンパク質である。ABCA1 と ABCG1 は、コレステロールを排出することで高密度リポタンパク質（HDL）形成に関与する。ABCG5 と ABCG8 のヘテロ二量体（ABCG5/ABCG8）は、小腸と肝臓の頂端膜側に発現し、コレステロールと植物ステロールを体外へ排出する。

ABCG5/ABCG8 がビタミン K の輸送に関与する可能性を検討したところ、ABCG5/ABCG8 発現細胞はコントロール細胞に比べて細胞内のビタミン K_1 蓄積量が低く、細胞外への排出量が高かった。従って、ABCG5/ABCG8 は植物ステロールのみならず、脂溶性ビタミンであるビタミン K_1 の輸送にも関与することが示された。このことは、ABCG5/ABCG8 が小腸におけるビタミン K の吸収調節に重要な役割を果たすことを示唆する。

本シンポジウムでは、ABC トランスポーターがコレステロールや脂溶性ビタミンなどの脂溶性物質を輸送し、それらの脂溶性物質の恒常性維持に働く機能について紹介する。

ABC (ATP-binding cassette) proteins transport substrates using energy of ATP hydrolysis. ABCA1 and ABCG1 transport cholesterol and are involved in high-density lipoprotein (HDL) formation. A heterodimer of ABCG5 and ABCG8 limits cholesterol absorption in the intestine and increases cholesterol excretion in the liver by transporting cholesterol to bile. ABCG5/ABCG8 transports not only cholesterol but also plant sterols, such as sitosterol.

ABCG5/ABCG8 functions in the export of cholesterol from cells and NPC1L1 functions in the import of cholesterol. NPC1L1 has been reported to transport not only cholesterol but also vitamin K. I hypothesized that substrate specificities are similar between NPC1L1 and ABCG5/ABCG8 and examined if ABCG5/ABCG8 transports vitamin K. Vitamin K_1 level in cells expressing ABCG5/ABCG8 was lower than that in control cells, and vitamin K_1 efflux from the cells to medium was higher in cells expressing ABCG5/ABCG8. These findings suggest that ABCG5 and ABCG8 are involved in the transport of not only sterols but also vitamin K. ABCG5/ABCG8 may play important roles in regulation of vitamin K absorption.

In this symposium, I will talk about ABC transporters involved in homeostasis of hydrophobic compounds such as sterols and fat-soluble vitamins.

cholesterol, vitamin, homeostasis

講演番号：4GS-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:25～ ミーティングルーム G

ポリフェノールが腸管胆汁酸再吸収トランスポーターの輸送に与える影響

The modulatory effect of polyphenols on apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) activity

○小林 彰子（東大農）
○Shoko Kobayashi (Tokyo Univ.)

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成されて腸管に分泌された後、小腸下部に発現する Apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) により 95%以上が再吸収され、肝臓で再利用される。腸管における胆汁酸の再吸収機構の阻害は、肝臓でのコレステロールから胆汁酸への変換を促進し、血中コレステロール濃度を低下させるため、高コレステロール血症の予防ターゲットとして注目されている。我々は、食品成分による血中コレステロール濃度の低下を目指し、腸管における胆汁酸の再吸収を阻害するポリフェノールの探索し、その輸送阻害機作の解明を試みた。

腸上皮吸収細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 を、胆汁酸のモデルとして [^{3}H]-Taurocholic acid (TC) を用いた。濃度依存性取り込み試験では、Caco-2 における TC の取り込み速度は飽和し、典型的なトランスポーター輸送機作を示した。非線形最小二乗法プログラムによる解析を行い、*J*max、*K*t、および *K*d を算出した。さらにこのトランスポーターは Na^+ 依存型であったことから、ASBT であると判断した。Caco-2 細胞を用いて胆汁酸取り込みを抑制するポリフェノールをスクリーニングした。紅茶に含まれる赤色色素成分の一種 teaflavin（TF）類が阻害活性を示し、特に teaflavin-3-gallate (TF2A) 及び theaflavin-3'-gallate (TF2B) の活性が高かった。TF2A および TF2B はカテキンの重合体で、ガロイル基の置換様式が異なる異性体である。これら TF 類は、Caco-2、及び ASBT を発現させたアフリカミドリザル腎由来 COS-7 細胞において、細胞に添加後ウオッシュアウトした系でも阻害活性を示した。以上のことからこれら TF 類は ASBT に作用していると考えられた。カテキンの一種である EGCg は中性緩衝液中で酸化構造をとり、タンパク質 Cys 残基のチオール基と共有結合することが報告されている（Lambert et al., 2008）。そこで我々は、タンパク質のモデルを用いた阻害実験によりその機構を解析した。チオール基を有するタンパク質のモデルとして、*N*-acetylcysteine を用いた。先にテアフラビンと *N*-acetylcysteine をインキュベーションした後に TC 取り込み試験を行うと、TF 類の取り込み阻害活性は消失した。さらに TF2A 及び TF2B を中性緩衝液中でプレインキュベートした後に TC 取り込み試験を行うと、添加後 10 分で阻害活性を示した。以上のことからこれら TF 類は、中性緩衝液内で酸化構造をとり速やかに ASBT の基質結合部位に作用し、胆汁酸取り込みを阻害する機構が考えられた。 Takashima Y et al., *J Agric Food Chem*, 2021, 69 (33), 9585–9596.

Over 95% of intestinal bile acid is reabsorbed though the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) in the terminal ileum and returned to the liver (enterohepatic circulation). Inhibiting ASBT has been identified as a potential strategy to reduce plasma cholesterol levels. Thus, in this study, we aimed to identify polyphenols that inhibit ASBT activity and to elucidate their mechanism. The concentration-dependent uptake of taurocholic acid (TC) by Caco-2 cells showed saturation kinetics active transport. TC was absorbed in a sodium-dependent manner into Caco-2 cells. These data demonstrated that the TC uptake transporter in Caco-2 cells is ASBT. The screening revealed that the catechin polymers, theaflavin (TF) 3-gallate (TF2A) and theaflavin 3'-gallate (TF2B), robustly suppressed ASBT. Kinetic analysis revealed that TF2A and TF2B were competitive inhibitors. TF2A and TF2B were found to inhibit ASBT by binding to its cysteine residues, according to the analysis using *N*-acetylcysteine.

Transporter, ASBT, theaflavin

講演番号：4GS-03
講演日時、会場：3 月 18 日 16:50～ ミーティングルーム G

腋臭症リスク因子 ABCC11 の機能を阻害する食品成分の探索・解析

In vitro screening and fractional approach for inhibitory activities of ABCC11, an axillary osmidrosis risk factor, in plant extracts and dietary flavonoids

○豊田 優[1,2]、齋藤 弘貴[3]、平田 拓[3]、紺谷 愛美[3]、土屋 陽一[3]、高田 龍平[1]、鈴木 洋史[1]（[1]東大病院薬剤部、[2]防衛医大分子生体制御学講座、[3]サッポロホールディングス（株））
○Yu Toyoda[1,2], Hiroki Saito[3], Hiroshi Hirata[3], Ami Kontani[3], Youichi Tsuchiya[3], Tappei Takada[1], Hiroshi Suzuki[1]（[1]The Univ. of Tokyo Hosp., [2]Natl. Defense Med. Col., [3]SAPPORO HOLDINGS LTD.）

ヒト ABC 輸送体 ABCC11 は、腋臭原因物質の分泌に関わる腋窩アポクリン腺に発現し、その遺伝子多型が腋臭症（ワキガ）リスク決定因子として知られている [1]。野生型 ABCC11 が腋臭症リスクに、タンパク質機能の欠損をもたらす変異型 ABCC11 がリスクなしに対応することから、ABCC11 の機能阻害が腋臭症形質の軽減・予防につながると考えられる。しかし、そのような作用を有する食品成分に関する報告はなされていない。そこで本研究では、ABCC11 の阻害活性を有する食品成分を探索した。まず、34 種類の食品素材から水を用いて抽出することでエキスを調製し、スクリーニング試験対象とした。終濃度 100 ppm における阻害実験の結果、大豆エキスにおいて、強い ABCC11 阻害活性が見出された。そこで、大豆エキスに含まれる活性成分の分離・精製、LC-Q-TOF-MS/MS を用いた構造情報の取得を進めたところ、ABCC11 阻害成分のひとつとしてゲニステインを同定することに成功した [2]。また、フラボノイド類に着目したさらなる検討を進めた結果、ゲニステインよりも強く ABCC11 を阻害するものが複数見いだされた。このような ABCC11 阻害成分の摂取、ないしは腋窩への塗布が腋臭症の改善につながるかどうかは興味深く、ヒトでの検討が進むことが期待される。

Human ATP-binding cassette transporter C11 (ABCC11) is a risk factor for axillary osmidrosis (AO) expressed in the axillary apocrine glands, the sources of the offensive odors from the armpits [1]. While AO can seriously impair the psychosocial well-being of the affected individuals, no causal therapy has been established for it other than surgical treatment. Therefore, identifying safe ways to inhibit ABCC11 may offer a breakthrough in treating AO. In this study, we screened for ABCC11-inhibitory activities in natural products derived from plants cultivated for human consumption using an *in vitro* assay system to examine the ABCC11-mediated transport of radiolabeled dehydroepiandrosterone sulfate, an ABCC11 substrate. Among tested extracts, the water extract of soybean was found to exhibit the strongest transport inhibition. From the soybean extract, via a fractionation approach, we successfully isolated and identified genistein, a soy isoflavone, as a novel ABCC11 inhibitor [2]. While further human studies are needed, our findings about the natural compounds will help develop a non-surgical therapy for AO.
[1] Toyoda *et al.*, ***FASEB J***, 2009; [2] Saito[#], Toyoda[#*] *et al.*, ***Nutrients***, 2020.

Transporter, Genistein, Body odor

講演番号：4GS-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:15～ ミーティングルーム G

シフォナキサンチンの消化管吸収における NPC1L1 の寄与

Involvement of NPC1L1 in intestinal absorption of siphonaxanthin

○真鍋 祐樹、菅原 達也（京大農）
○Yuki Manabe, Tatsuya Sugawara (Kyoto Univ.)

カロテノイドは天然に広く存在する脂溶性色素であり、私たちの日常的な食事にも 50 種類程度を見出すことができる。演者らは、食品に含まれるカロテノイドの生物活性の探索研究に従事しており、クビレズタ（海ぶどう）に含まれるシフォナキサンチンの強い抗炎症作用を報告している（1,2)。さらに、シフォナキサンチンの生物活性を有効利用するべく、その消化管吸収や生体内代謝に関する研究も進めている。カロテノイドは脂溶性であり、単純拡散によって小腸上皮細胞に取り込まれると考えられてきたが、NPC1L1（Nieman-Pick C1-like 1）や SR-B1（scavenger receptor class B member 1）による促進拡散の寄与も示唆されており、どの経路が優勢であるかはカロテノイドの種類によって異なる。演者らは、培養細胞や実験動物、さらにはタンパク質分子レベルの検討によって、シフォナキサンチンが NPC1L1 と相互作用し吸収されることを見出しており（3)。本発表では、これらを含めた最新の研究内容を紹介し、その生理的な意義を議論したい。

Carotenoids are natural lipophilic pigments responsible for yellow to red coloration. More than 1,000 carotenoids have been identified thus far, and about 50 carotenoids are found in our usual diet. We have been investigating biological activities of carotenoids and reported that siphonaxanthin, a carotenoid of green algae such as *Caulerpa lentillifera*, exhibited potent anti-inflammatory activities compared with other carotenoids (1, 2). To utilize the potent activities of siphonaxanthin, we have also studied its intestinal absorption and metabolic fate. Since carotenoids are lipophilic molecules, it has been long considered that they are absorbed by passive diffusion; however, several studies indicated the involvement of facilitated diffusion mediated by NPC1L1 and SR-B1. Using cultured cells, animals, and recombinant peptides, we demonstrated that NPC1L1 promotes intestinal absorption of siphonaxanthin. In this talk, we would like to introduce our recent data and discuss about the physiological significance of NPC1L1-mediated absorption of carotenoids.

1. Manabe, Y. et al., *J. Nat. Med.*, **74**, 127-134, 2020.
2. Manabe, Y. et al., *Nutrients*, **13**, 3699, 2021.
3. Manabe, Y. et al., *Lipids*, **54**, 707-714, 2019.

NPC1L1, carotenoid, intestinal absorption

講演番号：4GS-05
講演日時、会場：3 月 18 日 17:40～ ミーティングルーム G

消化管における亜鉛吸収を制御する亜鉛トランスポーター
Zinc transporters regulating dietary zinc absorption in the intestine

○橋本 彩子[1]、神戸 大朋[2] ([1]京女大・家政・食物栄養、[2]京大院・生命)
○Ayako HASHIMOTO[1], Taiho KAMBE[2] ([1]Dept. of Food and Nutr., Kyoto Women' s Univ., [2]Grad Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

亜鉛は、生体内の種々の酵素活性やタンパク質の構造維持、シグナル調節において機能する必須微量元素の一つである。成人では体内に約 2 g 存在し、全身に広く分布して機能する。食物由来の亜鉛は、主に十二指腸や空腸で吸収されるが、この亜鉛吸収の調節には、亜鉛トランスポーターZIP4 と ZNT1 が主要なはたらきを担っていると考えられている。ZIP4 は、腸管上皮細胞の管腔側にある頂端膜上に発現して、2 価の亜鉛イオンを腸管上皮細胞内に取り込む。続いて、腸管上皮細胞内の亜鉛は側底膜上に存在する ZNT1 によって門脈中に輸送され、亜鉛はアルブミンや α2-マクログロブリンと結合して血中を通過し、肝臓に送られ、そして全身へと輸送される。この吸収過程で働く ZIP4 や ZNT1 の発現は、亜鉛状態により制御されることが知られている。ZIP4 は、亜鉛欠乏時には mRNA の安定化やタンパク質の分解が抑制され、細胞膜上の存在量が増大し亜鉛取り込みに寄与する。一方で、亜鉛十分時には速やかにエンドサイトーシスされ、分解を受ける。ZNT1 の発現は、ZIP4 とは逆の亜鉛応を示す。ZNT1 は、転写因子の MTF1 により発現が制御されており、亜鉛依存的に転写が促進され発現量が増大する。さらに、亜鉛欠乏時には ZNT1 はエンドサイトーシスされ分解を受ける。このような機構から、ZIP4 の発現量が変化することによって、細胞内亜鉛レベルが変動し ZNT1 の発現量が調節され、亜鉛吸収が制御されている可能性が考えられる。本発表では、消化管における亜鉛吸収に関わる亜鉛トランスポータやその制御について概説するとともに、これらのトランスポーターを標的とした亜鉛栄養改善の可能性について考察する。

Zinc is an essential trace element, with approximately 2 g present in the adult human body. It is widely distributed and functions throughout the body. The zinc transporters ZIP4 and ZNT1 play a major role in regulating the absorption of food-derived zinc, which is mainly absorbed in the duodenum and jejunum. ZIP4 is expressed on the apical membrane of intestinal epithelial cells and allows divalent zinc ions into the cells from the lumen. Zinc in the enterocytes is then transported by ZNT1 on the basolateral membrane into the portal vein, where it binds to albumin and α2-macroglobulin. Zinc status regulates the expression of ZIP4 and ZNT1. In this presentation, we will review the zinc transporters involved in dietary zinc absorption and their regulation, and discuss the possibility of targeting these transporters to improve zinc nutrition.

zinc transporter, ZIP4, intestinal absorption

講演番号：4GS-06
講演日時、会場：3 月 18 日 18:05～ ミーティングルーム G

腸管における尿酸排出トランスポーターABCG2 を亢進するポリフェノールの解析

The analysis of polyphenols which enhance intestinal urate efflux transporter ABCG2

○薩 秀夫[1]、榎本 泰大[1]、堀 友稀[1]、近藤 泰嗣[1]、豊田 優[2,3]、高田 龍平[2]、鈴木 洋史[2] ([1]前橋工大工生物工学、[2]東大病院薬剤部、[3]防衛医大分子生体制御学講座)
○Hideo Satsu[1], Yasuhiro Enomoto[1], Yuki Hori[1], Taishi Kondo[1], Yu Toyoda[2,3], Tappei Takada[2], Hiroshi Suzuki[2] ([1]Maebashi Inst. of Technol., [2]The Univ. of Tokyo Hosp., [3]Natl. Defense Med. Col.)

尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物であり、体内では主として肝臓や小腸で産生される。尿酸は体内で抗酸化作用を示す一方で、血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超えると高尿酸血症と定義され、痛風や尿路結石を発症しやすくなる。また近年では、動脈硬化症や腎疾患、高血圧などの発症との関連性も報告されている。最近では、コロナ禍の長期化で痛風や高尿酸血症の患者数が増加傾向との報告があり、さらに日本人集団においては高尿酸血症が COVID-19 重症化のリスク因子になるとの報告もなされている。従って痛風・高尿酸血症の予防・改善は、コロナ禍において以前にも増してきわめて重要であるとも考えられる。

尿酸の体内動態に関与する分子としては、プリン体から尿酸への生合成に関与するキサンチンオキシドレダクダーゼや腎臓において尿酸再吸収を担うトランスポーターURAT1 などが知られており、これらは高尿酸血症治療薬や「尿酸値が高めの方へ」向けた機能性食品の分子ターゲットとなっている。加えて近年では、ABC トランスポーターの一種である ABCG2 が腸管における尿酸排出を担っていることが見出された。そこで演者らは ABCG2 に焦点を当て、食品成分によって ABCG2 を活性化することで腸管からの尿酸排出を促進し血清尿酸値を低下させて痛風・高尿酸血症を予防することを目的として解析を進めた。本講演では、ABCG2 の発現を亢進するポリフェノールの探索およびその作用メカニズムの解析について紹介したい。

Uric acid is the final metabolite of purines in humans, and is mainly produced in the liver and small intestine. A serum urate level of more than 7.0 mg/dL is defined as hyperuricemia, which can lead to gout and urinary tract stones. Recently, it has been reported that the number of patients with gout and hyperuricemia is on the rise due to a prolonged pandemic situation, and also that hyperuricemia is a risk factor for COVID-19 severity in a Japanese population. Therefore, prevention and improvement of gout and hyperuricemia are considered to be more important than ever. As a new molecule involved in the disposition of urate in the body, ABCG2, one of the ABC transporters, has been recently found to play a role in intestinal urate efflux. Therefore, we focused on ABCG2 and analyzed the effect of food components on ABCG2 activation. In this presentation, we would like to introduce our current findings for the exploring of polyphenols that enhance the expression of ABCG2 and the analysis of their regulatory mechanism.

uric acid, transporter, polyphenol

分野融合連携（他学会連携）シンポジウム

学術活動強化委員会では，他学会との連携を強化するために，他学会との共同企画で分野融合連携（他学会連携）シンポジウムを開催してきました．2022 京都大会でも，日本農芸化学会とも関連が深い，日本味と匂学会，日本細菌学会と 2 つのシンポジウムを開催いたします．皆様，奮ってご参加ください．

3 月 16 日（水）16:00〜18:30

2AJ 「食べる」「飲む」行動を制御する味覚・嗅覚の脳神経基盤

3 月 16 日（水） 16:00〜18:30
共　催：日本味と匂学会
会　場：ミーティングルーム F
世話人：東原 和成（東大院農・応生化），吉田 竜介（岡大院学術研究院医歯薬学）
座　長：東原 和成（東大院農・応生化），吉田 竜介（岡大院学術研究院医歯薬学）

16:00　2AJ-01　日本味と匂学会の紹介……○吉原 良浩（理研CBS）

16:05　2AJ-02　**The channel synapse mediates chemosensory neurotransmission**
……○Akiyuki Taruno[1,2,3]
（[1]Dept. Mol. Cell Physiol., Kyoto Prefec. Univ. Med., [2]JST PRESTO, [3]JST CREST）

16:30　2AJ-03　**Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification**
……○Ken-ichiro Nakajima（National Institute for Physiological Sciences（NIPS））

16:55　2AJ-04　**Appetite and food odor attraction**……○Nao Horio, Liberles Stephen（Harvard Medical School）

17:20　2AJ-05　マウス嗅結節における食へのモチベーション形成の神経メカニズム……○村田 航志（福井大医）

17:45　2AJ-06　**Gut osmolality sensing for fluid homeostasis**……○Yuki Oka（Caltech）

3 月 17 日（木）16:00〜18:30

3AJ　微生物群集の構造と動態の理解

3 月 17 日（木） 16:00〜18:30
共　催：日本細菌学会
後　援：公益財団法人 大隅基礎科学創成財団，新学術領域研究「ポストコッホ生態」
会　場：ミーティングルーム G
世話人：新谷 政己（静岡大院総合科学技術），鈴木 仁人（国立感染症研究所）
座　長：新谷 政己（静岡大院総合科学技術），鈴木 仁人（国立感染症研究所）

16:03　3AJ-01　**Comprehensive analysis of plasmid-host interaction in natural environments**
……○Masato Suzuki（Nat. Inst. Infect. Dis.）

16:28　3AJ-02　**A distribution survey of environmental microbiome by single-cell genomics**
……○Yoshihiko Hoshino[1], Mitsunori Yoshida[1], Yohei Nishikawa[2], Masato Suzuki[3], Hanako Fukano[1], Haruko Takeyama[3], Toshihiko Suzuki[4]
（[1]Nat. Inst. Infect. Dis. Dept. Mycobact., [2]Waseda Univ. BioMol. Engineer., [3]Nat. Inst. Infect. Dis. AMR Ctr.,, [4]Tokyo. Med. Dent. Univ. Dept. Bact. Patho.）

16:53　3AJ-03　**Identification of novel microbes using cocultivation with *Acanthamoeba*.**
……○Hiroki Nagai（Gifu Univ.）

17:18　3AJ-04　シングルセルレベルの解析技術を用いたプラスミドの動態解明
……○新谷 政己[1,2,3]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研，[3]理研・BRC-JCM）

17:38　3AJ-05　希少放線菌 ***Actinoplanes missouriensis*** が形成する胞子嚢の休眠と覚醒を制御する新規なシグマ - アンチシグマ因子制御系
……○手塚 武揚[1,2]，大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

18:03　3AJ-06　**Applying single cell imaging to understand bacterial membrane vesicle transport**
……○Masanori Toyofuku[1,2,3]（[1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, [3]SunRiSE）

講演番号：2AJ-01
講演日時、会場：3 月 16 日 16:00～ ミーティングルーム F

日本味と匂学会の紹介
Introduction of The Japanese Association for the Study of Taste and Smell (JASTS)

○吉原 良浩 (理研 CBS)
○Yoshihiro Yoshihara (RIKEN CBS)

日本味と匂学会（JASTS）は、1967 年に発足した「日本味と匂のシンポジウム」を前身として、味覚と嗅覚に関する科学の広範な研究の進展を目的として 1991 年に設立されました。学術大会の開催・学会誌の刊行・Online セミナーシリーズの開催により会員の交流を促進し、顕彰事業・若手の会の開催などにより若手研究者の育成にも積極的に取り組んでいます。また、米国・欧州の関連学会との交流、アジア地区連携シンポジウムの開催などにより、国際化の推進を図っています。

The Japanese Association for the Study of Taste and Smell (JASTS) was established in 1991 with the aim of advancing a wide range of research in the science of taste and smell. The association promotes interaction among its members by organizing an annual meeting, publishing academic journals, and holding online seminar series, and actively fosters young researchers by organizing award programs and young researchers' gathering. We also promote internationalization through exchanges with related societies in the US (AChemS) and Europe (ECRO), and by holding symposiums in cooperation with the Asian countries.

Gustation, Olfaction, Chemosensation

講演番号：2AJ-02
講演日時、会場：3 月 16 日 16:05～ ミーティングルーム F

The channel synapse mediates chemosensory neurotransmission

○Akiyuki Taruno[1,2,3] ([1]Dept. Mol. Cell Physiol., Kyoto Prefec. Univ. Med., [2]JST PRESTO, [3]JST CREST)

Among six members of the calcium homeostasis modulator (CALHM) family, we originally identified CALHM1 as a pore-forming subunit of a slowly-activating voltage-gated channel with a wide pore which is permeable to adenosine triphosphate (ATP). Subsequently, we discovered that CALHM1 and CALHM3 hetero-oligomerize to form a fast-activating voltage-gated channel, CALHM1/3. Both subunits are expressed in sweet-, bitter-, umami-, and salty-sensing taste bud cells (TBCs) and genetic elimination of either subunit abolishes the release of neurotransmitter ATP from those TBCs and, consequently, the perception of sweet, bitter, umami, and salty tastes. Remarkably, instead of synaptic vesicles, TBCs employ a noncanonical chemical synapse involving CALHM1/3 as the conduit for neurotransmitter release. As chemical neurotransmission was supposed to be mediated solely by Ca^{2+}-dependent exocytosis, we termed this unique chemical synapse “channel synapse”. We further reported the structure of CALHM channels and channel synapse. The discovery, function, and structure of the channel synapse will be discussed.

Although the CALHM1/3 channel synapse potentially mediates various cell-cell communications throughout the body, it remains unclear where it exists and functions outside the tongue. Here, we generated a reporter mouse model for *Calhm1* and *Calhm3*, screened > 40 organs for reporter protein expression, and revealed tissue distribution of cells expressing CALHM1/3. In one of those CALHM1/3^{+} tissues, we genetically, anatomically, and functionally identified the presence of channel synapses and its physiological relevance. Extra-oral distribution and function of the CALHM channel synapse will also be discussed.

CALHM, taste, synapse

講演番号：2AJ-03
講演日時、会場：3 月 16 日 16:30～ ミーティングルーム F

Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification

○Ken-ichiro Nakajima (National Institute for Physiological Sciences (NIPS))

The gustatory system plays a critical role in sensing appetitive and aversive taste stimuli for evaluating food quality. Although taste preference is known to change depending on internal states such as hunger, a mechanistic insight remains unclear.

Here we examine the neuronal mechanisms regulating hunger-induced taste modification. Starved mice exhibit an increased preference for sweet taste and tolerance for bitter taste. Agouti-related peptide (AgRP)-expressing neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus play a pivotal role in triggering appetite. We thus next evaluate the role of AgRP neurons on hunger-induced taste modification with optogenetic experiments. We found that the hunger-induced taste modification is recapitulated by selective activation of AgRP neurons projecting to the lateral hypothalamus, but not to other regions. These results suggest that both appetitive and aversive tastes are modified by the lateral hypothalamus projecting AgRP neurons.

We finally characterized the lateral hypothalamic neurons that function as downstream neurons of AgRP neurons with DREADD-based pathway specific inhibition experiments. We found that glutamatergic neurons in the lateral hypothalamus play a key role in modulating preferences for both appetitive and aversive tastes by using distinct pathways projecting to the lateral septum or the lateral habenula, respectively.

These hypothalamic circuits would be important for optimizing feeding behavior under fasting.

Although hunger is known to make food tastier empirically (“Hunger is the best sauce”), our results show the neural mechanism behind the hunger-induced taste modification.

hunger, taste, hypothalamus

講演番号：2AJ-04
講演日時、会場：3 月 16 日 16:55～ ミーティングルーム F

Appetite and food odor attraction

○Nao Horio, Liberles Stephen (Harvard Medical School)

Olfaction plays an important role in food seeking, reproductive behavior, territorial aggression, and predator escape. In a complex environment, animals will pay attention only to particular sensory cues, and behavioral attraction can depend on internal physiology. For example, hunger is a powerful motivational state, and hungry mice will use olfaction to find and locate food sources needed for survival. However, mechanisms by which internal state shapes olfactory circuits remain poorly understood. Here, by using a simple and robust two-choice assay to investigate hunger dependent odor responses and optogenetic methods, we identified a neuronal mechanism by which hunger enhances attraction to food odors over other olfactory cues. By activating each axon of agouti-related peptide (AGRP) neurons, we found that AGRP neurons promote food odor attraction through projections to the paraventricular thalamus. Studies with KO mice and agonist/antagonist injections showed that food odor attraction by AGRP neurons act through neuropeptide Y (NPY) and its receptor NPY5R. These findings show that food-odor-responsive neurons comprise an olfactory subcircuit that listens to hunger state through thalamic NPY release. More generally, these studies provide general insights into the neuronal basis of perception, attention, and behavior. All animal procedures followed the ethical guidelines outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and all protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at Harvard Medical School.

Olfaction, Appetite

講演番号：2AJ-05
講演日時、会場：3 月 16 日 17:20～ ミーティングルーム F

マウス嗅結節における食へのモチベーション形成の神経メカニズム

Neural mechanisms of food odor-induced motivated behaviors in the mouse olfactory tubercle

○村田 航志（福井大医）
○Koshi Murata (Univ. Fukui)

空気中のおいしそうな食べ物の匂いは私達に食欲を感じさせる。口の中では食べ物の匂いは風味となっておいしさを形成し、さらなる摂食行動を促進する。では脳はどのような神経メカニズムで食べ物の匂いの情報から食へのモチベーションを形成するのだろうか。

嗅粘膜で受容された匂いの情報は、脳内の嗅球へと伝えられる。嗅球の投射ニューロン群は、嗅皮質と総称される脳底部の広大な領野へと軸索を投射する。嗅皮質の一領野である嗅結節には、腹側線条体としての解剖学的特徴を有する。嗅結節の投射ニューロンは、背側線条体や側坐核の投射ニューロンと同様にドーパミン受容体 D1 または D2 を発現し、腹側被蓋野からドーパミン入力を受ける。ドーパミンは行動を強く動機づける脳内報酬系と呼ばれる神経回路を構成する主要な神経伝達物質である。我々は嗅結節の食へのモチベーションへの関与を探ってきた。

マウスが食べ物と関連付けた匂いに対して探索行動を示すとき、嗅結節内では前内側部の D1 陽性ニューロンが強く c-fos 応答を示した。オプトジェネティクスと場所嗜好性試験を用いて嗅結節前内側部 D1 陽性ニューロンの機能を調べたところ、このニューロン群の光刺激はマウスにとって誘引的に作用した。薬理遺伝学的に同ニューロン群を活性化すると、活性化中は飼料の摂食量が増え、さらに活性化中に食べた飼料に対して嗜好性を獲得する傾向が見られた。以上の結果は、嗅結節の前内側部 D1 陽性ニューロンが、食べ物の匂いによる食へのモチベーション形成に関わる可能性を示唆する。

The smell of delicious food elicits appetite and forms flavor sensation and yumminess. What are the neural mechanisms of food odor-induced motivated behaviors? The olfactory tubercle, a region of the olfactory cortex, has the anatomical feature of the ventral striatum. Projection neurons in the olfactory tubercle express dopamine receptors D1 or D2 and receive dopamine input from the ventral tegmental area. When mice showed exploratory behavior to odors associated with foods, D1-positive neurons in the anteromedial part of the olfactory tubercle showed remarkable c-fos expression. In our preliminary study, pharmacogenetic activation of the D1-positive neurons in the anteromedial olfactory tubercle resulted in an increase in food intake and acquisition of food preference. These results suggest that D1-positive neurons in the anteromedial olfactory tubercle are involved in food odor-induced motivated behaviors.

olfaction, eating behavior, olfactory tubercle

講演番号：2AJ-06
講演日時、会場：3 月 16 日 17:45～ ミーティングルーム F

Gut osmolality sensing for fluid homeostasis

○Yuki Oka (Caltech)

Fluid homeostasis is a vital function that regulates the balance between water and sodium. When this balance shifts in one direction, the brain detects the changes and triggers appetite to drive water or sodium intake for compensation. Defining the neural logic of these processes is critical for understanding brain function underlying normal and abnormal appetite. Our goal is to understand how the brain processes internal state information and peripheral signals to regulate goal-oriented behaviors.

In the mammalian brain, thirst is mainly regulated by the forebrain structure called lamina terminalis (LT). We previously identified that thirst-driving neurons in the LT are rapidly suppressed upon water drinking. This thirst satiation is caused by two factors including oropharyngeal mechanical and gut osmolality signals, In this presentation, I will focus on the sensory mechanisms of gut osmolality detection. We examined sensory representation in sensory ganglia and osmolality detection mechanisms through specific sensory neurons at the periphery, We further investigated how gut osmolality signals affect brain thirst circuits by combining in vivo optical recording and loss-of-function in a peripheral sensory branch. These results reveal an additional piece to understand how our body and brain cooperate to maintain body fluid balance.

Homeostasis, Thirst, Gut-brain axis

講演番号：3AJ-01
講演日時、会場：3 月 17 日 16:03～ ミーティングルーム G

Comprehensive analysis of plasmid-host interaction in natural environments

○Masato Suzuki (Nat. Inst. Infect. Dis.)

Antimicrobial resistance genes (ARGs) are often transferred among bacteria by conjugative plasmids and have spread over the world. Conventional molecular epidemiological analysis of antimicrobial-resistant bacteria is based on sequence analysis of isolates, however, there are limitations on individual characterization when analyzing meta-samples, such as animal feces and environmental waters. In this study, we aimed to perform comprehensive analysis of plasmid–host interaction in natural environments using bacteria from environmental water samples in Japan and Vietnam. To construct genomic structures that separate bacterial chromosomes and plasmids at the single-cell level, we utilized bioinformatics technologies combining data from high-throughput sequencing (short-read and/or long-read sequencing) and Hi-C (chromosome conformation capture), a method for detecting DNA interactions in the same cell, leading to link chromosome-plasmid-ARG in individual bacteria. Furthermore, we constructed novel sequence libraries of ARGs and plasmids, and this enabled the single-cell genome analysis at unprecedented resolution and revealed previously unknown dynamics of plasmids and ARGs in environmental bacteria. Some of the relationships could be confirmed by analyzing antimicrobial-resistant isolates. Therefore, our approach would be promising for investigating bacterial antimicrobial resistance in the environment.

Antimicrobial resistance gene, plasmid, single-cell analysis

講演番号：3AJ-02
講演日時、会場：3 月 17 日 16:28～ ミーティングルーム G

A distribution survey of environmental microbiome by single-cell genomics

○Yoshihiko Hoshino[1], Mitsunori Yoshida[1], Yohei Nishikawa[2], Masato Suzuki[3], Hanako Fukano[1], Haruko Takeyama[3], Toshihiko Suzuki[4] ([1]Nat. Inst. Infect. Dis. Dept. Mycobact., [2]Waseda Univ. BioMol. Engineer., [3]Nat. Inst. Infect. Dis. AMR Ctr.,, [4]Tokyo. Med. Dent. Univ. Dept. Bact. Patho.)

Buruli ulcer, caused by *Mycobacterium ulcerans* is a skin Neglected Tropical Disease that is mainly encountered in West Africa. Around 5000 new cases are reported annually to the WHO. Despite its impact, the disease is not yet fully understood - including route of transmission. One of the biggest gaps in achieving this knowledge is due to unavailability of isolated bacteria. The ability to separate and culture individual bacteria species is critical for microbiological studies. Due to slow cell division rates, there are few reports of successful culture of Buruli ulcer-causing mycobacteria that are present in the environment. Clarification of the transmission around the circumstance may be important mission. To gain a more comprehensive understanding of bacterial infections, a method for a priori microbiome analysis that does not require separation and culture of bacteria is needed. By distinguishing every bacterium, single-cell analyses can yield comprehensive genetic information. Here we applied a high-throughput method for encapsulating single bacterium into individual droplets to perform novel diagnostics on clinical and environmental specimens. We have been developing an algorithm tool for analysis of composite genetic data, and investigated whether this method could be applied to clean and integrate genomic information derived from single cells encapsulated in droplets.

single cell genomics

講演番号：3AJ-03
講演日時、会場：3 月 17 日 16:53～ ミーティングルーム G

Identification of novel microbes using cocultivation with Acanthamoeba.

○Hiroki Nagai (Gifu Univ.)

Recent development in microbiology, such as the discovery of candidate phyla radiation bacteria and of giant viruses, brought up a novel view of microbes: we microbiologists are aware only a small fraction of microbes on the Earch. The limitation is simply due to the fact that we are not able to grow such microbes in laboratories, and efforts facilitated by many areas of methodology are being made to overcome or work around the limitation. Our laboratory has been working on the molecular pathogenesis by intracellular bacteria *Legionella* infection. *Acanthamoeba*, a well-known host of the firstly discovered giant virus, *Mimivirus*, is a natural host of *Legionella* in nature. Therefore, we have decent expertise in the studies of intracellular microbes inside of *Acanthamoeba*. Taking full advantage of the expertise, I conducted screening for novel symbiotic/parasitic microbes to *Acanthamoeba* based on rounds of cocultivation. The screening also involves the appropriate use of antifungal and antibacterial reagents and/or filtration to limit contaminating fungi and fast-growing bacterial species. Candidate microbes were cloned by limiting dilution and classified using the sequences of SSU rRNA or genes conserved among nucleocytoplasmic large DNA viruses. Of over 150 candidates, >80% microbes are either *Proteobacteria* or *Bacteroidetes*. In addition, SSU rRNA sequences of two candidate bacteria suggests that these are novel species of the Phylum *Actinobacteria*. NGS and phylogenetic analysis demonstrated that these represent a novel clade of the Class *Acidimicrobiia*. The remaining <20% microbes are giant viruses, including *Mimivirus/Megavirus/Moumouvirus* (80%), one novel *Pandoravirus*, and five unknown giant viruses. NGS and phylogenetic analysis demonstrated that these unknown viruses represent a novel clade of *Mimiviridae*, which are distantly related to Mimiviruses known to infect *Acanthamoeba* and are rather closely related to *Organic Lake phycodnavirus* known to infect algae. These results illuminate that the world is full of microbes untouched by human hands, and the co-culture-with-amoeba strategy helps us to reach where no one has gone before.

Acanthamoeba, Actinobacteria, giant virus

講演番号：3AJ-04
講演日時、会場：3 月 17 日 17:18～ ミーティングルーム G

シングルセルレベルの解析技術を用いたプラスミドの動態解明

Understanding behaviors of plasmids in natural environments using single-cell-level analyses

○新谷 政己[1,2,3] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研、[3]理研・BRC-JCM)
○Masaki Shintani[1,2,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]RIKEN)

プラスミドは，細胞間の接触を伴う接合伝達によって，異なる細胞間を，世代を経ずに伝播する．プラスミドは，薬剤耐性遺伝子や物質代謝遺伝子など種々の遺伝子を伝播するために，細菌の進化・適応を促すとともに，環境・医療面でも重要な遺伝因子である．しかし，自然界では「どの」プラスミドが「いつ」，「どの」細菌から「どの」細菌へと伝播しているのかについては，その多くが不明のままである．そこで演者らは，こうしたプラスミドの環境中における動態の解明を目指してきた．まず日本各地の土壌，河川・湖沼底泥，下水処理場，家畜厩肥などから，種々の接合伝達性プラスミドを収集した．その結果，環境に広く分布することが知られる IncP/P-1 群プラスミドの他，PromA 群に属するプラスミドを多数得ることに成功した．次に，得られた PromA 群プラスミドに，GFP をコードする遺伝子を挿入し，フローサイトメトリーとセルソーターを利用して，本群のプラスミドが，どの細菌間を伝播するのか，モデル細菌群集を用いて検証した．その結果，PromA 群プラスミドは，綱レベルで異なる細菌間を伝播する広宿主域プラスミドであること，また，同じ PromA 群プラスミドに属していても，プラスミドごとに伝播する細菌の種類が異なることが判明した．さらに，本群プラスミドを元来保有している宿主（＝天然の宿主）の情報が乏しかったため，微小な液滴（water in oil droplet）を利用したデジタル PCR とソーティングを行い，その天然の宿主を解明しようと試みた．その結果，500 以上の OTU から 9 種類の OTU まで絞り込むことに成功した．講演ではプラスミドの動態に影響を及ぼす他の因子についても議論したい．

Plasmids can be transmitted between different bacterial cells and are important genetic elements because they are spreading various genes, including drug resistance genes. However, it remains unclear when and which plasmids are transmitted from one bacterium to another in nature. The objective our study is to understand the behaviors of different plasmids in the environment. PromA group plasmids were successfully obtained from different environmental samples as many as IncP/P-1 group plasmids, which are known to be widely distributed in the environment. Next, the host ranges of different PromA plasmids were compared using a model bacterial comm2unity and flow cytometry and cell sorter. As a result, PromA group plasmids showed broad host ranges transferring among different class bacteria. Notably, transconjugants of each plasmid was different even if they belong to the same PromA group plasmid. Since there was little information on the original host of PromA group plasmid (i.e., the natural host), their natural host were identified by droplet digital PCR and sorting methods. As a result, nine operating taxonomic units (OTU) were obtained as candidates of natural hosts of PromA plasmid.

.

plasmid, conjugative transfer, PromA

講演番号：3AJ-05
講演日時、会場：3 月 17 日 17:38～ ミーティングルーム G

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が形成する胞子嚢の休眠と覚醒を制御する新規なシグマ-アンチシグマ因子制御系

Novel sigma-anti-sigma factor system that regulates sporangiospore dormancy and awakening in *Actinoplanes missouriensis*

○手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Takeaki Tezuka[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

非選択的な方法で分離した場合、放線菌分離株の 9 割程度は頑強で生育が早い *Streptomyces* 属放線菌となる。*Streptomyces* 属以外の放線菌（いわゆる希少放線菌）は一般に脆弱で生育が遅く、生態系では *Streptomyces* 属とは異なった役割を担っていると考えられる。実際、地表に溜まった落ち葉の上層（表層）部分の分解には *Streptomyces* 属放線菌が、下層部分での分解には希少放線菌がそれぞれ重要な役割を担っていると考えられている。希少放線菌には、遊走子（運動性胞子）を作るものもいるが、これは水分含量の多い落ち葉の下層部での生活に適したものである。*Actinoplanes missouriensis* はそのような希少放線菌の一種であり、菌糸伸張による増殖の後、胞子嚢柄の先端に胞子嚢を形成する。胞子嚢内部には数百の胞子が休眠細胞として成熟するが、外部に水分を感知すると覚醒し、最外層の胞子嚢膜が破れて胞子を放出する。胞子はべん毛により水中を高速で移動するが、発芽に適した環境では運動を停止して菌糸生長を開始する。我々の研究室では *A. missouriensis* のユニークな形態分化に注目し、主に遺伝学的手法を用いてその分子機構の解明を進めている。これまでに胞子嚢形成と開裂にかかわる遺伝子群の転写をグローバルに活性化する転写制御機構を詳細に解析してきたが、最近の研究により新規なドメイン構造を有するシグマ因子 SsdA とアンチシグマ因子 SipA からなるシグマ因子-アンチシグマ因子システムが胞子のストレス耐性と胞子嚢の開裂を制御していることが明らかになった。本講演では、生態系における希少放線菌の推定される役割を紹介するとともに、*A. missouriensis* 休眠胞子の覚醒について最新の研究成果を発表する。

A rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* grows as a branched substrate mycelium from a germinating spore and subsequently forms terminal sporangia, which contain a few hundred spores, from the substrate mycelia through short sporangiophores. In response to water, the terminal sporangia open up and release the spores into external environments, where the spores start to swim as zoospores by means of flagella. At the niches suitable for vegetative growth, zoospores stop swimming and begin to germinate. Although rare actinomycetes, including *A. missouriensis*, have complex life cycles, molecular biological studies of their morphological development have been limited. We have studied the molecular mechanisms for the complex life cycle of *A. missouriensis* as a model organism. In this presentation, we will present our recent discovery of a novel sigma-anti-sigma factor system that regulates sporangiospore dormancy and awakening in *A. missouriensis*.

Actinoplanes missouriensis, spore dormancy, sigma-anti-sigma factor system

講演番号：3AJ-06
講演日時、会場：3 月 17 日 18:03～ ミーティングルーム G

Applying single cell imaging to understand bacterial membrane vesicle transport

○Masanori Toyofuku[1,2,3] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, [3]SunRiSE)

Most bacteria release membrane vesicles to the extracellular environment, which have diverse functions involved in important processes such as horizontal gene transfer, phage decoy and bacterial communications. Also, MVs have immunostimulatory activity which is applied for vaccine development. Despite their various functions, how MVs are formed is not fully understood. The canonical model shows that MVs are formed through the blebbing of the outer membrane in Gram-negative bacteria. We took advantage of live-cell imaging and found a different MV formation route from blebbing where MVs are formed through a process termed explosive cell lysis in *Pseudomonas aeruginosa*. RNA-seq of MVs revealed that explosive cell lysis is triggered by a peptidoglycan degrading enzyme, endolysin. Endolysin is a widely conserved enzyme that is typically encoded in the prophage region. Further analysis showed the involvement of endolysin in triggering MV formation in Gram-positive bacteria including mycolic acid containing bacteria. Our results demonstrate that MVs are formed through different route that may determine their cargo and therefore their functions. I will introduce how live cell imaging and single cell analysis provided us key findings that may uncover the important steps involved in shuttling MVs.

Membrane vesicle, Bacterial communication, Live cell imaging

実行委員会企画シンポジウム

生命・食・環境の広い領域を包括する農芸化学会においては，自分の専門外の分野になると現状や将来展望を理解することが難しくなってしまいがちです．大会では毎年，特定分野を深掘りする魅力的なシンポジウムが数多く開催されますが，専門外のシンポジウムへの参加は敷居が高いと感じることも多く，他分野への視野を広げ，自らの研究の新しい展開を探るせっかくの機会を十分に活かし切れていないと思う大会参加者も多いのではないでしょうか？ そこで今回の大会では，異分野の方にも分かりやすく多様な分野の現状や将来展望をお話しいただくことで「農芸化学の今を俯瞰できる」シンポジウムを企画しました．様々な分野を先導し，第一線でご活躍中の演者の方々に，学生の皆さんにも理解してもらえる平易な言葉でご自身の研究や分野の現状，将来展望についてお話しいただきます．「せっかく多様な分野の人々が集まる大会に参加したのだから異分野の話も聞いてみたい」と思う多くの方々にご参加いただけることを期待しています．

3月18日（金） 16:00〜18:30

4AC　今こそ聞きたい農芸化学

3月18日（金） 16:00〜18:30
会　場：ミーティングルームH
世話人：栗原 達夫（京大化研），菅原 達也（京大院農），河内 孝之（京大院生命科学），齊藤 安貴子（大阪電気通信大工）
座　長：栗原 達夫（京大化研），菅原 達也（京大院農），河内 孝之（京大院生命科学），齊藤 安貴子（大阪電気通信大工）

16:00　　はじめに……○栗原 達夫（京大化研）
16:05　4AC-01　まだまだ広がる微生物の世界……○高谷 直樹[1,2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS）
16:40　4AC-02　脂質酸化情報の精緻化から創造する食品の未来品質・健康社会……○仲川 清隆（東北大農）
17:15　4AC-03　アーバスキュラー菌根共生の生理活性物質化学……○秋山 康紀（阪府大院・生命環境）
17:50　4AC-04　ゲノム情報を利用した生物活性天然物の酵素合成戦略およびその応用展開……○及川 英秋（北大院理）
18:25　　おわりに……○菅原 達也（京大院農）

講演番号：4AC-01
講演日時、会場：3 月 18 日 16:05～ ミーティングルーム H

まだまだ広がる微生物の世界

Still expanding world on microbial researches

○高谷 直樹 [1,2] ([1] 筑波大・生命環境、[2] 筑波大・MiCS)
○Naoki Takaya[1,2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS)

微生物は 20 世紀のバイオテクノロジーの発展に大きな貢献をしてきた。農芸化学はその中で、発酵、創薬、天然物化学、遺伝資源等の最先端を担ってきた。近年、微生物の生理・生態と多様性が分かるにつれ、私たちは、環境・食・健康という人類最大の課題を解決するための鍵の一つが微生物であることに気づき始めたといえよう。地球上では、動植物を凌ぐ数 100 万種以上の微生物が、生きた全バイオマスの 50%を占め、生態系の維持に大きく貢献することが示されてきた。科研費・新学術領域「ポストコッホ生態」（令和元年～）では、30 年以上に渡り 4 年 8 輪作を安定して運用してきた畑作施肥量試験圃を対象に、微生物・土壌化学・気象などのデータを収集している。さらに、これらの相関解析をとおして、特定の化学成分や施肥条件によって異なる特定の微生物がハブとなって生態系ネットワークが構成されることを予測可能にしている。一方、99%以上と言われる未培養微生物や微生物と他者との未知の相互作用にアクセスするために、環境微生物を高速・高効率に分離・培養するマイクロウェルデバイスや、培養を介さずに種や機能を知る顕微分光技術も構築している。これらは微生物資材等を用いた作物増産の新技術や生態系の制御・デザインにつながるものである。人の活動範囲と微生物は切り離せないものである。これ以外にも様々な分野と微生物学の融合によって、目に見えない微生物の利用の可能性がまだまだ広がると期待される。

As we learn more about the physiology, ecology and diversity of microorganisms, we have begun to realize that microorganisms are one of the keys to solving social problems. Millions of microbial species inhabit the earth that account for 50% of living biomass and maintain ecosystems. The Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas ″Post-Koch Ecology″ collected data on microbiome, soil chemistry, and meteorology in a crop fertilization test field that had been operated in an eight-crop rotation for more than 30 years. Network analysis of these data showed that ecosystems are composed of specific chemical components and microorganisms that act as hubs. We have also developed microdevices that can efficiently separate/cultivate environmental microorganisms, and microspectroscopies that can determine species and functions without cultivation. These will lead to new microbial-inoculant technologies for increasing crop production.

microbiome, uncultured bacteria, applied microbiology

講演番号：4AC-02
講演日時、会場：3 月 18 日 16:40～ ミーティングルーム H

脂質酸化情報の精緻化から創造する食品の未来品質・健康社会

Future Quality of Food and Healthy Society Created by Elaboration of Lipid Oxidation Information

○仲川 清隆（東北大農）
○Kiyotaka Nakagawa (Tohoku Univ.)

食品や私たちの身体（生体）を構成する脂質が酸化され過酸化脂質となり、食品劣化や疾病に繋がると言われて久しいと思います。以来その詳細メカニズム、即ち“食品や生体中で、脂質は実際にどのように酸化（ラジカル酸化、酵素酸化、一重項酸素酸化など）され、どのような過酸化脂質が生じ得るのか（そして、その影響）の全貌解明”が、世界の過酸化脂質研究者の目標とするところかと存じます。

こうした中で、私どもは、“過酸化脂質のヒドロペルオキシ基の近傍構造（酸素の結合部位）を解析できれば、脂質がどのように酸化されるのかわかる？”と考え研究を進めてきました。しかし、MS/MS を用いてもヒドロペルオキシ基由来のフラグメントは何ら見出せず、長い試行錯誤の末、ある時、リン脂質ヒドロペルオキシド（PCOOH）の$[M+H]^+$と$[M+Na]^+$の強度が標品と実試料で異なる（故に、試料中の PCOOH を精確に定量できない）ことに気づきました。全てを$[M+Na]^+$に傾けようと測定系に Na を加えると、定量の実現に加え、予想外に、ヒドロペルオキシ基由来のフラグメントを発見しました。これが突破口となり、Na を用いた LC-MS/MS 法で、PCOOH のみならず様々な過酸化脂質のヒドロペルオキシ基の近傍構造のわずかな違いを捉え、脂質がどのように酸化されるのかを見極められるようになってきました。

そして幸運にも、上記フラグメンテーション機構は、酸化一次生成物である脂質ヒドロペルオキシドから酸化二次生成物への生成機構に通じる（つまり、酸化二次生成物は多種多様かつ膨大ですが、酸化一次生成物の構造からその生成をある程度予想できる）ことに極最近気づき、脂質酸化経路の全貌の解明に挑んでいます。

本シンポジウムでは、こうした取り組みとともに、私どもの方法を用いた新たな知見（過酸化脂質の吸収の有無、不飽和脂肪酸ではなく飽和脂肪酸の酸化など）をご紹介いたします。

We are developing a variety of LC-MS/MS methods to evaluate how lipids are actually oxidized (radical oxidation, enzymatic oxidation, singlet oxygen oxidation, etc.) and what kind of lipid peroxides are produced in foods and in vivo. We believe that these methods will provide unique insights into conventional lipid oxidation research.

Lipid peroxides, Lipid Oxidation, LC-MS/MS

講演番号：4AC-03
講演日時、会場：3 月 18 日 17:15～ ミーティングルーム H

アーバスキュラー菌根共生の生理活性物質化学

Bioactive natural products chemistry of the arbuscular mycorrhizal symbiosis

○秋山 康紀（阪府大院・生命環境）
○Kohki Akiyama (Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.,)

植物が陸に進出したのは約 4 億年前のことである。今日，大地は緑で覆われ，我々人類を含め多くの生物が植物の恩恵を受けて生きている。この 4 億年にわたる陸上植物の生存と進化を地下で支えてきたのがアーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi，AM 菌）である。菌根菌とは植物根と共生して菌根（mycorrhiza）を形成する菌類のことである。AM 菌は菌糸を根の細胞内部に侵入させる内生菌根菌の一種であり，根の皮層細胞で樹枝状体（arbuscule）と呼ばれる栄養交換器官を形成することからその名が付けられている。AM 菌は根の外に伸ばした菌糸で土壌中からリン酸などのミネラルを吸収して宿主植物に与え，自らは宿主から糖や脂質などの炭素源を受け取る相利共生関係を結ぶ。AM 菌との共生は原始陸上植物が極貧栄養の陸上環境で生きていくのに極めて重要な役割を果たしたと考えられている。現在では AM 菌との共生は 70%以上もの陸上植物に見られ，農業や自然生態系で植物の生育を支え続けている。宿主への依存度が高い多くの共生・寄生生物に見られるように，AM 菌もまた単独ではほとんど生育せず，生活環を完結できない絶対共生菌である。これまでに我々は AM 共生に関与する生理活性物質（＝共生制御物質）の解明を目標に研究を行ってきた。農芸化学系天然物化学伝統の“モノ取り”を基盤として，化学合成も手段として採用しつつ，様々な共生制御物質を明らかにしてきた。例えば，今日では植物ホルモンとして知られるストリゴラクトンが AM 共生における宿主シグナルであること，様々なタイプのフラボノイド類が共生制御に関与すること，また脂肪酸が AM 菌の胞子形成までの生活環を完結できる生育促進物質であること，等々である。本講演では，これら AM 共生関連生理活性物質の研究について農芸化学的な視点から紹介する。

The arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is formed by more than 70% of land plants with members of the Glomeromycotina fungi. AM fungi facilitate the uptake of mineral nutrients such as phosphate and nitrogen from the soil. In return, the fungi receive organic carbon from the plants. AM fungi are obligate symbionts incapable of completing their life cycle in the absence of a host root. In this presentation, I would like to talk about the isolation and identification of bioactive natural products involved in the regulation and establishment of AM symbiosis.

arbuscular mycorrhizal symbiosis, strigolactone, fatty acid

講演番号：4AC-04
講演日時、会場：3 月 18 日 17:50～ ミーティングルーム H

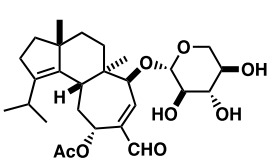
ゲノム情報を利用した生物活性天然物の酵素合成戦略およびその応用展開

Strategy for enzymatic synthesis of bioactive natural products and its application

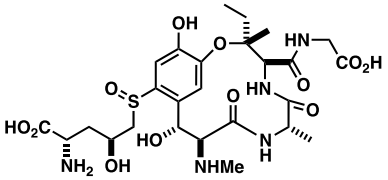
○及川 英秋（北大院理）
○Hideaki Oikawa (Hokkaido Univ.)

バンコマイシン、タキソール、タクロリムスなどの医薬品、植物ホルモン、昆虫のフェロモン、食品の旨味成分などの小分子化合物（天然物）は、“化学と生物”を主題とする農芸化学分野の重要なテーマである。こうした優れた生物活性を有する天然物は、細胞中のごくありふれた物質から酵素という触媒を用いて生合成される。2010 年代に入り、ゲノム解析の技術革新により、微生物などの天然物の設計図となる生合成遺伝子クラスター（BGC）の入手が容易になった。これにより、微生物汎用ホストに BGC の遺伝子を順次導入し、生合成経路を明らかにすると共に、目的とする天然物を酵素合成する手法が確立されつつある [1]。こうした背景のもと我々は、麹菌をホストとして、糸状菌天然物を網羅的に合成する研究を行なってきた。

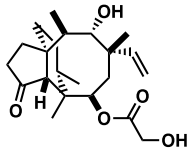
本講演では、最近開発された高発現領域への高効率遺伝子導入法や、それを適用した複雑な構造を持つ糸状菌天然物の合成例、新規酵素反応の発見などのほか、カビとは大分異なるキノコへの本法の適用など、最近の成果を紹介する [2-4]。同時に、以下のような天然物の利用なども俯瞰してみたい; 1) 生合成的手法を活用した新規天然物の探索; 2) 構造未知の有用天然物の構造決定支援; 3) 天然物の真の機能解明; 4) 生合成酵素の論理的機能改変。



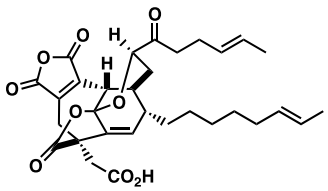
erinacine P



ustiloxin B



pleuromutilin



phomoidride A

In 2010s, genomic analysis of microorganism provides large number of biosynthetic gene clusters (blueprints) of the bioactive metabolites. Heterologous expression in the filamentous fungi as hosts is one of the powerful tools to produce the natural products and to elucidate their biosynthetic pathways[1]. In my lecture, development of screening-free expression system using efficient genome editing method, their application to synthesize highly elaborated metabolites, and finding of novel modification enzymes[2-4]. In addition, I will discuss application of these methods in future. Ref: 1) Biosci Biotechnol Biochem, **84**, 433 (2020); 2) Angew. Chem. Int. Ed., **60**, 23403 (2021); 3) Angew. Chem. Int. Ed., **59,** 17996 (2020); 4) J. Am. Chem. Soc., **141**, 15519 (2019).

natural products, biosynthesis, heterologous expression

スポンサードセミナー プログラム

スポンサードセミナー（旧ランチョンセミナー）では，幅広い“農芸化学分野”に関わる企業関係の皆様から新製品や新技術等の情報を発信していただき，産学官連携の推進に努めております．

スポンサードセミナーは，事前申込の必要はなく，当日，どなたでもご参加いただけます．

参加登録番号と参加申込時のE-Mailアドレスを使用し，プログラム検索サイト（https://jsbba2.bioweb.ne.jp/jsbba2022/）にログインしてご聴講ください．

3月16日（水）12:00 ～ 12:50

2BL　Noster株式会社　　ミーティングルームB

座長：小川 順（京都大学大学院農学研究科 教授）

『腸内細菌研究が創出する健康・医療新産業』

新規創薬・食品モダリティとしてのマイクロバイオームとポストバイオティクスの可能性

國澤 純（医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチン・アジュバント研究センター　センター長）

2DL　長瀬産業株式会社 / キッコーマン株式会社　　ミーティングルームD

座長：東原 和成（東京大学大学院農学生命科学研究科教授（応用生命科学専攻生物化学研究室））

『天然希少アミノ酸「エルゴチオネイン」研究の新展開』

1. 認知症マーカーかつ機能性食品でもある「エルゴチオネイン」最近の研究進展の興奮

柳田 充弘（沖縄科学技術大学院大学教授（G0細胞ユニット）、京都大学名誉教授）

2. スマートセル技術を活用した高度精製エルゴチオネインの開発

仲谷 豪（長瀬産業株式会社 ナガセR&Dセンター）

3. 発酵調味料・発酵食品に応用可能なエルゴチオネイン高生産麹菌の発見

佐竹 遼子（キッコーマン株式会社 研究開発本部）

3月17日（木）12:00 ～ 12:50

3BL　ライカマイクロシステムズ株式会社　　ミーティングルーム B

司会：田中 晋太朗（ライカマイクロシステムズ株式会社）

『蛍光顕微鏡のニューノーマルと蛍光寿命イメージング』

1. THUNDER が作り出す蛍光顕微鏡のニューノーマル

鶴巻 宣秀（ライカマイクロシステムズ株式会社）

2. 次世代共焦点顕微鏡 STELLARIS と蛍光寿命イメージング

長利 卓（ライカマイクロシステムズ株式会社）

3DL　ベックマン・コールター株式会社　　ミーティングルーム D

異なる環境下で微生物培養を評価するマイクロバイオリアクター BioLector のアプリケーションのご紹介

北川 哲平（ライフサイエンス バイオテクノロジー事業本部）

3FL　味の素株式会社　　ミーティングルーム F

司会：藤島 義之（味の素株式会社 グローバルコーポレート本部 R&B 企画部）

『食品のおいしさを引き出すコクと産業への応用』

1. 食品のコクとその生成メカニズム

西村 敏英（女子栄養大学 栄養学部）

2. ***kokumi*** 物質の受容機構と食品における官能特性

北島 誠司（味の素株式会社 食品研究所 技術開発センター 風味制御グループ）

3月18日（金）12:00 ～ 12:50

4BL　Twist Bioscience　　ミーティングルーム B

司会：野口 匡則（Twist Bioscience）

『#WeMakeDNA - 合成生物学と微生物学による進化機構解明へのアプローチ』

1. 人工遺伝子を用いた RNA ファージの適応進化機構の解明

柏木 明子（弘前大学農学生命科学部食料資源科学科バイオテクノロジーコース 准教授）

2. 未来を創る：あなたの最高の研究アイデアを可能にする DNA ツール

河合 岳志（Twist Bioscience　ビジネスデベロップメントマネージャー）

日本農芸化学会2022年度大会
Noster株式会社スポンサードセミナー
講演番号　2BL

NOSTER
Connecting life & gut microbiome.

腸内細菌研究が創出する健康・医療新産業

日時　2022年3月16日(水)
12:00～12:50

会場　ミーティングルームB

座長　京都大学大学院農学研究科
小川 順 教授

腸内細菌研究は、ゲノム科学の進展によりそれまでの単離同定を主とした解析から、microbiotaやmicrobiomeと称される菌叢の俯瞰的解析へと大きく転換した。今後、一細胞レベルでのゲノム解析や、膨大な分子・代謝物を対象とするメタボロミクス解析などのオミクス解析、くわえて、健康状態や疾患と腸内細菌叢・食事・腸内細菌代謝物との関連性を読み解くコホート研究などの情報科学により、腸内細菌と疾患・健康に関する知見はさらに深化すると考えられる。このような状況は、腸内細菌研究を起点とした新たな健康・医療産業の胎動をうながしている。本セミナーでは、その具体例を紹介するとともに、今後の腸内細菌研究の動向、関連する健康・医療新産業の創出を議論したい。

新規創薬・食品モダリティとしてのマイクロバイオームとポストバイオティクスの可能性

医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチン・アジュバント研究センター
國澤 純 センター長

「腸内環境」や「腸活」「善玉菌」などの言葉が広く知られるようになった社会の変化やその基盤となる学術的な発展と共に、特定の細菌を投与することで疾患の予防や治癒を目指すマイクロバイオーム医薬品の可能性が見えてきた。また、食品開発の観点からは、「ポストバイオティクス」という新しいキーワードのもと、食品成分を基質に腸内細菌が産生する有用物質が、ヘルスケア領域を創出する新たなコンテンツとして注目されている。

私たちは現在、食品成分と腸内細菌が形成する腸内環境と健康との関係について、ヒトを対象とした研究と動物モデルを用いた基礎研究とを融合的に進めることで研究の高度化を行い、さらに、得られた知見をもとに、創薬や食品の開発、新たな健康増進システム作りなどへ展開する研究を行っている。本講演では、我々の最近の知見を中心に、腸内環境が新しい社会に貢献する可能性について紹介したい。

【講演番号 2DL】

日本農芸化学会 2022 年度大会

天然希少アミノ酸「エルゴチオネイン」研究の新展開

～生理機能研究と発酵生産技術の進展～

日時　3 月 16 日（水）12：00～12：50

会場　ミーティングルーム D

座長　東原　和成　教授（東京大学大学院農学生命科学研究科　応用生命化学専攻）

講演 1（30 分）

認知症マーカーかつ機能性食品でもある「エルゴチオネイン」最近の研究進展の興奮

柳田　充弘　教授（沖縄科学技術大学院大学　G0 細胞ユニット、京都大学名誉教授）

要旨

エルゴチオネイン(EGT)はヒト血液に多量含まれる低分子メタボライトである。赤血球中に富むが、脳も含めて全身に分布する。安定な水溶性代謝物として定量しやすい。ヒスチジンと硫黄を含有するトリメチルアンモニウム系の抗酸化分子として分類されており、アミノ酸誘導体の一種。ビタミンとの機能的類似性も指摘されている。百年以上も前に発見されているのにも関わらず、その機能は強力な抗酸化活性以外長らく不明であった。しかし、以下に述べるように最近重要な進展があった。ヒトは EGT を合成できないが、EGT を体内に取り込むトランスポーターを持つことが判明した。その結果 EGT を細胞内に高濃度に蓄えることが可能となり、細胞ミトコンドリアを酸化ストレスから保護することも可能となる。実際ミトコンドリア膜にトランスポーターETT が富むことも示された。 最近、発酵法による高純度 EGT の大量生産技術が開発され、サプリメント、化粧品、機能性食品、医薬品市場など産業面での利用普及の迅速な発展が期待されている。EGT を多量に含むタモギタケはスーパーで生鮮食品として含量表示付きで販売されている。EGT は人の複数の疾病、特に認知症とも関わり、今後診断・治療にも役立つことが大いに期待されている。EGT 含量は老化関連疾病である認知症の進行と共に体内濃度が減少することも知られてきた。筋力が低下したフレール患者での認知症では EGT の減少程度は少ないがアルツハイマー病の重度認知症ではさらに顕著な減少が見出されている。一方で、筋力は低下するが認知症を示さないサルコペニア症患者では EGT 減少は少ない。純化かつ大量生産が可能となった EGT を広い範囲の認知症の治療、軽減化に利用する方向の研究が今後活発に行われるだろう。特に EGT は食品として認知されているので、期待は高いが、広範な大量利用には安全性・適用利用範囲も含めて今後注意深く研究されるだろう。EGT はその前駆体や誘導体も含めてヒトには数種存在し、これらが疾病により濃度が変動することが知られている。トリメチルアミノ基を持つ脳内成分の研究開発の方向性は大変興味深い。

講演 2　**スマートセル技術を活用した高度精製エルゴチオネインの開発**

仲谷　豪　（長瀬産業株式会社　ナガセ R&D センター）

講演 3　**発酵調味料・発酵食品に応用可能なエルゴチオネイン高生産麹菌の発見**

佐竹　遼子（キッコーマン株式会社　研究開発本部）

共催：　長瀬産業株式会社、 キッコーマン株式会社

日本農芸化学会 2022 年度大会
スポンサードセミナー
プログラム No. 3BL

蛍光顕微鏡のニューノーマルと蛍光寿命イメージング

日時：3 月 17 日（木）12：00～12：50　会場名：ミーティングルーム B

ライカマイクロシステムズ株式会社

【演題 1】

THUNDER が作り出す蛍光顕微鏡のニューノーマル

演者：鶴巻　宣秀（ライカマイクロシステムズ株式会社）

今や蛍光観察は、研究分野において「ノーマル」な機器として多くの方が使用される時代となっています。しかしコロナ禍では、時間の制約下で、いかに「研究を進めていくか」ということが重要になってきています。そこで、蛍光観察を限られた時間でいかに効率的に、最大限の結果を生み出していくかという点に注目し、通常の蛍光顕微鏡でありながら、超高精細画像で取得できるイメージングシステム THUNDER で「蛍光顕微鏡のニューノーマル」をご提案します。



蛍光イメージングが劇的に変わる！

THUNDER 画像集はこちら

【演題 2】

次世代共焦点顕微鏡 STELLARIS と蛍光寿命イメージング

演者：長利　卓（ライカマイクロシステムズ株式会社）

ライカマイクロシステムズは次世代の共焦点顕微鏡 STELLARIS を発表しました。この STELLARIS は検出感度や分解能に磨きをかけたのはもちろんのこと、これまで特定の用途でのみ利用されてきた【蛍光寿命】を誰もが簡単に利用できる技術にして標準搭載しました。当セミナーでは【蛍光寿命ってナニ？】や【それで何ができるの？】という疑問にお答えしつつ、STELLARIS がライフサイエンスイメージングのお役に立てる技術をご紹介いたします。



STELLARIS の製品情報はこちら

ライカ マイクロシステムズ 株式会社
本　　社　〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-29-9　Tel.03-6758-5640　Fax.03-5155-4336
大 阪セールスオフィス　〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎5-4-9 商業第2ビル10F　Tel.06-6374-9771　Fax.06-6374-9772
名古屋セールスオフィス　〒460-0008 名古屋市中区栄 2-3-31 CK22キリン広小路ビル 5F　Tel.052-222-3939　Fax.052-222-3784
福 岡セールスオフィス　〒812-0025 福岡市博多区店屋町8-30 博多フコク生命ビル 12F　Tel.092-282-9771　Fax.092-282-9772

日本農芸化学会2022年度大会
ベックマン・コールター株式会社

異なる環境下で微生物培養を評価する マイクロバイオリアクター BioLectorの アプリケーションのご紹介



日　時　2022年 3月 17日 [木]　12：00 ～ 12：50

演　者　北川　哲平　ベックマン・コールター株式会社　ライフサイエンス　バイオテクノロジー事業本部

会場名　ミーティングルームD
プログラムNo. 3DL

バイオテクノロジーの発展において、微生物は非常に重要な貢献を果たしてきました。特に、食品、医薬品、グリーンバイオ、ホワイトバイオでは微生物を利用した産業利用での研究が激化しています。
より効率的な微生物利用”をするには、菌株のスクリーニングや生産プロセスの“最適化”を考慮する必要があります。

BioLectorシリーズは、マイクロプレートベースで最大48ウェルで複数の微生物株を同時に培養し、培養液中の生菌数、蛍光、pH、DOなどの培養パラメータをオンラインでモニタリングすることが可能なマイクロバイオリアクターです。ガスコントロールモジュールにより、嫌気培養や各O_2濃度での好気培養を実現し、様々な微生物研究にお使いいただけます。また、マイクロ流路を用いた流加培養やpH制御にも対応し、より複雑な培養プロセスの開発にも使用できます。

本セミナーでは、これまで低pH範囲では制御が困難だった少量培養でのタンパク質生産に適したpHを評価したアプリケーションデータや、生産性を大きく左右するスケールアップにおけるデータを中心にBioLectorを用いたアプリケーションをご紹介し、新製品BioLector XTの機能と特長についてご紹介いたします。

Beckman CoulterおよびBeckman Coulterロゴは、Beckman Coulter, Inc.の登録商標です。

ベックマン・コールター株式会社
本　　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー
お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL https://www.beckman.jp

BECKMAN COULTER Life Sciences

MAPSS-LS-202202-35

Eat Well, Live Well.

AJINOMOTO

日本農芸化学会2022年度大会

スポンサードセミナー 3FL



食品のおいしさを引き出す
コクと産業への応用

日時：3月17日(木) 12:00～12:50

開催方法：オンライン

1 オープニングトーク

味の素株式会社 R&B企画部　藤島 義之

2 食品のコクとその生成メカニズム

女子栄養大学 栄養学部教授　西村 敏英



- コクの定義：食品のおいしさとコク
- コクの3大要素：複雑さ、広がり、持続性 食品によってコクの要素に適切な強さがある
- コクの各要素の形成・増強メカニズムと寄与物質：各3要素の形成・増強メカニズムと寄与成分

3 *kokumi*物質の受容機構と食品における官能特性

味の素株式会社 食品研究所　北島 誠司



- 食品のコクを増強する*kokumi*物質
- カルシウム感知受容体CaSRを介した*kokumi*物質の分子受容メカニズム
- CaSRを活性化する*kokumi*物質γ-Glu-Val-Glyの官能特性
- *kokumi*物質γ-Glu-Val-Glyの産業活用と今後の展望

主催者：味の素株式会社

日本農芸化学会2022年度大会
スポンサードセミナー（プログラムNo. 4BL）

講演番号 4BL | Friday, March 18, 12:00~12:50

#WeMakeDNA - 合成生物学と微生物学による進化機構解明へのアプローチ
[共催企業]Twist Bioscience

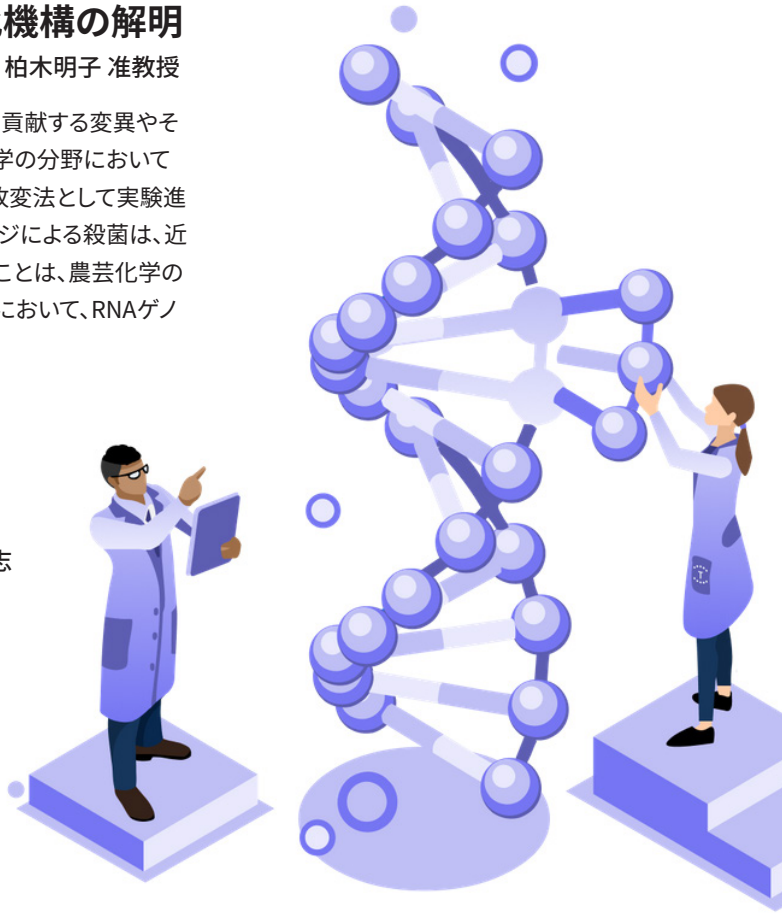
招待講演
人工遺伝子を用いたRNAファージの適応進化機構の解明

弘前大学農学生命科学部食料資源科学科バイオテクノロジーコース 柏木明子 准教授

我々は、溶菌性ss(+)RNAファージを用い、実験進化の手法で適応進化に貢献する変異やその適応度上昇への貢献度を評価している。このような研究は、進化生物学の分野において重要なだけでなく、デザインすることが難しいss(+)RNAファージの機能改変法として実験進化が有用であることも示している。ファージセラピーに代表されるファージによる殺菌は、近年再注目されており、実験進化で様々な環境に適応したファージを得ることは、農芸化学の分野においても有用である。本講演では、ss(+)RNAファージの実験進化において、RNAゲノムのcDNAを合成遺伝子として活用している例を紹介する。

企業講演
未来を創る：あなたの最高の研究アイデアを可能にするDNAツール

Twist Bioscience ビジネスデベロップメントマネージャー　河合岳志



セミナー事前登録で全員もらえる！
Starbacksドリンクチケット（500円分）*
さらに学会会員様は当日視聴でダブルチャンス！
・Twist Gene Fragments 5kb* フリーチケット（3名様）
・らまのぬいぐるみ（5名様）

当社ウェブサイトにある以下のフォームからご登録をお願いいたします

*事前登録の以下のフォームを送信いただいた時点で、ギフトの授受と、ドリンクチケット送付のためにのみ株式会社オリーブプランニングへ個人情報を開示することにご同意いただいたものとみなします。

ギフトカードの送付不要でご登録のみご希望のお客様は、ウェビナー登録の上、jsalescustomer@twistbioscience.comまでお知らせいただけましたら幸いです。

【お問い合わせ先】
E-mail:jsalescustomer@twistbioscience.com

© 2022 All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2022 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会　2022 年 度　大 会　講 演 要 旨 集（オンライン）
Program & Proceedings (online) of the Annual Meeting 2022 Kyoto of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2022 年 3 月 5 日公開　Published online 5 March 2022　ISSN 2186-7976

発行者　公益社団法人日本農芸化学会　JSBBA　https://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　DYNACOM　https://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　KOMIYAMA PRINTING　https://www.kopas.co.jp/