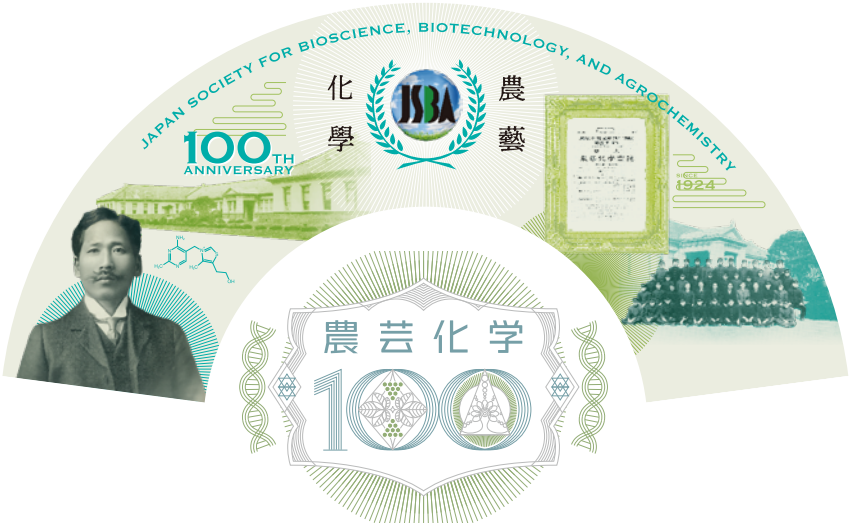
ISSN 2186-7976

March 5, 2024
令和６年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2024

大会講演要旨集

■２０２４年度(令和６年度)大会[東京]■





公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者一覧及び本部主催講演 ---------- 2
一般講演番号の見方 ---------- 6
一般講演発表プログラム ---------- 7
一般講演発表要旨 ---------- 69
大会シンポジウムプログラム ---------- 1,559
大会シンポジウム要旨 ---------- 1,567
分野融合連携（他学会連携）シンポジウムプログラム ---------- 1,692
分野融合連携（他学会連携）シンポジウム要旨 ---------- 1,693
ランチョンセミナープログラム ---------- 1,703
ランチョンセミナー要旨 ---------- 1,705
JABEE ランチョンシンポジウムプログラム---------- 1,716
JABEE ランチョンシンポジウム要旨---------- 1,717
教育講演プログラム ---------- 1,719
教育講演プログラム要旨 ---------- 1,720
特別企画シンポジウムプログラム ---------- 1,726
特別企画シンポジウムプログラム要旨 ---------- 1,727

日本農芸化学会

（2024 年度）学会賞等授賞式、受賞者講演、受賞者一覧及び本部主催講演

学会賞等授賞式、受賞者講演（日本農芸化学会賞、日本農芸化学会功績賞、農芸化学技術賞、農芸化学奨励賞）

日時：2024 年 3 月 24 日（日）9 時～12 時、13 時 10 分～14 時 5 分
場所：東京農業大学世田谷キャンパス　百周年記念講堂（東京都世田谷区桜丘 1-1-1）

本部主催講演（別府輝彦先生追悼講演）

日時：2024 年 3 月 24 日（日）12 時 20 分～13 時
場所：東京農業大学世田谷キャンパス　百周年記念講堂（東京都世田谷区桜丘 1-1-1）

受賞者講演（農芸化学女性研究者賞、農芸化学若手女性研究者賞、農芸化学女性企業研究者賞）

日時：2024 年 3 月 26 日（火）13 時 50 分～15 時 20 分
場所：東京農業大学世田谷キャンパス　A1 会場（東京都世田谷区桜丘 1-1-1）

2024 年 3 月 24 日（日）進行予定

（ 9：00） **2024 年度学会賞等授与式**
　　1 授賞選考委員長報告
　　2 日本農芸化学会賞授与
　　3 日本農芸化学会功績賞授与
　　4 農芸化学技術賞授与
　　5 農芸化学奨励賞授与
　　2024 年度農芸化学女性研究者賞等授与式
　　1 授賞選考委員長報告
　　2 農芸化学女性研究者賞授与
　　3 農芸化学若手女性研究者賞授与
　　4 農芸化学女性企業研究者賞授与
（ 9：40） **第 21 回農芸化学研究企画賞表彰式**
　　1 産学官学術交流委員長報告
　　2 農芸化学研究企画賞表彰
（ 9：45） **BBB 論文賞、BBB Most-Cited Review Award**
　　1 英文誌編集委員長報告
（ 9：50） **会長祝辞**
（ 9：55） ** 休憩 5 分間 **
（10：00） **受賞者講演開始**
（10：00） 日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件、各 25 分）
（10：50） 日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件、各 20 分）
（11：30） 農芸化学技術賞受賞者講演（2 件、各 15 分）
（12：00） **受賞者講演終了**
（12：00） ** 休憩 20 分間 **
（12：20） **本部主催講演（別府輝彦先生追悼講演）開始**
（13：00） **本部主催講演終了**
（13：00） ** 休憩 10 分間 **
（13：10） **農芸化学奨励賞受賞者講演開始**
（13：10） 農芸化学奨励賞受賞者講演（10 件、各 5 分）
（14：05） **農芸化学奨励賞受賞者講演終了**

（14：05） ** 休憩 10 分間 **
（14：15） **本部主催特別企画シンポジウム　これまでの農芸化学研究の 100 年を振り返って開始**
（17：05） **シンポジウム終了**

2024 年 3 月 26 日（火）進行予定
（13：50） **農芸化学女性研究者賞等受賞者講演開始**
（13：55） 農芸化学女性研究者賞受賞者講演（2 件、各 20 分）
（14：35） 農芸化学若手女性研究者賞受賞者講演（2 件、各 15 分）
（15：05） 農芸化学女性企業研究者賞受賞者講演（1 件、15 分）
（15：20） **農芸化学女性研究者賞等受賞者講演終了**

受賞者

【日本農芸化学会賞】（2 件、50 音順）

内田 浩二　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「食と健康に関連した生命現象の化学反応」

田中 寛　（東京工業大学科学技術創成研究院）
「微生物における細胞制御の統合的理解」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件、50 音順）

長岡 利　（岐阜大学応用生物科学部）
「脂質代謝制御に関する食品機能学的研究」

堀内 裕之　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「糸状菌の菌糸極性生長・形態分化に関わる機能分子の細胞遺伝学」

【農芸化学技術賞】（2 件、50 音順）

サッポロビール株式会社
「酵母の醸造特性・物質変換に着目したビールテイスト飲料の品質向上と商品開発」

ハウス食品グループ本社株式会社
「PCR による食物アレルゲン検査法の開発、公定法化、市販キット化」

【農芸化学奨励賞】（10 件、50 音順）

大橋 一登　（群馬大学生体調節研究所）
「ミトコンドリアにおける NADP(H)供給とその調節に関する分子生化学的研究」

加藤 晃代　（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「微生物の産業利用および異種タンパク質生産の効率化に関する研究」

北岡 直樹　（北海道大学大学院農学研究院）
「植物の防御応答に関わる天然有機化合物の生合成機構と生理作用の解明」

呉 静　（静岡大学農学部）
「高等菌類由来の生物活性物質に関する化学的研究」

高橋 春弥　（京都大学大学院農学研究科）
「健康機能評価に寄与する質量分析データの応用展開」

藤井 達也　（産業技術総合研究所機能化学研究部門）
「糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* による植物バイオマス糖化技術の研究」

三谷 塁一　（信州大学農学部）
「食品成分の標的タンパク質の同定とそれに基づく機能性発現メカニズムに関する研究」

宮崎 翔　（東京農工大学グローバルイノベーション研究院）
「植物における新たな生活環制御に関わるテルペノイドの生合成研究」

宗正 晋太郎　（岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域）
「気孔の開閉運動を制御するイオンチャネル活性制御機構の解明」

村井 勇太　（北海道大学大学院農学研究院）
「化学的アプローチによるスフィンゴ脂質関連分子の新しい生理機能の解明」

【農芸化学女性研究者賞】(2 件、50 音順)

小林 彰子　(東京大学大学院農学生命科学研究科)
「ポリフェノールの体内動態と機能性研究」

山田 美和　(岩手大学農学部)
「生分解性プラスチックの微生物による合成と分解に関する研究」

【農芸化学若手女性研究者賞】(2 件、50 音順)

奥田 綾　(京都大学複合原子力科学研究所)
「小胞体における酸化的フォールディング酵素の機能・構造相関解析」

DAMNJANOVIC Jasmina (名古屋大学大学院生命農学研究科)
「産業用酵素群の実用化を指向した酵素科学・工学的研究」

【農芸化学女性企業研究者賞】(1 件)

柳樂 明佳　(株式会社明治研究本部乳酸菌研究所)
「乳タンパク質の健康機能に関する研究」

【農芸化学研究企画賞】(2 件、50 音順)

岡野 憲司　(関西大学化学生命工学部)
「減算的菌叢改変技術を活用した次世代プロバイオティクスシード微生物の発掘」

中川 優　(名古屋大学糖鎖生命コア研究所)
「糖鎖を標的とした新興感染症治療薬リードの開発」

【2024 年度日本農学賞 (本会推薦)】

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました。
2024 年 4 月 5 日東京大学山上会館で開催される日本農学大会において、日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています。

受　賞　者:片岡 宏誌 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)
受 賞 題 目:昆虫の発育を調節する神経ペプチドならびにステロイドに関する研究

【2023 年 (Vol.87) BBB 論文賞 (掲載順)】(10 件)

pp.90～98　Arata Banno, Mako Yamamoto, Maihemuti Mijiti, Asahi Takeuchi, Yuyang Ye, Natsuki Oda, Nanami Nishino, Akio Ebihara, Satoshi Nagaoka
The physiological blood concentration of phenylalanine-proline can ameliorate cholesterol metabolism in HepG2 cells

pp.119～128　Atsushi Kurata, Shino Yamasaki-Yashiki, Tomoya Imai, Ayano Miyazaki, Keito Watanabe, Koichi Uegaki
Enhancement of IgA production by membrane vesicles derived from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

pp.179～190　Ruriko Miyazaki, Shunji Kato, Yurika Otoki, Halida Rahmania, Masayoshi Sakaino, Shigeo Takeuchi, Toshiro Sato, Jun Imagi, Kiyotaka Nakagawa
Elucidation of decomposition pathways of linoleic acid hydroperoxide isomers by GC-MS and LC-MS/MS

pp.389～394　Kuniki Kino, Takuma Komabayashi, Ayaka Hashida, Ayumu Kuramoto
Improving the enzymatic activity of L-amino acid α-ligase for imidazole dipeptide production by site-directed mutagenesis

pp.501～510　Saaya Sekine, Shohei Takase, Runa Hayase, Kota Noritsugu, Yuki Maemoto, Yasue Ichikawa, Kenji Ogawa, Yasumitsu Kondoh, Hiroyuki Osada, Minoru Yoshida, Akihiro Ito
Identification of a derivative of the alkaloid emetine as an inhibitor of the YAP-TEAD interaction and its potential as an anticancer agent

pp.638～645　Izza Nur Laily, Michiki Takeuchi, Taku Mizutani, Jun Ogawa

An ACE2, SARS-CoV-2 spike protein binding protein, -like enzyme isolated from food-related microorganisms

pp. 747～757 Huei-Fen Jheng, Miho Takase, Satoko Kawarasaki, Zheng Ni, Shinsuke Mohri, Kanako Hayashi, Atsushi Izumi, Kuni Sasaki, Yu Shinyama, Jungin Kwon, Su-Ping Ng, Haruya Takahashi, Wataru Nomura, Rina Yu, Koji Ochiai, Kazuo Inoue, Teruo Kawada, Tsuyoshi Goto
8-Prenyl daidzein and 8-prenyl genistein from germinated soybean modulate inflammatory response in activated macrophages

pp. 1068～1076 Yoshimi Kobayashi, Tai-Ying Chiou, Masaaki Konishi
Artificial intelligence-assisted analysis reveals amino acid effects and interactions on *Limosilactobacillus fermentum* growth

pp. 1285～1294 Yuko Watanabe, Eri Katsumura, Tatsuki Domon, Yuta Ishikawa, Rina Oguri, Minami Takashima, Qi Meng, Masato Kinoshita, Hisashi Hashimoto, Kiyotaka Hitomi
Establishment of transgenic epithelium-specific Cre-recombinase driving medaka (*Oryzias latipes*) by homology repair mediated knock-in

pp. 1407～1419 Chihiro Watanabe, Eri Oyanagi, Takafumi Aoki, Hiroki Hamada, Masato Kawashima, Takashi Yamagata, Michel J Kremenik, Hiromi Yano
Antidepressant properties of voluntary exercise mediated by gut microbiota

【2023年Most-Cited Review Award】被引用回数 19 回

Vol. 85, No. 9, pp. 1919～1931
Akifumi Sugiyama
Flavonoids and saponins in plant rhizospheres: roles, dynamics, and the potential for agriculture

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２５日（月）
３ ⟶ ３月２６日（火）
４ ⟶ ３月２７日（水）

次のアルファベットは階数、その次の数字一桁は、会場番号

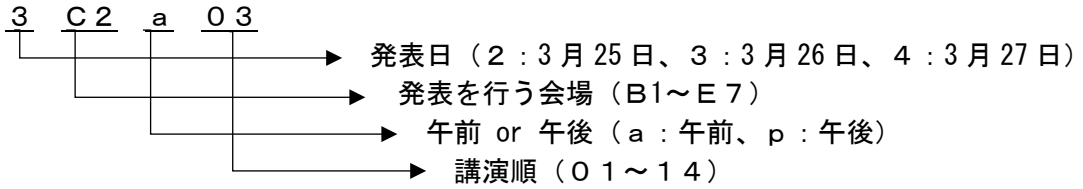
Ａ　　１号館１階
Ｂ　　１号館２階
Ｃ　　１号館３階
Ｄ　　１号館４階
Ｅ　　１号館５階

（例：Ｂ５　→　１号館２階　Ｂ５会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番



たとえば、**３Ｃ２ａ０３**は、
３月２６日（火）、１号館Ｃ２会場、午前の部、３番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

０１．　9：30	０２．　9：41	０３．　9：52	０４．10：03
０５．10：14	10：25（USB 接続時間）	０６．10：33	０７．10：44
０８．10：55	０９．11：06	１０．11：17	11：28（USB 接続時間）
１１．11：36	１２．11：47	１３．11：58	１４．12：09

ｐ［ｐｍ］（午後）

０１．13：50	０２．14：01	０３．14：12	０４．14：23
０５．14：34	14：45（USB 接続時間）	０６．14：53	０７．15：04
０８．15：15	０９．15：26	１０．15：37	15：48（USB 接続時間）
１１．15：56	１２．16：07	１３．16：18	１４．16：29

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は 1 題につき，11 分（発表 8 分，質疑 2 分 30 秒，交替時間 30 秒）です．
2. ○は講演者（登壇者）を示します．
3. 座長は，本集の前のページまたは大会プログラム検索サイト（https://www.jsbba.or.jp/2024/wp-content/uploads/file/info/jsbba2024_moderators.pdf）の座長一覧表をご覧ください．
4. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2：3 月 25 日，3：3 月 26 日，4：3 月 27 日），2〜3 文字目は講演会場（B1〜E7），4 文字目（英字小文字 1 字）の a は午前，p は午後，5〜6 文字目（数字 2 桁）は講演順番（01〜14）となります．
（例）「3C2a03」は，3 月 26 日，C2 会場，午前の部，3 番目の講演となります．
5. トロフィーマークがついている演題は，トピックス演題となります（30 題）．

第 2 日（3 月 25 日）

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名（所属）

B1 会場　午後の部（14:01〜16:40）

食品—食品工学-製造工学，加工学/食品工学-その他—

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2B1p02　乳酸を利用した魚醤製造法に関する研究
14:01　○正田 直輝，辰野 竜平，古下 学，福田 翼　（水産機構水大校）

2B1p03　大豆を利用したカツオ味噌の製造条件に関する研究
14:12　○福田 翼，矢倉 陽平，辰野 竜平，古下 学　（水産機構水大校）

2B1p04　マイクロ波加熱によるガラクトースの異性化に及ぼす卵殻添加の影響
14:23　○二俣 真[1]，尾西 佑一朗[1]，安達 修二[2]，Khuwijitjaru Pramote[3]，渡邉 義之[4]，小林 敬[1]，谷 史人[1]　([1]京大農院，[2]京都先端大，[3]Silpakorn Univ.，[4]大阪公立大農）

2B1p05　フリージング条件がアイスクリームに配合したビフィズス菌の生残性に及ぼす影響
14:34　○島田 昌幸，井上 恵介，元吉 智美　（森永乳業株式会社研究本部 食品開発研究所）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2B1p06　モリンガ種子の麹菌発酵産物，モリンガ麹の機能性成分の分析
14:53　○関口 愛里彩[1]，上野 義栄[2]，青木 秀之[3]，尾山 廣[1]　([1]摂南大学，[2]京都女子大学･家政学部，[3]池田食研）

2B1p07　乳酸菌と食品酵素に及ぼす高圧処理の影響
15:04　○堀江 暁[1]，堀 沙織里[2]，井口 晃徳[2]，重松 亨[2]，森下 あい子[1]，加藤 優[1]　([1]キリンHD･飲料未来研，[2]新潟薬科大･応生科）

2B1p08　イソアミラーゼを用いた新規プラントベースヨーグルトの開発
15:15　○小笠原 早織，篠田 美咲，守谷 崇　（合同酒精株式会社）

2B1p09　真空焼成がパン品質に与える影響解析
15:26　○古澤 駿[1]，小野 航[2]，岡 大貴[3]，伊賀 大八[4]，井上 好文[4]，野口 智弘[2]　([1]東京農大院･農化，[2]東京農大応生･食加技セ，[3]東京農大応生･農化，[4]日本パン技研）

2B1p10　食感設計に加熱を多目的で取り込んだフード 3D プリント
15:37　○島田 勇輝，武政 誠　（東京電機大院理）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2B1p11　酵母エキス抽出残渣を用いた味噌様調味料の調製
15:56　○吉永 亜美[1]，上野 貴生[2]，清野 俊介[3]，永井 誠也[3]，眞榮田 麻友美[3]，前橋 健二[1,3]，吉川 潤[1,3]　([1]東農大院応生，[2]アサヒグループ食品(株)食品原料，[3]東農大応生）

2B1p12　メイラード反応産物とビールのコクについて
16:07　○望月 マユラ，堀江 暁，太田 麗子，越村 裕子，加藤 優，森下 あい子　（キリンHD飲料未来研）

2B1p13　プロテアーゼを含んだ食品の添加によるタウナギのタンパク質への影響
16:18　○廣瀬 和樹，藤堂 景史，飯村 裕子，齋藤 慎二　（常磐大）

2B1p14　マイタケ粗酵素液による鶏卵含有たんぱく質の分解
16:29　○鮫島 由香[1,4]，沖 留理子[2]，福田 史織[3]，竹本 尚未[2]，松井 徳光[3,4]　([1]羽衣国際大食栄，[2]武庫女大院食栄，[3]武庫女大食栄，[4]武庫女大栄養科学研究所）

B2 会場　午前の部（9:30〜12:20）

食品—食品工学-物性，分析—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2B2a01　ビール泡品質の新規評価方法の開発 1　二次元色彩計を用いたフロスティーミストの定量化
9:30　○飯牟礼 隆[1]，石鍋 菜々子[1]，浅井 梓[2]，潮井 徹[1]　([1]サッポロビール(株)価値創造フロンティア研究所，[2]サッポロビール(株)商品･技術イノベーション部）

2B2a02　ビール泡品質の新規評価方法の開発 2　泡の再生力の評価と再生力に差が生じる原因の追究
9:41　○石鍋 菜々子[1]，飯牟礼 隆[1]，浅井 梓[2]，潮井 徹[1]　([1]サッポロビール(株)価値創造フロンティア研究所，[2]サッポロビール(株)商品･技術イノベーション部）

2B2a03　アミノ酸の疎水性と水和パラメータ h および関連パラメータの関係
9:52　○佐藤 之紀[1,2]，佐藤 礼奈[2]　([1]岩手大院連合農学，[2]弘前大農生科）

2B2a04　食用コオロギのにおいに寄与する成分の特定
10:03　○亀崎 悠，佐々木 直里　（都産技研）

2B2a05　難溶性食品成分の in vitro 試験に適用可能な新規溶媒の開発
10:14　○久保田 祐介[1]，黒田 浩介[2]，平田 英周[3]，田中 康浩[1]　([1]サントリーホールディングス株式会社，[2]金沢大学 理工研究域生命理工学系，[3]金沢大学 がん進展制御研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2B2a06　食品中のプロテオグリカン分離手法の開発と事例紹介
10:33　○川嶋 草平，山口 信哉　（青森県産業技術センター）

2B2a07　LC-MS を用いた飲料中の高感度プリン体分析
10:44　○高橋 洋武[1]，平松 幸之助[1]，橘田 規[1]，照井 善光[1]，望月 直樹[2]　([1]一般財団法人日本食品検査，[2]横浜薬科大学）

2B2a08　食感評価を目的としたエビ圧縮時の圧力分布の調査
10:55　○梅谷 華奈，井上 竜一　((公財)東洋食品研究所）

2B2a09　ゴボウ圧縮時の圧力分布と成分の関係
11:06　○井上 竜一，梅谷 華奈　((公財)東洋食品研究所）

2B2a10　清酒中のバニリンの定量と閾値調査
11:17　○孛儿只斤 蘇日娜，長船 行雄，岸本 徹，久常 有里，磯谷 敦子　（独立行政法人 酒類総合研究所）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2B2a11　UHPLC を用いた酒類中 37 成分の D/L-アミノ酸自動分析法の改良
11:36　○岩田 奈津紀，寺田 英敏，小林 まなみ　（株式会社島津製作所）

2B2a12　HPLC-SERS 法での食品成分分析の試み
11:47　○山口 洋[1]，竹井 弘之[2]　（[1]東洋大院生命，[2]東洋大生命）

2B2a13　イムノスティック法を用いた食物アレルゲンの簡便・高感度検出技術の開発
11:58　○飯嶋 益巳[1,2]，笹村 雄斗[2]，田辺 明子[1]，中高下 莉子[1]，那須 茜[1]，黒田 俊一[3]　（[1]東農大･応生･健康，[2]東農大院･健康，[3]阪大･産研）

2B2a14　穀粒内のタンパク質局在と炊飯米物性との関係
12:09　○木村 映一　（農研機構･食品研）

B2 会場　午後の部（13:50〜16:40）

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2B2p01　フリーポアラテアートの自動作製
13:50　○武政 誠，河北 彩翔　（東京電機大理工）

2B2p02　小角 X 線散乱と赤外分光による米粉の内部構造評価に関する研究
14:01　○石川 大太郎，楊 嘉敏，七島 なつみ，山田 栞菜，藤井 智幸　（東北大院農）

2B2p03　望む食感を与える食品構造設計に向けた 3D プリント食品の自動食感評価法開発
14:12　○金子 瑠晟，武政 誠　（東京電機大理工）

2B2p04　赤外 / 遠赤外分光スペクトルによる糖添加ゼラチンゲルの解析
14:23　○七島 なつみ，楊 嘉敏，石川 大太郎，藤井 智幸　（東北大院農）

2B2p05　腸内細菌脂質代謝物 HYA の生理機能に関する臨床研究結果
14:34　○若山 水歩　（Noster株式会社）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2B2p06　低グリセミックインデックス食品のセカンドミール効果
14:53　○東口 夢[1]，池ノ内 佳苗[2]，小澤 真理子[2]，中村 健一郎[3]，鈴木 靖志[1,4]　（[1]武庫川女子大学食物栄養科学部食創造科学科，[2]株式会社シュガコン，[3]コトノーツ，[4]武庫川女子大学バイオサイエンス研究所）

2B2p07　G タンパク質共役エストロゲン受容体の活性化を介したピセアタンノールの抗肥満効果
15:04　○有澤 琴子[1]，松岡 愛弓[2]，小澤 菜月[2]，市 育代[2]，藤原 葉子[2]　（[1]東北大院薬，[2]お茶大院ライフ）

2B2p08　豆腐の微細構造とゲル強度に及ぼすトリグリセリドの脂肪酸組成の影響
15:15　○油屋 和[1,2]，丸岡 早紀[3]，室井 由起子[1]，杉元 康志[1]，渡邉 啓一[1]　（[1]九州栄養福祉大，[2]鹿大院連農，[3]九大院農）

2B2p09　デキサメタゾン誘導性筋萎縮のコレステロール代謝を介した病態制御
15:26　○市 育代[1]，久保 慧[2]，清水 誠[1]　（[1]お茶大 基幹研究院，[2]お茶大 ライフサイエンス）

2B2p10　干ばつストレス時に発生するバレイショの加工特性変化
15:37　○川本 健太，増冨 裕文，吉岡 睦美，根岸 順子，阿久津 圭子，鶴見 貴志，石原 克之　（カルビー株式会社）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2B2p11　コーヒー食品のレシピ検討と官能試験による風味特徴の評価
15:56　○浅岡 那月，岩井 和也，垣内 美紗子，浦川 夏帆，中川 真緒，福永 泰司　（UCC上島珈琲株式会社　R&D本部）

2B2p12　ピペリン-α- シクロデキストリン包接体の溶解性および吸収性評価
16:07　長谷川 莉沙，近本 啓太，○上梶 友記子，石田 善行，中田 大介，佐藤 有一，寺尾 啓二　（(株)シクロケムバイオ）

2B2p13　微粉砕処理がセルロースをはじめとする食物繊維に与える影響について
16:18　○吉田 暁登[1]，小西 正朗[2]，邱 泰瑛[2]　（[1]北見工大院，[2]北見工大）

2B2p14　亜臨界水を用いた和種薄荷茎に対する抽出効率の検討
16:29　○吉村 祐介[1]，小西 正朗[2]，邱 泰瑛[2]　（[1]北見工大院，[2]北見工大）

B3 会場　午前の部（9:30〜12:20）

動物―細胞機能-シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム/細胞構造-細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，生体膜，メンブレントラフィック，相分離―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2B3a01　mRNA 核外輸送受容体 TAP とタンパク質輸送受容体 CRM1 の二つの輸送受容体による mRNA 核外輸送の生物学的意義
9:30　○鵜飼 生望[1]，竹森 久美子[1]，増田 誠司[1,2]　（[1]近大院農，[2]近大アンチエイジングセンター）

2B3a02　HSP90 阻害剤とアントラサイクリン系薬剤同時添加により mRNA の核内蓄積の解消
9:41　○堀 史人[1]，竹森 久美子[1,2]，増田 誠司[1,2]　（[1]近大院農，[2]近大農食）

2B3a03　高速 cAMP イメージング技術による匂い応答計測
9:52　○佐藤 幸治，東原 和成　（東大院農）

2B3a04　昆虫味覚受容体のリガンド結合様式および活性化機構の立体構造モデル
10:03　○森永 敏史[1]，永田 宏次[1]，伊原 さよ子[1]，新村 芳人[1,2]，佐藤 幸治[1]，東原 和成[1]　（[1]東大院農，[2]宮崎大学獣）

2B3a05　合成脂質を用いたヒト ABCA1 の活性調節機構の解析
10:14　○師岡 はるか[1]，藤原 朋哉[2]，安部 真人[2]，三澤 嘉久[3]，馬場 直道[3]，木岡 紀幸[1]，木村 泰久[1]　（[1]京大農･応用生命科学，[2]愛媛大院農･生命機能学，[3]備前化成株式会社）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2B3a06　低酸素応答機構の制御によるヒト表皮立体培養系での分化促進効果
10:33　遠藤 真悠子[1]，手島 裕文[1]，北谷 宏仁[1]，小林 稔[2]，辻 徳治[1]，原田 浩[2]，○人見 清隆[2]　（[1]名大院創薬科学，[2]京大院生命）

2B3a07　羊水がヒト表皮細胞における表皮形成関連因子の発現制御に与える影響
10:44　○辻 徳治[1]，小野川 諒[1]，村井 篤嗣[2]，辰川 英樹[1]，人見 清隆[1]　（[1]名大院創薬科学，[2]名大院生命農学）

2B3a08　アンドロゲンは褐色脂肪組織においてアドレナリンによる体熱産生を抑制する
10:55　○原田 直樹[1,2]，久保 慶太朗[2]，大西 照晃[1]，北風 智也[1,2]，後藤 剛[3]，乾 博[1,2,4]，山地 亮一[1,2,5]　（[1]阪公大農，[2]阪府大生環，[3]京大院農，[4]大手前健栄，[5]阪公大生資センター）

2B3a09　エストロゲン受容体による protein kinase A シグナル抑制作用とそのメカニズムの解明
11:06　○大西 照晃[1]，久保 慶太朗[2]，原田 直樹[1,2]，北風 智也[1,2]，乾 博[1,2,3]，山地 亮一[1,2,4]　([1]阪公大院・農，[2]阪府大院・生命環境，[3]大手前大・健栄，[4]阪公大・生資センター)

2B3a10　FUS の液-液相分離に核内アクチン繊維が及ぼす影響の解析
11:17　○西間木 胡桃[1]，藤井 健太郎[2]，堀籠 智洋[1]，高山 裕貴[1,3]，原田 昌彦[1,3]　([1]東北大院農，[2]量子科学技術研究開発機構，[3]東北大 国際放射光イノベーション・スマート研究センター)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2B3a11　ヒト培養細胞を用いた疲労評価モデルの確立
11:36　○森 彩香[1]，野口 明日香[2]，堀籠 悟[1]，渡辺 睦行[2]　([1]日本食品分析センター，[2]昭和女子大学)

2B3a12　ヒト毛乳頭細胞を用いた細胞試験による海老名市産イチゴの育毛効果の検証
11:47　○宮内 勇樹[1,2]，謝 凉晶[1]，廣川 隆彦[3]，村上 小枝子[3]，馬 思慧[1]，矢野 敏史[1]，原 太一[1]　([1]早大人科院，[2]近代化学(株)，[3]神奈川県産技総研)

2B3a13　オートファジー活性に及ぼす発酵食品の探索と機能性成分の解析
11:58　○菅谷 侑香，矢野 敏史，原 太一　(早大人科院)

2B3a14　ワサビ 6-MSITC によるオートファジー制御機構の解明
12:09　○久原 麻那，矢野 敏史，原 太一　(早大人科院)

B3 会場　午後の部(13:50〜16:40)

動物―細胞機能-シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2B3p01　Autophagy Induction by D-amino acids: A Dive into mTOR-independent Signaling Pathways
13:50　○Kun XIE[1,2]，Jinyun WANG[1]，Miyu Kamimura[1]，Saki shiota[1]，Taichi Hara[1]　([1]Laboratory of Food and Life Science，Faculty of Human Sciences，Waseda University，[2]College of Animal Science and Technology，Hunan Agricultural University)

2B3p02　4,4'-Dimethoxychalcone (DMC): A Novel GATA2-Dependent Modulator of Autophagy Beyond mTOR Signaling
14:01　○Jinyun WANG，Kun Xie，Taichi Hara　(Laboratory of Food and Life Science，Faculty of Human Sciences，Waseda University)

2B3p03　Enhanced Metabolic Efficiency with Ketone Body Supplementation in Keto-Adaptation: Insights from Animal and Cell Culture Studies
14:12　○SIHUI MA[1]，YISHAN TONG[2]，SATOSHI YANO[1]，KATSUHIKO SUZUKI[3]，TAICHI HARA[1]　([1]Faculty of Human Sciences，Waseda Univ.，[2]Graduate School of Sport Sciences，Waseda Univ.，[3]Faculty of Sport Sciences，Waseda Univ.)

2B3p04　骨細胞，破骨細胞，軟骨細胞分化における骨形成型オリゴ DNA の作用
14:23　○木村 智勇[1]，高谷 智英[1,2,3]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大バイオメディカル研)

2B3p05　筋形成型オリゴ DNA は BMP2 依存的な骨芽細胞の分化を阻害する
14:34　○松島 もも[1]，木村 智勇[1]，高谷 智英[1,2,3]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大バイオメディカル研)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2B3p06　ヨウ化ニンニクによる細胞賦活作用の作用機序の解明
14:53　○岩崎 なつみ[1]，宮内 勇樹[1,2]，廣川 隆彦[3]，謝 凉晶[1]，矢野 敏史[1]，原 太一[1]　([1]早稲田大学，[2]近代化学(株)，[3]神奈川県産技総研)

2B3p07　オートファジーを制御するジケトピペラジンのスクリーニング
15:04　○矢野 敏史[1]，内田 頌太郎[2]，唐鎌 翔大[2]，鈴木 伸[2]，木野 邦器[2]，原 太一[1]　([1]早大人科院，[2]早大理工院)

2B3p08　筋形成型オリゴ DNA は BMP2 による筋分化の阻害を回復する
15:15　○石田 智香[1]，山本 万智[2]，高谷 智英[1,2,3]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大バイオメディカル研)

2B3p09　筋形成型オリゴ DNA の抗子宮平滑筋肉腫作用の検討
15:26　○平林 ゆり[1]，高谷 智英[1,2,3]　([1]信州大院総合理工，[2]信州大農，[3]信州大バイオメディカル研)

2B3p10　インドキシル硫酸は Akt/β-カテニン /c-myc および AhR/c-myc 経路の活性化を介して大腸癌細胞の増殖と EGFR の発現増加を導く
15:37　○一坂 優[1]，矢野 彰三[3]，丹羽 利充[2]，清水 英寿[1]　([1]島大院自然，[2]修文大，[3]島大院医学)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2B3p11　AMPK による SRSF9 のリン酸化が SUMO 化に与える影響の解析
15:56　○中沢 茉紘[1]，松本 英里[1]，小坂 愼太郎[2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]，鈴木 司[2]　([1]東農大院，[2]東農大)

2B3p12　がん抑制タンパク質 TSC 複合体の新規結合因子 PGRMC1 の機能解析
16:07　○石井 真央[1]，逸見 明央[1]，鈴木 康央介[2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]，鈴木 司[2]　([1]東農大院・応生科・農化，[2]東農大・応生科・農化)

2B3p13　AMPK が新規基質 DDB1 を介して Cullin4 ユビキチンリガーゼに及ぼす影響の解析
16:18　○鈴木 司[1]，吉澤 千尋[2]，鈴木 理子[2]，秋山 果穂[2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]　([1]東農大・応生科・農化，[2]東農大院・応生科・農化)

2B3p14　5-アミノレブリン酸代謝産物による動物細胞増殖抑制機構の解析
16:29　○渡邉 晴也[1]，森谷 薫穂[2]，千葉櫻 拓[1,2]　([1]東農大院生命，[2]東農大生命)

B4 会場　午前の部(9:30〜12:20)

微生物―遺伝子-構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2B4a01　プラスミドの接合伝達の可否と，プラスミドと細菌染色体間の塩基組成類似性の関係
9:30　○山﨑 凜[1]，徳田 真穂[2]，敦賀 俊太[3]，前田 壮[1]，金原 和秀[1,2,3]，新谷 政己[1,2,3,4]　([1]静大・工，[2]静大院・創造，[3]静大院・総合科技，[4]静大・グリーン研)

2B4a02　プラスミドが接合伝達する細菌を塩基配列の特徴から予測する
9:41　○徳田 真穂[1]，敦賀 俊太[2]，前田 壮[3]，山﨑 凜[3]，金原 和秀[1,2,3]，新谷 政己[1,2,3,4]　([1]静大院・創造，[2]静大院・総合科技，[3]静大・工，[4]静大・グリーン研)

2B4a03　プラスミド pCAR1 由来の核様体タンパク質 Pnd の DNA 結合様式の解明
9:52　○江本 光毅[1]，水口 千穂[2,3]，森脇 由隆[2,3]，YANG Miaoyan[2]，鈴木 研志[2,3]，岡田 憲典[2]，野尻 秀昭[2,3]　([1]東大・農，[2]東大院・農生科，[3]東大・微生物連携機構)

2B4a04　シアノバクテリアから見出された新規プラスミド複製因子と複製開始メカニズムに関する研究
10:03　○坂田 実乃里[1]，Kaltenbrunner Alena[2]，大舘 和真[1]，前田 海成[3]，青柳 智大[1]，坂巻 裕[1]，荷村（松根）かおり[1]，大林 龍胆[4]，Wolfgang Hess[2]，渡辺 智[1]（[1]東農大院･バイオ，[2]フライブルク大学，[3]東工大研究院化生研，[4]静岡大）

2B4a05　大腸菌－枯草菌間の接合伝達における *oriT* 最小領域の特定
10:14　○神崎 泰輝，猪又 俊輔，深田 悠太，片岡 正和（信州大院理工）

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

2B4a06　Pseudomonas 属細菌由来のプラスミドの複製に必要な DNA 領域の同定
10:33　○磯貝 菜々子[1]，徳田 真穂[2]，水口 千穂[3]，金原 和秀[1,2]，野尻 秀昭[3]，鈴木 仁人[4]，新谷 政己[1,2,5]（[1]静大･工，[2]静大院･創造，[3]東大院･農生科，[4]感染研･薬剤耐性研究センター，[5]静大･グリーン研）

2B4a07　*Pseudomonas* 属細菌由来の環境浄化に寄与する染色体組み込み型接合因子（ICEs）のデータベースからの探索
10:44　○廣瀬 遼，上原 由楓，藤波 寛人（宮崎大工）

2B4a08　IncP/P-1 群プラスミドの異なる亜群に属するプラスミドの性状の違いとその原因の解析
10:55　新谷 政己[1,2,3,4]，○前田 壮[1]，徳田 真穂[2]，敦賀 俊太[3]，上條 遥陽[3]，金原 和秀[1,2,3]（[1]静大･工，[2]静大院･創造，[3]静大院･総合科技，[4]静大･グリーン研）

2B4a09　フィリピンにおける薬剤耐性菌および耐性遺伝子の伝播に寄与するプラスミドの同定
11:06　○増元 めぐみ[1]，徳田 真穂[2]，佐藤 佑香[3]，敦賀 俊太[3]，野上 勇魚[3]，金原 和秀[1,2,3]，鈴木 仁人[4]，新谷 政己[1,2,3,5]（[1]静大･工，[2]静大院･創造，[3]静大院･総合科技，[4]感染研･薬剤耐性研究センター，[5]静大･グリーン研）

2B4a10　接合伝達性プラスミド RP4 を用いた好アルカリ菌への遺伝子導入法の確立
11:17　○山本 純子[1]，片岡 正和[1,2]（[1]信州大院生命医工，[2]応用微生物学ルネサンスセンター）

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

2B4a11　枯草菌の超高効率自然形質転換法の開発と応用
11:36　○赤沼 元気[1]，河村 富士夫[2,3]，相馬 亜希子[2]，鈴木 祥太[3,4]，佐藤 勉[4]（[1]学習院大理，[2]千葉大園芸，[3]立教大理，[4]法政大生命）

2B4a12　好熱性真正細菌 *Geobacillus* sp. Kps3 における 2 つのイントロン含有 Flagellin 遺伝子とホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子の構造と機能
11:47　○石塚 盛雄[1]，中原 悠輔[1]，石田 達矢[1]，馬野 航[1]，石橋 奈々[1]，早川 准平[1]，粟井 貴子[1]，赤沼 元気[2]（[1]中央大理工，[2]学習院大理）

2B4a13　複合培養における色素生産応答に関わる *sco1842* 遺伝子の機能解析
11:58　○久保木 綾梨[1]，LEI YUKUN[2]，浅水 俊平[2,3]，尾仲 宏康[1,2]（[1]学習大理，[2]東大院農，[3]神戸大先端バイオ）

2B4a14　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* において sortase により細胞壁に局在する細胞表層タンパク質 AMIS_68180 は正常な胞子嚢形成に必須である
12:09　○譚 鋳文[1]，手塚 武揚[1,2]，大西 康夫[1,3]（[1]東大院･農生科･応生工，[2]北里大･感染制御，[3]東大･微生物イノベ連携機構）

B4 会場　午後の部（13:50～16:40）

微生物―遺伝子-構造，機能/代謝-代謝経路，メタボローム―

p01～p05 発表者の接続時間 13:42～13:50

2B4p01　*Brevibacillus* 属細菌における「忌避」の微生物間相互作用
13:50　○河野 日向子，村上 周一郎（明治大農）

2B4p02　ニワトリ由来 Lactobacillus crispatus 菌株がもつ高分子 S-layer タンパク質の特性と抗原運搬体への応用
14:01　○三﨑 彩，横田 健治，梶川 揚申（東農大院応生）

2B4p03　分裂酵母の温度感受性変異株を用いた胞子形成に関わる新規遺伝子の探索
14:12　○小林 京五，中村 太郎（大阪公立大院理）

2B4p04　分裂酵母の胞子細胞膜形成に関わる生育に必須な SPB タンパク質の同定
14:23　○久永 里梨，中村 太郎（大阪公立大院理）

2B4p05　Role of Mar1, an HMG-box protein, in the adsorption to *n*-alkane and cell morphology in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*
14:34　○Simiao LIANG[1]，Chiaki Ishimaru[1]，Katsuro Matsuse[1]，Ryo Iwama[1,2]，Kenta Sato[3]，Natsuhito Watanabe[1]，Satoshi Tezaki[1]，Hiroyuki Horiuchi[1,2]，Ryouichi Fukuda[1,2]（[1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Laboratory for Bioinformatics Research, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research）

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:53

2B4p06　オーファン酵素遺伝子特定のための酵素機能予測モデルの開発
14:53　○廣田 佳亮，山田 拓司（東工大）

2B4p07　DNA 修復関連タンパク質 DR0042 の発現・精製
15:04　○井上 光誠[1]，坂井 雅[2]，鳴海 一成[1]（[1]東洋大，[2]農工大院）

2B4p08　*Rubrobacter radiotolerans* の突然変異解析
15:15　○川﨑 一輝，久保 彩，鳴海 一成（東洋大･生命）

2B4p09　*Geobacillus kaustophilus* における染色体挿入型ベクターの異常複製
15:26　○服部 未澄[1]，大城 隆[2,3]，鈴木 宏和[2,3]（[1]鳥取大院･持続性，[2]鳥取大･工，[3]鳥取大･GSC）

2B4p10　IV 型分泌装置の構成因子 TrbB は TraR による ICE_{KKS102}Tn*4677* の切り出し活性化に関与する
15:37　○松本 哲，岸田 康平，永田 裕二，大坪 嘉行（東北大院生命）

p11～p14 発表者の接続時間 15:48～15:56

2B4p11　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の硫黄非含有合成培地における生育条件の探索
15:56　○松村 聡一郎，折田 和泉，福居 俊昭（東工大･生命理工）

2B4p12　超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* 改変株におけるヌクレオシド依存増殖の解析
16:07　○西田 哲，陳 陽子，折田 和泉，福居 俊昭（東工大･生命理工）

2B4p13　ニッケル欠乏環境に適応したメタン生成代謝の変化
16:18　○野村 駿介[1,2]，嶋 盛吾[1]（[1]マックスプランク陸生微生物学研究所，[2]旭化成ファーマ株式会社）

2B4p14　アグマチンおよびオルニチンをプトレッシンに変換する腸内細菌の探索
16:29　○網 優太[1]，瀧原 速仁[2]，奥田 修二郎[2]，栗原 新[1]（[1]近畿大院生物理工，[2]新潟大医学）

B5 会場　午前の部（9:30〜11:28）

有機化学，天然物化学 ―作用機構，構造と活性―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2B5a01　久慈産琥珀から得られる spirolactone norditerpenoid の肝細胞における糖新生抑制作用
9:30　○吉田 潤[1]，工藤 唯[2]，伊藤 芳明[2]，木村 賢一[2]　([1]岩手医大・教養教育，[2]岩手大院・総合科学)

2B5a02　食用ほおずきに含まれる新規 withanolide 硫酸エステルの同定と生物学的役割
9:41　○上杉 祥太[1]，越野 広雪[2]，箱崎 真友佳[1]，菅野 裕子[1]，菅原 英範[1]，鈴木 瑞季[3]，白石 朗子[1]，結城 彩花[1]，木村 賢一[3]，矢野 明[1]　([1]岩手生工研，[2]理研CSRS，[3]岩手大院・総合科学)

2B5a03　がん細胞の中心体クラスタリング阻害活性を有する kolavenic acid analog の構造活性相関
9:52　○古山 達貴[1]，西殿 悠人[2,3]，湯川 格史[4,5]，田中 謙[2]，木村 賢一[1]　([1]岩手大院・総合科学，[2]立命館大・薬学部，[3]立命館大・総合科学技術研究機構，[4]広島大院・統合生命科学，[5]広島大・健康長寿研究拠点（HiHA））

2B5a04　ハマゴウに含まれるジテルペン類の単離，構造決定，ならびに生物活性評価
10:03　○花木 祐輔，安部 凜太郎，岩瀬 二千翔，杉山 康憲，原 康雅，柳田 亮　(香川大農)

2B5a05　フェノキサジン環を持たない新規 Actinomycin 誘導体の合成及び生物活性評価
10:14　○山上 健太，花木 祐輔，原 康雅，柳田 亮　(香川大農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2B5a06　ペルヒドロヒストリオニコトキシン類のニコチン性アセチルコリン受容体に対する阻害活性の構造活性相関
10:33　○森 澄海人[1]，西川 慶祐[2]，小野 陽介[2]，松村 匡浩[2]，高山 浩一[1]，伊原 誠[1]，松田 一彦[1]，森本 善樹[2]　([1]近畿大農，[2]阪公大院理)

2B5a07　ネオニコチノイドとの相互作用におけるショウジョウバエの D α 4 および D β 3 サブユニットの役割
10:44　○高山 浩一[1]，小森 勇磨[1]，伊原 誠[1]，SATTELLE David B.[2]，松田 一彦[1]　([1]近畿大農，[2]UCL)

2B5a08　セイヨウミツバチのニコチン性アセチルコリン受容体の機能的発現と薬理特性に対する補助因子の効果
10:55　○伊原 誠，高山 浩一，伊藤 稜，森 澄海人，武林 真由花，江川 瑠夏，山本 新菜，木村 裕紀，松田 一彦　(近畿大農)

2B5a09　計算化学を用いた昆虫キチン合成阻害剤の結合部位予測
11:06　森 湖太郎[1]，宮下 正弘[1]，池口 満徳[2]，森 聡一朗[3]，柴田 哲男[3]，○中川 好秋[1]　([1]京大院農，[2]横浜市大，[3]名工大工)

2B5a10　分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においてペンタデカン酸が誘導する脂肪毒性
11:17　○星川 陽次郎[1,2]，代田 夏帆[2]，松山 晃久[1,3]，木村 聡[1]，LI Sheena[3,4]，八代田 陽子[3]，BOONE Charles[3,4]，津川 裕司[3,5,6,7]，有田 誠[6,7,8]，吉田 稔[1,3,9]，西村 慎一[1,2,9]　([1]東大院・農，[2]広島大院・統合生命，[3]理研CSRS，[4]トロント大・ドネリーセンター，[5]東農工大院・工，[6]理研IMS，[7]横市大院・生命医，[8]慶大院・薬，[9]東大・微生物連携機構)

B5 会場　午後の部（14:01〜16:40）

有機化学，天然物化学―作用機構，構造と活性―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2B5p02　カプサイシンはアラキドン酸カスケードにより TRPA1 を間接的に活性化しタイトジャンクションを開口する
14:01　○南雲 陽子[1,2]，神田 祐輔[4]，向山 海凪[4]，臼井 健郎[1,3]　([1]筑波大生命環境系，[2]筑波大地中海・北アフリカ研究センター，[3]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大生命農学)

2B5p03　細胞膜透過性改善技術による天然ペプチド化合物の潜在的生理活性の探索
14:12　○兼田 康平，小倉 知也，鈴木 海渡，長谷部 文人，丸山 千登勢，濱野 吉十　(福井県大院生物資源)

2B5p04　PIECE 法による微生物細胞内へのタンパク質 / 酵素の直接導入法の開発
14:23　○大塚 早葉[1]，兼田 康平[1]，長谷部 文人[1]，丸山 千登勢[1]，荒川 賢治[2]，濱野 吉十[1]　([1]福井県大院生物資源，[2]広島大院統合生命)

2B5p05　計算機予測に基づくランカサイジンのエステル化および抗腫瘍活性評価
14:34　○岡野 芽衣[1]，西浦 菜摘[1]，DO Kiep Min[2]，森田 洋行[2]，AYOUB Ahmed Taha[3]，荒川 賢治[1]　([1]広島大院・統合生命，[2]富山大・和漢研，[3]HToO Bioscience)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2B5p06　4-8 結合型プロアントシアニジン立体配座に関する自由エネルギー地形の分子シミュレーション解析
14:53　○上田 稔淳[1]，河原 岳志[1,2]，真壁 秀文[1,2,3]，梅澤 公二[1,2,3]　([1]信大・農，[2]信大院・総合理工，[3]信大・バイオ研)

2B5p07　3 つのラブダン型ジテルペノイドの核内受容体 constitutive androstane receptor に対する活性
15:04　○関口 光広，藤浪 佑衣，高土 恵有，木本 祐，東村 泰希　(石川県立大学)

2B5p08　環状ペプチドマルホルミン類は血管内皮細胞による uPA 活性上昇を誘導する
15:15　○小泉 幸央[1]，長井 賢一郎[2]，蓮見 惠司[3]　([1]秋田大院医，[2]北里大薬，[3]東京農工大院農)

2B5p09　Pseudodeflectusin の構造活性相関と結合タンパク質の探索
15:26　○山本 由珠，鈴木 景，古山 祐貴，倉持 幸司　(東理大)

2B5p10　Accumulation and bioactivities of CAF 603 in filamentous fungus
15:37　○WEN ZHANG，Akinori Soga，Yuta Murai，Makoto Hashimoto　(The University of Hokkaido)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2B5p11　エポキシド不斉開環反応を触媒する植物由来有機分子触媒の発見-1：触媒作用へのラムノガラクツロナン側鎖部分の関与
15:56　○加藤 康夫[1,3]，和田 浩一[2]，日比 慎[1,3]，浅野 泰久[1]，山本 佳樹[3]，浅野 健裕[2]，竹内 祐希[2]　([1]富山県大・生医工研セ，[2]協和ファーマケミカル(株)，[3]富山県大院・工)

2B5p12　エポキシド不斉開環反応を触媒する植物由来有機分子触媒の発見-2：触媒作用へのβ-1,4-D- ガラクタンの関与
16:07　○和田 浩一[1]，日比 慎[2]，加藤 康夫[2]，榎 純一[2]，竹内 祐希[1]，浅野 健裕[1]　([1]協和ファーマケミカル(株)，[2]富山県大・生医工研セ)

2B5p13　エポキシド不斉開環反応を触媒する植物由来有機分子触媒の発見-3：β-1,4-D- ガラクタン重合度と触媒活性の関係
16:18　○日比 慎[1]，和田 浩一[2]，加藤 康夫[1]，榎 純一[1]，大坂 一生[1]，浅野 健裕[2]，竹内 祐希[2]　([1]富山県大・生医工研セ，[2]協和ファーマケミカル(株))

2B5p14　アジサイの青色に関わるアントシアニン錯体の極低温気相分光
16:29　○濵田 昇賢，村松 悟，井口 佳哉　（広島大院先進）

C1 会場　午後の部（14:01〜15:48）

環境科学・バイオマス利用―資源変換，資源再生利用―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2C1p02　生物の石灰化におけるプロトン輸送メカニズムの解明
14:01　○長尾 颯己[1]，竹内 猛[2]，加藤 由悟[3]，鈴木 道生[3]　([1]東大農，[2]沖縄科学技術大学院大学，[3]東大院農)

2C1p03　円石に含まれる Ca 結合能を持つタンパク質の探索
14:12　○木村 龍太郎[1]，浪川 勇人[1]，根岸 瑠美[2]，長坂 征治[3]，胡桃坂 仁志[2]，加藤 由悟[1]，鈴木 道生[1]　([1]東大院農，[2]東大定量研，[3]東洋大生命科学)

2C1p04　CO_2 固定技術の開発に貢献するバイオミネラル粉末の機能解析
14:23　○浪川 勇人，鈴木 道生　（東大院農）

2C1p05　生物活性向上を指向したアルギニンオリゴマー結合型ゼルンボン誘導体の合成
14:34　○石原 怜奈，柏崎 玄伍，井坂 くるみ，北山 隆　（近畿大院農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C1p06　オウレン根圏土壌由来新規ベルベリン資化性菌の単離
14:53　○小池 音寧，武田 尚，若菜 大悟，堀内 正子，細江 智夫　(星薬大)

2C1p07　カンプトテシン資化性菌の単離と特性
15:04　○武田 尚，鈴木 ひとみ，雉子波 樹，若菜 大悟，堀内 正子，須藤 浩，細江 智夫　(星薬大)

2C1p08　ジブロモゼルンボン誘導体の反応性を利用した多環式化合物の構築
15:15　○池上 剣生[1]，柏崎 玄伍[1]，西澤 拓未[1]，吉川 知美[1]，河合 靖[2]，土田 敦子[3]，北山 隆[1]　([1]近畿大院農，[2]長浜バイオ，[3]埼玉医大)

2C1p09　新規機能性物質創製に向けて：光学活性をもつキラルゼルンボン誘導体の創製
15:26　○鈴木 基元[1]，柏崎 玄伍[1]，本村 亘[1]，河合 靖[2]，北山 隆[1]　([1]近畿大院農，[2]長浜バイオ)

2C1p10　植物化学物質であるゼルンボンから誘導体化された高反応性アレン型ゼルンボンの Brønsted 酸誘導による渡環反応
15:37　○中村 蒼[1]，柏崎 玄伍[1,2]，渡辺 凌[2]，北村 優斗[2]，西川 慎太郎[1]，吉村 寛太[2]，河合 靖[3]，土田 敦子[4]，北山 隆[1,2]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農，[3]長浜バイオ，[4]埼玉医大)

C2 会場　午前の部（9:30〜12:20）

有機化学，天然物化学 ―単離構造決定（微生物）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2C2a01　異種発現 *Streptomyces lividans* TK23 を利用した新規アンスラキノン化合物の取得
9:30　○坂井 克行，二村 友史，野川 俊彦，越野 広雪，長田 裕之，高橋 俊二　（理研 CSRS）

2C2a02　Expression of Syo_1.56 SARP Regulator Unveils Potent Elasnin Derivatives with Antibacterial Activity
9:41　○Islam Adel Abdelhakim Amin[1,2]，Yushi Futamura[3]，Yukihiro Asami[4]，Hideaki Hanaki[4]，Naoko Kito[1]，Sachiko Masuda[5]，Arisa Shibata[5]，Ken Shirasu[5]，Hiroyuki Osada[3]，Jun Ishikawa[6]，Shunji Takahashi[1,7]　([1]Natural Product Biosynthesis Research Unit，RIKEN CSRS，[2]Department of Pharmacognosy，Faculty of Pharmacy，Assiut University，[3]Chemical Resource Development Research Unit and Drug Discovery Chemical Bank Unit，RIKEN CSRS，[4]Ōmura Satoshi Memorial Institute，Kitasato University，[5]Plant Immunity Research Group，RIKEN CSRS，[6]National Institute of Infectious Diseases，[7]Graduate School of Science and Engineering，Saitama University)

2C2a03　CTX3C 同族体，51-hydroxyCTX3C のプロダクトイオンの帰属ならびに 51-OH 同族体のシグナル識別
9:52　○鵜飼 亮伍[1]，内田 秀明[2]，菅谷 紘一[3]，小野瀬 淳一[3]，大城 直雅[4]，阿部 直樹[3]，安元 健[5]　([1]東農大院・健康，[2]アジレント・テクノロジー，[3]東農大・健康，[4]国立医薬品食品衛生研究所，[5]食品分析セ)

2C2a04　栗国島産未記載種海洋シアノバクテリア由来 Terukufazoline 類の単離，構造決定，生物活性および全合成
10:03　○田口 黎武[1]，海老原 玲[1]，恒松 雄太[3]，Ghulam Jeelani[4]，野崎 智義[4]，末永 聖武[1]，岩崎 有紘[2]　([1]慶大理工，[2]中央大理工，[3]名大院生命農，[4]東大医)

2C2a05　赤潮由来渦鞭毛藻 *Karenia selliformis* の増殖を亢進するバクテリア成分の同定
10:14　○恒松 雄太[1]，尾崎 俊希[1]，前田 直哉[1]，鈴木 重勝[2]，藤田 雅紀[3]，北 将樹[1]，河地 正伸[2]　([1]名大院生命農，[2]国立環境研究所，[3]北大院水産)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2C2a06　フェアリー化合物のキノコホルモン候補として化学的研究
10:33　○呉 静[1,2]，吉川 蒼人[1]，崔 宰熏[2,3]，平井 浩文[2,3]，河岸 洋和[1,2]　([1]静大農，[2]静大キノコ科学研究所，[3]静大共創)

2C2a07　フェアリーリング形成菌とノシバとの化学的相互作用
10:44　○スヌワル アルビン[1]，崔 宰熏[1,2,3,4,5]，平井 浩文[1,2,3,4,5]，河岸 洋和[3,5]　([1]静大院・創造，[2]静大・共創，[3]静大・農，[4]静大・グリーン研，[5]静大・キノコ科研)

2C2a08　サナギタケ（*Cordyceps militaris*）由来の新規フェアリー化合物誘導体の探索
10:55　○森井 風詩[1]，崔 宰熏[1,2,3,4]，鈴木 智大[3,5]，道羅 英夫[3,4]，平井 浩文[1,2,3,4]，河岸 洋和[1,3]　([1]静大農，[2]静大共創，[3]静大キノコ科研，[4]静大グリーン研，[5]宇大バイオ)

2C2a09　きのこ由来シロキクラゲ菌糸体誘導物質の探索
11:06　○小林 太洋，ナンタワン カオニウォン，會見 忠則，一柳 剛　（鳥取大農）

2C2a10　キクラゲ抗白癬菌物質の探索
11:17　○一柳 剛[1]，宋 晟遥[2]，山本 悠輝[2]，平田 智基[3]，會見 忠則[1]　([1]鳥取大農，[2]鳥取大院持続性社会創成，[3]鳥取大連農)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2C2a11　Isolation，structure elucidation，and biological activities of sesquiterpenes and phthalides from two edible mushrooms Pleurotus species
11:36　○Jewel De Padua[1]，Emi Fukushima Sakuno[2]，Kotomi Ueno[3]，Thomas Edison dela Cruz[4]，Atsushi Ishihara[3]　([1]The United Graduate School of Agricultural Sciences，Tottori University，[2]The Tottori Mycological Institute，The Japan Kinoko Research Center Foundation，[3]Faculty of Agriculture，Tottori University，[4]Department of Biological Sciences，College of Science，University of Santo Tomas)

2C2a12　Identification of two phthalide derivatives and an oxindole compound isolated from the edible mushroom Pleurotus ostreatus and their inhibitory activities against plant pathogenic microorganisms
11:47　○Enrico Cabutaje[1]，Kotomi Ueno[2]，Kumiko Osaki-Oka[2]，Kazutaka Kido[2]，Thomas Edison dela Cruz[3]，Atsushi Ishihara[2]　([1]The United Graduate School of Agricultural Sciences，Tottori University，[2]Faculty of Agriculture，Tottori University，[3]Department of Biological Sciences，College of Science，University of Santo Tomas)

2C2a13　コガネタケ培養物からの揮発性抗菌物質の単離
11:58　○田中 智也[1]，下田 絵美子[2]，宮崎 つぐみ[3]，徳本 健人[3]，田澤 寿明[3]，大崎 久美子[2]，石原 亨[2]　([1]鳥大院持社創生，[2]鳥大農，[3]エステー株式会社)

2C2a14　コウタケ属キノコ ケロウジ由来新規抗炎症活性ジテルペノイド sarcodonin 類の単離・構造決定，構造活性相関研究
12:09　○河村 篤[1]，飯田 優希[2]，北 将樹[3]，真壁 秀文[1,2]　([1]信大バイオメディカル研，[2]信大院総合理工･農，[3]名大院生命農)

C2 会場　午後の部(13:50〜16:40)

有機化学，天然物化学 ―単離構造決定(動物，植物)―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2C2p01　インディカ種イネが生産するストリゴラクトン
13:50　○井上 美智，王 梓鳳，野村 崇人，謝 肖男　(宇大バイオ)

2C2p02　ササゲの生産するストリゴラクトンの単離と構造解析
14:01　○阿部 怜生[1]，本間 大翔[1]，若林 孝俊[1,2]，滝川 浩郷[2]，水谷 正治[1]，杉本 幸裕[1]　([1]神戸大院農，[2]東大院農生科)

2C2p03　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株を用いた久慈産琥珀由来の生物活性物質の探索
14:12　○丹場 晴也[1]，越野 広雪[2]，野川 俊彦[2]，今井 央由[2]，高木 博史[3]，木村 賢一[1]　([1]岩手大院･総合科学，[2]理研CSRS，[3]奈良先端大･バイオ)

2C2p04　スペイン産琥珀と久慈産琥珀の生物活性物質の構造と活性の比較研究
14:23　○笹本 啓将[1]，鈴木 瑞季[1]，越野 広雪[2]，CESER Menor-Salvan[3]，木村 賢一[1]　([1]岩手大院･総合科学，[2]理研 CSRS，[3]Alcala大学)

2C2p05　珪化木の遺伝子破壊酵母に対する生物活性と活性物質の同定
14:34　○田端 菜々海，木村 賢一　(岩手大院･総合科学)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C2p06　動物性餌としてコオロギに認識される化合物の精製
14:53　○清家 瞳，永田 晋治　(東大院新領域)

2C2p07　ハネカクシから初めて同定された(7*R*)-actinidine の生合成経路と生理活性
15:04　○高谷 佑生[1]，大畑 勇統[2]，丸山 宗利[3]，森 直樹[2]　([1]京大農，[2]京大院農，[3]九大博)

2C2p08　オキナワフグ(*Chelonodon patoca*)由来の新規テトロドトキシン類縁体の単離，構造決定(2)
15:15　○青沼 栞里[1]，工藤 雄大[2,1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学際研)

2C2p09　日本産二枚貝のテトロドトキシンの定量と類縁体の同定
15:26　○松井 蘭丸[1]，八巻 慶汰[1]，工藤 雄大[2,1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学際研)

2C2p10　致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の新規類縁体の推定構造
15:37　○青木 玲翔[1]，岩崎 浩太郎[2]，佐々木 理[2]，川島 悠岐[2]，工藤 雄大[3,1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，佐々木 誠[2]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東北大院生命科学，[3]東北大学際研)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2C2p11　ショウガから単離した新規含窒素ラブダン型ジテルペン類の構造解析
15:56　○武永 朋巳[1]，大坪 弘樹[1]，藤本 崇[2]，筒井 歩[3]，藤田 智之[3]　([1]信州大院総合理工，[2]明星大理工，[3]信州大農)

2C2p12　ショウガから単離した新規ラブダン型ジテルペノイドの生成機構の解明
16:07　○村上 智拓[1]，武永 朋巳[2]，大坪 弘樹[2]，筒井 歩[1,2]，藤田 智之[1,2]　([1]信州大農，[2]信州大院総合理工)

2C2p13　マウンテンキャビア由来新規アシル化フラボノイド配糖体の化学構造および DPP-IV 阻害活性
16:18　○竹田 翔伍[1]，下田 博司[1]，萬瀬 貴昭[2]，森川 敏生[2,3]　([1]オリザ油化株式会社，[2]近畿大･薬総研，[3]近畿大･アンチエイジングセ)

2C2p14　米由来新規アシル化グルコシルセラミドの化学構造および表皮保湿作用
16:29　○米田 朱里[1]，竹田 翔伍[1]，萬瀬 貴昭[2]，下田 博司[1]，森川 敏生[2,3]　([1]オリザ油化株式会社，[2]近畿大･薬総研，[3]近畿大･アンチエイジングセ)

C3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2C3a01　*Acinetobacter* 属細菌の 2-フェノキシアセトフェノン変換を担う酵素遺伝子の同定
9:30　○中川 永理[1]，羽部 浩[2]，古屋 俊樹[1]　([1]東京理科大院･創域理工，[2]産総研･環境創生)

2C3a02　糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子発現に関わる転写因子の機能分類
9:41　○藤井 達也，森田 友岳　(産総研･機能化学)

2C3a03　草食性陸ガニの生産するリグニン分解酵素群の解析
9:52　○三宅 克英，北 健，水野 利春，鈴木 壱士　(名城大理工)

2C3a04　褐藻主要多糖アルギン酸からの油脂生産を目指した油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるエキソ型アルギン酸リアーゼの細胞外発現
10:03　北村 友香[1]，橋本 渉[2]，○河井 重幸[1]　([1]石川県立大，[2]京大院農)

2C3a05　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
10:14　○松崎 浩明，上原 直己，江副 佑策，美野 将伴　(福山大生命工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2C3a06　Microaerobic insights into production of polyhydroxyalkanoates containing 3-hydroxyhexanoate via native reverse *β*-oxidation from glucose in *Ralstonia eutropha* H16
10:33　○KAI HEE HUONG，IZUMI ORITA，TOSHIAKI FUKUI　(Tokyo Inst. of Tech.)

2C3a07　水電気分解と気相閉鎖循環型リアクターを用いた *Ralstonia eutropha* 改変株による CO_2 からの共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成
10:44　○福居 俊昭[1]，Di Stadio Gabriele[1]，中村 龍平[2,3]，折田 和泉[1]　([1]東工大生命理工，[2]東工大地球生命研，[3]理研)

2C3a08　食品加工残渣を用いたハロモナス属細菌による PHB 生産
10:55　○中島 亜純[1]，弘埜 陽子[1]，岡﨑 文美[2]，仲山 英樹[3]，原 清敬[1]　([1]静県大食栄，[2]三重大院生資，[3]長崎大)

2C3a09　東南アジア原産リグノセルロース系バイオマスを原料とした PHB 生産
11:06　○荒井 隆益[1]，藍川 晋平[1]，Sudesh Kumar[2]，Fazita MR Nurul[2]，Cheu Peng Leh[2]，Haafiz MK Mohamad[2]，Guan Seng Tay[2]，小杉 昭彦[1]　([1]国際農研，[2]マレーシア理科大)

2C3a10　非プロトン性ポリエーテルによる微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸の分子量低下効果の解析
11:17　○田中 聖也[1]，蜂須賀 真一[2]，菊川 寛史[2]，松本 謙一郎[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2C3a11　水素酸化細菌の独立栄養条件でのジャー培養における発泡要因
11:36　○田中 賢二[1]，鈴木 慎一郎[2]　([1]近大産理工，[2]電源開発)

2C3a12　*Megasphaera elsdenii* を用いた水素生産システムの長期運転過程の発酵性状
11:47　○石川 瑞季，曽 厚嘉，藤本 尚志，大西 章博　(東京農大)

2C3a13　遺伝子組換え *Rhodobacter sphaeroides* によるグルコースからの水素生産検討
11:58　○徳山 秀太[1]，清水 哲[2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大･バイオ，[2]RITE)

2C3a14　高集積化酵素複合体を用いた CO_2 を資源とするエチレン生産
12:09　○神藤 定生[1]，陳 韶華[3]，狩野 隼大[2]，松岡 茜[2]，徳田 千優[2]，竹内 一矢[2]，立松 正眞[2]，田村 廣人[2]　([1]名城大理工，[2]名城大農，[3]エボリューション[2]株式会社)

C3 会場　午後の部(13:50〜16:40)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2C3p01　マイクロバイオーム解析により明らかとなる生分解性と非生分解性有機化合物の差異
13:50　○林 拓矢[1]，鈴木 美和[2]，粕谷 健一[1,2]，高橋 講平[3]，野崎 京子[3]　([1]群大院理工，[2]群大食健セ，[3]東大院工)

2C3p02　天然化合物を含むポリブチレンスクシネートの海洋生分解性
14:01　○太田 美乃里[1]，鈴木 美和[2]，石井 俊一[3]，鹿島 裕之[3]，権田 昂平[1]，石谷 佳之[3]，橘 熊野[1,2]，粕谷 健一[1,2]　([1]群大院理工，[2]群大食健セ，[3]海洋機構)

2C3p03　移動性細菌 *Paenibacillus* sp. NK-L2 株が有機塩素系殺虫剤分解細菌株を運ぶヒッチハイク現象
14:12　○松添 華子，岸田 なつみ，加藤 広海，岸田 康平，大坪 嘉行，永田 裕二　(東北大院･生命科学)

2C3p04　微小結晶蛍光測定法および一細胞技術によって得られた多環芳香族化合物分解菌の解析
14:23　○ベハラノ フェリペ[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，PINYAKONG Onruthai[3]，野尻 秀昭[1,2]　([1]東大院･農生科･AgTECH，[2]東大･微生物連携機構，[3]Chulalongkorn Univ.)

2C3p05　Intermediates accumulation on pyrene degradation within pyrene-degrading bacterial consortia
14:34　○Yuanhao ZHU[1]，Felipe VEJARANO[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Kazunori OKADA[1]，Onruthai PINYAKONG[3]，Hideaki NOJIRI[1,2]　([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chulalongkorn Univ.)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C3p06　高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 によるネオニコチノイド系殺虫剤 imidaclothiz 代謝機構の解析
14:53　○松浦 瑠夏[1]，殷 茹[2]，呉 静[3,4]，長井 薫[5]，森 智夫[3,4]，河岸 洋和[3,4]，平井 浩文[6,7]　([1]静大大学院，[2]静大創造院，[3]静大農，[4]静大キノコ研，[5]京府生命環境，[6]静大グローバル共創，[7]静大グリーン研)

2C3p07　高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による loxoprofen 分解機構の解析
15:04　○殷 茹[1]，呉 静[2,3]，長井 薫[4]，森 智夫[2,3]，河岸 洋和[2,3]，平井 浩文[3,5,6]　([1]静大創造院，[2]静大農，[3]静大キノコ研，[4]京府大生命環境，[5]静大グローバル共創，[6]静大グリーン研)

2C3p08　高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による ibuprofen 分解機構の解明
15:15　○朴 苑喜[1]，呉 静[2,3]，森 智夫[2,3]，河岸 洋和[2,3]，平井 浩文[3,4,5]　([1]静大大学院，[2]静大農，[3]静大キノコ研，[4]静大グローバル共創，[5]静大グリーン研)

2C3p09　細菌由来の有機塩素系殺虫剤γ-HCH 分解酵素を発現する形質転換シロイヌナズナの作製と評価
15:26　○鄧 文昊，高田 美信，岸田 康平，大坪 嘉行，渡辺 正夫，永田 裕二　(東北大院･生命科学)

2C3p10　*Comamonas thiooxydans* R2 株におけるフェノール分解と機能的分化
15:37　○鈴木 研志[1,2]，上原 悠太郎[3]，水口 千穂[1,2]，栗栖 太[4]，二又 裕之[5,6,7]，野尻 秀昭[1,2]　([1]東大院･農生科，[2]東大･微生物連携機構，[3]東大院･工，[4]東大院･工･水環セ，[5]静大院･創造，[6]静大院･総合科技，[7]静大･グリーン研)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2C3p11　フェノールの分解及びフェノール分解産物を基質とする PHA の生産に関する研究
15:56　○大上 嵩洋，張 倏喆　(室蘭工業大学大学院)

2C3p12　Ralstonia sp. C1 株による PHB 分解及び生産に関する研究
16:07　○張 倏喆　(室工大院)

2C3p13　海洋からのプラスチック分解菌の単離
16:18　○沼田 真吾[1]，東端 啓貴[1,2]　([1]東洋大生命，[2]東洋大学バイオレジリエンス研究プロジェクト)

2C3p14　陸域からのプラスチック分解菌の単離
16:29　○中島 華子[1]，東端 啓貴[1,2]　([1]東洋大院生命，[2]東洋大学バイオレジリエンス研究プロジェクト)

C4 会場　午前の部(9:30〜12:20)

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2C4a01　トウモロコシが産生するフィトアレキシン zealexin 類の合成研究
9:30　○栗原 洸，石井 航平，飯嶋 章太，松島 芳隆　(東京農業大学･農芸化学)

2C4a02　HSP70 誘導活性を有する Persenone 類の合成研究
9:41　○小野 桜，伊木 あゆ美，小田 花音，山本 彩羽，藤巻 貴宏，松島 芳隆　(東京農業大学･農芸化学)

2C4a03　Valinophos および DHPPA ジペプチドの合成研究
9:52　○中村 皓毅[1]，松島 芳隆[2]　([1]乙卯研究所，[2]東京農業大学)

2C4a04　アルキリデン保護基を活用する立体選択的な庄野酸化の開発
10:03　○赤羽 晋之介，森住 春香，北野 克和，岡田 洋平　(東農工大)

2C4a05　光ラジカル環化反応を用いたジヒドロベンゾフラン骨格を有する蛍光色素の合成
10:14　○門倉 旦宗[1]，王 子茉[1]，堀口 元規[2]，北野 克和[1]，岡田 洋平[1]　([1]東農工大，[2]産総研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2C4a06　生合成模倣戦略による citrifuran A の合成研究
10:33　○後藤 悠友[1]，町屋 綾佳[1]，奥村 太知[2]，岡 悠介[1]，石橋 理[1]，塩野 義人[3]，目黒 康洋[1]，桑原 重文[1]，榎本 賢[1]　([1]東北大院農，[2]東北大農，[3]山形大農)

2C4a07　Alchivemycin 類のポリオール部位の合成研究
10:44　○石橋 理[1]，權 垠相[2]，目黒 康洋[1]，桑原 重文[1]，榎本 賢[1]　([1]東北大院農，[2]東北大院理)

2C4a08　メロテルペノイド型天然物の網羅的全合成
10:55　○目黒 康洋，小宅 真理，榎本 賢，桑原 重文　(東北大院農)

2C4a09　Birch 還元-アルキル化を用いた *ent* -カウレンの合成研究
11:06　○阪野 奨太[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富山県大生医工研セ)

2C4a10　ホルモサリド A C1-C21 フラグメントの合成研究
11:17　○伊藤 陽奈[1]，茂住 梨沙[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富山県大生医工研セ)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2C4a11　Pseudosporamide 類の合成研究
11:36　○菊田 依乃[1]，桂川 美咲[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富山県大生医工研セ)

2C4a12　Synthesis and structural elucidation of antatollamide A and its derivatives
11:47　○YITONG LI，Keigo Takamatsu，Hiroyuki Konno　(Yamagata University)

2C4a13　可溶性タグを活用したペプチドの分子内環化
11:58　○岡田 洋平，山上 紗弓理，北野 克和，千葉 一裕　(東農工大)

2C4a14　ホスフィンを活用した電解ペプチド合成
12:09　○島村 藍人，永原 紳吾，北野 克和，千葉 一裕，岡田 洋平　(東農工大)

C4 会場　午後の部(13:50〜16:40)

有機化学，天然物化学—ケミカルバイオロジー—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2C4p01　抗マラリア活性を示すβ-カルボリン／クマリンハイブリッド化合物の発見
13:50　○二村 友史[1]，長 展生[1]，喜久里 貢[1]，新倉 保[2]，早瀬 大貴[1]，清水 猛[1]，小林 富美恵[3]，小山 裕雄[1]，渡辺 信元[1]，長田 裕之[1]　([1]理研CSRS，[2]杏林大･医，[3]麻布大･生命･環境)

2C4p02　抗カンジダ物質 TPPB の構造活性相関とタンパク質－化合物間相互作用解析
14:01　○青野 晴美[1]，二村 友史[1,2]，堀 康宏[1]，室井 誠[1]，平野 弘之[1]，本田 香織[1]，西浦 正芳[1]，侯 召民[1]，木野 邦器[2]，長田 裕之[1,2,3]　([1]理研CSRS，[2]早大理工総研，[3]静岡県立大)

2C4p03　筋分化促進ホスホロチオエート修飾オリゴ DNA の鏡像異性体に関する計算構造集団解析
14:12　○榎本 湧也[1]，高谷 智英[1,2,3]，下里 剛士[1,2,3]，梅澤 公二[1,2,3]　([1]信大･農，[2]信大院･総合理工，[3]信大･バイオ研)

2C4p04　α シヌクレインを標的とした中分子核酸の開発と神経治療への応用
14:23　○村上 一馬[1]，泉尾 直孝[2]，長尾 知生子[3]，水口 賢司[3]，Chawla Esha[4]，Bitan Gal[4]　([1]京大院農，[2]富山大薬，[3]大阪大蛋白研，[4]カルフォルニア大ロサンゼルス校)

2C4p05　アルコールによる Meyer-Overton 相関はタンパク質のない人工膜で成立する
14:34　松本 惇志[2]，○上園 幸史[1]　([1]東大･院理･生物科学，[2]九大･院理･生物)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C4p06　Girolline is a sequence context-specific modulator of eIF5A activity
14:53　○Tilman Schneider-Poetsch[1]，Yongjun Dang[2]，Mayumi Arata[3]，Yuichi Shichino[4]，Ali Al Mourabit[5]，Celine Morrow[5]，Daniel Romo[6]，Jun O. Liu[7]，Shintaro Iwasaki[4,8]，Minoru Yoshida[1,9,10]　([1]Chemical Genomics Research Group，RIKEN Center for Sustainable Resource Science，[2]Center for Novel Target and Therapeutic Intervention，Institute of Life Sciences，Chongqing Medical University，[3]Drug Discovery Seed Compounds Exploratory Unit，RIKEN Center for Sustainable Resource Science，[4]RNA Systems Biochemistry Laboratory，RIKEN Cluster for Pioneering Research，[5]Institut de Chimie des Substances Naturelles，CNRS UPR 2301，Univ. Paris-Sud，Université Paris-Saclay，[6]Department of Chemistry and Biochemistry，Baylor University，[7]Department of Pharmacology and Molecular Sciences，The Johns Hopkins University School of Medicine，[8]Department of Computational Biology and Medical Sciences，Graduate School of Frontier Sciences，The University of Tokyo，[9]University Professor Office，The University of Tokyo，[10]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology，The University of Tokyo)

2C4p07　コレラ菌 Na^+ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素の特異的化学修飾と動態観測
15:04　○宮地 咲野[1]，田中 比奈子[1]，石川 萌[1]，Blanca Barquera[2]，桝谷 貴洋[1]，村井 正俊[1]，三芳 秀人[1]　([1]京大院農，[2]レンセラー工科大)

2C4p08　コオロギにおける交尾直後の交尾拒否反応の sNPF による調節機構
15:15　○祝 貞，永田 晋治　(東大新領域)

2C4p09　ジャスモン酸イソロイシンラクトンによる植物アルカロイド生産活性化
15:26　○奥村 太知[1]，齊藤 里菜[2]，加治 拓哉[1]，安部 洋[3]，上田 実[1,2]　([1]東北大院理，[2]東北大院生命，[3]理研BRC)

2C4p10　フェアリー化合物(AOH)によるシワ改善効果
15:37　○青島 央江[1]，伊吹 リン太[1]，河岸 洋和[2]　([1]ビタミンC[60]バイオリサーチ株式会社，[2]静岡大学農学部)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2C4p11　化合物 C の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対する生育阻害作用機構の解析
15:56　○大竹 拓実[1]，松村 結衣[1]，笹本 要[2]，横田 智也[2]，荒井 孝義[2]，知花 博治[2]，笠原 浩司[1]　([1]東農大院生命，[2]千葉大学)

2C4p12　金属依存性プロテイン Ser/Thr ホスファターゼ 1A 新規阻害剤の阻害機構解析
16:07　○鈴木 健友[1]，小島 駿也[2]，饒村 修[2]，大西 素子[1]　([1]中部大院応生，[2]中部大応化)

2C4p13　3,5-ジガロイルフラバン-3- オール誘導体の 3 位の立体が活性やタンパク質との相互作用に与える影響
16:18　○堀口 諒太[1]，青木 環[1]，道下 僚[1]，室井 誠[3]，長田 裕之[3,4]，齊藤 安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院工，[2]大阪電通大工，[3]理研CSRS，[4]静岡県立大薬)

2C4p14　AhR および Nur77 リガンドの探索とその抗ウイルス活性
16:29　○丸山 華凜[1]，中村 洸[1]，安河内 美月[1]，大橋 啓史[2,3,4]，中嶋 章悟[2,3,5]，齋藤 史季[1]，渡部 翔太[1]，村上 裕信[1,6]，岡田 麻衣子[7]，藤野 寛[1,6]，渡士 幸一[2,3,4]，紙透 伸治[1,6]　([1]麻布大獣医，[2]感染研･治療薬･ワクチン開発研究センター，[3]感染研･ウイルス第二部，[4]東理大理工，[5]福祉村病院　長寿医研，[6]麻布大ヒトと動物の共生科学センター，[7]東京工科大応用生物)

C5 会場　午前の部(9:30〜11:28)

微生物―細胞-栄養，生育，増殖，培養/その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2C5a01　乳化した培地中の菌体の発酵生産性の検討
9:30　○馬場 文雄　(ダイナノファー乳化発酵研究所)

2C5a02　酵母エキスの製法と乳酸菌培養への影響
9:41　○深野 和紘，二田 昂志郎，周 哲，多和田 悠貴，齊藤 悠希，冨高 美佐，勝又 忠与次，松島 厳　(三菱商事ライフサイエンス株式会社)

2C5a03　人工代謝経路の増強に向けた適応実験室進化と有用変異の同定
9:52　○井口 元太[1]，山本 啓介[2]，平沢 敬[1]　([1]東工大生命理工，[2]Green Earth Institute株式会社)

2C5a04　通気性培養容器による曝気を行わない好気性微生物の培養法
10:03　○吉田 健一[1]，横山 協佑[1]，石川 周[1]，オクテム アイシュゲル[2]，ヴァンダイル ヤンマルタン[2]，四ツ谷 昌人[3]，佐藤 亮介[3]　([1]神大イノベ，[2]フローニンゲン大，[3]潤工社)

2C5a05　機械学習による微生物の選択的増殖の培地開発
10:14　○張 抒楊，會田 穂乃香，イン ベイウェン　(筑波大. 生命環境)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2C5a06　細菌の多剤耐性に影響を与える化学成分の網羅的探索
10:33　○荒木 駿平，會田 穂乃香，イン ベイウェン　(筑波大･生命環境)

2C5a07　キノン構造を有する有機触媒は酸化ストレスによる細胞毒性を示す
10:44　○西山 辰也[2]，宮本 宜英[1]，永澤 健大[2]，上田 賢志[1,2]　([1]日大院･生物資源科学，[2]日大･生物資源科学)

2C5a08　遺伝子組換え型 DRHS-AFP の抗真菌活性の検討評価
10:55　○中西 梨奈，髙塚 由美子，山田 麗，原 富次郎　(京大エネ研)

2C5a09　子嚢菌門真菌類に対する遺伝子組換え型 DRHS-AFP の抗真菌性スクリーニング
11:06　○岸 一輝，髙塚 由美子，原 富次郎　(京大エネ研)

2C5a10　*Rhizoctonia solani* 菌糸融合群・亜群間における DRHS-AFP 分泌性の違い
11:17　○山田 麗，髙塚 由美子，中西 梨奈，原 富次郎　(京大エネ研)

C5 会場　午後の部(14:01〜16:40)

微生物―細胞-栄養，生育，増殖，培養/その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2C5p02　アンモニアガス絶対要求性放線菌 *Nocardiopsis* sp. の単離とその生育特性
14:01　○吉田 ナオト，清 啓自　(宮崎大農)

2C5p03　ユニークな増殖形態を示す Sporichthya 属放線菌の生理学研究
14:12　○郭 心哲[1]，竹下 典男[2]，手塚 武揚[1,3]，大西 康夫[1,4]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]筑波大･生命環境系･MiCS，[3]北里大･感染制御，[4]東大･微生物イノベ連携機構)

2C5p04　分離共培養容器を用いたサンゴ共在細菌間相互作用と生理活性物質の解析
14:23　○神山 殊果[1]，中島 玲[2]，西川 有美[3]，深谷 昭三[4]，三浦 夏子[1,2,3]，植田 充美[5]，片岡 道彦[1,2,3]　([1]阪府大生命環境，[2]阪公大院農，[3]阪府大院生命環境，[4]株式会社サンキ精機，[5]京大院農)

2C5p05　*Clostridium perfringens* の 2′-フコシルラクトース資化に伴う病原性関連因子の誘導は *Bifidobacterium* 属細菌との共培養によって抑制される
14:34　○中島 有登[1]，ARZAMASOV A. Aleksandr[2]，阪中 幹祥[1]，村上 隆太[3]，小酒井 智也[1]，吉田 圭佑[3]，加藤 紀彦[1]，廣瀬 潤子[4]，長尾 早枝子[5]，清水 金忠[1,3]，小田巻 俊孝[1,3]，RODIONOV A. Dmitry[2]，OSTERMAN L. Andrei[2]，片山 高嶺[1]　([1]京大院生命，[2]Sanford Burnham Prebys，[3]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所，[4]京女大家政，[5]長尾助産院)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C5p06　黄色ブドウ球菌が分泌する凝乳因子の解析
14:53　○間嶋 朱里，下田 蒼，戸部 隆太，米山 裕　(東北大農)

2C5p07　細菌の増殖を特徴づける化学成分の機械学習支援型探索
15:04　○會田 穂乃香，イン ベイウェン　(筑波大･生命農学)

2C5p08　駿河湾表層水・深層水からのポリヒドロキシアルカン酸分解細菌の単離および特性解析
15:15　○蜂須賀 真一[1]，櫻井 徹生[1]，水野 匠詞[1]，百武(石井) 真奈美[1]，宮原 佑宜[1]，山﨑 資之[2]，柘植 丈治[1]　([1]東工大 物質理工，[2]静岡県水産･海洋技術研究所)

2C5p09　*Aspergillus* 属真菌に対する光触媒反応で生成する活性酸素種の解析
15:26　○小倉 盛史，上田 美祐，鈴木 智順　(東理大院生物)

2C5p10　分岐鎖脂肪酸が微生物生体膜流動性へ及ぼす影響
15:37　○上畑 季穂，三浦 健太郎，森田 誠一，西本 真琴　(和高専)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2C5p11　微生物に対する空気ファインバブルの効果に関する調査
15:56　○岩崎 なつね[1]，豊田 健太[1]，堂本 実咲希[1]，多田 佳織[2]，西内 悠祐[2]，則村 史歩[1]，秦 隆志[2]，西本 真琴[1]　([1]和高専，[2]高知高専)

2C5p12　枯草菌に対する空気ファインバブルの効果
16:07　○豊田 健太[1]，岩崎 なつね[1]，堂本 実咲希[1]，多田 佳織[2]，西内 悠祐[2]，則村 史歩[1]，秦 隆志[2]，西本 真琴[1]　([1]和高専，[2]高知高専)

2C5p13　茶えのき清酒製造における沸騰水の検討
16:18　○西島 七海[1]，竹本 尚未[1]，佐々木 裕子[2]，山口 真弥[3]，福田 史織[4]，松井 徳光[1,4,5]　([1]武庫女大院食栄，[2]甲子園大栄養，[3]中野市農業協同組合，[4]武庫女大食栄，[5]武庫女大栄養科学研究所)

2C5p14　*Lepista nuda* に存在する ADH の特性およびワイン製造に及ぼす影響
16:29　○竹本 尚未[1]，鮫島 由香[2,4]，福田 史織[3]，松井 徳光[1,3,4]　([1]武庫女大院食栄，[2]羽衣国際大食栄，[3]武庫女大食栄，[4]武庫女大栄養科学研究所)

C6 会場　午前の部（9:30〜12:20）

食品—食品機能・栄養-免疫，炎症/食品機能・栄養-アレルギー・アレルゲン—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2C6a01　もち麦の経口投与が免疫機能に及ぼす影響ついて
9:30　○若木 学，田村 基，庄司 俊彦，小堀 俊郎，高山 喜晴，後藤 真生　（農研機構食品研究部門）

2C6a02　新規分光学的網羅解析技術を活用した食品素材の健康機能性の評価
9:41　○後藤 真生[1]，若木 学[1]，小堀 俊郎[1]，石川 千秋[1]，塚原 正俊[2]，石川（高野）祐子[1]　（[1]農研機構食品研，[2](株)バイオジェット）

2C6a03　ウシラクトフェリンがヒト末梢血単核球中の免疫細胞に及ぼす影響の検討
9:52　○矢後 拓己[1]，久保 周太郎[1]，多田 明日翔[1]，織田 浩嗣[1]，岩淵 禎弘[2]，田中 美順[1]，橋本 真一[2]　（[1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所，[2]和歌山県立医科大学 医学部 先端医学研究所 分子病態解析研究部）

2C6a04　健常成人の呼吸器と全身の健康維持に対するウシラクトフェリンの効果
10:03　○久保 周太郎[1]，織田 浩嗣[1]，多田 明日翔[2]，矢後 拓己[1]，杉田 千泰[3]，吉田 裕樹[3]，戸井田 達典[3]，田中 美順[1]，黒川 昌彦[3]（[1]森永乳業株式会社　研究本部　基礎研究所，[2]森永乳業株式会社　海外事業本部，[3]九州保福大薬）

2C6a05　パラミロン高含有 *Euglena gracilis* EOD-1 株の摂取が唾液中免疫グロブンリン A の親和性に与える影響
10:14　○河野 高徳[1]，内藤 淳子[1]，西田 典永[1]，新藏 礼子[2]　（[1]神鋼環境ソリューション，[2]東大　定量研）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2C6a06　漬物由来乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* TK61406 株の免疫賦活作用の検討
10:33　○中村 優一[1]，杉浦 俊作[1]，大野 友也[1]，田中 沙智[2]，森下 美香[1]　（[1]東海漬物(株)，[2]信州大院農）

2C6a07　皮膚感作が食品アレルギーに与える影響の解析
10:44　○篠原 真梨，服部 誠，好田 正　（東農工大院･応生化）

2C6a08　Procyanidin B2 3,3″-di-O-gallate によるグルタミン取り込みの阻害を介した T 細胞機能制御
10:55　○遠藤 勝紀，阿蘇 晴香，新妻 史絵，柾 明弘，真壁 秀文，田中 沙智　（信州大院農）

2C6a09　食物繊維サイリウムは，タフト細胞の苦味受容体と 2 型免疫応答を介して，小腸 GasderminC 発現を増大する
11:06　○松永 太陽，石井 南葵，山本 祥也，鈴木 卓弥　（広大院統合生命）

2C6a10　健常者での *Lacticaseibacillus paracasei* MCC1849 殺菌体の免疫指標への影響検討ー無作為化，二重盲検，プラセボ対照，並行群間比較試験ー
11:17　○加藤 久美子[1]，新井 聡[1]，佐藤 壮一郎[1]，岩淵 紀介[1]，高良 毅[2]，田中 美順[1]　（[1]森永乳業株式会社研究本部基礎研究所，[2]医療法人社団盛心会タカラクリニック）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2C6a11　アルツハイマー病患者対象ロスマリン酸介入試験における発現変動 microRNA の機能解析
11:36　○松井 美涼[1]，山本 萌乃[1]，篠原 もえ子[2]，小野 賢二郎[2]，三坂 巧[1]，阿部 啓子[1]，小林 彰子[1]　（[1]東大院農，[2]金沢大医）

2C6a12　3 種類の水溶性食物繊維がヌードマウスにおいて腸管 IgA 産生に与える影響
11:47　○松本 健司，大坪 茉里奈　（石川県大生資環）

2C6a13　ヨーグルトの摂取が小学校児童の感冒症状および体調に与える影響
11:58　○山田 成臣[1]，勝倉（江橋）由夏[1]，唐 舒宜[1]，高木 理沙[1]，指原 紀宏[1]，鴨狩 淳一[2]，松土 和広[2]，東郷 信一[2]，安斎 祥江[2]，田中 譲[3]，北條 研一[1]　（[1]株式会社 明治，[2]八王子市教育委員会，[3]医療法人社団永生会みなみ野病院）

2C6a14　薬用植物由来乳酸菌の単離・同定および菌株の特性解析
12:09　○新妻 史絵[1]，阿蘇 晴香[1]，柾 明弘[1]，遠藤 勝紀[1]，塚元 美奈子[2]，高橋 知也[2]，田中 沙智[1]　（[1]信大院農，[2]株式会社アルソア慧央グループ）

C6 会場　午後の部（13:50〜16:40）

食品—食品機能・栄養-免疫，炎症/食品機能・栄養-癌，抗癌—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2C6p01　酵母死菌粉末 PA 酵母 SC-1 はマクロファージのサイトカイン産生を調節する
13:50　○高橋 絵里歌[1]，野出 純一[1]，安井 謙介[2]，菊池 洋介[1]（[1](株)日清製粉グループ本社，[2]日清ファルマ(株)）

2C6p02　自己免疫疾患における交差性 IgE 抗体の解析
14:01　○藤田 夏歩子，中村 亘希，阿南 優佑，板倉 正典，内田 浩二　（東大院農）

2C6p03　BLaER1 を用いたヒトマクロファージモデルの構築
14:12　○児玉 梨佳[1]，Van Zandbergen Ger[2]，戸田 雅子[1]　（[1]東北大院農，[2]Paul-Ehrlich-Institut）

2C6p04　リポ多糖との相互作用に着目した乳酸菌表層タンパク質の生理学的役割の解明
14:23　○山本 祥也，安井 健太，鈴木 卓弥　（広大院統合）

2C6p05　*Lentilactobacillus hilgardii* strain H-50 は TLR2 を介して IL-6 を誘導し，免疫グロブリン A の分泌を向上する。
14:34　○金沢 里奈[1]，三浦 大典[1]，鈴木 卓弥[2]，三本木 至宏[2]，山本 祥也[2]　（[1]広大生生，[2]広大院統合）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C6p06　Tempe starter-fermented wheat bran attenuated DSS-induced colitis by increasing fecal SCFA
14:53　○Afifah Zahra Agista[1]，Yushan Chien[1]，Yusuke Ohsaki[1]，Takuya Koseki[2]，Michio Komai[1]，Hitoshi Shirakawa[1]　([1]Grad. Sch. Agri. Sci.，Tohoku Univ.，[2]Fac. Agri.，Yamagata Univ.)

2C6p07　イミダゾールジペプチドの経口投与がマウス腸内細菌叢及び腸管免疫応答に与える影響
15:04　○村山 瑠[1]，志波 優[1]，佐藤 謙一郎[3]，八村 敏志[2]，戸塚 護[1]　（[1]東農大院生命，[2]東大院農，[3]東海物産(株)）

2C6p08　酵母由来α-マンナンの樹状細胞における IL-10 産生に関与する代謝経路の解析
15:15　○鄭 廷宇[1]，武藤 優奈[1]，宮澤 大樹[2]，安部 知純[2]，大森 慶河[3]，高橋 恭子[3]，戸田 雅子[1]　（[1]東北大院･農，[2]東北大･未来研，[3]日大生資科）

2C6p09　*Weizmannia coagulans* SANK70258 の樹状細胞を介した免疫調節作用機構と経口摂取による腸管免疫への効果
15:26　○山下 二矢[1]，伊藤 直人[1]，池田 裕樹[1]，南川 夏己[1]，八代 拓也[1]，八須 匡和[1]，長田 和樹[1]，相田 正典[2]，山田 良一[2]，西山 千春[1]　（[1]東理大院先進工生命システム，[2]三菱ケミカル(株)）

2C6p10　ポリフェノールおよび酸化酵素含有製剤 DEOATAK P1 のヒト単球細胞に及ぼす効果
15:37　○後藤 有貴[1]，長田 和樹[1]，片桐 万由佳[1]，神田 寛登[1]，時田 隆世[1]，大田黒 晴樹[2]，武田 寿弘[2]，平本 忠浩[3]，西山 千春[1]（[1]東理大院先進工生命システム，[2]高砂香料工業　研究開発本部，[3]高砂フードプロダクツ）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2C6p11　高脂肪食摂取モデルの病態発症における STAT1 を介した宿主免疫応答の関与
15:56　○中庭 和奏[1]，中里 海翔[1]，小栗 勇魚[1]，志智 俊介[2]，木村 沙織[2]，中本 裕紀[2]，白川 智沙斗[2]，武冨 紹信[2]，北村 秀光[1,3]（[1]東洋大理工，[2]北大院医，[3]北大遺制研）

2C6p12　ブタプラセンタ抽出成分によるヒト免疫担当細胞の免疫賦活効果
16:07　○根上 愛梨[1]，江嶌 伸[1]，村山 拓海[1]，加藤 和則[2]，北村 秀光[1,3]（[1]東洋大理工，[2]東洋大院健康スポーツ科学，[3]北大遺制研）

2C6p13　微細藻類ユーグレナおよびその成分である パラミロンの免疫調節機能の検討
16:18　○中島 綾香[1]，鈴木 健吾[1]，安達 貴弘[2]（[1]株式会社ユーグレナ，[2]東京医科歯科大学）

2C6p14　がん免疫逃避に関与する制御性 T 細胞の機能に及ぼす乳脂肪球皮膜の影響
16:29　○森澤 美希，橋本 啓，山田 潔（宇都宮大農）

C7 会場　午前の部（9:30〜12:20）

微生物―細胞-分離，分類，生態/細胞-構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2C7a01　細菌叢サンプルに含まれる黄色ブドウ球菌の multi-locus sequence typing を単離せずに実施にするための multiplex-nested PCR 法
9:30　○小倉 康平[1,2]，古屋 紘花[3]，竹本 訓彦[4]（[1]京大院農，[2]金沢大新学術，[3]金沢大院医薬保，[4]医療研究センター研）

2C7a02　難培養微生物の可培養化と有用機能の同時探索を可能にする革新的スクリーニング手法の開発
9:41　○新山 海[1]，下村 有美[1]，加藤 節[1]，中島田 豊[1,2]，青井 議輝[1,2]（[1]広島大院統合生命，[2]広島大瀬戸内CN研究センター）

2C7a03　1 細胞ラマン・蛍光顕微分光分析により明らかにする葉圏微生物の色素多様性
9:52　○菅野 菜々子，重藤 真介（関西学院大理）

2C7a04　酸性ゲルマイクロドロップレットを活用した環境中からのハイスループットな油脂酵母スクリーニング法の開発
10:03　○橘 駿介[1]，若月 良子[1]，鈴木 義之[2]，志田 洋介[3]，小笠原 渉[2]，赤澤 真一[1]（[1]長岡高専・物質工，[2]長岡技大・技学イノベ，[3]長岡技大・物生）

2C7a05　人工知能画像処理技術に基づく放線菌の探索方法
10:14　○鬼頭 紬[1]，一 真帆[1]，宮野 嶺[2]（[1]三田国際学園高等学校，[2]北里大学 大村智記念研究所 微生物機能研究室）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2C7a06　*in silico* 解析に基づく *Apilactobacillus kunkeei* の分類方法の評価
10:33　○前野 慎太朗[1]，遠藤 明仁[2]（[1]山口大農，[2]東農大応用生物科学）

2C7a07　ゲノム情報から予測した大規模タンパク質量情報と質量分析による広範囲な原核微生物の迅速同定
10:44　○関口 勇地[1]，寺本 華奈江[2]，Tourlousse Dieter[1]，大橋 明子[1]，濱嶋 麻裕[1]，三浦 大典[1]，山田 賢志[2]，岩本 慎一[2]，田中 耕一[2]（[1]産業技術総合研究所，[2]島津製作所）

2C7a08　ゲノムベースの次世代微生物分析システムによる 乳酸菌の MALDI-MS プロテオタイピング
10:55　○寺本 華奈江[1]，相原 茉耶[1]，岩本 慎一[1]，田中 耕一[1]，関口 勇地[2]（[1]島津製作所，[2]産業技術総合研究所）

2C7a09　フーリエ変換赤外分光光度計による乳酸菌の菌株識別
11:06　○荒木 貴久[1]，寺本 華奈江[1]，藤 里砂[1]，岩崎 祥子[1]，岩本 慎一[1]，田中 耕一[1]，関口 勇地[2]（[1]株式会社　島津製作所，[2]産業技術総合研究所）

2C7a10　乳酸菌 *Companilactobacillus alimentarius* KH4 のキシラン特異的な凝集に関わる細胞表層タンパク質の特性解析
11:17　○矢野 嵩典，山本 万結，三井 亮司（岡山理大生命）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2C7a11　ナノ内視鏡 AFM によるバクテリア細胞内部の可視化
11:36　○牛嶋 勇貴[1]，後藤 拓海[2]，江本 光毅[3]，宮澤 佳甫[2,4]，水口 千穂[1,5]，岡田 憲典[1]，福間 剛士[2,4]，野尻 秀昭[1,5]（[1]東大院・農生科・AgTECH，[2]金沢大院・自然科学，[3]東大・農，[4]金沢大・WPI-NanoLSI，[5]東大・微生物連携機構）

2C7a12　BepA と BamB を欠損する大腸菌変異株における SDS 感受性の解析
11:47　○成田 新一郎[1]，渡邉 きくの[1]，秋山 芳展[2]（[1]山形県立米沢栄養大，[2]京大医生研）

2C7a13　リボソーム安定性によるセシウム耐性：大腸菌 ZX-1 株のケーススタディ
11:58　○小嶋 大喜[1]，黒崎 綾音[2]，伊藤 政博[1,2,3]（[1]東洋大院生命科学，[2]東洋大生命科学，[3]東洋大バイオレジリエンス研究プロジェクト）

2C7a14　接合伝達における細胞膜リン脂質の役割
12:09　○熊谷 連，大坪 嘉行，永田 裕二，岸田 康平（東北大院・生命科学）

C7 会場　午後の部（13:50〜16:40）

微生物―細胞-分離，分類，生態/物質生産-微生物変換，酵素反応，機能性高分子―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2C7p01　循環型汚水浄化槽に由来する複合微生物系内での有機物分解促進細菌株の探索
13:50　○奥山 勇太，鈴木 智順（東理大院生物）

2C7p02　循環型汚水浄化槽から分離した代謝産物要求細菌株が汚水浄化に与える影響の解析
14:01　○小野里 昂大，鈴木 智順（東理大院生物）

2C7p03　循環型汚水浄化槽内の代謝産物要求細菌がヘルパー細菌の生育に及ぼす影響
14:12　○田邉 詩織，鈴木 智順（東理大院生物）

2C7p04　高濃度 CO_2 に適応した海洋性好アルカリ藻類の探索
14:23　○金井 大智，藤井 克彦（工学院大院化学応用学）

2C7p05　油脂を蓄積する気生微細藻類の探索
14:34　○飯塚 理子，油井 信弘，藤井 克彦（工学院大院化学応用学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2C7p06　海洋からの粘性マトリクス産生微生物の探索
14:53　○渡辺 丈，藤井 克彦（工学院大院化学応用学）

2C7p07　活性汚泥構成細菌 Shinella zoogloeoides に感染するバクテリオファージの探索
15:04　○丁 ジャウェ，久保田 貴，藤井 克彦（工学院大院化学応用学）

2C7p08　レッサーパンダ粘膜便症の原因解明にむけた腸内細菌叢解析
15:15　○上江洲 海，鈴木 智順（東理大院生物）

2C7p09　陸域地下深部透水性砂岩層における微生物群集の解明
15:26　○吉田 晶，幸塚 麻里子，鈴木 庸平（東大院理）

2C7p10　リクガメ異種間での腸内細菌叢の比較とヘルマンリクガメ腸内細菌の分離
15:37　○髙橋 侑女[1]，山本 裕司[2]，落合 優[2]，稲橋 佑起[1,3]，向井 孝夫[2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大獣医，[3]北里大大村研）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2C7p11　天然酵母の取得及びその利用
15:56　○中島 美咲，大土 光経，竹内 海光，有谷 博文，秦田 勇二　（埼玉工大工）

2C7p12　国内における自然環境からの *Saccharomyces cerevisiae* の分離と性質
16:07　○森谷 千星，柴山 洋翔，島村 具仁子，田渕 由希子，宮崎 由美子，山口 薫　（独立行政法人製品評価技術基盤機構）

2C7p13　日光東照宮文化財とその周辺環境に生育する真菌叢の網羅的解析
16:18　○苅山 駿太，大島 祥，須崎 裕人，小笠原 麻衣，鈴木 智順　（東理大院）

2C7p14　ドロップレットスクリーニングにおける蛍光物質拡散の抑制
16:29　○村山 祐樹[1]，中村 彰宏[2]，鈴木 義之[2]，志田 洋介[1]，小笠原 渉[2]　（[1]長岡技大院工，[2]長岡技大院イノベ）

D1 会場　午前の部（9:30〜11:28）

食品―食品機能・栄養-その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D1a01　ヒト大腸細菌叢 *in vitro* モデルにおいてグルコサミン添加は酪酸菌を選択的に増加させて酪酸産生を誘導する
9:30　○新谷 知也[1]，佐々木 大介[1]，吉田 崇伸[1]，猪熊 健太郎[1]，松木 泰[1]，蓮沼 誠久[1,2]，近藤 昭彦[1]　（[1]神戸大院・科技イノベ，[2]神戸大・先端バイオ）

2D1a02　ヒト腸内細菌叢培養の高精度化およびハイスループットモデルの開発
9:41　○佐々木 大介，新谷 知也，松木 泰，近藤 昭彦　（神戸大院・科技イノベ）

2D1a03　マイクロカプセル化シーベリー果実油経口摂取による肌環境改善効果
9:52　○森 大輔[1]，岡本 拓也[1]，鈴木 直子[2]，和泉 達也[3]　（[1]岐阜セラツク製造所，[2]オルトメディコ，[3]広尾皮フ科クリニック）

2D1a04　ヒト皮膚線維芽細胞の光老化に対するシーベリー果実油の機能解析
10:03　○岡本 拓也[1]，中島 史恵[2]，柴田 貴広[2]，森 大輔[1]　（[1](株)岐阜セラツク製造所，[2]名大院農）

2D1a05　栄養調整による身体データ改善のための個別栄養最適食
10:14　○中村 浩蔵[1]，後藤 和馬[1]，宮川 竜征[1]，鈴木 ゆみ子[1]，山口 翔平[1,2]，小山 正浩[2]　（[1]信大農，[2](株)ウェルナス）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D1a06　体重改善を目的とした個別栄養最適食の効果検証（シングルアーム試験）
10:33　○後藤 和馬[1]，山口 翔平[1,2]，宮川 竜征[1]，鈴木 ゆみ子[1]，小山 正浩[2]，中村 浩蔵[1]　（[1]信大農，[2](株)ウェルナス）

2D1a07　血圧改善を目的とした個別栄養最適食の効果検証（シングルアーム試験）
10:44　○小山 正浩[1]，山口 翔平[1,2]，後藤 和馬[2]，宮川 竜征[2]，鈴木 ゆみ子[2]，小泉 創[3]，中村 浩蔵[2]　（[1](株)ウェルナス，[2]信大農，[3]日本たばこ産業(株)）

2D1a08　酒造好適米を用いた米飯の摂取が Balb/c マウスの成長と脂質代謝に及ぼす影響
10:55　○大石 怜実[1]，牧田 友香[2]，松岡 信[3]，松田 幹[3]，平野 可奈[2]　（[1]金城学院大院・人間生活・消費者科学，[2]金城学院大・生活環境・食環境栄養，[3]福島大・食農学類・附属発酵醸造研究所）

2D1a09　酒造好適米を用いた米飯の摂取が Balb/c マウスの腸内細菌叢に及ぼす影響
11:06　○牧田 友香[1]，明治 真結[2]，大石 怜実[3]，日野 真吾[4]，西尾 俊亮[5]，松岡 信[5]，松田 幹[2,5]，平野 可奈[1]　（[1]金城学院大・生活環境・食環境栄養，[2]福島大・食農学類，[3]金城学院大院・人間生活・消費者科学，[4]静岡大・農学部・応用生命，[5]福島大・食農学類・附属発酵醸造研究所）

2D1a10　血圧関与栄養成分の調整による高血圧自然発症ラットの血圧改善
11:17　○山口 翔平[1,2]，鈴木 美穂[1]，後藤 和馬[1]，小山 正浩[2]，中村 浩蔵[1]　（[1]信大農，[2](株)ウェルナス）

D1 会場　午後の部（14:01〜16:40）

食品―食品機能・栄養-酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化/食品機能・栄養-その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2D1p02　梅干し果肉に含まれるヒト皮膚線維芽細胞における老化予防物質の探索
14:01　○夏見 宙茉[1]，奥野 祥治[1]，河野 良平[2]，宇都宮 洋才[2]　（[1]和歌山高専，[2]大阪河崎リハ大）

2D1p03　大豆フェリチンによるオートファジーの促進と細胞老化抑制作用の検討
14:12　○上野 有紀[1]，川本 善之[2]，増田 太郎[3]　（[1]愛知学院大健康科学，[2]中部大生命健康科学，[3]摂南大農）

2D1p04　ユズ果皮抽出物のヒト皮膚角化細胞におけるエストロゲンに類似した作用を介した機能性解析
14:23　○田村 紀人[1]，河本 美幸[2]，木曽 昭典[2]，川嶋 善仁[2]，河原 岳志[1,3]　（[1]信大院　総合理工，[2]丸善製薬株式会社　総合研究所，[3]信大　学術研究院農）

2D1p05　パッションフルーツ種子由来ピセアタンノールによる骨格筋細胞 C2C12 における SIRT1 とその関連遺伝子の活性化
14:34　○田中 健太，山口 拓見，川上 晋平　（森永製菓）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D1p06　近縁なコイとゼブラフィッシュの苦味受容体機能の比較解析
14:53　○神戸 優香里，浅岡 亮太，清水 駿希，糸井川 壮大，中北 智哉，戸田 安香，石丸 喜朗　（明大農）

2D1p07　豆苗の再栽培環境における抗酸化作用
15:04　○鶴岡 由紀，細谷 孝博　（東洋大院食環境）

2D1p08　サフラン花弁抽出物の抗糖化作用および MMP 阻害作用の評価
15:15　○中垣内 美里[1]，走 優名[1]，角谷 晃司[1,2]　（[1]近畿大・薬学総合研，[2]近畿大・アンチエイジングセ）

2D1p09　ボイセンベリー葉抽出物が結腸がん細胞へ及ぼす細胞毒性の解析
15:26　○中村 聡太[1]，水木 徹[4]，三浦 健[1,2,3]　（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大学・生命科学，[3]東洋大・ライフイノベーション研究所，[4]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

2D1p10　ボイセンベリー葉抽出液の抗菌作用について
15:37　○山口 ゆい[1]，三浦 健[1,2]　（[1]東洋大生命科学，[2]東洋大ライフイノベーション研究所）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D1p11　パン酵母によるエクオール代謝に関する化学的研究
15:56　○丹羽 利夫[1]，加藤 陽二[2]，横山 慎一郎[3]，大澤 俊彦[4]　（[1]修文大健康栄養，[2]兵庫県大環境人間，[3]岐阜県食品科学研究所，[4]愛知学院大学健康科学）

2D1p12　茶由来サポゲニン R_1-barrigenol は PC12 細胞において酸化ストレスに対する神経保護作用を示す
16:07　○林 遼太郎，福光 聡，間 和彦　（(株)ニップン　中研イノベーションセンター）

2D1p13　甘茶イソクマリン類のウイルス感染阻害活性
16:18　○矢野 明[1]，大石 智一[2]，結城 彩花[1]　([1]岩手生工研，[2]微化研)

2D1p14　ケルセチン添加によりヒト骨格筋細胞は遅筋様の表現型を示す
16:29　○永井 研迅[1,2]，金田 喜久[1]，出雲 貴幸[1]，中井 正晃[1]，本多 裕之[2]，清水 一憲[2]　([1]サントリーウエルネス株式会社 生命科学研究所，[2]名古屋大学大学院 工学研究科)

D2 会場　午前の部(9:30〜12:20)

食品—食品機能・栄養-メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝/食品機能・栄養-ビタミン・ミネラル—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D2a01　食品加工条件および胃腸消化における食用藻類由来のDPP-4 阻害ペプチドの安定性
9:30　○繪鳩 康太，佐藤 菜央，飯島 陽子，杉山 健二郎　(工学院大)

2D2a02　フルクトース飲水摂取による膵β細胞量減少を伴った耐糖能異常の誘発
9:41　○新森 耀[1]，原田 直樹[1]，杉本 圭一郎[2,4]，北風 智也[1]，乾 博[1,3]，山地 亮一[1,4]　([1]阪公大院農，[2]長岡香料，[3]大手前大健栄，[4]阪公大生資センター)

2D2a03　*Apilactobacillus kosoi* 死菌体の経口摂取による肥満抑制メカニズムについて
9:52　○邱 泰瑛[1]，森山 五月[2]，松山 静香[2]，高橋 知也[2]　([1]北見工大，[2]アルソア R&D)

2D2a04　バレレン酸とその類縁体が脂肪細胞と 2 型糖尿病モデルマウスに与える影響
10:03　○信平 真奈，只石 幹，小西 良子，服部 一夫　(東農大応生)

2D2a05　3T3-L1 細胞におけるポリメトキシフラボノイドによる脂質生成および脂質生成遺伝子発現の制御
10:14　○木本 幸伸[1]，杉山 実希[1]，河野 良平[2]，宇都宮 洋才[2]，奥野 祥治[1]　([1]和歌山高専，[2]大阪川崎リハ大)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D2a06　スルフォラファンの新規結合分子の探索とその機能解析
10:33　小高 愛未[1]，○川平 浩太朗[2]，菊地 瑛登[2]，正路 健太[2]，石神 健[3]，鈴木 司[1,2]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大·応生科·農化，[2]東農大院·応生科·農化，[3]東農大·生命)

2D2a07　スルフォラファンによる脂肪滴局在タンパク質 PLIN2 への作用の解析
10:44　○藤枝 駿介[1]，小高 愛未[2]，正路 健太[1]，石神 健[3]，鈴木 司[2]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大院·応生科·農化，[2]東農大·応生科·農化，[3]東農大·生命)

2D2a08　スルフォラファンによる腸内細菌叢の変化と抗肥満作用への影響
10:55　○和田 美沙希[1]，多田 しおり[2]，小高 愛未[1]，藤巻 貴宏[1]，鈴木 司[1]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大·応生科·農化，[2]東農大院·応生科·農化)

2D2a09　小麦タンパク質による腸内細菌叢と代謝恒常性への影響に関する研究
11:06　○渡邉 沙耶，羽石 悠里，宮本 潤基　(東農工大院農)

2D2a10　加齢に伴う栄養感受性変化と生体エネルギー代謝調節に関する研究
11:17　○長谷川 真由[1]，五十嵐 美樹[2]，宮本 潤基[1]，木村 郁夫[3]　([1]東京農工大学農学府大学院，[2]脳神経疾患研究所，[3]京都大学生命科学研究科大学院)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2D2a11　中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルによる代謝恒常性維持機構の解明
11:36　○大植 隆司[1,2]，木村 郁夫[1,2,3]　([1]京大院生命，[2]京大院薬，[3]東農工大院農)

2D2a12　遺伝的メタボリック症候群モデル動物におけるビタミンE代謝変動
11:47　○池田 彩子[1]，田路 莉子[2]，三澤 莉帆[2]，小林 美里[1]，阪野 朋子[3]，金 東浩[2]，佐伯 茂[2]　([1]名古屋学芸大，[2]大阪公大，[3]名古屋女短大)

2D2a14　β-アドレナリン刺激に対する応答性を指標とするUCP1 発現調節遺伝子の探索および評価
12:09　○川原崎 聡子[1]，瀬尾 茂人[2]，岡松 優子[3]，高橋 春弥[1]，野村 亘[1,4]，神戸 大朋[5]，木村 和弘[3]，斉藤 昌之[3]，松田 秀雄[2]，井上 和生[1,4]，後藤 剛[1,4]　([1]京大院農·食品生物，[2]阪大院情報·バイオ情報工学，[3]北大院·獣医，[4]京大·C-PIER·生理化学U，[5]京大院生命·統合生命)

D2 会場　午後の部(13:50〜16:40)

食品—食品機能・栄養-メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝/食品機能・栄養-消化・吸収，循環・血管—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2D2p01　褐色脂肪細胞の生理活性物質産生に対する食品成分の作用評価
13:50　○佐々木 玲，増田 祥子，黒崎 文華，畠 恵司　(秋田県総食研)

2D2p02　ベージュ脂肪細胞におけるアドレナリン感受性を増強する食品成分の機能解析
14:01　○高橋 尚子[1]，沼崎 南[2]，井上 博文[1]，森本 洋武[1]，後藤 剛[3]，河田 照雄[3]，江口 文陽[2]，上原 万里子[1]，高橋 信之[1]　([1]東京農大·応生科·食品安全健康，[2]東京農大·地域環境·森林，[3]京大·農·食品生科)

2D2p03　Induction of brown-like adipocyte formation by the food-derived factor is associated with an increase in sympathetic nerve density in the inguinal white adipose tissue of mice
14:12　○Sho NISHIKAWA[1]，Takuya Shoda[1]，Kyosuke Ashikawa[1]，Daiki Onodera[1]，Daiki Kato[1]，Aru Konno[2]，Takuya Kojima[3]，Takuma Hyodo[3]，Shiro Takei[3]，Shigetoshi Okazaki[4]，Takanori Tsuda[3]　([1]Teikyo Univ. of Sci，[2]Hamamatsu Univ. of Med，[3]Chubu Univ.，[4]iPERC of Hamamatsu Univ. of Med.)

2D2p04　15N トレーサー分析による 1-Deoxynojirimycin の臓器蓄積評価
14:23　○高須 蒼生[1]，パリダ イザベラ スパルディ[2]，伊藤 隼哉[2]，山岸 賢治[3]，中島 泰弘[4]，木村 俊之[4]，仲川 清隆[2]　([1]岐阜薬科大，[2]東北大院農·食品機能分析学，[3]農研機構·食品研究部門，[4]農研機構·高度分析研究センター)

2D2p05　ゲニポシド酸経口投与による食事性負荷ラットの病態改善効果
14:34　○鈴木 ゆみ子[1]，後藤 和馬[1]，宮川 竜征[1]，小林 正和[2]，大河内 公一[2]，山口 翔平[1]，中村 浩蔵[1]　([1]信州大院農，[2]小林製薬株式会社)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D2p06　ヒトと齧歯類における腸管胆汁酸トランスポーターの比較
14:53　○齋藤 佑太，黒部(髙島) 優季，小林 彰子　(東大院農)

2D2p07　消化管における胆汁酸輸送機作の解析
15:04　○黒部(高島) 優季[1]，齋藤 佑太[1]，宮脇 里奈[1]，三坂 巧[1]，柳澤 宏太[2]，宮内 栄治[2]，佐々木 伸雄[2]，荻原 琢男[3]，小林 彰子[1]
([1]東大院農，[2]群大生調研，[3]高崎健康福祉大薬)

2D2p08　腸管オルガノイドの単層培養法の確立とその利用法の検討
15:15　○神戸 理恵[1]，清水 誠[2]，岩槻 健[1]，小西 良子[1]，只石 幹[1]，服部 一夫[1]　([1]東農大応生，[2]東農大)

2D2p09　霊長類消化管オルガノイドを用いた消化管上皮センサー細胞研究
15:26　○松井 伸祐[1]，有永 理峰[1]，星 凛佳[1]，米谷 達哉[1]，篠原 満利恵[2]，稲葉 明彦[3]，今井 啓雄[3]，岩槻 健[1]　([1]東農大応生，[2]東大工，[3]京大ゲノム進化)

2D2p10　寒天由来オリゴ糖が線虫の腸管透過性に及ぼす影響の検証
15:37　○出坂 夏美[1]，東村 泰希[2]　([1]石川県大院，[2]石川県大)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D2p11　ヒシエキスをラットに経口投与後の加水分解性タンニンの血中動態および尿中排泄
15:56　○池田 千秋[1]，森 彩夏[1]，細川 夏菜乃[1]，岩岡 裕二[1]，上村 知広[2]，伊東 秀之[1]　([1]岡山県大院，[2]林兼産業株式会社)

2D2p12　吸収経路の異なるケルセチン関連化合物の摂取が腸間膜リンパ節の免疫応答に及ぼす影響
16:07　○室田 佳恵子[1,2]，四之宮 紗菜[2]，柳 利咲[3]，早坂 晴子[3,4,5]　([1]島根大生物資源，[2]島根大院自然科学，[3]近大院総合理工，[4]近大理工，[5]近大理工総研)

2D2p13　マルトビオン酸はコラーゲンの吸収を促進する
16:18　○池田 奈未[1]，末廣 大樹[2]，深見 健[2]，大西 素子[1,3]　([1]中部大院応生，[2]サンエイ糖化(株)，[3]中部大応生)

2D2p14　黒糖・芋焼酎由来成分のグレリン様摂食促進作用の生体での検証
16:29　○千葉 殖幹[1]，緒方 美咲[1]，吉崎 由美子[2]，乾 明夫[2]，高峰 和則[3]，上園 保仁[4]，横川 由起子[5]，高橋 隆二[1]　([1]クラシエ(株)漢方研，[2]鹿大農 附焼酎・発酵学セ，[3]鹿大医 漢方薬理学，[4]慈恵医科大　疼痛制御，[5]鹿大理 有機化学)

D3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

植物——一次代謝，二次代謝，メタボローム—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D3a01　植物有用成分の高生産を目指した共培養系の応用
9:30　○士反 伸和[1]，潤井 みや[1]，山田 泰之[1]，中川 明[2]，佐藤 文彦[3,4]，南 博道[2]　([1]神戸薬大，[2]石川県大，[3]京大院生命，[4]サントリー生命科学財団・生有研)

2D3a02　三環性クマリン生合成における環化制御機構の解析
9:41　○新屋 和花[1]，韓 俊文[1]，三浦 謙治[2]，棟方 涼介[1,3]，矢﨑 一史[1]　([1]京大生存研，[2]筑波大生命環境，[3]JSTさきがけ)

2D3a03　植物培養細胞におけるエピゲノム改変を介した新たな休眠二次代謝覚醒法と新規クロロゲン酸類生合成酵素の発見
9:52　○野村 泰治[1,2]，加藤 康夫[1,2]　([1]富山県大・工，[2]富山県大・生医工研セ)

2D3a04　オオムギにおけるホルダチン合成酵素の同定
10:03　○宇部 尚樹[1,2]，石原 亨[3]，藪田 行哲[3]，武田 真[4]，加藤 康夫[1,2]，野村 泰治[1,2]　([1]富山県大・工，[2]富山県大・生医工研セ，[3]鳥取大・農，[4]岡山大・植物研)

2D3a05　青パパイヤ果実の形状における機能性の検討
10:14　○解良 康太，浅田 遥香，菊地 駿介，齊藤 翔真，飯嶋 益巳，中山 勉　(東農大応生)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D3a06　植物病原細菌誘引活性物質 Ethyl-β-D-glucopyranoside は，根圏のエタノールに対するストレス応答産物である
10:33　○白戸 梓美[1]，前木場 直輝[2]，夏目 雅裕[2]，野口 恵一[3]，宮崎 翔[4]，川出 洋[1,2]　([1]東農工大農，[2]東農工大院農，[3]東農工大院工，[4]東農工大GIR)

2D3a07　生きた化石植物におけるジテルペンの分析と生合成に関する研究
10:44　○藤澤 里奈[1]，湊 康将[1]，新井 さくら[3]，宮崎 翔[2]，川出 洋[1,3]　([1]東農工大院農，[2]東農工大GIR，[3]東農工大農)

2D3a08　生きた化石植物における単機能型ジテルペン環化酵素の機能
10:55　○新井 さくら[1]，藤澤 里奈[2]，湊 康将[2]，宮崎 翔[3]，川出 洋[1,2]　([1]東農工大農，[2]東農工大院農，[3]東農工大GIR)

2D3a09　ヒガンバナ科アルカロイド生合成に関わるメチル基転移酵素の解析
11:06　○水野 紗英，海老澤 さくら，藤巻 貴宏，松島 芳隆，須恵 雅之　(東農大・農化)

2D3a10　オオムギ病害抵抗性に関わる *N*-アシルトランスフェラーゼの解析
11:17　○勝田 瑞皐[1]，竹野谷 美穂子[2]，矢嶋 俊介[2]，須恵 雅之[1]　([1]東農大・農化，[2]東農大・バイオ)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2D3a11　ダイズ根におけるフラボンおよびフラボノールの蓄積と根細菌叢への影響
11:36　○松村 広志郎[1]，松田 陽菜子[1]，高松 恭子[1]，山﨑 真一[2,3]，高瀬 尚文[4]，藤井 義晴[5]，青木 裕一[2]，櫻井 望[6,7]，矢﨑 一史[1]，杉山 暁史[1]　([1]京大生存研，[2]東北大ToMMo，[3]理研BRC，[4]京都先端科学大バイオ環境，[5]東京農工大農，[6]遺伝研，[7]かずさDNA研)

2D3a12　柑橘クマリン生産機構の解明に向けたトランスクリプトーム解析
11:47　○市川 公康[1]，松下 修平[1]，新屋 和花[1]，松川 哲也[3,4]，棟方 涼介[1,2]，矢﨑 一史[1]　([1]京都大・生存研，[2]JST さきがけ，[3]近大・附属農場，[4]近大・生物理工)

2D3a13　マヌカハニーに特徴的に含まれるレプトスペリン生合成経路の化学的解明
11:58　○加藤 陽二[1,2]，古谷 優夏[1]，中井 逸斗[1]，高岡 瑛未[1]，村田 芳行[3]，丹羽 利夫[4]　([1]兵庫県大環境人間，[2]兵庫県大先端食セ，[3]岡山大院環境生命，[4]修文大学)

2D3a14　GC/MS メタボローム解析を用いたショウガの品種差比較
12:09　○石井 寿成[1]，西殿 悠人[2,3]，田中 謙[1]，坂本 雄紀[2]　([1]島津製作所，[2]立命館大薬，[3]立命館大総研)

D3 会場　午後の部(13:50〜16:40)

植物——一次代謝，二次代謝，メタボローム/環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2D3p01　マメ科植物におけるストリゴラクトンの構造多様化に関わる酵素の同定
13:50　○本間 大翔[1]，内田 聖乃[2]，若林 孝俊[1,2]，滝川 浩郷[2]，水谷 正治[1]，杉本 幸裕[1]　([1]神戸大院農，[2]東大院農)

2D3p02　バラ科イチゴのテルペン系香気成分の放出を担う候補遺伝子の解析
14:01　○後藤 桃佳[1]，段 奈々子[1]，上岡 颯人[1]，李 豪[1]，橘 頼之[1]，市野 琢爾[1,2]，杉山 暁史[1]，棟方 涼介[1]，矢﨑 一史[1]　([1]京都大・生存研，[2]神戸薬科大)

2D3p03　トマト由来 UDP-xylose 4-epimerase の酵素学的解析
14:12　○服部 悠太[1]，稲葉 環[1]，太田 信吾[1]，大西 利幸[2]　([1]静大院・総科技・農，[2]静大・グリーン研)

2D3p04　微細藻ユーグレナのゲノム編集によるカロテノイド生合成経路の解明
14:23　○玉木 峻[1]，腰塚 悠貴[2]，野村 俊尚[1,3]，石川 まるみ[4,5]，山田 康嗣[4,5]，鈴木 健吾[4,5]，篠村 知子[2]，持田 恵一[1,5,6,7]　([1]理研・CSRS，[2]帝京大・理工・バイオ，[3]山形大・農，[4](株)ユーグレナ，[5]理研・BZP，[6]横浜市大，[7]長崎大)

2D3p05　コーヒー由来テルペン類配糖化酵素遺伝子の単離同定および基質選択性に係る領域の探索
14:34　○井田 美帆，佐々木 香織，川上 寛子，水野 幸一　(秋田県大生物資源)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D3p06　食品の超硫黄オミクス解析
14:53　○笠松 真吾[1]，金野 文香[1]，三浦 千春[1]，大脇 拓真[1]，久龍 茉尋[1]，菱山 純一[2]，福井 健介[3]，久礼 昭二[3]，津村 和伸[3]，井田 智章[4]，居原 秀[1]　([1]大公大院理，[2]大府大院理，[3]不二製油株式会社，[4]大公大研究推進機構)

2D3p07　ゼニゴケにおけるビスビベンジル化合物であるマルカンチン類の生合成の解析
15:04　○井上 珠緒[1]，水田 珠希[1]，石崎 公庸[2]，高梨 功次郎[3]，水谷 正治[1]　([1]神戸大院農，[2]神戸大院理，[3]信州大院総合理工)

2D3p08　シロイヌナズナにおける ビスマスによる酸化ストレスの誘発と DNA 損傷
15:15　○長田 武，西村 信人，浦 直哉，小林 良　(摂南大理工)

2D3p09　イネの低温順化処理により誘導される高度な低温耐性の分子機構
15:26　○提箸 祥幸[1]，岡崎 圭毅[2]，北條 優子[3]，松浦 恭和[3]，森 泉[3]　([1]農研機構・生物研，[2]農研機構・農環研，[3]岡山大・資源植物)

2D3p10　シロイヌナズナ FYVE1/FREE1 はグルタミンに応答した TORC1 の活性化に関与する
15:37　○谷川 美頼[1,2]，磯野 江利香[2]，前田 達哉[1]　([1]浜松医大，[2]コンスタンツ大学)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D3p11　苔類ゼニゴケにおけるアスコルビン酸生合成経路の同定と機能解析
15:56　石田 哲也[1]，田中 泰裕[2]，小川 貴央[1,2]，丸田 隆典[1,2]，重岡 成[3]，○石川 孝博[1,2]　([1]島根大院・自然科学，[2]鳥取連大・生命資源，[3]近畿大・付属農場)

2D3p12　転写因子ファミリー内での比較解析から根粒共生獲得の軌跡を探る
16:07　○野崎 翔平[1]，野田 桃菜[1]，小野田 浩宜[2]，三浦 謙治[1]，壽崎 拓哉[1]　([1]筑波大生命環境/T-PIRC，[2]名古屋大NUSR)

2D3p13　地上部の光環境は根端の細胞分裂制御を介して主根の伸長を調節する
16:18　○市川 晴雪，陽川 憲　(北見工大院)

2D3p14　植物の根部への脂肪酸処理による地上部の二次代謝物の増加
16:29　○小野 萌花，陽川 憲　(北見工大院)

D4 会場　午前の部(9:30〜12:09)

植物—植物ホルモン，成長調節物質—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D4a01　HGPRT によるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
9:30　○安井 熙[1]，崔 宰熏[1,2,3,4,5]，近藤 満[4]，呉 静[3,5]，平井 浩文[1,2,3,4,5]，河岸 洋和[3,5]　([1]静大総科技，[2]静大共創，[3]静大農，[4]静大グリーン研，[5]静大キノコ科研)

2D4a02　植物におけるフェアリー化合物の生合成に関する研究
9:41　○鳥越 満梨香[1]，崔 宰熏[1,2,3,4,5,6]，道羅 英夫[4,5,6]，呉 静[1,6]，平井 浩文[1,2,3,4,5,6]，河岸 洋和[1,6]　([1]静大・農，[2]静大・共創，[3]静大院・総合農，[4]静大院・総科技，[5]静大・グリーン研，[6]静大・キノコ科研)

2D4a03　フェアリー化合物由来 SAM と SAH アナログとメチル化機構の関係
9:52　○久米 こころ[1]，崔 宰熏[1,2,3,4]，道羅 英夫[1,3,4]，謝 肖男[4,5]，大内 仁志[6]，稲井 誠[6]，滝田 良[6]，平井 浩文[1,2,3,4]，河岸 洋和[1,4]　([1]静大院・総科技，[2]静大院・共創，[3]静大・グリーン研，[4]静大・キノコ科研，[5]宇都宮大・バイオ，[6]静県大・薬)

2D4a04　エンドウヒゲナガアブラムシを用いた昆虫におけるサイトカイニン水酸化酵素の探索
10:03　○佐藤 渓，鈴木 義人　(茨大・食生科)

2D4a05　昆虫におけるインドール-3- 酢酸生合成酵素に関する研究
10:14　市川 輝[1]，國岡 祐里[1]，宮田 海[1]，日裏 雄史[6]，浅見 忠男[2]，土田 努[3]，中村 周吾[4]，藤本 瑞[5]，○鈴木 義人[1,6]　([1]茨大農，[2]東大院農，[3]富山大理，[4]東洋大情報連携，[5]農研機構本部，[6]農工大院連合農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D4a06　コムラサキシメジ(*Lepista sordida*)における 2-azahypoxanthine の生合成研究
10:33　○杉山 弥優[1]，崔 宰熏[1,2,3,4]，鈴木 智大[5]，道羅 英夫[3,4]，呉 静[1,4]，平井 浩文[1,3,4]，河岸 洋和[1,4]　([1]静大・農，[2]静大・共創，[3]静大・グリーン研，[4]静大・キノコ科研，[5]宇都宮大・バイオ)

2D4a07　AOH の高生産微生物の探索とその機能に関する化学的研究
10:44　○児玉 彩乃[1]，崔 宰熏[1,2,3,4]，マングリリ ラチミタ[1]，森 智夫[1,4]，平井 浩文[1,2,3,4]，河岸 洋和[1,4]　([1]静大・農，[2]静大・共創，[3]静大・グリーン研，[4]静大・キノコ科研)

2D4a08　フェアリー化合物の生合成・代謝に関する研究
10:55　○徳岡 佑[1]，崔 宰熏[1,2,3,4,5]，中原 諒太[1]，ペレリ ピエール[1]，道羅 英夫[1,2,4]，山下 起三子[2]，呉 静[2,5]，平井 浩文[1,2,3,4,5]，河岸 洋和[2,5]　([1]静大院総科技，[2]静大農，[3]静大院創造，[4]静大グリーン研，[5]静大キノコ科研)

2D4a09　ベントグラスにおける AOH 代謝産物及び担子菌成長調節物質の探索
11:06　○猪野 蒼太[1]，崔 宰熏[1,2,3,4,5]，平井 浩文[1,2,3,4,5]，河岸 洋和[3,5]　([1]静大院・総科技，[2]静大・グリーン研，[3]静大・農，[4]静大・共創，[5]静大・キノコ科研)

2D4a10　チャノキにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
11:17　○阿部 孝宏[1]，猪野 蒼太[2]，崔 宰熏[1,2,3,4,5]，呉 静[1,5]，天池 一真[6]，伊丹 健一郎[6,7]，平井 浩文[1,2,3,4,5]，河岸 洋和[1,5]　([1]静大・農，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研，[4]静大・共創，[5]静大・キノコ科研，[6]名大院理，[7]名大ITbM)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2D4a11　飢餓を無くし，地球温暖化を止め，緑の地球を回復する解決法の提案
11:36　○染井 正徳[1]，染井 秀[2]，染井 和子[2]　([1]金沢大名誉教授，[2]ソメイヤッコ研究所)

2D4a12　ジベレリン不活性化とは異なるジベレリン起源物質の不活性化機構の解明
11:47　○宮崎 翔[1]，川出 洋[2]，中嶋 正敏[3]　([1]農工大院GIR，[2]農工大院農，[3]東大院農)

2D4a13　Involvement of gibberellin in the rapid germination of Chloris virgata
11:58　○Tingyi YAO[1]，Ikuo TAKAHASHI[1]，Takeshi NAKANO[2]，Masatoshi NAKAJIMA[1]，Tadao ASAMI[1]　([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci.，Univ. Tokyo，[2]Grad. Sch. Biostudies，Kyoto. Univ)

D4 会場　午後の部（13:50〜16:29）

植物―植物ホルモン，成長調節物質/植物工学-育種，物質生産，形質転換―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2D4p01　フェアリー化合物非感受性変異株の作出と解析
13:50　○三ッ國 佳祐[1]，田中 裕基[1]，鈴木 智大[1,4]，崔 宰熏[2,3,4]，謝 肖男[1,4]，野村 崇人[1]，岡本 昌憲[1,5]，道羅 英夫[2,4]，河岸 洋和[3,4]（[1]宇都宮大･バイオ，[2]静大･グリーン研，[3]静大･農，[4]静大･キノコ科研，[5]理研）

2D4p02　ミヤコグサ内生 KAI2 リガンドの検出と部分精製
14:01　○秋山 康紀[1,2]，鍋嶋 武郁[2]（[1]阪公大院農，[2]阪府大院生命環境）

2D4p03　Leafy gall 形成を引き起こす植物病原菌における FAS1 の役割
14:12　○宮田 和輝[1]，Alicia Surjana[1]，小嶋 美紀子[2]，幸木 謙典[1]，西川 俊夫[1]，榊原 均[1,2]（[1]名大院生命農，[2]理研 CSRS）

2D4p04　棒状樹形を呈するリンゴ突然変異体原因酵素の選択的阻害剤創製研究
14:23　○井上 太喜[1]，北島 裕大[1]，岡本 啓佑[1]，長野 玄知[1]，高橋 郁夫[1]，川田 紘次郎[1]，宮崎 翔[2]，岡田 憲典[1]，浅見 忠男[1]，岡田 和馬[3]，中嶋 正敏[1]（[1]東大院農，[2]東京農工大･GIR，[3]農研機構）

2D4p05　ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索および受容体選択性の評価
14:34　○川田 紘次郎[1]，高橋 郁夫[1]，呉 雅珊[1]，伊藤 晋作[2]，姜 凱[1]，中村 英光[1]，浅見 忠男[1]（[1]東大院農，[2]東農大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D4p06　エチレンによるイネ種子の発芽促進機構の解析
14:53　○森田 重人[1,2]，髙畠 彩夏[1]，増村 威宏[1,2]（[1]京府大院生命環境，[2]京都府農技セ生資セ）

2D4p07　構造解析から明らかとなった植物成長調整剤によるイネジベレリン生合成・代謝酵素の選択的阻害機構
15:04　○竹原 清日[1]，尾原 寛之[1]，三上 文三[2]，芦苅 基行[1]，上口(田中) 美弥子[1]（[1]名大･生物機能センター，[2]京大･生存圏）

2D4p08　褐藻類サガラメにおける仮根伸長促進因子の探索
15:15　○齋藤 禎一[1]，島貫 郁[1]，後藤 康丞[1]，岡本 一利[1]，吉川 康夫[2]，清水 一輝[2]，今井 基文[2]，鈴木 進二[2]，萩原 快次[2]，峯田 克彦[1,3]，五條堀 孝[1,4]（[1]一般財団法人マリンオープンイノベーション機構，[2]静岡県水産･海洋技術研究所，[3]早稲田大学ナノ･ライフ創新研究機構，[4]アブドラ国王科学技術大学）

2D4p09　ジベレリン様活性を有する化合物 DIPA の合成類縁体活性
15:26　○佐藤 謙太，前田 紗希，王 建文，高橋 郁夫，中嶋 正敏，浅見 忠男（東大院農）

2D4p10　天然変性領域のケミカルリデザインによるジャスモン酸関連転写因子 MYC ファミリー選択的阻害剤の開発
15:37　○高岡 洋輔[1]，劉 瑞琦[1]，李 奇[1]，上田 実[1,2]（[1]東北大院理，[2]東北大院生命科学）

p11〜p13 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D4p11　DELLA 分解誘導剤 A1 とその生理活性
15:56　○澁谷 純太郎，高橋 郁夫，太田 鋼，中嶋 正敏，浅見 忠男（東大院農）

2D4p12　ホルモン制御剤 NJ15 の植物表層に与える影響の解析
16:07　○坂上 奈々帆，中嶋 正敏，浅見 忠男（東大院･農生科）

2D4p13　トマト毛状根による活性型ビタミン D3 生合成
16:18　○水田 珠希[1]，山岸 萌子[1]，中川 真太郎[1]，秋山 遼太[1]，村中 俊哉[2]，杉本 幸裕[1]，水谷 正治[1]（[1]神大院農，[2]阪大院工）

D5 会場　午前の部（9:30〜11:28）

酵素―アミノ酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素/酸化還元酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D5a01　A mitochondrial membrane bound *O*-acyltransferase is involved in the biosynthesis of Nitrogen Signaling Factors (NSFs) in *Schizosaccharomyces pombe*
9:30　○KANRIN RI[1,2]，Yoko Yashiroda[2]，Go Hirai[3]，Masaya Usui[4]，Minoru Yoshida[1,2,5]（[1]Dept. Biotechnol.，Univ. Tokyo，[2]Chem. Genomics Res. Gr.，RIKEN CSRS，[3]Fac. Pharm. Sci.，Kyushu Univ，[4]BMA，RIKEN CBS，[5]CRIIM，Univ. Tokyo）

2D5a02　Phosphorylation-mediated cofactor specificity switch in glutamate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*
9:41　○YIFAN WANG[1]，Takeo TOMITA[1,2]，Ayako YOSHIDA[1,2]，Saori KOSONO[1,2]，Makoto NISHIYAMA[1,2]（[1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci.，UTokyo，[2]CRIIM，UTokyo）

2D5a03　Crystal structure of the LysJ-LysW complex from *Thermus thermophilus*
9:52　○Wenyuan SHI[1]，Ayako YOSHIDA[1,2]，Saori KOSONO[1,2]，Makoto NISHIYAMA[1,2]（[1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci. UTokyo，[2]CRIIM，UTokyo）

2D5a04　シアノフィシン生合成におけるアスパラギン酸縮合反応とその制御の分子機構
10:03　○宮川 拓也[1,2]，楊 健[2,3]，川崎 政人[4,5]，安達 成彦[4]，藤井 歩[2]，宮内 裕美子[2]，村松 知成[2]，守屋 俊夫[4]，千田 俊哉[4,5]，田之倉 優[2]（[1]京大院･生命，[2]東大院･農生科，[3]中科院･南海海洋研，[4]高エネ機構･物構研･構造生物，[5]総研大･先端学術院）

2D5a05　Tyrosine phenol-lyase 阻害剤 3,5-dihydroxybenzoic acid 経口摂取はマウス糞便フェノール量を減少させる
10:14　○小林 琢磨[1,2]，大石 栞[1]，原 幸大[3]，橋本 博[3]，渡辺 賢二[3]，吉岡 泰淳[1]，三好 規之[1]（[1]静県大院･薬食，[2]日本学術振興会，[3]静県大･薬）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D5a06　超好熱菌由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素変異体の酵素活性向上に関与するアミノ酸残基の同定
10:33　○伊藤 一樹[1]，前野 美久[1]，櫻庭 春彦[2]，大島 敏久[3]，末 信一朗[4]，里村 武範[4,5]（[1]福井大院･工，[2]香川大，[3]大阪工大，[4]福井大学･工，[5]福井大ライフ）

2D5a07　超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素を基盤とした直接電子移動型酵素の開発
10:44　○前野 美久[1]，伊藤 一樹[1]，末 信一朗[2]，里村 武範[2,3]（[1]福井大院･工，[2]福井大学･工，[3]福井大ライフ）

2D5a08　GABA 資化性好熱性真菌の単離と GABA オキシダーゼの探索
10:55　阿部 一樹，○高橋 祥司（長岡技科大）

2D5a09　セレノシステイン含有マルチヘムシトクロムは細菌ドメインに広く保存されたポリスルフィド還元酵素である
11:06　○井上 真男[1,2]，伊豆 由記子[1]，青野 陸[1]，越智 杏奈[1]，三原 久明[1]（[1]立命大･生命，[2]立命大･R-GIRO）

2D5a10　ロダネーゼ様タンパク質 ExtH の硫黄転移活性に関わる Cys 残基の同定
11:17　○工藤 碧斗[1]，藤田 大樹[1]，井上 真男[1,2]，青野 陸[1]，越智 杏奈[1]，三原 久明[1]（[1]立命大･生命，[2]立命大･R-GIRO）

D5 会場　午後の部（14:01〜16:40）

酵素―糖質代謝関連酵素―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2D5p02　選択的白色腐朽菌の溶解性多糖モノオキシゲナーゼを用いたサトウキビ収穫廃棄物パルプの分解
14:01　○八木 勇成[1,2]，大賀 恵利[1,2]，近藤 敬子[1,3,4]，岡野 啓志[4,5]，渡辺 隆司[4,5]，永田 崇[1,2,3,4]，片平 正人[1,2,3,4]　([1]京大エネ研，[2]京大院エネ科，[3]京大エネ研カーボンネガティブ，[4]京大バイオマスプロダクトツリー，[5]京大生存研)

2D5p03　ラミナリビオース合成酵素に変換したβ-1,3 グルカンホスホリラーゼ変異酵素の性質と利用
14:12　○鬼塚 怜音，藤野 早瑛，川口 剛司，炭谷 順一　(大阪公立大院農)

2D5p04　*Bacillus halosaccharovorans* 由来β-amylase の高温反応性の増強
14:23　○前田 泰輝，田中 真奈，川口 剛司，炭谷 順一　(大阪公立大院農)

2D5p05　ランダム変異および部位特異的サチュレーション変異による糸状菌由来 GH3 β-グルコシダーゼの高耐熱化
14:34　○松崎 千秋[1]，日高 将文[2]，中島 由香里[1]，本多 裕司[3]，小柳 喬[3]，石川 一彦[4]，加藤 紀彦[5]，熊谷 英彦[1]，片山 高嶺[5]　([1]石川県大資源研，[2]東北大院農，[3]石川県大生資環，[4]松谷化学工業株，[5]京大院生命)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D5p06　高濃度 EDTA 耐性を持つα-アミラーゼの獲得
14:53　○森本 晃帆[1]，依田 卓也[1]，細川 正人[1,2]，津田 宗一郎[1]　([1]bitBiome株式会社，[2]早大院・先進理工)

2D5p07　アスガルドアーキアにおける fructose-1,6-bisphosphatase の探索
15:04　○佐藤 喬章[1,2]，中川 裕介[1]，跡見 晴幸[1,2]　([1]京大院工，[2]京大カーボンネガティブ・エネ研)

2D5p08　Biochemical analyses on phosphoenolpyruvate carboxykinases from brown algae
15:15　○Jianqiang JIN，Yuusuke Yokooji，Haruyuki Atomi　(Kyoto Univ.)

2D5p09　複数の褐藻分解酵素を利用した藻類バイオマスから有用単糖及び天然フコイダン抽出法の確立
15:26　○福井 望天[1]，高須賀 太一[1,2]　([1]北大院農，[2]北大院国際食資源)

2D5p10　異なる 2 種の菌株から見出されたアカモクフコイダン低分子化酵素
15:37　○藤田 太洋[1]，川口 紗季[2]，八木 寿梓[2]，鈴木 宏和[2]，大城 隆[2]　([1]鳥取大院・持続創生，[2]鳥取大・工)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D5p11　ゲノムマイニングで取得した麹菌由来のエンドグルカナーゼに新たに見出されたマンナナーゼ活性について
15:56　○渡部 昭[1]，松沢 智彦[2]，氏家 成隆[1]，新谷 尚弘[1]，五味 勝也[1]　([1]東北大院農，[2]香川大農)

2D5p12　*Burkholderia contaminans* LK2dm 由来の D-マンノースイソメラーゼの特性評価と *o* -アミノジフェニル酢酸法を用いたイソメラーゼアッセイ
16:07　○篠田 小雪[1]，森本 兼司[1,2]　([1]香川大院農，[2]香川大国際希少糖研究教育機構)

2D5p13　Investigation of region critical for the physical interaction of the yeast dolichyl-phosphate glucosyltransferase Alg5p
16:18　○Samantha SAMANTHA，Tetsuo TAKAHASHI　(Tokai University)

2D5p14　酵母ドリコールキナーゼ Sec59p に関する物理的相互作用の解析
16:29　○高橋 哲夫，栗原 航希　(東海大工生物工学)

D6 会場　午前の部（9:30〜12:20）

動物―個体-生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D6a01　オスマウスの尿中のフェロモンとその受容体および神経回路に関する研究
9:30　○村田 健[1]，板倉 拓海[2]，東原 和成[1]　([1]東大院農，[2]カリフォルニア工科大学)

2D6a02　子マウス尿に応答する鋤鼻受容体の同定と子殺し行動における機能解析
9:41　○神戸 朱琉[1]，村田 健[1]，板倉 拓海[2]，東原 和成[1]　([1]東大院農，[2]カリフォルニア工科大学)

2D6a03　パートナー系統に着目した母マウスの攻撃行動の研究
9:52　○齊藤 航介[1]，板倉 拓海[1]，村田 健[1]，金子 武人[2]，東原 和成[1]　([1]東大院農，[2]岩手大院理工)

2D6a04　必須アミノ酸トリプトファンによる記憶増強効果とそのメカニズムの解析
10:03　○杉山 奏美，川嶋 珠生，谷水 俊之，喜田 聡　(東京大学大学院　農学生命科学研究科　応用生命化学専攻)

2D6a05　マウス食傷モデルの開発
10:14　○平 裕太郎，喜田 聡　(東大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D6a06　排卵期女性の匂いは男性に対してポジティブな心理生理効果を有する
10:33　○白須 未香[1]，大木 望[1]，小倉 由資[1]，平澤 佑啓[1]，岡本 雅子[1]，川村 理恵子[1]，滝川 浩郷[1]，東原 和成[1,2]　([1]東大院農，[2]東大WPI-IRCN)

2D6a07　言葉ラベルが香り知覚と一次嗅覚野の活動に及ぼす影響
10:44　○岡本 雅子[1]，奥村 俊樹[2]，黄田 育宏[2,3]，横井 惇[2,3]，中井 智也[2]，西本 伸志[2,3]，東原 和成[1]　([1]東大院農，[2]情報通信研究機構，[3]大阪大学)

2D6a08　脳波を用いた，ヒトの脳における匂い情報処理の時空間ダイナミクスの解明
10:55　○加藤 麦彦，東原 和成，岡本 雅子　(東大院農)

2D6a09　食物価値の社会伝達による食物新奇性恐怖の減弱と空腹感の誘導
11:06　○岡山 龍人，喜田 聡　(東大院農)

2D6a10　条件付け場所嗜好性課題を応用した嗜好性の高い食物摂食によるポジティブ情動産生機構の解析
11:17　○若山 直希，桑鶴 良文，喜田 聡　(東大院農)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2D6a11　環境エンリッチメントによる 3q29 領域欠失導入マウスの精神疾患様行動の回復
11:36　○秋本 祐弥[1,2]，福島 穂高[2]，三浦 大樹[2]，橋本 均[3,4,5,6,7,8]，橋本 亮太[8]，中澤 敬信[2,8]　([1]WDB株式会社エウレカ社，[2]東農大生命，[3]阪大院薬，[4]阪大院連合小児子どものこころセ，[5]阪大院データビリティフロンティア機構，[6]阪大先導的学際研究機構，[7]阪大院医，[8]国立精神神経医療研究セ精神疾患病態研)

2D6a12　条件づけ味覚嗜好学習によって苦味溶液に対する嗜好性の人為的向上
11:47　○高橋 明日香，劉 牧言，喜田 聡　(東京大農)

2D6a13　Glyoxalase 1 の阻害はマウスの非糖尿病時の不安を減少させ，糖尿病時の不安を増加させる
11:58　○白井 海斗[1]，竹中 麻子[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

2D6a14　高脂肪食摂取マウスへのタンパク質制限がエネルギー代謝に及ぼす影響
12:09　○相馬 大智[1]，金子 賢太朗[2]，竹中 麻子[2]　([1]明大院農，[2]明大農)

D6 会場　午後の部(13:50〜16:40)

動物—個体-生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生/細胞機能-シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2D6p01　コリン欠乏に対する超生物学的適応
13:50　○小幡 史明[1,2]，藤田 有香[1,2]　([1]理化学研究所，[2]京大院生命)

2D6p02　アミノ酸バランス検知システムによる食欲調節メカニズムの解明
14:01　吉田 健人[1]，○松居 翔[1]，塚本 麻衣[1]，淺原 俊一郎[2]，小栗 靖生[1]，都築 巧[1]，佐々木 努[1]　([1]京大院農，[2]神大院医)

2D6p03　大腸炎マウスにおける皮膚遺伝子発現の解析
14:12　○佐伯 樹，山本 祥也，鈴木 卓弥　(広島大学大学院統合生命科学研究科)

2D6p04　グアーガム分解物はマウスの腸内環境を改善し，エタノール投与による肝脂肪蓄積を緩和させる。
14:23　○森島 爽[1,2]，安部 綾[2]，岡本 沙季[2]，カプール マヘンドラ[2]，大角 将秀[1]，大久保 勉[1]，小関 誠[1,2]，西尾 昌洋[1]，井上 亮[3]　([1]三重大生資，[2]太陽化学，[3]摂南大農)

2D6p05　新規鋤鼻受容体候補遺伝子 ancV1R 欠損オスマウスの表現型解析
14:34　○武田 紗季，近藤 宏，岩田 哲朗，二階堂 雅人，廣田 順二　(東工大生命理工院)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D6p06　炎症性腸疾患に耐性を示す核内受容体型転写因子 NR4A3 欠損マウスの免疫応答と腸管構造
14:53　○南川 夏己[1]，伊藤 直人[1]，片桐 万由佳[1]，中野 信浩[2]，原 むつ子[2]，樋上 賀一[3]，長田 和樹[1]，吉村 昭彦[4]，西山 千春[1]　([1]東理大院先進工生命システム，[2]順大院アトピー疾患研究センター，[3]東理大薬生命創薬，[4]慶大医)

2D6p07　NRF2 欠損の胎内環境並びに性差が及ぼす接触性皮膚炎への影響
15:04　○杉原 彩夏，長田 和樹，西山 千春　(東理大院先進工生命システム)

2D6p08　転写抑制因子 Bach1 は多量体免疫グロブリン受容体の発現調節を介して腸管腔への IgA 分泌を制御する
15:15　○東村 泰希[1]，松本 健司[1]，三谷 塁一[2]，髙木 智久[3]，武藤 哲彦[4]，五十嵐 和彦[4]，内藤 裕二[3]　([1]石川県立大·生資環，[2]信州大院·農，[3]京府医大院·医，[4]東北大院·医)

2D6p09　常圧低酸素環境における酸素濃度の違いが身体に与える影響
15:26　○藤掛 明日希[1]，岡本 真由美[2]，小島 匡人[1]，黒澤 麻由美[1]，松下 敬一[1]，坪井 玲奈[3]，寺尾 安生[2]　([1]株式会社TSM，[2]杏林大学，[3]High Altitude Management株式会社)

2D6p10　膵ポリペプチド細胞の分化可塑性ならびに運命決定機序の研究
15:37　○佐藤 隆史[1]，中川 祐子[1]，深石 貴大[1]，福中 彩子[1]，綿田 裕孝[2]，藤谷 与士夫[1]　([1]群馬大生体調節研，[2]順天堂大院医)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D6p11　Role of the mevalonate pathway in the regulation of selective autophagy and atrophy in skeletal muscle
15:56　○Liyang NI[1]，Xiaolin Zhao[1]，Hidetoshi Sakurai[2]，Ryuichiro Sato[1]，Yoshio Yamauchi[1]　([1]The Univ. of Tokyo，[2]Kyoto Univ.)

2D6p12　カプサイシン型とオイゲノール型リガンドによるバニロイド受容体の活性化に対する嗅覚受容体およびフォルスコリンの調節作用の違い
16:07　○森山 さくら[1,2]，日沼 州司[2]，黒田 俊一[1,2]　([1]大阪大学生命機能研究科，[2]大阪大学　産業科学研究所)

2D6p13　発生期ゼブラフィッシュ胚において紫外線および青色光が DNA 損傷に与える影響
16:18　○廣谷 陸，佐藤 大輝，佐藤 一臣　(玉川大院)

2D6p14　ケヅメリクガメの TRPV1 遺伝子の解析
16:29　○海老原 充　(関東学院大理工)

D7 会場　午前の部(9:30〜12:20)

生物科学—糖鎖科学-構造，機能，糖鎖工学，その他—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2D7a01　未利用資源由来多糖・オリゴ糖の調製と構造活性相関
9:30　○藤澤 萌[1]，二階堂 望[1]，太田 空良[2]，上野 裕太郎[2]，渡邊 崇[1,2]，尾形 慎[3]，戸谷 一英[1,2]　([1]一関高専·化学バイオ，[2]一関高専·専攻科，[3]福島大·農)

2D7a02　未利用糖質資源の免疫活性と MPS による評価
9:41　○和野崎 貴乙[1]，太田 空良[2]，藤澤 萌[1]，二階堂 望[1]，上野 裕太郎[2]，藤原 康宣[1,2]，渡邊 崇[1,2]，大沼 清[3]，長久保 大輔[4]，戸谷 一英[1,2]　([1]一関高専·化学バイオ，[2]一関高専·専攻科，[3]長岡技科大·物質生物，[4]姫路獨協大·薬)

2D7a03　シロイヌナズナ用転移酵素 GATL のペクチン生合成における役割
9:52　○濱田 紗愛，砂崎 遥香，石川 和也，家門 絵理，石水 毅　(立命館大·生命)

2D7a04　シロイヌナズナ由来の機能未知ガラクトース転移酵素の選抜
10:03　○福榮 美月，小野 真央，濱田 紗愛，石川 和也，家門 絵理，石水 毅　(立命館大·生命)

2D7a05　エンド-*β*-N-アセチルグルコサミニダーゼ HS の立体構造と機能発現機構
10:14　倉内 郁哉[1]，大倉 和貴[1]，森 真司[1]，米澤 健人[2]，清水 伸隆[2]，田中 里佳[3]，細川 千絵[1]，宮原 郁子[1]，○伊藤 和央[1]　([1]阪公大·院理，[2]KEK·物構研，[3]阪公大·工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2D7a06　マトリグリカンオリゴ糖とクラスター分子の合成
10:33　○小寺 康太[1]，田村 敬裕[2]，望月 楽斗[3]，田村 純一[1,2,3]　([1]鳥大院農，[2]鳥大院連大農，[3]鳥大農)

2D7a07　ケラタン硫酸オリゴ糖の化学合成
10:44　○服部 怜，岩間 千明，植村 優那，武田-奥田 尚子，田村 純一　(鳥大農)

2D7a08　養殖銀鮭に含まれるグリコサミノグリカンの組成分析
10:55　○北井 悠仁，田村 純一　(鳥大農)

2D7a09　*Elizabethkingia* 属細菌由来 O-glycoprotease の C 末端領域の解析
11:06　○高島 晶，黒河内 政樹，八須 和子，水野 真盛，高田 美生　((公財)野口研)

2D7a10　乳由来シアリル糖ペプチドに含まれるシアル酸含有 *O* 結合型糖鎖の定性および定量分析
11:17　○樋口 淳一[1]，黒河内 政樹[2]，三塚 翔[1]，石田 祐子[1]，福留 博文[1]，野々山 典子[1]，山口 敏幸[1]，水野 真盛[2]，郷田 雅之[1]，酒井 史彦[1]　([1]雪印メグミルク(株)　ミルクサイエンス研究所，[2](公財)野口研究所　糖鎖有機化学研究室)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2D7a11　ヒドロキシ脂肪酸(2-HOT)の化学合成と抗真菌活性
11:36　○土肥 博史[1,2]，田中 萌瑛[1]，山本 和加子[1]，島田 貴士[1]　([1]千葉大院園芸，[2]千葉大MCRC)

2D7a12　ガラクトヘプトース骨格を有する KRN7000 誘導体の合成
11:47　○草間 明希[1]，渡邊 健吾[1]，西田 芳弘[1,2]，土肥 博史[1,2]
([1]千葉大院園芸，[2]千葉大MCRC)

2D7a13　天然多糖由来多孔質材料の開発
11:58　○菅野 憲一[1,2]，上田 麻未[1]，米村 陽[1]，畑中 大和[1]，斉藤 健太郎[1]，石川 健太[2]　([1]近大産理工，[2]近大院産理工)

2D7a14　組換えヒトインテレクチン-1 の糖結合特異性
12:09　○林 勇輝，鷲見 勇吾，伊藤 誌小里，奥村 裕紀，氏田 稔 (名城大院農)

D7 会場　午後の部(14:53〜16:18)

生物科学—糖鎖科学-構造，機能，糖鎖工学，その他/タンパク質・ペプチド科学-構造，機能，その他—

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2D7p06　トランスクリプトーム解析によるイネディフェンシン由来ペプチドの作用メカニズムの解析
14:53　○落合 秋人[1,2]，東海林 裕翔[1]，芦原 紗喜[1]，大橋 一登[3]，谷口 正之[4]，提箸 祥幸[5]，田中 孝明[1,2]　([1]新潟大院自然研，[2]新潟大工，[3]群大･生調研，[4]新潟青陵短大･人間総合，[5]農研機構･生物研)

2D7p07　イネ由来多機能性ペプチドの機能性向上に関する研究
15:04　○遠藤 めい[1]，東海林 裕翔[1]，鈴木 優飛[1]，谷口 正之[2]，田中 孝明[1]，落合 秋人[1]　([1]新潟大院自然研，[2]新潟青陵短大･人間総合)

2D7p08　保護単糖による表面修飾シリカ粒子の合成と相互作用
15:15　○加藤 佑介[1]，鈴木 綾乃[1]，中村 彩乃[1]，内田 司[1]，蟹江 善美[3]，蟹江 治[1,2]　([1]東海大　院，[2]東海大　工，[3]東海大技)

2D7p09　ホスファチジルグルコシドの固相合成
15:26　○松尾 一郎[1]，藤原 駿佑[1]，狩野 航輝[1]，グレイメル ピータ[2]，平林 義雄[2,3]，石井 希実[1]　([1]群馬大院理工，[2]理研，[3]順天大院医)

2D7p10　複合型糖鎖を用いた抗体糖鎖特異的 ENGase(Endo-S)の活性検出
15:37　○石井 希実，野口 智恵，井上 周征，松尾 一郎　(群馬大院理工)

p11〜p12 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2D7p11　細胞壁多糖α-1,3-グルカン依存的凝集性の評価系構築に向けたα-1,3-グルカノオリゴ糖被覆 ビーズの作製
15:56　○竹俣 海志[1]，宮澤 拳[1]，小泉 亜未[1]，吉見 啓[2,4]，目黒 康洋[1]，佐藤 伸一[5]，岩田 忠久[3]，木村 聡[3]，阿部 敬悦[1,2]
([1]東北大院農，[2]東北大未来研，[3]東大院農，[4]京大院地環学，[5]東北大院学際研)

2D7p12　ビフィズス菌由来の新規糖質加水分解酵素によりセヤル種アラビアガム AGP から切断されるオリゴ糖の構造解析
16:07　○石渡 明弘[1]，佐々木 優紀[2,3]，松尾 綾子[2]，橋口 実々花[2]，藤村 花乃子[2]，北原 兼文[2]，藤田 清貴[2]，越野 広雪[1]，田中 克典[1,4]，伊藤 幸成[1,5]　([1]理研，[2]鹿大農，[3]京大院生命，[4]東工大院物質理工，[5]阪大院理)

E1 会場　午前の部(9:30〜11:28)

微生物—物質生産-醸造，発酵(一次代謝産物)/代謝-発酵生理，代謝調節—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E1a01　自然界酵母から清酒製造に適する醸造用酵母への効率的な育種方法の開発
9:30　○栗林 喬[1,2]，菅原 雅通[1]，金桶 光起[2]，小熊 哲哉[2]，鍋倉 義仁[1]，青木 俊夫[1]　([1]新潟醸造試，[2]新潟食農大)

2E1a02　尿素非生産性を維持したカプロン酸エチル高生産性清酒酵母の育種法の開発
9:41　○田中 純平[1]，菅原 雅通[1]，栗林 喬[1,2]，佐藤 圭吾[1]，鍋倉 義仁[1]，城 斗志夫[3]，青木 俊夫[1]　([1]新潟醸造試，[2]新潟食農大，[3]新潟大農)

2E1a03　酵母におけるリン酸応答性アルコール発酵調節
9:52　美馬 未紗希，高木 博史，○渡辺 大輔　(奈良先端大)

2E1a04　フラクトオリゴ糖生産酵母 *Zalaria* sp. Him3 株を用いたイソマルトオリゴ糖生産
10:03　○松谷 遥希[1]，田中 駿[2]，眞榮田 麻友美[2]，前橋 健二[1,2]，吉川 潤[1,2]　([1]東農大院応生，[2]東農大応生)

2E1a05　*Citrobacter braakii* TB-96 株における電気発酵の効果と応用による新規培養系の構築
10:14　○柳瀬 卓馬[1]，井上 謙吾[1]，吉田 ナオト[1]，中島(神戸) 敏明[2]，清 啓自[1]　([1]宮大院農，[2]筑波大院生命環境系)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E1a06　窒素固定細菌を用いた大気中窒素を由来とする L-グルタミン酸発酵法の改良
10:33　○吉留 大輔[1]，日髙 真誠[1]，伊藤 有亮[1,2]，古園 さおり[1,3]，西山 真[1,3]　([1]東大院･農生科，[2]キッコーマン株式会社，[3]東大･微生物連携機構)

2E1a07　システインを高生産する酵母の育種と機能解析
10:44　○磯貝 章太[1]，西村 明[1]，園原 詩野[2]，岡田 知之[2]，継国 孝司[2]，高木 博史[1]　([1]奈良先端大･研究推進，[2]武蔵精密工業･植物バイオ)

2E1a08　酵母の分岐鎖アミノ酸アミノトランスアミナーゼ変異体によるフーゼルアルコール生産性の向上
10:55　KOONTHONGKAEW Jirasin，豊川 洋一，○高木 博史　(奈良先端大バイオ)

2E1a09　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 新規油脂超高蓄積変異株の取得と油脂高生産原因遺伝子の同定
11:06　○佐藤 里佳子[1]，森 一樹[2]，荒 学志[1]，山崎 晴丈[1]，田代 康介[2]，石谷 孔司[3]，油谷 幸代[3]，高久 洋暁[1]　([1]新潟薬大･応生科，[2]九州大･院農，[3]産総研･生物プロセス)

2E1a10　ルーメン細菌由来 Plasmalogen 合成遺伝子を導入した大腸菌でのエタノールアミン型 Plasmalogen の生産
11:17　○吉井 直毅[1]，小野寺 智子[2]，阿部 直樹[1]，金子 淳[1]　([1]東北大院農，[2]名寄市立大栄)

E1 会場　午後の部(14:01〜16:40)

微生物—物質生産-醸造，発酵(一次代謝産物)—

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

2E1p02　野生酵母のゲノム情報から探る清酒酵母の低温発酵特性に関与する遺伝子の探索
14:01　○川原 悠暉[1]，久松 賢太郎[2]，澤井 美伯[2]，吉村 明浩[2]，正木 和夫[3]，赤尾 健[3]，島田 昌也[1]，中川 智行[1]　([1]岐阜大院自然科学，[2]岐阜県食品科学研究所，[3]酒類総合研究所)

2E1p03　協会系清酒酵母の胞子発芽異常に関与する新規遺伝子の探索
14:12　○周 延，金井 宗良，赤尾 健　(酒総研)

2E1p04　比較ゲノミクスに基づくワイン酵母の潜在的な高発酵性に関する解析
14:23　○髙橋 空良，渡辺 大輔　(奈良先端大･バイオ)

2E1p05　米麹中のα-アミラーゼの簡易測定法の改良
14:34　○五島 徹也[1]，織田 健[1]，島本 和美[1]，赤尾 健[1]，鈴木 繁哉[2]，下地 一彦[2]　([1]酒類総合研究所，[2]キッコーマンバイオケミファ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2E1p06　大腸菌呼吸鎖変異株ΔNDH-IΔCyto$_{B3}$ を用いたグルコースからの GABA の高生産
14:53　○若原 洋輝，溝越 拓哉，吹谷 智，横田 篤，前田 智也（北大院農）

2E1p07　バナナ茎から単離した新規 Saccharomyces cerevisiae およびその泡盛醸造用ロイシン蓄積変異株の特性解析
15:04　○塚原 正俊[1]，磯貝 章太[2]，東 春奈[1]，塚原 恵子[1]，豊川 洋一[2]，高木 博史[2]（[1]バイオジェット，[2]奈良先端大･バイオ）

2E1p08　油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* を用いた飽和脂肪酸の生産
15:15　○大道 春輝[1]，広瀬 大樹[1]，CHIH-CHAN Wu[2]，宮崎 健太郎[2]，冨田 宏矢[2,3]，本田 孝祐[2,3]（[1]阪大院･工，[2]阪大･生工国交セ，[3]阪大･先導的学際研機構）

2E1p09　バクテリアルセルロース生産における培地成分の影響
15:26　○鷹西 晴大[1]，片桐 瀬那[1]，樋口 杏奈[1]，小林 由衣乃[2]，鈴木 敏弘[3]，石川 森夫[3]，仁平 高則[1]，竹園 恵[1]，小野寺 正幸[1,2]（[1]新潟工大工，[2]新潟県微研，[3]東農大醸造）

2E1p10　清酒中オリゴ糖による香気成分の揮発抑制効果
15:37　○六倉 春樹[1]，本田 千尋[2]，中山 俊一[1,3]，岡田 奈菜子[3]，馬宮 綾音[3]，進藤 斉[1,3]，穂坂 賢[1,3]，徳岡 昌文[1,3]（[1]東農大院･応生，[2]静岡県大･食栄，[3]東農大･応生）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2E1p11　Molecular breeding of the oleaginous fungus *Mortierella alpina* for the production of EPA at ordinary temperature
15:56　○Nina Barua[2], Akinori Ando[1,2], Tomoyo Okuda[2], MO Brian King Himm[2], Ryohei Nakatsuji[2], Hiroyuki Ikemoto[3], Hiroshi Kikukawa[5], Takaiku Sakamoto[4], Sakuradani Eiji[4], Jun Ogawa[1,2]（[1]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Nisshin Pharma Inc., [4]Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, [5]Div. Appl. Chem., Fac. Eng., Hokkaido Univ.）

2E1p12　味噌中のオリゴ糖の網羅的分析
16:07　○河崎 乃々果[1]，勝田 亮[2]，徳岡 昌文[3]，熊澤 茂則[1]，本田 千尋[1]（[1]静県大食栄，[2]東農大院生命，[3]東農大院応生）

2E1p13　清酒より発見された配糖体の構造解析
16:18　○秋山 唯[1]，本田 千尋[1]，吉澤 耕[2]，山田 明日香[2]，小泉 泉美[2]，徳岡 昌文[2]，熊澤 茂則[1]（[1]静県大院薬食，[2]東農大院応生）

2E1p14　タンパク質組成変異米を麹及び掛米に用いた製成酒の特徴について
16:29　○飯塚（古川）幸子，長船 行雄，藤田 晃子，阿久津 武広，磯谷 敦子，鈴木 崇，向井 伸彦（酒総研）

E2 会場　午前の部（9:30〜12:20）

微生物―細胞-細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E2a01　細胞性粘菌の発生過程におけるスフィンゴミエリナーゼコード遺伝子の機能解析
9:30　○池谷 彩佳[1]，成田 隆明[2]（[1]千葉工大･院先進工，[2]千葉工大･先進工･生命）

2E2a02　セラミドの de novo 合成に関わる遺伝子の過剰発現が *Dictyostelium discoideum* の発生・分化に与える影響
9:41　○木村 詩音[1]，成田 隆明[2]（[1]千葉工大･院先進工，[2]千葉工大･先進工･生命）

2E2a03　出芽酵母における微小管脱重合阻害剤添加によるミトコンドリア形態異常
9:52　○村田 和加恵[1,2]，山瀬 優日[1]，荻田 亮[3]，山口 良弘[2]，藤田 憲一[2]（[1]米子高専，[2]大阪公大院･理，[3]大阪公大健康研セ）

2E2a04　Persimmon tannin enhances *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to ethanol stress
10:03　○Ilhamzah[1], Yoshihiro Yamaguchi[1], Akira Ogita[1,2], Ken-ichi Fujita[1]（[1]Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ., [2]Res. Center Urban Health Sports, Osaka Metro. Univ.）

2E2a05　アルコール発酵におけると酵母細胞内タンパク質の凝集と Btn2 の重要性
10:14　今井 芙月，古谷 昇，○井澤 真吾（京都工繊大院工芸科学）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E2a06　下面発酵ビール醸造酵母の凝集とエタノール耐性の関係性について
10:33　○小島 香穂，三浦 健（東洋大院生命科学）

2E2a07　清酒酵母のエタノール応答関連遺伝子の QTL 解析
10:44　○河内 孝之[1,2]，金井 宗良[1]，赤尾 健[1,2]（[1]酒総研，[2]広島大院･統合生命）

2E2a08　低酸素条件下におけるエノラーゼ活性の変化および変異体活性の変化の検証
10:55　○鷲尾 成実[1]，三浦 夏子[1,2]，片岡 道彦[1,2]（[1]阪府大･生命環境，[2]阪公大院･農）

2E2a09　低酸素培養における G-body 形成率経時的変化の観察
11:06　○森川 穂香[1]，赤井 美咲[2]，三浦 夏子[1,2]，片岡 道彦[1,2]（[1]阪府大･生命環境，[2]阪公大院･農）

2E2a10　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出した新たな活性カルボニル種消去分子と終末糖化産物の生成抑制機構
11:17　○那須野 亮[1,2]，高木 博史[3]（[1]神戸大･先端バイオ，[2]奈良先端大･バイオ，[3]奈良先端大･研推）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2E2a11　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における培養温度に依存した浸透圧ストレスの解析
11:36　○吉川 雄樹，伊藤 玲奈（秋田県立大学）

2E2a12　スフィンゴ脂質レベルに依存した転写因子 Com2 の分解制御によるスフィンゴ脂質代謝制御
11:47　○田淵 光昭，松本 康生，長井 彩音，白井 里樹，小松 楠於，石野 裕子，田中 直孝（香川大農）

2E2a13　絶対嫌気性 *Clostridium* 属の O_2 感受性の分子機構に関する研究
11:58　○畠 典雅，富岡 哲平，小宮山 新大，スチュワード グナルディ，川崎 信治（東農大院微生物）

2E2a14　高度な光酸化ストレス耐性を持つ微細藻類のストレス応答性代謝プログラムのオミクス解析
12:09　○豊島 拓樹[1]，三井 珠來[1]，石毛 太一郎[2]，高市 真一[1]，川崎 信治[1]（[1]東農大微生物，[2]東農大ゲノム解析セ）

E2 会場　午後の部（13:50〜16:40）

微生物―細胞-細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2E2p01　大腸菌における新規 toxin-antitoxin system，*yjbL-yjbM* の同定
13:50　○比嘉 毬乃[1]，山口 良弘[2]（[1]阪市大理，[2]阪公大理）

2E2p02　酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* 3288 株における新規 toxin-antitoxin system の同定
14:01　○池上 和里[1]，比嘉 毬乃[1]，山口 良弘[2]（[1]阪市大理，[2]阪公大理）

2E2p03　耐熱菌由来ヒートショックタンパク質が大腸菌のマルチストレス耐性に及ぼす影響
14:12　○佐藤 悠[1]，岡野 憲司[2]，本田 孝祐[3,4]（[1]山口大･中高温微セ，[2]関西大･化生工，[3]阪大･生工国際セ，[4]阪大･先導的学際研機構）

2E2p04　大腸菌 Trk 型 K 取込みトランスポーターの進化的背景
14:23　○Tanudjaja Ellen[1]，星 直美[1]，山本 兼由[2]，井原 邦夫[3]，古田 忠臣[4]，辻井 雅[1]，石丸 泰寛[1]，魚住 信之[1]　([1]東北大学大学院工学研究科，[2]法政大学生命科学部生命機能学科，[3]名古屋大学遺伝子実験施設，[4]東京工業大学 生命理工学院)

2E2p05　枯草菌におけるリボソーム生合成と S-アデノシルメチオニン代謝との関連性の解析
14:34　○大坂 夏木[1]，朝井 計[2]，田中 寛[1]　([1]東工大化生研，[2]東農大バイオ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2E2p06　部位特異的なゲノム DNA の二重鎖切断が枯草菌の胞子形成に与える影響の解析
14:53　○本橋 直大，田中 俊平，朝井 計　(東京農大院バイオ)

2E2p07　*Thermococcus kodakarensis* 由来リバースジャイレースに関する研究
15:04　○平木 陽向，東端 啓貴　(東洋大生命)

2E2p08　放線菌における *sigR* を介した酸化ストレス応答のピロガロール誘導型分岐形成への関与
15:15　○福原 彩穂[1]，加藤 愛美[2]，浅水 俊平[3]，尾仲 宏康[1]　([1]学習院大理，[2]慶応大先端生命研，[3]神戸大先端バイオ)

2E2p09　新規糖刺激を PTS-TCS 間で伝えるコネクター RcsG
15:26　○山口 和宣[1]，保山 菜穂子[2]，萩原 慧[1]，深見 知可[1]，加藤 明宣[1]　([1]近畿大院農バイオ，[2]近畿大農バイオ)

2E2p10　様々な細菌集団および単離細菌株に対する有機塩素系殺虫剤分解酵素遺伝子のキャプチャリング実験
15:37　○岡 俊璃，岸田 康平，大坪 嘉行，永田 裕二　(東北大院生命科学)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2E2p11　ナノ秒パルス高電界による酵母代謝への影響
15:56　○越村 匡博[1]，竹内 凜[2]，四田 杏美[2]，猪原 武士[3]，山﨑 隆志[1]　([1]佐世保高専･物質工学科，[2]佐世保高専･専攻科，[3]佐世保高専･電気電子工学科)

2E2p12　作出したカフェイン感受性株の変異箇所の特定について
16:07　○山口 穂香[1]，高久 美鈴[2]，水木 徹[3]，三浦 健[1,2,4]　([1]東洋大，[2]東洋大院，[3]東洋大学バイオ･ナノエレクトロニクス研究センター，[4]東洋大学ライフイノベーション研究所)

2E2p13　クロロゲン酸による乳酸菌におけるカフェイン耐性の向上について
16:18　○髙久 美鈴[1]，山口 穂香[2]，水木 徹[3]，三浦 健[1,2,4]　([1]東洋大院，[2]東洋大，[3]東洋大学バイオ･ナノエレクトロニクス研究センター，[4]東洋大学ライフイノベーション研究所)

2E2p14　グラム陽性菌における抗菌性陽イオン界面活性剤の作用機構の解析
16:29　○中田 陽[1]，佐々木 美穂[1,2]，松村 吉信[1,2]　([1]関西大･生命生物工，[2]関西大･ORDIST)

E3 会場　午前の部(9:30〜11:28)

食品—食品機能・栄養-酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化/食品機能・栄養-その他—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E3a01　過酸化リン脂質の代謝からみたフェロトーシス誘導機構の評価
9:30　○鈴木 優里[1]，加藤 主税[2]，加藤 俊治[1]，山崎 寛之[3]，Isabella Supardi Parida[1]，Mirinthorn jutanom[1]，竹腰 進[3]，仲川 清隆[1]　([1]東北大院農，[2]静岡大院農，[3]東海大医)

2E3a02　過酸化スクアレンによるヒト皮膚角化細胞へのフェロトーシスの誘導と植物抽出物による抑制
9:41　○加藤 主税[1,2]，楠本 惟吹[1]，加藤 俊治[1]，乙木 百合香[1]，伊藤 隼哉[1]，鈴木 優里[1]，戸塚 広乃[3]，Arun Rajgopal[4]，Jina Hong[4]，仲川 清隆[1]　([1]東北大院農，[2]静大院農，[3]Nutrilite 社，[4]ABG INTL社)

2E3a03　カルノシン酸による線虫 *C.elegans* の GLO1 活性化と糖化抑制作用
9:52　○瀬戸山 央　((地独)神奈川県立産技総研)

2E3a04　D-アラニンの経口摂取が中年マウスの行動に及ぼす影響
10:03　○西 純可[1]，豊田 淳[1,2]　([1]茨大院農，[2]農工大院連合農)

2E3a05　カベルネ・ソーヴィニヨンワインに含まれる機能性成分の皮膚老化に対する効果
10:14　○沢辺 昭義[1,2]，田中 文人[1]，山本 朱那[2]，竹田 竜嗣[3]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]関西福祉科学大･健康福祉)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E3a06　テリハボク(*C. inophyllum*) の産生するフラボノイドが糖化中間産物に及ぼす影響
10:33　○加々美 龍大[1]，宇佐美 徹[2]，松川 哲也[1]，梶山 慎一郎[1]　([1]近大院生物理工，[2]株式会社すまエコ)

2E3a07　ローヤルゼリーは老化表皮角化細胞においてセノモルフィック効果を示す
10:44　○中川 友希江，伊藤 隆志，奥村 暢章　(株式会社山田養蜂場)

2E3a08　ラフマ葉抽出物による月経に伴う不定愁訴の改善
10:55　○押切 春佳，國吉 智子，小林 夕希子，楊 金緯　((株)常磐植物化学研究所)

2E3a09　ゼブラフィッシュを用いた抗酸化食品成分に関する研究
11:06　○小林 麻己人[1]，木元 広実[2]，佐藤 綾香[1]　([1]筑波大･医学医療系，[2]農研機構･食品研)

2E3a10　プレニル化がケンフェロールの抗酸化性に及ぼす影響
11:17　○立石 晟菜[1]，韓 俊文[2]，棟方 涼介[2]，矢崎 一史[2]，古賀 武尊[1]，田井 章博[1]，向井 理恵[1]　([1]徳島大･生物資源，[2]京大･生存研)

E3 会場　午後の部(13:50〜16:40)

有機化学，天然物化学—生合成/その他—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2E3p01　ジャガイモシストセンチュウ孵化誘因物質 solanoeclepin A および類縁体の実用的供給法
13:50　○山口 友喜，渡邊 正悟，岡本 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県立大薬)

2E3p02　Solanoeclepin A 生合成経路解明に向けた *Nicotiana benthamiana* への一過性異種発現における重要中間体 cycloartenol および関連化合物の単離構造解析について
14:01　○青木 聡樹[1]，岡本 拓実[1]，山本 泰誠[2]，岸本 真治[1]，渡辺 賢二[1,2]　([1]静岡県大薬，[2]アデノプリベント)

2E3p03　マメ科モデル植物およびその近縁種を用いたダイズシストセンチュウ孵化誘因物質 glycinoeclepin A の生合成遺伝子および経路の解明
14:12　○村上 侑太郎，岡本 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

2E3p04　サラシナショウマの主成分 cimigenol を基点とした de novo transcriptome 解析による生合成遺伝子・経路の解明
14:23　○岡本 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

2E3p05　抗腫瘍性抗生物質 fumagillin 生合成遺伝子のウイルス発現系による新規抗がん遺伝子治療法の確立
14:34　○根岸 天都，恒松 雄太，佐藤 道大，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2E3p06　放線菌 *Streptomyce albulus* における硫黄キャリアタンパク質を介した新規メチオニン生合成経路の解明
14:53　○足立 和也，丸山 千登勢，濱野 吉十，長谷部 文人　（福井県大院生物資源）

2E3p07　抗生物質 resormycin が有するβ-homolysine の生合成機構の解明
15:04　○今堀 千咲[1]，小笠原 泰志[2]，山中 一也[3]，長谷部 文人[1]，五十嵐 雅之[4]，大利 徹[2]，濱野 吉十[1]，丸山 千登勢[1]　([1]福井県大院生物資源，[2]北大院工，[3]関西大化生工，[4]微化研)

2E3p08　パプアニューギニア産珪藻 *Nitzschia navis-varingica* のカイノイド生産酵素の同定
15:15　○芦田 康洋[1]，Clyde Puilingi[2]，前野 優香理[3]，工藤 雄大[4,1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，小瀧 裕一[1]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]Pacific Adventist Univ.，[3]東大院農，[4]東北大学際研)

2E3p09　異種発現カイノイド合成酵素を用いた新規カイニン酸類縁体の調製
15:26　山田 基生[1]，○望月 政希[1]，前野 優香理[2]，小瀧 裕一[1]，寺田 竜太[3]，工藤 雄大[4,1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東大院農，[3]鹿児島大院連合農，[4]東北大学際研)

2E3p10　*In vivo* 標識及び免疫染色による渦鞭毛藻サキシトキシン生合成の明暗サイクル内変動解析
15:37　○長 由扶子[1]，土屋 成輝[1]，大村 卓朗[2]，此木 敬一[1]，大島 泰克[3]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]水圏科学，[3]東北大院生命)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2E3p11　SREBP-1 特異的阻害剤創製を目指したバインダースクリーニング
15:56　○廣 佳穂里[1]，高橋 裕[1]，丸山 貴史[1]，岡部 隆義[2]，小島 宏建[2]，山内 祥生[1]，佐藤 隆一郎[2]　([1]東大院農，[2]東大院薬)

2E3p12　芳香族アミン誘導体の水素ー重水素交換反応
16:07　○橋本 誠[1]，タクリム ゼトリアナ　プテリ[1,2]，デシタ トリアナ[1]，村井 勇太[1]　([1]北大院農，[2]インドネシア国立研究開発機構)

2E3p13　3-スチリルフラボン類の合成及び HL-60 に対する増殖抑制活性に関する研究
16:18　○堤 ありさ[1]，川井 悟[1]，吉澤 結子[2]，常盤野 哲生[2]　([1]電大院先端研，[2]秋田県大)

2E3p14　フラバン-3- オール-加熱安定化ゼラチン複合体の機能性評価
16:29　○山下 啓太[1]，青木 環[1]，堀口 諒太[1]，植村 美希[2]，谷口 正紘[2]，齊藤 安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院工，[2]大阪電通大工)

E4 会場　午前の部(9:30〜11:58)

生物科学—生物工学-酵素工学・生物反応工学，生物材料工学，生体医用工学—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E4a01　Preparation and degradability of novel cross-linked functional hydrogels from enzymatic synthesized α-1,3-glucan and its carboxymethyl derivative
9:30　○ZHENGYU SU[1]，HARUKA KINOSHITA[1]，YOICHI TAKEDA[1]，MAKOTO OGAITO[2]，MATSUI DAISUKE[1]，YOSUKE TOYOTAKE[1]，MAMORU WAKAYAMA[1]　([1]The Univ. of Ritsumeikan，[2]Shimadzu Corporation)

2E4a02　In vivo evolution of the *Ralstonia* sp. phosphite dehydrogenase (PtxD): isolation and biochemical characterization of the nitrate resistant PtxD
9:41　○Gamal Nasser Abdel-Hady[1,2]，Linh Thi Thuy Cao[1]，Takenori Ishida[1]，Takeshi Ikeda[1]，Hisakage Funabashi[1]，Akio Kuroda[1]，Ryuichi Hirota[1]　([1]Unit of Biotechnology，Division of Biological and Life Sciences，Graduate School of Integrated Sciences for Life，Hiroshima University，[2]Department of Genetics，Faculty of Agriculture，Minia University)

2E4a03　構造生物電気化学的手法による膜結合型フルクトース脱水素酵素の反応機構解明
9:52　○府川 江央留，宋和 慶盛，北隅 優希，白井 理　(京大院農)

2E4a04　新規 PET 分解酵素の同定と表面特徴量解析を用いた酵素改変
10:03　○馬橋 英章[1]，平井 洵[1]，桜井 滋[1]，井手 圭吾[1]，小川 雅人[1]，細川 正人[1,2]，津田 宗一郎[1]　([1]bitBiome株式会社，[2]早大院・先進理工)

2E4a05　コケ由来ペルオキシダーゼ Prx34 の TPX フィルム培養による生産
10:14　伊藤 健司[1,3]，日下志 和也[1]，○中 雄輝[1]，秋田 求[2,3]　([1]近畿大院生物理工，[2]近畿大生物理工，[3]株式会社セルフィルム研究所)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E4a06　Norovirus-based platform for modular displaying of antigenic protein candidates for mosquito-borne infectious diseases
10:33　○Jirayu Boonyakida，Enoch Y. Park　(Res. Inst. Green Sci. Technol.，Shizuoka Univ.)

2E4a07　Envelope Domain III (EDIII) displaying Dengue virus-like particle: A tetravalent Virus Like Particle (VLP) using silkworm expression system
10:44　○Krishna Raja MUTHURAMAN[1]，Jirayu BOONYAKIDA[2]，Enoch Y. PARK[1,2]　([1]Grad. Sch. Sci. Technol.，Shizuoka Univ.，[2]Res. Inst. Green Sci. Technol.，Shizuoka Univ.)

2E4a08　耐熱性ヘリカーゼと耐熱性鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いた等温核酸増幅法
10:55　○村上 雄人[1]，生田 宗一郎[1,2]，柳原 格[3]，保川 清[4]，藤原 伸介[1,2]　([1]関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻，[2]関西学院大学生命環境学部，[3]大阪母子医療センター，[4]京都大学大学院農学研究科)

2E4a09　キメラ DNA ポリメラーゼを用いた鎖置換活性に影響を与える領域の特定
11:06　○西 晃輝[1]，生田 宗一郎[1]，柳原 格[2]，保川 清[3]，藤原 伸介[1]　([1]関学理工，[2]大阪母子医療センター，[3]京大院農)

2E4a10　アミノ酸配列及び部位特異的変異を用いた *Pseudomonas* sp. WU-001 由来アコニット酸イソメラーゼの活性に必須なアミノ酸残基の特定
11:17　○小林 万稀[1]，石井 義孝[2]，桐村 光太郎[1,2]　([1]早大院先進理工，[2]早大理工総研)

a11〜a12 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2E4a11　低温菌シンプル酵素触媒における熱処理の影響
11:36　○田島 誉久，穴田 康太，緋田 安希子，加藤 純一　(広島大院統合生命)

2E4a12　Enzymatic synthesis of non-natural plasmalogen by improving solubility of *Streptomyces antibioticus* derived phospholipase D in recombinant *E. coli*
11:47　○Shamoli Akter[1]，Riko Yamaguchi[2]，Aki Kanehama[3]，Takahiro Iwamoto[2]，Meme Hasegawa[3]，Akeno Ito[2]，Megumi Nishimukai[1,3]，Miwa Yamada[1,3]，Akiko Kashiwagi[1,2]　([1]UGAS，Iwate University，[2]Hirosaki University，[3]Faculty of Agriculture，Iwate University)

E4 会場　午後の部（13:50〜16:40）

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2E4p01　酵素を構成するアミノ酸の性質に基づく可溶性変異の導入－タンパク質の記憶をたどって－
13:50　○篠田 優，浅野 泰久　（富山県大工）

2E4p02　Single-molecule display system for directed evolution of enzymes
14:01　○Jasmina DAMNJANOVIC[1]，Ai SUGIYAMA[1]，Kyoka ISHIHARA[1]，Yugo IWASAKI[2]，Hideo NAKANO[1]（[1]Nagoya Univ.，[2]Chubu Univ.）

2E4p03　シンチレーション特性を示す蛍光タンパク質の開発
14:12　○千葉 拓馬[1]，杉浦 一徳[2]，永井 健治[2]，栗田 悠子[1]，小林 奈通子[1]，田野井 慶太朗[1]　（[1]東大院農，[2]阪大産研）

2E4p04　抗ウイルス性能を付与したポリプロピレン表面コーティング
14:23　○平尾 理恵，竹内 久人，河田 順平，石田 亘広　（(株)豊田中央研究所）

2E4p05　レトルトパウチ×高温高圧処理を利用したPCR産物の汚染除去と遺伝情報漏洩対策
14:34　○陶山 哲志，佐々木 章　（産総研バイオメディカル）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2E4p06　ニッキング酵素とヌクレアーゼを用いた高速・高感度等温核酸増幅
14:53　○藤井 亮太，矢内 久陽，天野 仰　（三井化学(株)）

2E4p07　ラマン分光を核としたマルチモーダルラベルフリーイメージングで迫る希少放線菌胞子嚢の特異な構成成分
15:04　○宇佐美 慶典[1]，手塚 武揚[2,3]，大西 康夫[2]，重藤 真介[1]（[1]関学大院・理工，[2]東大院・農生科・応生工，[3]北里大院・感染制御）

2E4p08　油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪球動態解析に向けた蛍光染色検討
15:15　○高橋 優花[1]，志田 洋介[1]，中村 彰宏[1]，佐藤 里佳子[2]，仁子 陽輔[3]，高久 暁洋[2]，小笠原 渉[1]　（[1]長岡技大，[2]新潟薬科大・応生命，[3]高大・複合領域科学）

2E4p09　枯草菌の細胞内 pH 調節関連遺伝子の網羅的な探索
15:26　○倉川 尊[1]，柄澤 匠[1]，福田 紘子[2]，森 浩禎[3]，中嶋 幹男[4]，片岡 正和[2]　（[1]信州大工，[2]信州大院総理工研，[3]広東省農業科学院，[4]MSL）

2E4p10　大腸菌細胞内の pH 調節に関与する候補遺伝子の網羅的スクリーニング
15:37　○福田 紘子[1]，倉川 尊[2]，柄澤 匠[2]，森 浩禎[3]，中嶋 幹男[4]，片岡 正和[1]　（[1]信州大院総理工研，[2]信州大工，[3]広東省農業科学院，[4]MSL）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2E4p11　ゲノム編集を利用したリン代謝経路のデザインによる生物学的封じ込め技術の高度化
15:56　○百川 直輝，石田 丈典，池田 丈，舟橋 久景，黒田 章夫，廣田 隆一　（広大院統合生命）

2E4p12　速度論的代謝解析におけるアンサンブルモデリングの高速化に向けた経験的棄却法の提案と検証
16:07　○竹谷 友之[1]，戸谷 吉博[2]，佐藤 美和[1]，二井手 哲平[2]，田邉 麻衣子[1]，清水 浩[2]，神鳥 明彦[1]　（[1]日立研開・基礎研，[2]阪大院・情報）

2E4p13　枯草菌をドナーとした接合伝達体による遺伝子組換え系構築
16:18　○須田 和奏，朝井 計　（東農大）

2E4p14　ε-poly-L-α-lysine-doxorubicin コンジュゲートを用いたDNA 導入技術の開発
16:29　○山中 雅喜，武内 大和，長谷部 文人，丸山 千登勢，濱野 吉十　（福井県大院生物資源）

E5 会場　午前の部（9:30〜12:20）

微生物—物質生産-発酵（二次代謝産物）/物質生産-微生物変換，酵素反応，機能性高分子—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E5a01　微生物を利用した熟成サーモンに含まれる血圧降下作用物質の分析
9:30　○片山 太智[1]，村上 周一郎[2]　（[1]明大院農，[2]明大農）

2E5a02　*Mucor lusitanicus* が生産する抗酸化物質の生産条件の検討
9:41　○坂上 真衣[1]，村上 周一郎[2]　（[1]明大院農，[2]明大農）

2E5a03　大腸菌によるレチナール生産
9:52　○雨宮 彩恵[1]，弘埜 陽子[1]，松田 史生[2]，戸谷 吉博[2]，石井 純[3]，原 清敬[1]　（[1]静県大食栄，[2]阪大院情報，[3]神戸大先端バイオ工研セ）

2E5a04　植物性素材中で D-アミノ酸を生産する *Lactiplantibacillus plantarum* の遺伝学的な特徴に関する解析
10:03　○加田 茂樹，大淵 俊，宮本 真理　（雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所）

2E5a05　ヒト腸内細菌 *Phocaeicola dorei* JCM 13471^T 由来 2 ドメイン型アラニンラセマーゼの組換えタンパク質発現と酵素学的性質の解析
10:14　○牟田口 祐太[1]，塚原 拓也[2]，加田 茂樹[2]　（[1]秋田県大生資，[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E5a06　ウェルシュ菌発現系のための新規発現ベクターの構築
10:33　○加藤 史帆[1]，荒川 利行[1]，成谷 宏文[2]，宮田 茂[1]　（[1]中部大・院・応用生物，[2]十文字女大・人間生活）

2E5a07　ウェルシュ菌による各種リパーゼ遺伝子の発現解析
10:44　○小泉 ありさ，加藤 史帆，加藤 実希，宮田 茂　（中部大・応用生物）

2E5a08　ゲノム編集によるウェルシュ菌へのキシロース資化性とキシラン分解活性の付与
10:55　○内山 奈奈香，川畑 博暉，宮城 侑弥，森山 龍一，宮田 茂　（中部大学・院・応用生物）

2E5a09　ゲノム編集によるウェルシュ菌のグリセロール資化性の改善：グリセロール代謝系遺伝子の発現が増殖に及ぼす影響
11:06　○佐藤 孝祐，佐藤 悠一朗，加藤 実希，矢野 智奈美，宮田 茂　（中部大・院・応用生物）

2E5a10　各種発酵経路の遺伝子欠失と補充がウェルシュ菌のグリセロール資化性に及ぼす影響
11:17　○宮本 航太，佐藤 悠一朗，矢野 智奈美，森山 龍一，宮田 茂　（中部大院応用生物）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2E5a11　超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株のアルコール脱水素酵素遺伝子の機能解析
11:36　○近藤 雪[1]，池田 裕布里[1]，新谷 政己[1,2]，吉田 信行[1]　（[1]静大院・総合技科，[2]静大・グリーン研）

2E5a12　超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株を用いたポリヒドロキシアルカン酸の生産
11:47　○大塚 彬弘[1]，岸本 晃次郎[1]，池田 裕布里[1]，折田 和泉[2]，吉田 信行[1]　（[1]静大院・総合科技，[2]東工大・生命理工）

2E5a13　超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株を用いたトリアシルグリセロールの生産
11:58　○岸本 晃次郎，大塚 彬弘，池田 裕布理，吉田 信行　（静大院・総合技科）

2E5a14　天然ゴム資化性放線菌のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝に関与するアルデヒド 脱水素酵素の同定
12:09　○川極 幸村[1]，儀武 菜美子[1]，ダム トゥイ ハン[2]，レー トゥアン[2]，谷川 大輔[3]，佐藤 伸[4]，グエン ラン フオン[2]，笠井 大輔[1]　([1]長岡技科大院･物質生物，[2]ハノイ工大･生物，[3]呉高専･環境，[4]鳥取環境大･環境)

E5 会場　午後の部(13:50〜16:40)

微生物―物質生産-微生物変換，酵素反応，機能性高分子―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2E5p01　*Leuconostoc citreum* KD3 株由来多糖合成酵素の基礎性状および転写発現量の解析
13:50　○吉田 健太郎[1]，阿部 秀飛[3]，柴田 栞里[3]，田中 裕大[2]，巻田 春香[2]，松本 健司[2]，本多 裕司[2]，小柳 喬[2]　([1]石川県大院 生資環，[2]石川県大　生資環，[3]サンエイ糖化)
2E5p02　発酵漬物由来 Leuconostoc citreum KD3 株のα-1,2 分岐デキストランの産生量およびグリコシド結合様式に培養条件が及ぼす影響
14:01　○伊藤 日向子[1]，吉田 健太郎[2]，柴田 栞里[3]，阿部 秀飛[3]，本多 裕司[1]，松本 健司[1]，小柳 喬[1]　([1]石川県立大　生資環，[2]石川県立大院　生資環，[3]サンエイ糖化)
2E5p03　モデル藍藻 Synechocystis sp. PCC6803 由来新規硫酸多糖シネカンの合成・制御機構の解明と生産性向上
14:12　○前田 海成[1]，榎本 元[2]，大舘 和真[3]，渡辺 智[3]，田中 寛[1]，池内 昌彦[4]　([1]東工大化生研，[2]電通大基盤理工，[3]東京農大生命，[4]東大)
2E5p04　藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の細胞外硫酸多糖 シネカンの大量生産系の確立と有用性の探索
14:23　前田 海成[1]，○大舘 和真[2]　([1]東工大･研究院･化生研，[2]東農大院･バイオ)
2E5p05　ペクチンからのポリヒドロキシアルカン酸生合成と合成菌の単離
14:34　○唐渡 龍平[1,2]，久留主 理人[2]，戸田 匠紀[2]，本田 正義[3]，阿部 英喜[4]，外村 彩夏[2]，白土 英樹[1,5]　([1]熊本県大院･環境共生，[2]東海大･農，[3]東京理科大･工，[4]理研 CSRS，[5]熊本県大･環境共生)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2E5p06　8-Prenylnaringenin 生産に関する研究 (1) ヒト腸内細菌のスクリーニングと共培養による効率的生産
14:53　○丹野 麻由[1]，植村 圭祐[1]，大谷 彬[2]，中島 賢則[3]，三橋 和也[2]，山本 浩明[3]，前田 智也[1]，横田 篤[1]，吹谷 智[1]　([1]北大院農，[2]株式会社ダイセル･ヘルスケアSBU，[3]株式会社ダイセル･事業創出C)
2E5p07　8-Prenylnaringenin 生産に関する研究 (2) サポート菌のスクリーニングとその活用による脱メチル化促進法
15:04　○大谷 彬[1]，中島 賢則[2]，三橋 和也[1]，丹野 麻由[3]，前田 智也[3]，横田 篤[3]，吹谷 智[3]，山本 浩明[2]　([1]株式会社ダイセル･ヘルスケアSBU，[2]株式会社ダイセル･事業創出C，[3]北大院農)
2E5p08　コリネ型細菌におけるメチルアンスラニレート耐性機構の解明とバイオ生産
15:15　○新居 大樹[1]，小暮 高久[1,2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大･バイオ，[2]RITE)
2E5p09　コリネ型細菌によるスクアレン生産
15:26　○尾上 友里奈[1]，清水 崇史[2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大･バイオ，[2]RITE)
2E5p10　コリネ型細菌によるフェルラ酸からのバニリン生産
15:37　○松富 優一[1]，小暮 高久[1,2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大･バイオ，[2]RITE)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2E5p11　指向性進化法によるバニリン合成酵素の機能改変
15:56　○藤巻 静香[1]，木野 邦器[2]，廣瀬 修一[3]，白坂 直輝[3]，牛尾 慎平[3]，古屋 俊樹[1]　([1]東京理科大院･創域理工，[2]早大･先進理工，[3](株)長瀬産業)
2E5p12　サトウキビバガスに由来する芳香族化合物からのバニリン酸生産に伴うシリンガ酸の分解抑制とその解消
16:07　○池田 和磨[1]，児玉 直哉[2]，大川 全[3]，樋口 雄大[1]，上村 直史[3]，政井 英司[3]，園木 和典[1]　([1]弘前大農学生命，[2]弘前大院農学生命，[3]長岡技科大物質生物)
2E5p13　フラビン依存性酸化酵素を利用したヒドロキシダイゼインの合成
16:18　○渡部 祥智子[1]，小原 亜希子[2]，卯川 裕一[2]，松山 彰収[2]，古屋 俊樹[1]　([1]東京理科大院･創域理工，[2](株)ダイセル)
2E5p14　*Shewanella oneidensis* MR-1 株を用いた 1,6-ヘキサンジオールの合成
16:29　○長谷川 優希[1]，富田 啓介[1]，中島 雄次[2]，半澤 敏[2]，高妻 篤史[1]，渡邉 一哉[1]　([1]東薬大生命，[2]東ソー株式会社)

E6 会場　午前の部(9:30〜12:20)

微生物―遺伝子-発現制御，トランスクリプトーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E6a01　Identification of plant signals inducing the *hrp* regulon in a plant pathogen *Ralstonia solanacearum* and the cognate receptor proteins
9:30　○Gyokuchiku SOU[1]，Masayuki Tsuzuki[2]，Akinori Kiba[2]，Yasufumi Hikichi[2]，Kouhei Ohnishi[2]　([1]Ehime Univ.，[2]Kochi Univ.)
2E6a02　Regulation mechanism of two master regulator genes *hrpG* and *prhG* in *Ralstonia solanacearum hrp* regulon
9:41　○Ki CYO，Akinori Kiba，Yasufumi Hikichi，Kouhei Ohnishi　(Kochi Univ.)
2E6a03　アミノ酸代謝グローバルレギュレーター GcvB small RNA を制御するスポンジ RNA
9:52　○宮腰 昌利　(筑波大医)
2E6a04　*adiA* mRNA 3'UTR から生成する新規 sRNA による大腸菌酸耐性の発現制御
10:03　○神田 健，宮腰 昌利　(筑波大医)
2E6a05　細菌 CSD タンパク質の標的 RNA 特異性を定義する分子基盤
10:14　○森田 鉄兵[1,2]，長谷川 智[2,3]，猪瀬 礼璃菜[2]　([1]慶大院政メ，[2]慶大先端研，[3]慶大環境情報)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E6a06　Shewanella oneidensis の電極バイオフィルム形成制御における鞭毛の関与
10:33　○出水 智樹，松元 陽歩，高妻 篤史，渡邉 一哉　(東京薬科大学院生命)
2E6a07　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における c-di-GMP シグナルによる電気化学活性バイオフィルムの活性化
10:44　○岩波 奈那江，松元 陽歩，高妻 篤史，渡邉 一哉　(東薬大生命)
2E6a08　*Ideonella sakaiensis* における MHETase と TPA 代謝遺伝子の発現解析
10:55　○田中 裕也[1]，平賀 和三[1]，乾 将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大･バイオ)
2E6a09　大腸菌における機能未知転写因子 YegW による新規グリコーゲン代謝制御
11:06　○齋藤 駿介[1]，小林 一幾[1]，保科 元気[2]，島田 友裕[1]　([1]明治大農，[2]法政大生命)

2E6a10　The phosphorylation status of the three-component phosphoprotein TcmV is responsive to the light reaction electron transfer in a cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942
11:17　○Xuan HUANG[1,2], Hitomi IMAMITSU[1,2], Ying LUO[1,2], Kan TANAKA[2]　([1]Life. Sci. Tech., Tokyo Tech, [2]Chem. Life. Sci., Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

2E6a11　大腸菌における翻訳促進新生ペプチドの網羅的探索
11:36　○加藤 晃代[1], 西河 佑馬[1], 中野 秀雄[1], 横山 源太朗[2,3], 浜田 道昭[2,3], 本野 千恵[2,4]　([1]名大院生命農, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]早大院先進理工, [4]産総研細胞分子)
2E6a12　Role of *Ke*-GroESL Chaperonin in Acetic Acid Bacterium *Komagataeibacter europaeus*: Stress Response and Heterologous Protein Stabilization
11:47　○Princessa Aulia Rahmayuliana[1], Yuya Tanakura[1], Soichiro Ikuta[2], Shinsuke Fujiwara[1,2]　([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Technol., Kwansei-Gakuin Univ., [2]Dept. of Biosci., Sch. of Biol. and Environ. Sci., Kwansei-Gakuin Univ.)
2E6a13　ポリシストロニック遺伝子の短鎖連結発現に影響する配列因子の解析
11:58　大﨑 南美[1], 戸下 侑大[2], 大城 隆[2,3], ○鈴木 宏和[2,3]　([1]鳥取大院・持続創生, [2]鳥取大・工, [3]鳥取大・GSC)
2E6a14　大腸菌 BasS/BasR-CsgD カスケードを介する Fe^{3+} 依存的な curli 合成と Fe^{3+}-シデロフォア輸送系の発現制御機構
12:09　○松吉 志[1,2], 小笠原 寛[2,3,4,5]　([1]信州大院・総理工, [2]信州大・基盤研究セ, [3]信州大・総合人間科学, [4]RCAM, [5]IFES)

E6 会場　午後の部(13:50〜16:40)

微生物—遺伝子・発現制御，トランスクリプトーム—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

2E6p01　急性脳症事件を引き起こしたスギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)の子実体および菌糸体の RNA-Seq 解析
13:50　○渡邊 望[1], 佐藤 匠[1], 三ッ國 佳祐[1], 小野 晶子[1,2], 鈴木 智大[1]　([1]宇都宮大・バイオ, [2]森林総合研究所)
2E6p02　サナギタケのレクチン遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析
14:01　○松田 里菜[1], 張 吉麗[1], 佐藤 匠[1], 三ッ國 佳祐[1], 茅谷 佳祐[1], 小野 晶子[2], 鈴木 智大[1]　([1]宇都宮大・バイオ, [2]森林総合研究所)
2E6p03　エリスリトールの誘導性プロモーター及び資化性低減株を組み合わせた糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるタンパク質生産技術の構築
14:12　○一瀬 桜子, 柴田 望, 高橋 史員, 小山 伸吾　(花王)
2E6p04　担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* のキシラナーゼプロモーターを活性化する制御因子(スイッチ)の同定
14:23　○三浦 敦宏[1], 田中 拓未[1], 坂井 寛章[2], 田中 瑞己[3], 森田 友岳[4], 北本 宏子[1]　([1]農研機構・農環研, [2]農研機構・高分析研, [3]農工大院・農, [4]産総研・機能化学)
2E6p05　ウシグソヒトヨタケに保存されている光受容体の分光特性
14:34　○伏見 圭司[1], 深澤 茉愛[2], 星野 宏季[2], 村口 元[3], 坂本 裕一[4], 成川 礼[2]　([1]神戸大・イノベ, [2]都立大・理学, [3]秋田県大・生物資源, [4]岩手生工研・生物資源)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

2E6p06　麹菌における CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を利用した多コピー遺伝子導入方法の確立
14:53　○張 斯来, 五味 勝也, 新谷 尚弘　(東北大院農)
2E6p08　麹菌における N-end rule の検証
15:15　○田中 瑞己[1], 大庭 麻緒[2], 河原崎 泰昌[2], 山形 洋平[1] ([1]農工大院農応生化, [2]静県大食栄養)
2E6p09　*Pseudomonas* sp. NGC7 株におけるフェルラ酸代謝系遺伝子群の転写制御システム
15:26　○大川 全[1], 樋口 雄大[2], 園木 和典[2], 上村 直史[2], 政井 英司[1]　([1]長岡技科大・物質生物, [2]弘前大・農学生命)
2E6p10　細菌におけるリグニン由来二量体芳香族化合物代謝系を包括的に制御する LigS の転写制御システム
15:37　○加藤 諒[1], Bleem Alissa[2], Kuatsjah Eugene[2], 片平 類[2], 菱山 正二郎[3], Beckham Gregg T.[2], 上村 直史[1], 政井 英司[1]　([1]長岡技科大・物質生物, [2]National Renewable Energy Laboratory, [3]森林総合研究所 森林資源科学研究領域)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

2E6p11　メタン生成アーキアにおけるセレンタンパク質の転写はセレンによって制御される
15:56　○青野 陸[1], 小野田 幹久[1], 井上 真男[1,2], 越智 杏奈[1], 三原 久明[1]　([1]立命大・生命, [2]立命大・R-GIRO)
2E6p12　大腸菌の硫化水素応答性転写因子 YgaV は内在性硫化水素合成に依存して鉄の取り込みを制御する。
16:07　○野々山 翔太[1], 前野 慎太朗[3], 林 哲也[2], 増田 真二[1] ([1]東工大・生命理工, [2]九州大・院医, [3]山口大・農)
2E6p13　リン脂質および糖脂質 MPIase 生合成に関わる CDP-ジアシルグリセロール生合成酵素をコードする *cdsA* 遺伝子の翻訳開始領域の解析
16:18　○日景 瑠那[1], 関谷 優晟[1], 沢里 克宏[2], 西山 賢一[1]　([1]岩大農, [2]テキサスヒューストン大)
2E6p14　枯草菌における tRNA レパートリーの解析
16:29　○相馬 亜希子, 山川 律穂, 高地 司, 河村 富士夫, 大久保 雄馬　(千葉大園芸院)

E7 会場　午前の部(9:30〜12:09)

食品—食品化学・糖質，脂質/食品化学・タンパク質・アミノ酸—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

2E7a01　多価不飽和脂肪酸の酸化は刺激味受容体 TRPA1 活性を増強させる
9:30　○金子 晏生[1], 松山 南[1], 山本 紘義[2], 須﨑 健太[2], 笹原 亮[2], 木原 明彦[2], 小林 英明[2], 伊藤 圭祐[1], 寺田 祐子[1]　([1]静岡県大院薬食, [2]キユーピー株式会社)
2E7a02　近赤外分光分析で挑むオリーブオイルの酸化度予測
9:41　○楠本 惟吹[1], 加藤 俊治[1,2], 乙木 百合香[1], 境野 眞善[3], 青木 亮輔[1,3], 齋藤 三四郎[3], 佐藤 俊郎[2,3], 今義 潤[3], 仲川 清隆[1,2] ([1]東北大院・農・食品機能分析, [2]東北大院・農・J-オイルイノベ, [3](株)J-オイルミルズ)
2E7a03　オリーブオイルの香りの生成経路の解明
9:52　○加藤 俊治[1,2], 境野 眞善[3], 青木 亮輔[2,3], 斎藤 三四郎[3], 佐藤 俊郎[1,3], 今義 潤[3], 仲川 清隆[1,2]　([1]東北大院・農・J-オイルイノベ, [2]東北大院・農・食品機能分析, [3](株)J-オイルミルズ)
2E7a04　BODIPY の誘導体化によるハイブリッド蛍光色素合成および疎水性相互作用を利用したオリゴ糖の定量
10:03　○住田 真利奈[1], 柏﨑 玄伍[1], 渡辺 凌[1], 中 亮太[1], 西川 晃弘[1], 日幸 隆雄[2], 北山 隆[1]　([1]近畿大院農, [2]福井県大生物資)
2E7a05　ガラクトオリゴ糖の加熱による 3-デオキシグルコソン形成要因の解明
10:14　○安達 志哉, 松本 均, 能見 祐理　(新潟薬大応生科)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

2E7a06　多重変異系統の固体 NMR による澱粉構造と米粉特性の評価
10:33　○堀 清純[1], 永松 大輝[2], 飯島 健[1], 朱 紅加[1], 藤田 直子[3], 加藤 悦子[4]　([1]農研機構, [2]東大・新領域創成科学, [3]秋田県立大・生物資源, [4]東洋大・食環境科学)

2E7a07　低アミロース米品種「スノーパール」から作出された高アミロース米変異体の澱粉特性
10:44　○佐々木 朋子[1]，鈴木 保宏[2]　([1]農研機構，[2]JATAFF)

2E7a08　山田錦の醸造適性にかかわる麹特性と醪の分解性について
10:55　○大塚 正睦[1]，辻井 良政[2]，数岡 孝幸[3]　([1]東京農大院･農化，[2]東京農大応生･農化，[3]東京農大応生･醸造)

2E7a09　粘質系焼きいもに分類されるサツマイモの β-アミラーゼ活性と澱粉の性質との関係
11:06　○本多 裕司[1]，小野 花月[1]，坂本 知昭[1]，高木 宏樹[1]，濵田 達朗[1]，大西 知子[2]，林 美央[2]　([1]石川県大･生資環，[2]石川農総研セ)

2E7a10　澱粉から得られる短直鎖糖質の諸性質と食品への応用
11:17　○河野 敦，山本 智大，吉田 洋則　(昭和産業株式会社)

a11～a13 発表者の接続時間 11:28～11:36

2E7a11　ホエー蛋白質の変性および凝集特性
11:36　○山川 忠則　(株式会社明治)

2E7a12　脱脂粉乳における凝乳性低下の要因解明
11:47　○安藤 浩貴[1]，小野 航[2]，岡 大貴[3]，野口 智弘[2]　([1]東京農大院･農化，[2]東京農大応生･食加技セ，[3]東京農大応生･農化)

2E7a13　Specific release of opioid peptide CM-12 from A2-type casein with *Aspergillus oryzae* alkaline protease that cleaves at the C-terminus of Ser–Leu–Xaa
11:58　○Yingjie CUI，Nobuhiro Hayashi，Naoyuki Yamamoto (Tokyo Institute of Technology)

E7 会場　午後の部(13:50～16:40)

食品―食品化学-タンパク質・アミノ酸―

p01～p05 発表者の接続時間 13:42～13:50

2E7p01　乾熱処理オボアルブミンに存在する可溶性凝集体および部分断片の形成段階検討
13:50　○小山 翔大[1,2]，児玉 大介[3]，半田 明弘[1,4]，辻井 良政[1,2]　([1]東京農大キユーピーエッグイノベーション，[2]東京農大応生･農化，[3]キユーピー(株)，[4]東京電機大学)

2E7p02　疎水性相互作用によるゲル形成における脂肪酸種類の影響
14:01　○神田 玲奈，山川 忠則　(株式会社 明治)

2E7p03　ゴマ由来化合物による phenol 生成酵素の阻害試験
14:12　○及川 大樹[1]，阿部 高明[2]，片山 高嶺[1]，中山 亨[3]　([1]京大院生命，[2]東北大院医，[3]東北大院工)

2E7p04　ペプチド制御による発泡酒のマウスフィール向上
14:23　○森下 あい子，望月 マユラ，加藤 優　(キリンHD飲料未来研)

2E7p05　バリン欠乏がマウスの腸管に及ぼす影響
14:34　○田島 由梨花[1]，香西 歩[1]，東 侑里[1]，岩槻 健[1]，美谷島 克宏[1]，清水 誠[2]，小西 良子[1]，只石 幹[1]，服部 一夫[1]　([1]東農大･応生，[2]東農大)

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:53

2E7p06　大豆多糖との複合体化による β-コングリシニンの機能改変
14:53　○田中 希実，若生 悠希，好田 正，服部 誠　(東農工大院･応生化)

2E7p07　タンパク質食品に対し凍害保護効果を示す大豆ホエー由来タンパク質の分画
15:04　○南部 美貴[1]，岡 大貴[2]，辻井 良政[2]　([1]東京農大院･農化，[2]東京農大応生･農化)

2E7p08　プラントベースミートを目指した新たな植物タンパク質「ムクナ豆分離タンパク質」の可能性
15:15　○岡 大貴，中川 莉歌，伊藤 あかり，辻井 良政　(東京農大応生･農化)

2E7p09　培養肉の風味向上のための細胞内アミノ酸分析
15:26　○古橋 麻衣[1,2]，澤山 淳[3]，竹内 昌治[1,2,3]　([1]東大院工，[2]東大生研，[3]東大院情報理工)

2E7p10　新しい食品材料としての納豆菌
15:37　○升水 友太[1]，深瀬 寛太[4]，佐々木 伸啓[2]，髙橋 栄子[4]，荒川 和晴[3]，大橋 由明[2]，斎藤 菜摘[4]　([1]鶴岡高専　専攻科，[2]フェルメクテス(株)，[3]慶大先端生命研，[4]鶴岡高専　創造工)

p11～p14 発表者の接続時間 15:48～15:56

2E7p11　小麦リポキシゲナーゼアイソザイムのグルテニンサブユニット構成変化に与える影響
15:56　○高 悦，宮城 怜奈，高橋 俊介，椎葉 究　(東京電機大院)

2E7p12　小麦リポキシゲナーゼアイソザイムの可溶性グルテニンサブユニット構成変化に与える影響
16:07　○宮城 怜奈，高 悦，高橋 俊介，椎葉 究　(東京電機大学)

2E7p13　ω-5 グリアジンを分解するマイタケ由来酵素の同定
16:18　○大小田 直史，平野 真衣，川端 真由，陸 鵬，伊藤 英晃，岡本 研，鈴木 道生，奥田 傑，永田 宏次　(東大院農)

2E7p14　種々の溶液中での米タンパク質の溶出
16:29　○大能 俊久，児玉 一馬　(福井工大)

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名(所属)

B1 会場　午後の部(14:01〜16:18)

食品—食品工学-製造工学，加工学/食品工学-物性，分析/食品工学-その他—

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

3B1p02　培養肉生産に用いる資源と市販肉とのトランスクリプトーム解析
14:01　○田村 倫子[1]，樗澤 怜[1]，輿石 雄一[2]，清水 達也[3]，五十君 靜信[4]　([1]東農大･応生物，[2]東農大･ゲノム解析セ，[3]東女医･先端生命医研，[4]東農大･食品安全研究セ)

3B1p03　高度α化小麦粉の添加による小麦粉二次加工品の硬化抑制とその機序解析
14:12　○丸田 草太[1]，木元 絵梨[1]，南部 優子[1]，谷 史人[1]，佐藤 開[2]，松村 康生[3]，松宮 健太郎[1]　([1]京大院農，[2](株)日清製粉グループ本社･基礎研究所，[3]京大生存研)

3B1p04　国産強力品種「夏黄金」の小麦粉生地の強力性を決定する理化学的要因の解析
14:23　○石塚 貴大[1]，松宮 健太郎[1]，池永 幸子[2]，南部 優子[1]，中村 俊樹[2]，松村 康生[3]　([1]京大院農，[2]東北農研，[3]京大生存研)

3B1p05　Alkaline treatment of soy protein isolate improves foaming capacity of egg-free cakes via increased starch gelatinization
14:34　○VARISARA VARANURANGSEE[1], HIROYUKI KANATANI[2], YUKO NANBU[1], YOSHIHIKO SAITO[2], FUMITO TANI[1], KENTARO MATSUMIYA[1]　([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Fuji Oil Co., Ltd.)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3B1p06　液中に液体を描画する技術に基づく 3D デザイン飲料の開発
14:53　○井之上 一平[1]，花崎 逸雄[2]　([1]サントリーグローバルイノベーションセンター(株)，[2]農工大)

3B1p07　米麹の配合によりフィチン酸分解・イノシトール生成を促進する玄米甘酒の製法開発
15:04　○丸井 淳一朗[1]，白石 洋平[2]，竹浦 澪[2]，シリナン ションプーセン[3]，パティナン ワリチャナン[3]，サイビセン ブロム[4]　([1]国際農研，[2]ビオック，[3]カセサート大食品研，[4]ラオス大農)

3B1p08　経皮電気刺激によって食品の味を調節する新しい呈味調節技術の検証
15:15　○松本 凌[1]，船水 拓実[1]，藤本 典大[1]，菅野 京子[1]，林 和寛[1]，伊地知 千織[1]，小野 信和[1]，暦本 純一[2]，中村 裕美[2]　([1]味の素株式会社，[2]東京大学大学院 情報学環･学際情報学府)

3B1p09　硬水は噴霧化により軟化できる
15:26　○久保 和弘[1]，春見 真柚[1]，山下 貴敏[2]　([1]岐阜大教育，[2]株式会社TKS)

3B1p10　乳酸菌を用いたジカウイルスに対する経口粘膜ワクチン開発の検討
15:37　○川﨑 淳矢[1]，西埜 菜津紀[2]，阪上 仁頌[1]，正木 秀幸[1,2]，芦田 久[1,2]　([1]近大院生物理工，[2]近大生物理工)

p11〜p12 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3B1p11　水素 / 重水素交換質量分析によるヒト血清アルブミンの泡沫表面での構造解析
15:56　○鳥巣 哲生，榎本 敢太，水口 潤哉，田之上 凌佑，内山 進　(阪大院工)

3B1p12　卵白アルブミンとリゾチームの相互作用および構造と泡沫特性の解析
16:07　鳥巣 哲生，○水口 潤哉　(大阪大学工学研究科)

C1 会場　午後の部(14:01〜16:07)

環境科学・バイオマス利用—資源変換，資源再生利用—

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

3C1p02　脱 Mg 海水を用いた炭酸カルシウム合成系への有機物の影響評価
14:01　○永野 湧貴[1]，安元 剛[2]，森安 賢司[3]，吉馴 太一[3]，鈴木 道生[1]　([1]東大院農，[2]北里大海洋生命，[3]日本海水)

3C1p03　ウニの硬組織の Mg の取り込み機構に関する解析
14:12　○小川 紗里奈[1]，浪川 勇人[2]，川野 潤[3]，加藤 由悟[2]，鈴木 道生[2]　([1]東大農，[2]東大院･農，[3]北大院･理)

3C1p04　琵琶湖水圏のオオカナダモ付着微生物によるマンガン除去能
14:23　○原田 英美子[1]，北川 博翔[1]，黒沢 高秀[2]，所 雅人[3]，保倉 明子[4]　([1]滋賀県大環境，[2]福島大共生システム理工，[3]東京電機大院工，[4]東京電機大工)

3C1p05　ウコン粉末からのクルクミノイドの高純度抽出回収システムの開発
14:34　○仲井 拓真，甲元 一也　(甲南大FIRST)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C1p06　Generation of disease-suppressive soil capable of inhibiting the growth of Ralstonia solanacearum and Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis by immobilizing multiple-parallel-mineralization microorganisms
14:53　○Meeboon Jamjan[1], Akinori Ando[2,3], Jun Ogawa[2,3], Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Makoto Shinohara[1]　([1]NARO, [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

3C1p07　月面での食料生産を想定した無機肥料製造法の検討
15:04　○中島 英理夏，篠原 信，田中 章浩　(農研機構)

3C1p08　ポリビニルアルコール担体を用いた乳酸資化性メタン発酵系の構築
15:15　○上村 太起[1]，鈴木 いぶき[1]，西山 辰也[1]，松林 未理[2]，片岡 直明[2]，上田 賢志[1]　([1]日大院生物資源，[2]水ingエンジニアリング(株))

3C1p09　北海道・天北炭田褐炭層の原位置環境を活用したバイオメタン生成の取り組みについて
15:26　○上野 晃生[1]，佐藤 聖[1]，玉村 修司[1]，村上 拓馬[1]，猪股 英紀[1]，青山 秀夫[2]，酒井 智生[2]，長沼 毅[3]，五十嵐 敏文[1,4,5]　([1]幌延地圏環境研究所，[2]UBE三菱セメント株式会社，[3]広島大院統合生命科学研究科，[4]旭川高専，[5]北海道大学工学研究院)

3C1p10　下水汚泥中の有機物評価と好気性高温発酵による分解促進
15:37　○添田 紗也加，矢野 紘子，吉井 貴宏，大島 泰郎　(共和化工･環境微生物研)

p11 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3C1p11　大豆ホエーのバイオスティミュラント効果に関する研究
15:56　○長底 正悟，久保 幹　(立命館大学生命科学部)

C2 会場　午前の部（9:30〜12:20）

有機化学，天然物化学―単離構造決定（微生物）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3C2a01　新規ペプチドグリカン生合成経路阻害剤の探索
9:30　梅津 秀平[1]，角田 毅[2]，鬼柳 春花[1]，稲橋 佑起[3,4]，野中 健一[3,4]，○小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工，[3]北里大大村研，[4]北里大院感染制御)

3C2a02　新規メナキノン生合成経路阻害剤の探索
9:41　○鬼柳 春花[1]，菊池 麻里江[1]，角田 毅[2]，野中 健一[3,4]，稲橋 佑起[3,4]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工，[3]北里大大村研，[4]北里大院感染制御)

3C2a03　シグナル分子 A-factor に類似するγ-ブチロラクトン化合物の化学-酵素合成と放線菌からの迅速同定
9:52　○工藤 雄大[1,2]，此木 敬一[2]，山下 まり[2]　([1]東北大学際研，[2]東北大院農)

3C2a04　*Paraphaeosphaeria* sp. KT4192 が生産する新規スピロビスナフタレン誘導体
10:03　○金原 龍飛，生沼 悠希，前多 隼人，田中 和明，橋本 勝（弘前大農生）

3C2a05　paraphaeoketone 類の単離と paraphaeolactone 類生合成の再検討
10:14　○生沼 悠希[1]，金原 龍飛[1]，兼平 類[1]，西川 俊夫[2]，田中 和明[1]，橋本 勝[1]　([1]弘大農生，[2]名大生命農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3C2a06　ゲノムマイニングによる新規プレニル化 lasso peptide の発見
10:33　○堤 隼馬[1,2]，稲橋 佑起[1,2]　([1]北里大院・感染制御科学府，[2]北里大・大村智記念研究所)

3C2a07　分離糸状菌 *Neohendersonia kickxii* 749 株の生産するフェニルエーテル誘導体について
10:44　○高橋 怜央，小関 卓也，塩野 義人　（山形大農）

3C2a08　物理化学的手法による放線菌の選抜および放線菌 24R005 の生産する新規 DPPH ラジカル捕捉物質：24R005A および 24R005B
10:55　○阿部 真夕，菰田 俊一　（宮城大食産業）

3C2a09　薬剤超感受性出芽酵母を基盤としたスクリーニングによる抗植物病原性真菌物質の発見
11:06　○本間 颯太[1,2]，君嶋 葵[1,2]，本庄 雅子[1,2]，小島 裕貴[1,2]，常盤 俊之[1,2]，西冨 あつか[1]，加藤 聡[1]，近藤 直純[1]，藤 晋一[3]，知念 拓実[4]，荒木 康子[5]，高橋 理[5]，臼井 健郎[6]，伊藤 考太郎[5]，浅見 行弘[1,2]　([1]北里大感染制御，[2]北里大大村研，[3]秋田県大生資，[4]東大院薬，[5]キッコーマン（株），[6]筑波大生命環境)

3C2a10　放線菌門細菌の細胞融合による二次代謝産物の探索
11:17　○黒川 航志[1]，西本 一貴[1]，辻 瑞紀[1]，北川 航[2]，澄本 慎平[1]，岡田 正弘[1]　([1]神奈川大学，[2]国立研究開発法人産業技術総合研究所)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3C2a11　Structure revision of tricholomenyn B
11:36　○Md. Julkar Nime，Yuna Oguri，Naoya Oku，Yasuhiro Igarashi　(Toyama Pref. Univ.)

3C2a12　インドネシア由来放線菌における二次代謝産物の広範なスクリーニング
11:47　○大垣 翔[1]，むすりみん るくまん[1]，あり ありむでぃん[2]，荒川 賢治[1]　([1]広島大院・統合生命，[2]マカッサル州立大学)

3C2a13　*Talaromyces* 属由来の新規アラニン結合ポリケチドの単離，構造決定及び抗ウイルス活性評価
11:58　○模素 希[1]，安河内 美月[1]，中嶋 章悟[2,3,4]，中村 洸[1]，小方 雅也[1]，井口 恵太[1]，菅野 和紀[1]，杉田 和俊[1]，村上 裕信[1,5]，倉持 幸司[6]，竹田 志郎[1,5]，渡士 幸一[2,3,6]，藤野 寛[1,5]，紙透 伸治[1,5]　([1]麻布大獣医，[2]感染症研 ウイルス第二部，[3]感染症研 治療薬・ワクチン開発研究センター，[4]福祉村病院 長寿医研，[5]麻布大ヒトと動物の共生科学センター，[6]東理大理工)

3C2a14　糸状菌 F8203 株が生産する抗真菌活性物質の単離および構造決定
12:09　○大塚 みゆき，矢野 考汰，高見澤 花　（玉川大学農)

C2 会場　午後の部（13:50〜16:40）

有機化学，天然物化学―単離構造決定（微生物）/単離構造決定（動物，植物）/代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3C2p01　培養条件に依存するナラタケが産生する二次代謝産物の探索
13:50　○金 都会[1]，崔 宰熏[1,2,3,4,5]，ウ ジン[4,5]，平井 浩文[1,2,3,4,5]，河岸 洋和[4,5]　([1]静大院創造，[2]静大グリーン研，[3]静大共創，[4]静大農，[5]静大キノコ科研)

3C2p02　ヒメマツタケ（*Agaricus blazei*）菌糸体由来の新規化合物の構造決定
14:01　○王 俊紅[1]，呉 静[2,3]，小椋 隆平[2]，小堀 一[4]，崔 宰熏[1,2,3,5]，平井 浩文[1,2,3,5]，河岸 洋和[2,3]　([1]静大院・創造，[2]静大・農，[3]静大・キノコ科学研究所，[4]岩出菌学研究所，[5]静大・共創)

3C2p03　New Oxazole type alkaloids from the roots of Oxytropis trichophysa grown in Mongolia
14:12　○Buyankhishig Buyanmandakh[1,2]，Murata Toshihiro[1]，Delgermaa Chinbat[3]，Gantumur Baasandorj[4]，Byambajav Tseesuren[5]，Undarmaa Otgonbaatar[3]，Bertsetseg Dalaijargal[3]，Davaapurev Bekh-Ochir[2,3]，Sasaki Kenroh[1]，Batkhuu Javzan[2,3]　([1]Tohoku Medical and Pharmaceutical University，[2]Graduate School，National University of Mongolia，[3]School of Engineering and Technology，National University of Mongolia，[4]Khovd School，National University of Mongolia，[5]Institute of Veterinary Medicine，Mongolian University of Life Sciences)

3C2p04　モンゴル国産マメ科植物アルカロイド：*Oxytropis lanata* 由来オキサゾールと *Astragalus melilotoides* 由来インドール
14:23　○村田 敏拓[1]，BATBOLD Badarch[2]，黒澤 七海[1]，BUYANKHISHIG Buyanmandakh[2]，菅沼 啓輔[3]，BANZRAGCHGARAV Orkhon[4]，DAVAAPUREV Bekh-Ochir[2]，BATKHUU Javzan[2]，佐々木 健郎[1]　([1]東北医薬大薬，[2]モンゴル国立大，[3]帯畜大原虫病研究セ，[4]モンゴル生命科学大獣医研)

3C2p05　ヒノキ精油に含まれるヒアルロン酸産生促進効果を示す成分の探索
14:34　○前川 実優[1]，勝崎 裕隆[1]，早川 琢也[2]，奥村 克純[1]，安藤 純子[2]，籠谷 和弘[2]　([1]三重大院生資，[2]辻製油株式会社)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C2p06　ザクロ葉に含まれる新規エラジタンニンモノマーの構造とその抗糖化活性
14:53　○岩岡 裕二[1]，CHEEWAPHAN Apinya[1]，桑村 真由[1]，好村 守生[2]，天倉 吉章[1]，伊東 秀之[1]　([1]岡山県大院，[2]松山大薬)

3C2p07　ブラックベリー葉に含まれる機能性ポリフェノールの探索
15:04　○松浦 美晴，増田 雅子，岩岡 裕二，伊東 秀之　（岡山県大院)

3C2p08　電子励起解離(EAD)を用いた殺菌剤イプフルフェノキン代謝物の構造解析
15:15　○岡部 脩平[1]，健田 潮[2]　([1]日本曹達株式会社，[2]株式会社エービー・サイエックス)

3C2p09　金時豆の種皮にカテキノピラノシアニジン A，B が含まれていた
15:26　○吉田 久美[1,2]，浅野 友世[2]　([1]愛工大工，[2]名大院情報)

3C2p10　カワラケツメイ(*Cassia nomame*)の化学成分に関する研究
15:37　○齊藤 哲也[1]，加藤 悦子[1]，佐藤 一[2]，細谷 孝博[1]　([1]東洋大院食環境，[2]ブルカージャパン)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3C2p11　耐熱性放線菌 AY2 が生産する熱ショック代謝物(HSM)の生産制御機構の解析
15:56　○森 柳[1]，齋藤 駿[1]，勝山 陽平[2,3]，大西 康夫[2,3]，荒井 緑[1]　([1]慶應義塾大院理工，[2]東大院農生科，[3]東大CRIIM)

3C2p12　ジャスモン酸メチル処理はカイワレ茎での局所的なリグニン蓄積を誘導する
16:07　○野下 浩二，堀 玲司，伊藤 一志，小川 敦史　(秋田県大生資科)

3C2p13　従属栄養細菌の超低栄養環境での増殖を引き起こす AdhX の基質の検討
16:18　○伊藤 蓮，Stari Leonardo，岸田 康平，大坪 嘉行，永田 裕二　(東北大院･生命科学)

3C2p14　LC/MS/MS 分析および主成分分析による虫糞茶と市販茶の比較
16:29　○丸岡 毅[1]，伊藤 友紀[2,3]，渡邉 淳[2,3]，飯田 順子[2,3]，吉永 直子[1]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]島津製作所，[3]大阪大学･島津分析イノベーション協働研究所)

C3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3C3a01　共培養による新規ラン藻増殖促進細菌の発見とその増殖促進メカニズムの調査
9:30　○TAN Pei-Yu[1]，石田 奨[3]，加藤 勇太[2]，邱 泰瑛[3]，小西 正朗[3]　([1]北見工大院･工，[2]環境大善株式会社，[3]北見工大･工)

3C3a02　バイオマス・光・抑草の関係解析
9:41　○玉田 佑貴，久保 幹　(立命館大学院生命科学研究科)

3C3a03　孟宗竹から抽出した成分の抗炎症作用について
9:52　○田嶋 奈々子，刀祢 重信，平本 茂，椎葉 究　(東京電機大院理工学研究科)

3C3a04　ヨシ分解能を持つ複合系微生物の探索
10:03　○三枝 和樹，高品 知典　(東洋院生命科学)

3C3a05　セルロース分解酵素の回収再利用方法の開発
10:14　○中井 葉子[1]，山﨑 清夏[1]，水野 正浩[2]，中島 嘉樹[1]，田中 英樹[1]，田川 聡美[2]，鮫島 正浩[2]，天野 良彦[2]　([1]セイコーエプソン，[2]信州大工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3C3a06　キトサンとカルボキシメチルセルロースからなるポリイオンコンプレックスゲルの合成と医用材料としての応用
10:33　○谷口 さくら[1]，新田 祥子[2]，岩本 博行[1,2]　([1]福山大生命工，[2]福山大GSC)

3C3a07　ビール酵母細胞壁成分によるイネの根張り向上と鉄プラーク形成に起因する無機栄養素吸収の変化
10:44　○小田 蓮乃[1]，落合 久美子[1]，小林 優[1]，山内 一生[2]，北川 隆徳[3]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]CALPIS AMERICA，Inc.，[3]アサヒバイオサイクル(株))

3C3a08　油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂質蓄積量と細胞周期の関係
10:55　○高山 優子[1]，森本 温貴[1]，齋藤 成昭[2]　([1]帝京大学，[2]久留米大学)

3C3a09　マルチストレス耐性酵母 *Pichia kudriavzevii* における耐酸・耐塩性遺伝子の高発現および破壊
11:06　○森口 大輔，大西 寛登，重本 歩睦，松鹿 昭則　(近大院･システム工)

3C3a10　コーヒーかす抽出液を利用した酵母によるバイオスティミュラントの生産
11:17　○河智 夏希[1]，弘埜 陽子[1]，菊川 寛史[1]，袴田 雅俊[2]，高木 啓詞[2]，原 清敬[1]　([1]静県大院薬食生，[2]沼津工業技術支援センター)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3C3a11　サトウキビバガスオルガノソルブリグニン由来の多様な芳香族化合物からバニリン酸を生産する微生物株の作出
11:36　○村木 香渚美[1]，大関 さおり[1]，入山 就[2]，増井 ゆい[2]，大川 全[3]，石丸 裕也[4]，樋口 雄大[1]，吉川 琢也[5]，吉田 曉弘[6]，上村 直史[3]，政井 英司[3]，中坂 佑太[4]，増田 隆夫[4]，園木 和典[1]　([1]弘前大･農生，[2]弘前大院･農生，[3]長岡技科大･物質生物，[4]北大院･工，[5]帯広畜産大･環境農学，[6]弘前大･地域戦略研)

3C3a12　発酵工学と高分子工学の融合：同時抽出発酵重合によるバイオマスプラスチックの直接生産
11:47　○木下 郁心，片岡 親良，麻生 祐司　(京工繊院バイオベース)

3C3a13　顕微鏡観察法によるポリヒドロキシアルカン酸生産過程におけるエネルギー代謝動態解析
11:58　○富士 航至[1]，梶川 彩香[1]，蜂須賀 真一[2]，冨田 宏矢[2]，菊川 寛史[2]，今村 博臣[3]，松本 謙一郎[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工，[3]京大生命)

3C3a14　ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素ブロック共重合メカニズム解析
12:09　○柳川 謙吾[1]，冨田 宏矢[2]，蜂須賀 真一[3]，菊川 寛史[3]，松本 謙一郎[3]　([1]北大院総合化学，[2]阪大生工国際セ，[3]北大院工)

C3 会場　午後の部(13:50〜16:40)

環境科学・バイオマス利用—環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3C3p01　海洋環境でのポリロタキサン生分解に関与する細菌叢の解析
13:50　○儀武 菜美子[1]，安藤 翔太[2]，伊藤 耕三[2]，笠井 大輔[1]　([1]長岡技科大院･物質生物，[2]東大院･新領域)

3C3p02　*Alcanivorax* 属細菌が海洋におけるポリプロピレンの主要な分解者である可能性ー PP の明らかな生分解の初報告
14:01　小池 紘輝[1]，宮本 憲二[2]，○寺本 真紀[1]　([1]高知大農林海洋，[2]慶應大理工)

3C3p03　海水中の微生物数とその挙動，樹脂の生分解活性との関係
14:12　○中山 敦好[1,2]，日野 彰大[1]，川崎 典起[1]，山野 尚子[1]，岡村 秀雄[3]　([1]産総研，[2]神戸大･院･海事，[3]神戸大･内海域セ)

3C3p04　紅藻類オゴノリ科オゴノリの成長と栄養塩吸収への培養温度と窒素化学形態の影響
14:23　○岡田 郁，黒須 泰行，本間 悠里，垣田 浩孝　(日大院総合基)

3C3p05　廃棄アクリロニトリル-ブタジエンゴム(NBR)分解菌の形質転換法の構築
14:34　○石田 拓真[1]，千葉 剛大[3]，杉森 大助[3]，山田 美和[2]　([1]岩手大院･農，[2]岩手大･農，[3]福島大･共生システム理工)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C3p06　土壌細菌のシトクロム P450 を駆動させる脂肪酸アナログを用いた微生物変換手法
14:53　○伊藤 史哉，唐澤 昌之，有安 真也，笠井 千枝，愛場 雄一郎，荘司 長三　（名大院理）

3C3p07　土壌細菌による常圧蒸留残渣油中の炭化水素の生分解
15:04　○境 美晴，守 次朗，カナリー ロバート　（横浜市大院生命ナノ）

3C3p08　乳酸菌によるジルコニウム沈着機構の解析
15:15　○加藤 由悟[1,2]，上原 章寛[2]，松村 大樹[3]，辻 卓也[3]，城 鮎美[2]，武田 志乃[2]，鈴木 道生[1,4]　([1]東大院農，[2]量研機構，[3]原子力機構，[4]東大·微生物イノベ連携機構）

3C3p09　新規 SOFIX データベースの構築およびデータベースに基づく肥沃度向上マニュアル作成・実証
15:26　○長谷川 紘大，久保 幹　（立命館大生命科学部）

3C3p10　マイクロコズム試験による生物学的封じ込め株の環境生残性評価
15:37　○森本 考司，西壕 佑介，石田 丈典，池田 丈，舟橋 久景，黒田 章夫，廣田 隆一　（広大院統合生命）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3C3p11　嫌気性細菌が生産する中鎖脂肪酸による新規土壌消毒法の開発
15:56　○天知 誠吾[1]，鈴木 ちはる[1]，三井 彩花[2]，宇佐見 俊行[1]，門馬 法明[3]　([1]千葉大院園芸，[2]千葉大園芸，[3]園芸植物育種研究所）

3C3p12　モエジマシダと嫌気性細菌を用いた革新的水田土壌浄化システムの開発
16:07　○石丸 明日翔[1]，山村 茂樹[2]，中嶋 信美[2]，青木 仁孝[2]，宮内 啓介[3]，黄田 毅[4]　([1]千葉大院園芸，[2]国環研，[3]東北学院大工，[4]東北大院環境）

3C3p13　ヒ素超蓄積植物根圏のマルチオミクス解析による 圃場環境におけるヒ素吸収促進要因の検討
16:18　○工藤 宏史[1]，韓 凝[2]，横山 大稀[1]，簡 梅芳[2]，菊地 淳[1]，井上 千弘[2]　([1]理研環境資源，[2]東北大環境）

3C3p14　Investigation of clubroot disease occurrence under chemical and organic soil environments
16:29　○Zakirul Islam，Tran Quoc Thinh，Motoki Kubo（Ritsumeikan Univ.）

C4 会場　午前の部（9:30〜12:20）

有機化学，天然物化学—合成，反応機構—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3C4a01　フラボノイドライブラリーの構築に向けた合成法の開発
9:30　○須貝 智也[1,2]，風間 友花[2]，高山 良明[2]，沓村 憲樹[1,2]　([1]筑波大睡眠研究機構，[2]筑波大院数理物質）

3C4a02　コギシギシに含まれるナフタレングルコシドの全合成
9:41　○蒔田 瑞祈，二瓶 賢一　（宇都宮大農）

3C4a03　ギンバイカに含まれるフロログルシノール配糖体の全合成
9:52　○棚瀬 由希乃，二瓶 賢一　（宇都宮大農）

3C4a04　エポキシオレフィンからの共役エンインの合成
10:03　○水本 大貴，西川 俊夫　（名大生命囊）

3C4a05　シクロオクチンの新規合成法の開発
10:14　○菱木 健太，山口 将司，小野 義貴，宮坂 忠親，西川 俊夫　（名大院生命農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3C4a06　アミロイド β の 3 量体モデルに用いる 3 回対称型トリスアミノ酸リンカーの合成研究
10:33　○内野 歩美，塚野 千尋，入江 一浩　（京大院農）

3C4a07　麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成研究（2）
10:44　○廣住 燎亮[1]，長 由扶子[1]，工藤 雄大[2,1]，此木 敬一[1]，長澤 和夫[3]，山下 まり[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学際研，[3]東京農工大院工）

3C4a08　クランベシン B 脱炭酸体の不斉全合成
10:55　○米倉 悠葵，紺野 真秀，尾崎 拓，中崎 敦夫　（岩手大理工）

3C4a09　Myrindole A の合成研究
11:06　○中村 優斗[1]，矢島 新[2]，斉藤 竜男[2]　([1]東農大院生命，[2]東農大生命）

3C4a10　Petchiether A の合成研究
11:17　庄司 篤史[1]，斉藤 竜男[2]，○矢島 新[2]　([1]東農大院生命，[2]東農大生命）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3C4a11　ハリアリ *Gnamptogenys striatula* の道しるベフェロモンの構成成分の合成
11:36　○田代 卓哉[1]，渡辺 裕之[2]　([1]三条市大工，[2]東大院農）

3C4a12　イリドイド配糖体の合成研究
11:47　○西川 俊夫[1]，大岡 左枝[1]，上野山 怜子[2]，白武 勝裕[1]，宮崎 雅雄[2]　([1]名大院生命農，[2]岩手大院連合農学）

3C4a13　ヨウ素を触媒に用いたキナゾリン誘導体の水中下有機溶媒フリー合成法
11:58　○谷森 紳治，鞆谷 祐貴，森脇 美来，槙山 浩平　（阪公大院農）

3C4a14　豊富な天然資源を活用した，ナリルチンの合成
12:09　○須貝 威，徳田 瑠理，能勢 和明，北澤 奈津美，花屋 賢悟，東林 修平　（慶大薬）

C4 会場　午後の部（13:50〜16:40）

有機化学，天然物化学—ケミカルバイオロジー/合成，反応機構—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3C4p01　Vitroprocine 類の合成研究
13:50　○丹 直輝，中井 成美，若森 晋之介，勝田 亮，石神 健（東農大·生命）

3C4p02　11β-HSD1 を阻害するメロテルペノイドの合成研究
14:01　○加藤 光輝，高橋 晴太郎，勝田 亮，石神 健，若森 晋之介　（東農大·生命）

3C4p03　トウダイグサ科植物由来 Lathyrane 型ジテルペン Epoxyboetirane A の左右フラグメントの合成研究
14:12　○北 紗織，入江 一浩，塚野 千尋　（京大院農）

3C4p04　Cyclohelminthol X の合成研究
14:23　○橋本 和樹，橋本 勝　（弘前大農生）

3C4p05　Physalin 類の合成研究
14:34　○山口 耀司，宮津 怜奈，宮坂 忠親，西川 俊夫　（名大院生命農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C4p06　アプリシアトキシン類縁体の網羅的合成法の開発
14:53　○波田 航平，新木 悠介，野倉 吉彦，西川 俊夫　（名大生命農）

3C4p07　ホタルルシフェリンの実用的な one-pot 合成法の開発
15:04　○加藤 まりあ[1]，土橋 一耀[1]，蟹江 秀星[3]，大場 裕一[2]，西川 俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]中部大応生，[3]産総研）

3C4p08　ミトコンドリア機能阻害剤 fusaramin の全合成による立体化学構造の決定，構造活性相関の解明，新規抗真菌活性の発見
15:15　○君嶋 葵[1,2]，萩本 大地[1]，本庄 雅子[1,2]，坂井 克行[1]，本間 颯太[1,2]，藤 晋一[3]，岩月 正人[1,2]，常盤 俊之[2]，野中 健一[1,2]，知念 拓実[4]，臼井 健郎[5]，浅見 行弘[1,2]　([1]北里大院感染制御，[2]北里大大村研，[3]秋田県大生資，[4]東大院薬，[5]筑波大生命環境)

3C4p09　合成生物学を基盤とした赤痢アメーバ病治療薬開発
15:26　○池田 朋奈[1]，大倉 優輝[1]，緒方 南海子[2]，北 将樹[3]，渡辺 賢二[2]，志津 怜太[2]，森 美穂子[4]，中野 由美子[5]，野崎 智義[4]，恒松 雄太[3]　([1]名大農，[2]静岡県大薬，[3]名大院生命農，[4]東大医，[5]国立感染研)

3C4p10　新規 MetAP1 阻害剤の探索と作用機序の解明
15:37　○安藤 知佳[1]，板倉 萌香[1]，北 将樹[1]，緒方 南海子[2]，志津 怜太[2]，恒松 雄太[1]　([1]名大院生命農，[2]静岡県大薬)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3C4p11　合成ユビキノンプローブを用いた出芽酵母のユビキノン取り込みに関与するタンパク質の探索
15:56　○水谷 みらい[1]，黒田 聖奈[1]，奥 公秀[2]，桝谷 貴洋[1]，村井 正俊[1]，三芳 秀人[1]　([1]京都大院農，[2]京都先端科学大 バイオ環境学部)

3C4p12　ミトコンドリア膜透過性亢進を阻害するイソオキサゾール類の作用機構研究
16:07　○渡辺 大賀，桝谷 貴洋，村井 正俊，三芳 秀人　(京大院農)

3C4p13　リン脂質-キナゾリン・ハイブリッド阻害剤を用いた呼吸鎖複合体-I のキノン反応ポケットの解析
16:18　○大谷 燎平，志村 優介，桝谷 貴洋，村井 正俊，三芳 秀人　(京大院農)

3C4p14　*Sphingobacterium* SPT 代謝産物 3-ケトジヒドロスフィンゴシンの立体解析
16:29　○村井 勇太[1,2]，本田 拓巳[3]，生城 浩子[4]，矢野 貴人[4]，門出 健次[2]　([1]北大院農，[2]北大院先端生命，[3]北大院生命，[4]大阪医薬大･医)

C5 会場　午前の部(9:30〜11:28)

微生物―細胞-構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3C5a01　Isolation and preliminary analysis of the protein-based sheath derived from *Haliscomenobacter hydrossis*
9:30　○Anushka DINESH，Nozomi MASUZAWA，Yuta NAKANISHI，Jitsusen CHINN，Minoru TAKEDA (Yokohama Natl. Univ.)

3C5a02　細菌細胞内に局在するファージ尾部様粒子が有する推定エフェクタータンパク質の同定
9:41　○永久保 利紀[1,2]，西山 辰也[3]，浅水 俊平[4,5]，尾仲 宏康[4,6]，野村 暢彦[1,2,7]，豊福 雅典[1,2]　([1]筑波大院･生命環境，[2]筑波大･MiCS，[3]日本大･生物資源，[4]東大院･農，[5]神戸大･先端バイオ，[6]学習院大･理，[7]筑波大･TARA)

3C5a03　*Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢膜形成に関わる遺伝子 *AMIS_66880-66890* の発見と機能解析
9:52　○伊藤 颯人[1]，手塚 武揚[1,2]，大西 康夫[1,3]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]北里大･感染制御，[3]東大･微生物イノベ連携機構)

3C5a04　シアノバクテリアに見出された機械受容チャネルによる代謝物の新奇放出機構
10:03　○釜阪 紘平[1]，加藤 悠一[2]，秀瀬 涼太[2]，松田 真実[2]，近藤 昭彦[1]，蓮沼 誠久[2]　([1]神戸大学イノベ，[2]神戸大学先端バイオ)

3C5a05　出芽酵母の BGL2 先端局在に対する Fab1/Vac14 阻害の影響評価
10:14　○竹下 亘，飯田 泰広　(神奈川工大)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3C5a06　メタノール酵母 *Komagataella phaffii* の Atg12 のリン酸化を介したオートファジー制御機構
10:33　○光部 雅俊[1]，中辻 拓実[2]，齋藤 敬[1]，奥 公秀[3]，白石 晃將[2]，阪井 康能[2]　([1]京大院総合生存学館，[2]京大院農，[3]京都先端科学大･バイオ環境)

3C5a07　分裂酵母の核ー細胞質間輸送因子が関わる核膜構造維持機構の解析
10:44　○柴田 遥[1]，久米 一規[2]，藤本 堯玄[2]　([1]広島大工，[2]広島大院統合生命)

3C5a08　分裂酵母胞子表面のデコボコ構造における α-グルカンの機能
10:55　○関 温子，増田 大輝，中村 太郎　(大阪公立大院理)

3C5a09　分裂酵母 S. Pombe の胞子最外層を構成するタンパク質層の構築メカニズムの解明
11:06　○坂口 智樹[1]，酒井 崇史[2]，吉川 佳里奈[2]，中村 太郎[1]　([1]大阪公立大院理，[2]大阪市立大院理)

3C5a10　分裂酵母の生育に必須な微小管結合因子 Peg1/CLASP の紡錘体形成における役割
11:17　平野 雄大[1]，○湯川 格史[1,2]　([1]広島大･院統合生命，[2]広島大･健康長寿研究拠点)

C5 会場　午後の部(14:01〜16:07)

微生物―遺伝子-構造，機能/その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

3C5p02　ペプチドグリカン構成成分が光触媒殺菌と過酸化水素生成に与える影響の検証
14:01　○佐藤 銀次，本村 陽香，鈴木 智順　(東理大院生物)

3C5p03　異なる生育期の細菌に対する光触媒殺菌効果の変動要因の解明
14:12　○安藤 志朗，槻 あかね，鈴木 智順　(東理大院生物)

3C5p04　ピロロキノリンキノンが酵母細胞表層に存在する可能性について
14:23　○具志 萌里，水谷 治，外山 博英　(琉大農)

3C5p05　紀州なれずし発酵乳酸菌の多様性と単離されたビフィズス菌の特徴
14:34　久保 実希[1]，平田 貴人[1]，大梅 倖輝[1]，丹羽 諒[2]，大野 智生[1]，末松 和真[1]，○岩橋 均[1]　([1]岐大応生，[2]京大医院)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C5p06　*Bacillus thuringiensis* A2545 株における抗菌活性と関連する遺伝子クラスターの解析
14:53　松川 木仁未[1]，齋藤 浩之[2]，三田 光章[3]，阿部 雄一[1]，原島 俊[1]，○浴野 圭輔[1]　([1]崇城大生物生命，[2]福岡工技セ･生食研，[3]中村産業開発(株))

3C5p07　イネいもち病菌における CRISPR/ErCas12a を用いたゲノム編集手法の検討
15:04　○原田 裕太，山崎 真也，荒添 貴之，鎌倉 高志　(東理大院創域理工)

3C5p08　乾燥耐性を有するシアノバクテリア *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥および蘇生過程における遺伝子発現解析
15:15　○柴﨑 健豪[1]，加藤 浩[2]，篠田 沙月[1]，横谷 香織[3]，安部 智子[1]　([1]東京電機大院･理工，[2]三重大･研究基盤，[3]筑波大･生命環境)

3C5p09　水田中のアーバスキュラー菌根菌(AMF)の胞子密度は栄養条件に影響を受けにくい
15:26　○岡崎 飛鳥，HUANG Yihao，TRAN QUOC Thinh，久保 幹　(立命館大院生命)

3C5p10　Study on function of individual type III effectors in *Ralstonia solanacearum*
15:37　○Rana Lokendra[1]，Tsuzuki Masayuki[2]，Kiba Akinori[2]，Hikichi Yasufmi[2]，Ohnishi Kouhei[2]　([1]Ehime University，[2]Kochi University)

p11 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3C5p11　*Tetragenococcus halophilus* SL10 株の凝集因子の同定
15:56　○柳原 愛梨[1]，松栄 幸汰[2]，脇中 琢良[3]，茂木 喜信[3]，渡部 潤[1,2,3,4]　([1]福島大院食農，[2]福島大食農，[3]ヤマサ醤油，[4]福島大食農発酵研)

C6 会場　午前の部(9:30〜12:20)

食品—食品機能・栄養-神経，内分泌，味覚・食欲—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3C6a01　シラスプロテアーゼ分解物由来 β-セクレターゼ阻害成分の探索・同定
9:30　○甲木 孝弘[1,2]，隅谷 栄伸[1]，金野 文香[2]，笠松 真吾[2]，居原 秀[2]　([1](公財)東洋食品研究所，[2]大阪公立大院 理学研究科 生物化学専攻)
3C6a02　LPS 誘発炎症モデルマウスに対する 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の作用解析
9:41　○大政 俊樹，奥山 聡，澤本 篤志，中島 光業　(松山大院 医療薬学)
3C6a03　運動と食品因子の併用は認知機能の向上を増幅できるか？ −運動と高吸収性クルクミンでの併用効果検証−
9:52　○鈴木 友也，太田 百香，伏見 知紗，武田 薫，津田 孝範　(中部大院応生)
3C6a04　カシス，アカジソ，甜茶に含まれるテストステロン分泌促進活性成分の機能解析と *in vivo* での検証
10:03　○足立 悠輔[1]，家代岡 広海[2]，鶴間 あい[2]，寺田 直史[2]，長世 智朗[2]，加藤 英介[2]，稲垣 洋介[3]　([1]北大農，[2]北大院農，[3]日本薬業)
3C6a05　弱鬱モデルマウスにおいて腸内細菌の占有率と相関して扁桃体の遺伝子を制御する転写因子の解析
10:14　○成田 龍矢[1]，近藤 隆[2]，阿部 啓子[3]，安岡 顕人[1]　([1]聖徳大人栄，[2]理研生命医科研，[3]東大院農応生科)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3C6a06　*Lacticaseibacillus paracasei* strain Shirota の継続摂取が内勤勤労者の日中のパフォーマンスに与える効果
10:33　○早川 弘子，石川 紘司，須田 一徳，権藤 祐輔，平沢 元希，中村 隼人，高田 麻衣，河合 光久，松田 一乗　(株式会社ヤクルト本社中央研究所)
3C6a07　ピーマン中の苦味物質を受容する苦味受容体の探索
10:44　○大上 明日実[1]，田村 佳子[1]，吉田 真梨[1]，奥田 悠介[1]，柳澤 琢也[1]，三坂 巧[2]　([1]キユーピー株式会社，[2]東大院農生科)
3C6a08　高甘味度甘味料の後口に感じられる苦味の客観的強度評価法の改良
10:55　○齋藤 美優，三坂 巧　(東大院農生科・応生化)
3C6a09　甘味受容体阻害剤が示すうま味受容体阻害活性の検討
11:06　○川﨑 舞子，木寺 優太，三坂 巧　(東大院農生科・応生化)
3C6a10　脊椎動物における旨味・甘味受容体 T1R の進化多様性の解明
11:17　○戸田 安香[1]，西原 秀典[2,3]，藏本 多恵[2,4]，蒲原 功汰[1]，後藤 あず紗[1]，星野 杏子[1]，岡田 晋治[5]，工樂 樹洋[6]，岡部 正隆[7]，石丸 喜朗[1]　([1]明大農・農芸化，[2]近大農・生物機能，[3]東工大院・生命理工，[4]東工大・科技創研，[5]東大院農生科・応生化，[6]国立遺伝研，[7]慈恵医大・解剖)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3C6a11　辛味・渋味成分に対する加齢依存的な嗜好性変化
11:36　○成川 真隆[1]，三坂 巧[2]　([1]京女大食，[2]東大院農)
3C6a12　さまざまな塩添加によるうま味の増加
11:47　○田中 伽奈，桂川 晴花，近藤 高史　(近畿大)
3C6a13　ヒト甘味の NaCl 添加による増加作用
11:58　○近藤 高史，勝亦 佑衣，吉武 杏花　(近畿大)
3C6a14　苦味受容体 Tas2r108 の発現調節により 3T3-L1 細胞の成熟脂肪細胞への分化は抑制される
12:09　○大島 翔汰，佐々木 琴美，鶴間 あい，木村 駿介，加藤 英介　(北大院農)

C6 会場　午後の部(13:50〜16:40)

食品—食品機能・栄養-免疫，炎症/食品機能・栄養-神経，内分泌，味覚・食欲/食品機能・栄養-その他—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3C6p01　新姫果皮抽出エキスの抗炎症効果
13:50　○小山 彩華[1]，渡辺 章夫[1,4]，衛藤 未侑[1]，針谷 夏菜華[1]，夏目 矩行[2]，山野 亜紀[3]，照屋 俊明[2,3]，米澤 貴之[4]，禹 済泰[5]　([1]十文字学園女大・食品開発，[2]琉球大院・理工，[3]琉球大・教育，[4]中部大・生機研，[5]中部大・応生)
3C6p02　ポリメトキシフラボノイドの吸収性と生理活性の相互連関解析
14:01　○衛藤 未侑[1]，阿部 馨[1]，山下 留奈[1]，小山 彩華[1]，夏目 矩行[2]，米澤 貴之[3]，禹 済泰[4]，渡辺 章夫[1,3]　([1]十文字学園女子大・食品開発，[2]琉球大院・理工，[3]中部大・生機研，[4]中部大・応生)
3C6p03　アミロイド β 誘発記憶障害モデルマウスのミトコンドリア機能低下に対する真珠層抽出成分の効果
14:12　○趙 岩，若生 真由美，大町 知輝，長谷川 靖　(室工大院)
3C6p04　オレガノの匂いによるマウスの食塩摂取調節機能に関する研究
14:23　○青柳 樹奈，細野 朗，大畑 素子，横山 壱成，長田 和実　(日本大生物資源)
3C6p05　肝臓 67kDa ラミニン受容体を介した EGCG の脳機能調節作用
14:34　○麻生 菜帆，李 寛雨，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文　(九大院農院・生機科)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C6p06　茶由来サポゲニン R1-barrigenol はマウスにおいて LPS による認知機能低下を改善する
14:53　○田代 結衣，林 遼太郎，岡田 晋治，阿部 啓子，小林 彰子　(東大院農)
3C6p07　ツノナシオキアミ乳化オイル粉末による睡眠の質改善作用
15:04　○山田 秀俊[1]，宮坂 らいむ[1]，濱田 浩司[2]　([1]帝科大・生命環境，[2]國洋)
3C6p08　シイタケ香気成分 Lenthionine は，Allyl isothiocyanate と共通の機序で TRPA1 チャネルを活性化させる
15:15　○新田 貴大[1]，竹隈 幸洋[1]，鴨井 享宏[1]，岩﨑 有作[2]　([1]ハウス食品グループ本社(株)，[2]京都府立大院 生命環境科学)
3C6p09　植物マイクロ RNA csn-miR166c-3p はオートファジー活性化を介してパーキンソン病症状を緩和する
15:26　○島田 優，熊添 基文，恩田 弘明，小川 史代，藤村 由紀，立花 宏文　(九大院農院・生機科)
3C6p10　腸内細菌枯渇状態のマウスは甘味をより好む
15:37　○藍原 祥子，小池 亜由梨，丸岡 祐子　(神戸大院農)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3C6p11　乳素材から調製したシアリル糖ペプチド濃縮物の記憶維持効果
15:56　○高梨 直也，鳴海 佳輔，山口 敏幸，福留 博文，中川 久子，郷田 雅之，小林 俊二郎　（雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所）

3C6p12　多感覚の統合的解析による『出来立てのおいしさ』の数値的特徴解明
16:07　○小川 雪乃，西部 美咲，亀井 誠生，堀江 芙由美，日下部 裕子　（農研機構食品研）

3C6p13　フラネオールの嗅覚刺激による自発運動量への影響
16:18　○木脇 百香，大畑 素子，横山 壱成，細野 朗，津田 真人，長田 和実　（日本大学）

3C6p14　木材粉末を用いて調製した食パンの嗜好性の評価
16:29　○佐藤 典子，小田 悠斗，高倉 春斗，宇和野 みづき　（甲子園大学）

C7 会場　午前の部(9:30〜12:20)

微生物―細胞-分離，分類，生態/物質生産-発酵(二次代謝産物)―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3C7a01　Isolation and identification of high D-amino acid-producing lactic acid bacteria
9:30　○levi PHAM，Shouji TAKAHASHI　(Nagaoka Univ. of Tech.)

3C7a02　好フルクトース，好酸性かつ寒天で生育困難な新属・新種の乳酸菌 *Philodulcilactobcillus* 属の分離・同定
9:41　○高屋 朋彰[1]，石山 洋平[2]，大橋 勝太[1]，熊久保 涼太[1]，山﨑 健[1]，大滝 俊樹[2]　([1]小山高専･物質，[2](株)ミヤトウ野草研究所）

3C7a03　*Aurantiochytrium* 属の遊走子が示す走化性とその分子機構
9:52　○渡邉 研志，新井 萌子，立田 光，秋 庸裕　（広島大院･統合生命）

3C7a04　メタン酸化細菌の走化性
10:03　○箕田 和奏，八幡 穣　（筑波大生物資源）

3C7a05　海洋細菌 *Aureispira marina* が有する不飽和 2-ヒドロキシ脂肪酸の二重結合の解析
10:14　○川原 一芳，入山 楓歌，飯田 博一　（関東学院大理工生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3C7a06　南極ユキドリ営巣跡から分離した微生物からのバイオフィルム阻害物質のスクリーニング
10:33　○阿座上 弘行[1,2]，木下 颯[1]，SIDDIQA Ayesha[1]，林 昌平[3]　([1]山口大農，[2]山口大中高温微セ，[3]島根大生物資源）

3C7a07　NO シグナリングを有する有用放線菌の探索
10:44　○武井 勝紀，伊藤 晋作，矢嶋 俊介，佐々木 康幸　（東農大院）

3C7a08　乱流が作り出す複雑な攪拌が微生物生産に与える影響の実測
10:55　○阿部 響介，八幡 穣　（筑波大生物資源）

3C7a09　タモギタケ発酵ダイズ抽出物の抗アレルギー効果
11:06　○齋藤 汐里，澤田 雄太，福士 涼介，新井 博文，佐藤 利次　（北見工大）

3C7a10　界面ファーメンターによる生物活性 sclerotiorin の高生産
11:17　○熊崎 風夏[1]，岩月 正人[2]，小田 忍[1]　([1]金沢工大･ゲノム研，[2]北里大･大村研）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3C7a11　オピオイド発酵生産プラットフォームの構築
11:36　○南 博道[1,2]，中川 明[1,2]　([1]石川県大･資源研，[2]ファーメランタ株式会社）

3C7a12　*Metschnikowia pulcherrima* AH550 株のプリケリミン酸高生産条件の検討
11:47　○浜口 愛勇生[1]，尚 思岐[2]，田口 久貴[1]，笹野 佑[1]　([1]崇城大院工，[2]崇城大生物生命）

3C7a13　生合成遺伝子クラスターにおける高精度クローニング法の開発
11:58　○武田 知己[1,2]，阿蘇 未沙紀[1]，上田 寛子[1]，加藤 章太朗[1,2]，湯澤 賢[1,2]　([1]慶大･先端生命研，[2]慶大院･政策メディア･先端生命）

3C7a14　二次代謝物生合成酵素阻害剤を用いた新規化合物の探索系の構築
12:09　髙村 郁実[1]，野川 俊彦[2]，岡野 亜紀子[2]，越野 広雪[2]，沼本 穂[1]，和田 大[1]，○加藤 直樹[1]　([1]摂南大･農，[2]理研CSRS）

C7 会場　午後の部(13:50〜16:40)

微生物―物質生産-発酵(二次代謝産物)―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3C7p01　脂肪酸ポリオールエステルを菌体外に生産するロドトルラ属酵母の生産能及びゲノム情報の解析
13:50　○真野 潤一[1]，須志田 浩稔[1]，田中 剛[2]，内藤 健[3]，小野 裕嗣[2]，池 正和[1]，徳安 健[1]，北岡 本光[4]　([1]農研機構食品研，[2]農研機構分析研，[3]農研機構資源研，[4]新潟大農）

3C7p02　食品廃棄物の循環利用に向けたオメガ 3 脂肪酸生産麹菌の改良
14:01　○中村 仁勇[1]，服部 領太[2]，鈴木 聡[1]，小竹 英一[1]，真野 潤一[1]　([1]農研機構食品研，[2]農研機構本部）

3C7p03　麹菌 *Aspergillus oryzae* においてオートファジーの欠損がコウジ酸生産を促進する分子機構の解析
14:12　○松下 天斗[1]，陳 俊林[1]，有岡 学[1,2]　([1]東大院農･応生工，[2]東大･微生物連携機構）

3C7p04　麹菌の異種天然化合物の生産性に関与する新規制御因子の同定と代謝機能の解析
14:23　○吉岡 弘史[1]，原中 実穂[1]，齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，南 篤志[3]，及川 英秋[4]，丸山 潤一[1,2]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]東大･微生物連携機構，[3]北大院･理，[4]中国･五邑大）

3C7p05　麹菌を用いた異種天然化合物生産における染色体領域の機能的関連の解析
14:34　○神作 佳孝[1]，齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，南 篤志[3]，及川 英秋[4]，丸山 潤一[1,2]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]東大･微生物連携機構，[3]北大院･理，[4]中国･五邑大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3C7p06　麹菌 *Aspergillus oryzae* における Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)の機能解析
14:53　○清水 雄太[1]，舟窪 絵衣美[2]，進藤 斉[1,2]，穂坂 賢[1,2]，徳岡 昌文[1,2]　([1]東農大院応生，[2]東農大応生）

3C7p07　混合栄養硫黄酸化細菌 *Thiothrix nivea* の酢酸代謝に及ぼす硫化水素の影響
15:04　○荒木 優衣[1]，斉藤 朝昌[1]，近藤 敬子[2]，片平 正人[2]，武田 穣[1]　([1]横国大工，[2]京大エネ研）

3C7p08　柑橘由来フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現させた組換え大腸菌を用いた *trans*-ケイ皮酸の発酵生産
15:15　○西川 優里[1]，小林 美稀[1]，大橋 博之[2]，大橋 貴生[1]　([1]摂南大院，[2]大阪産業研）

3C7p09　組換え大腸菌を用いたラズベリーケトンの高生産
15:26　○薄井 くるみ[1,2]，桝尾 俊介[1,2]，高谷 直樹[1,2]　([1]筑波大院生命環境系，[2]微生物サステイナビリティ研究センター）

3C7p10　大腸菌を用いたフライボノイド生産プラットフォームの構築
15:37　○中川 明[1,2]，新谷 隆史[1]，南 博道[1,2]　([1]ファーメランタ株式会社，[2]石川県立大学)

p11～p14 発表者の接続時間 15:48～15:56

3C7p11　大腸菌を用いたモルヒネの発酵生産
15:56　○Rosenberg Sumamal[1]，中川 明[1,2]，新谷 隆史[1]，南 博道[1,2]　([1]ファーメランタ株式会社，[2]石川県立大学)
3C7p12　*De novo* RiPPs 創薬を志向した非天然チオペプチド発酵生産系の確立
16:07　○伊地知 新太[1]，永井 栄美子[2]，浅水 俊平[3]，Vinogradov Alexander A.[4]，後藤 佑樹[4]，菅 裕明[4]，尾仲 宏康[1]　([1]学習院大理，[2]アルバートアインシュタイン医科大学，[3]神戸大先端バイオ，[4]東大院理)
3C7p13　フェノール性二次代謝産物発酵生産プラットフォームの構築
16:18　○新谷 隆史[1]，中川 明[1,2]，南 博道[1,2]　([1]ファーメランタ株式会社，[2]石川県大資源研)
3C7p14　新規 lasso peptide における機能向上アナログの作製とその生理活性評価
16:29　○道下 ひかる[1]，星野 翔太郎[1]，永井 栄美子[2]，尾仲 宏康[1]　([1]学習院大理，[2]アルバート･アインシュタイン医科大学)

D1 会場　午前の部(9:30～11:28)

食品—食品機能・栄養-酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化—

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

3D1a01　メイラード反応生成香気による線虫 *C. elegans* の寿命延長に対する熱ショック因子の関与
9:30　○横山 壱成[1]，瀬戸山 央[2]，大畑 素子[1]，長田 和実[1]　([1]日大生物資源，[2](地独)神奈川県立産業技術総合研究所)
3D1a02　線虫 *C.elegans* における希少糖 D-allulose の AGEs 蓄積抑制効果
9:41　○佐藤 正資，平田 恵子，染原 のい，藤澤 智彩，細川 歌音　(香川大農)
3D1a03　抗酸化物質の機能性，吸収性を高める多糖系キャリアの開発
9:52　○河南 翔馬，甲元 一也　(甲南大FIRST)
3D1a04　黄花フリージア(*Freesia X hybrida*)に含有される新規フラボノイド配糖体の化学構造及びその生理活性評価
10:03　○菅谷 真歩[1]，岩本 のぞみ[1]，宇佐美 真由[1]，齋藤 歩那[1]，酒見 裕香[1]，三沢 典彦[2]，竹村 美保[2]，上垣 陽平[2]，東村 泰希[3]，村濱 稔[4]，降旗 一夫[5]，新藤 一敏[1]　([1]日女大家政，[2]石川県大生資研，[3]石川県大食品研，[4]石川県農林総合研究センター，[5]東大農)
3D1a05　ナンテンハギ(*Vicia unijuga*)に含まれる抗酸化成分の同定(ケルセチン配糖体)及びその活性評価
10:14　○島上 真帆，菅谷 真歩，太田 秀香，岡 美波，小川 莉央，新藤 一敏　(日女大)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

3D1a06　ポリアミン量減少による骨芽細胞分化低下に対するスペルミジンとダイゼインの影響
10:33　○君羅 好史[1]，植村 武史[2]，古地 壮光[2]，大澤 吉弘[1]，真野 博[1]　([1]城西大･薬･医療栄養，[2]城西大･薬･薬)
3D1a07　紫キャベツ長期摂取の生体機能への影響
10:44　○渡邉 理江[1,2]，井上 碧[1]，先川 碧[1]，儀間 章託[2]，達脇 茉胡[1]，田中 昭佳[1]，塚本 芽衣[1]　([1]美作大食物，[2]美作大院生活科学)
3D1a08　乳酸菌 *Lactobacillus crispatus* KT-11 株の腸管を介した皮膚改善効果とその分子基盤の解明
10:55　○平野 萌々華[1]，大木 妙子[2]，渡邉 樹[2]，片倉 喜範[3]　([1]九大院農，[2]株式会社キティー，[3]九大院農学研究院)
3D1a09　アスタキサンチン／β-グルカンナノ粒子包接複合体の調製とその安定性の評価
11:06　○三和 正弥，甲元 一也　(甲南大学FIRST)
3D1a10　ウロリチン A による腸管を介した皮膚改善
11:17　○徳永 直大[1]，平江 衣絵[2]，大倉 美早紀[3]，小原 亜希子[4]，工藤 眞文[4]，卯川 裕一[4]，片倉 喜範[5]　([1]九大 農，[2]九大院 生資環，[3]九大院 システム生命，[4]株式会社ダイセル，[5]九大院農院)

D1 会場　午後の部(14:01～16:40)

食品—食品機能・栄養-その他—

p02～p05 発表者の接続時間 13:53～14:01

3D1p02　Development of bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules
14:01　○Gaku NAKATO[1]，Hikaru INOUE[1,2]，Satoshi ONAWA[1]，Hitoshi AGEMATSU[1]，Nozomu OBANA[3]，Risako FURUKAWA[1]，Joe INOUE[1,2]，Shinji FUKUDA[1,2,3,4,5]　([1]KISTEC，[2]Keio Univ.，[3]Univ. of Tsukuba，[4]Juntendo Univ.，[5]Metabologenomics，Inc.)
3D1p03　長崎県五島市での腸内細菌叢と排便状況等に関する横断研究ならびにシンバイオティクスヨーグルト摂取による整腸作用への影響
14:12　○小谷 篤幸[1]，徐 宸東[1]，新井 聡[1]，加藤 久美子[1]，世羅 至子[2]，本郷 涼子[2]，山口 彩[2]，岩淵 紀介[1]，小田巻 俊孝[1]，田中 美順[1]，田中 一成[3]　([1]森永乳業･基礎研，[2]長崎県大･栄養健康，[3]長崎県大･地域連携セ)
3D1p04　*Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* FC 株の摂取が便秘傾向者の腸内細菌叢に及ぼす影響
14:23　○田畑 祥之，渡辺 真通，後藤 弥生，鈴木 利雄，丸山 健太郎　(フジッコ株式会社)
3D1p05　緑茶カテキン EGCG がヒト末梢血由来単核細胞の DNA メチル化に与える影響
14:34　○張 翼麟，山本 真生，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文　(九大院農院･生機科)

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:53

3D1p06　腸内環境改善を介したストレス低減効果に対する小麦ブラン摂取の影響に関する無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験
14:53　○菊池 洋介[1]，大谷 彩夏[1]，川本 智裕[1]，長谷田 茜[2]，勝山(鏡) 豊代[2]，本間 直幸[2]，西平 順[2]　([1]日清製粉グループ本社，[2]北海道情報大)
3D1p07　UVB 照射により脆弱化した皮膚への卵殻膜摂食の効果
15:04　○宮澤 萌愛，松﨑 愛，山地 巧真，山根 拓実，大石 祐一　(東京農大応生)
3D1p08　ハイカカオチョコレートの嗜好性に関する調査研究
15:15　○田平 琴音[1]，村上 汀子[1]，岡前 菜花[1]，伊藤 大二郎[1]，釜阪 寛[1]，中野 久美子[2]，伏木 亨[1]　([1]甲子園大，[2]甲子園短大)
3D1p09　紫カリフラワーの抗酸化活性に及ぼす調理の影響
15:26　○近藤(比江森) 美樹，伊藤 志音里，小柳 彩華　(高知県立大健康栄養)
3D1p10　動物油脂と植物油の配合がフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境におよぼす影響
15:37　岡田 妃可，○岡崎 由佳子　(藤女子大人間生活)

p11～p14 発表者の接続時間 15:48～15:56

3D1p11　冷温受容体を活性するメントールの長期摂取が体温調節機能に及ぼす影響
15:56　○森 紀之，毎熊 麻花，中島 綾，柳井 美希　(同女大･生活科学)

3D1p12　PQQ による GPR35 活性化機構の解析
16:07　○安藤 春美[1]，金森 星[1]，中島 史恵[1]，井上 飛鳥[2]，内田 浩二[3]，柴田 貴広[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬，[3]東大院農)

3D1p13　Inhibitory effect of cumin and cardamom extract on Influenza A virus infection
16:18　○Abdullah Al Sufian Shuvo[1]，Yoshihiko Maekawa[2]，Masahiro Kasai[3]，Takeshi Kawahara[1,2,4]　([1]Graduate School of Medicine，Science and Technology，Shinshu University，[2]Graduate School of Science and Technology，Shinshu University，[3]S &B Foods Inc.，[4]Academic Assembly School of Science and Technology，Institute of Agriculture，Shinshu University)

3D1p14　発酵食品の製造時の発酵プロセスにおける藻類添加の効果の検証
16:29　○河野 祐介[1]，橋本 祐佳[1]，吉冨 健一[2]，鈴木 健吾[1]，中島 綾香[1]　([1]株式会社ユーグレナ，[2]株式会社咲吉)

D2 会場　午前の部(9:30〜12:20)

食品―食品機能・栄養-消化・吸収，循環・血管/食品機能・栄養-アレルギー・アレルゲン―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3D2a01　緑藻類ヒトエグサに含まれるアンジオテンシン変換酵素阻害活性成分
9:30　○近藤 さくら，黒須 泰行，本間 悠里，垣田 浩孝　(日大院総合基)

3D2a02　ブルーベリー葉エキスによる動脈弛緩反応を介した血圧降下作用
9:41　○藤田 裕之[1]，叢 シン宇[1]，矢野 善久[1]，山崎 正夫[2]　([1]京都先端大バイオ環境，[2]宮崎大学農)

3D2a03　魚類由来エラスチンペプチドの継続摂取は高血圧性腎障害を抑制する
9:52　○中村 優希[1]，増田 誠司[1,2,3]，竹森 久美子[1,2]　([1]近畿大学大学院農学研究科応用生命化学専攻，[2]近畿大学農学部食品栄養学科，[3]近畿大学アンチエイジングセンター)

3D2a04　スフィンゴ脂質作動性血管収縮に対する Fisetin の作用機序解析
10:03　○鶴留 奈津子[1]，南 雄二[2]，加治屋 勝子[2]　([1]香大医，[2]鹿大農)

3D2a05　膵リパーゼを阻害する大麦若葉由来タンパク質の阻害活性に重要なアミノ酸配列の解析
10:14　○山口 莉奈[1]，佐々木 琴美[2]，鶴間 あい[2]，加藤 英介[2]　([1]北大農，[2]北大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3D2a06　Na+ 共輸送型グルコーストランスポーター SGLT2 及び SGLT1 活性を阻害する食品成分の探索・解析
10:33　○佐藤 優[1]，島尻 結衣[1]，小森 大雅[2]，尾關 佑樹[3]，深見 裕之[3]，薩 秀夫[2]　([1]前橋工大院，[2]前橋工大，[3]小林製薬･中央研究所)

3D2a07　褐藻類クロメとノコギリモクのメタノール抽出画分中のヒアルロニダーゼ阻害活性
10:44　○岸野 愛，黒須 泰行，本間 悠里，垣田 浩孝　(日大院総合基)

3D2a08　緑藻類スジアオノリに含まれるヒアルロニダーゼ阻害活性成分の分子量分布と組成
10:55　○古谷 香乃，黒須 泰行，本間 悠里，垣田 浩孝　(日大院総合基)

3D2a09　ピーナッツアレルゲン Ara h1 の N 末端ドメインの消化酵素に対する抵抗性の検討と消化物由来残存エピトープの同定
11:06　石橋 里菜[1]，Asaduzzaman Md.[1]，松井 照明[2]，高里 良宏[2]，伊藤 浩明[2]，木村 吉伸[1,3]，○前田 恵[1]　([1]岡大院環境生命，[2]あいち小児保健医療センター，[3]くらしき作陽大食文化)

3D2a10　花粉 Gibberellin-regulated protein の免疫学的手法による定量
11:17　○門間 敬子，平川 由紀，吉原 早紀，村林 穂香，成田 宏史　(京女大家政)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3D2a11　ラット好塩基球白血病細胞 RBL-2H3 に発現している苦味受容体
11:36　○川島 満[1]，小林 和暉[2]，眞榮田 麻友美[2]，吉川 潤[1,2]，前橋 健二[1,2]　([1]東農大院応生，[2]東農大応生)

3D2a12　MHC class II 分子を発現する粘膜型マスト細胞は抗原提示により食物アレルギー症状を増悪させる
11:47　○中野 信浩[1]，大石 賢司[1,2]，北浦 次郎[1]，小川 秀興[1]，清水 俊明[1,2]，奥村 康[1]　([1]順天堂大院医･アトピー疾患研究センター，[2]順天堂大院医･小児科学)

3D2a13　食物アレルギー環境下，$CD4^+$ 制御性 T 細胞 は骨と腸管において異なる応答を示す
11:58　○星野 友宏[1]，曽我 皓平[2]，西辻 幸介[2]，礒垣 遼[2]，八村 敏志[2]，足立(中嶋) はるよ[2,3]　([1]慶応大薬･薬科学，[2]東大院農生科･食の安全研究セ，[3]東大院農生科･免疫生体機能社会連携講座)

3D2a14　消化管アレルギーモデルにおける腸内細菌が骨量および骨の免疫応答に与える影響
12:09　○西辻 幸介[1]，曽我 皓平[1]，礒垣 遼[1]，星野 友宏[2]，角田 茂[1,3]，平山 和宏[1,4]，八村 敏志[1]，足立(中嶋) はるよ[1,5]　([1]東大院農生科･食の安全研究セ，[2]慶応大薬･薬科学，[3]東大院農生科･獣医･実験動物，[4]東大院農生科･獣医･獣医公衆衛生，[5]東大院農生科･免疫生体機能社会連携講座)

D2 会場　午後の部(13:50〜15:26)

食品―食品機能・栄養-アレルギー・アレルゲン/食品機能・栄養-免疫，炎症―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3D2p01　*Lentilactobacillus hilgardii* strain H-50 の自由摂取による食物アレルギーの予防効果の検証
13:50　○川原 佳菜子[1]，範 蓉[2]，鈴木 卓弥[2]，山本 祥也[2]　([1]広大生生，[2]広大院統合)

3D2p02　Kaempferol による RALDH2 発現調節と食物アレルギー改善効果
14:01　○髙橋 美貴，長田 和樹，綿貫 優実，山口 昌樹，八代 拓也，西山 千春　(東理大院先進工生命システム)

3D2p03　褐藻ノコギリモクから単離された物質 2 種の抗アレルギー効果
14:12　○杉浦 義正[1]，三角 彰太[2]，山谷 裕昭[3]，中西 正美[4]，平田 文久[4]，勝崎 裕隆[5]，林 裕一[6]，村瀬 昇[1]　([1]水産機構水大校，[2]西ノ島町，[3]ノア隠岐，[4]JFしまね，[5]三重大院･生資，[6]岡部･海洋事業部)

3D2p04　Analysis of the inhibitory mechanism of vialinin A and DMT on TNF-α production in RBL-2H3 cells
14:23　○DJIDJOU TAGNE ANGE MURIELLE，KOUICHI SUGAYA，JUN-ICHI ONOSE，NAOKI ABE　(Tokyo University of Agriculture)

3D2p05　アレルゲン特異的 T 細胞誘導性乳酸菌の作製とその有効性の検討
14:34　○高崎 凌，笠原 紳，須田 義人，島津 朋之　(宮城大食産業)

p06〜p08 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3D2p06　経皮感作食物アレルギーにおける皮膚のかゆみと好酸球の関係
14:53　黒木 穣，水田 成俊，鳥屋尾 千佳，○服部 秀美　(宮崎大農)

3D2p07　Interleukin-13 は，マウス小腸オルガノイドにおいて抗菌ペプチド産生を誘導する
15:04　○石井 南葵[1]，松井 伸祐[2]，山本 祥也[1]，岩槻 健[2]，鈴木 卓弥[1]　([1]広島大学大学院統合生命科学研究科，[2]東京農業大学大学院応用生物科学研究科)

3D2p08　マスト細胞による脂肪細胞の分化・成熟の抑制作用
15:15　○秋田 梨沙，江原 舜樹，鈴木 明日香，祖父江 春菜，中西 祐輔，高橋 恭子　(日大生物資源)

D3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

植物——次代謝，二次代謝，メタボローム/生物間相互作用—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3D3a01　リン酸欠乏下におけるイネの SQDG 合成能欠損変異体のリピドーム解析
9:30　○背戸 美紗代[1]，浜崎 大輔[1]，高野 耕司[2]，西澤 具子[2]，庄司 翼[3]，勝崎 裕隆[1]，斉藤 和季[2]，岡咲 洋三[1]　([1]三重大院生資，[2]理研 CSRS，[3]富山大和漢研)

3D3a02　イネに含まれるアシル化 MGDG 合成酵素活性の検出
9:41　○中村 早希[1]，浜崎 大輔[1]，高野 耕司[2]，庄司 翼[3]，勝崎 裕隆[1]，斎藤 和季[2]，岡咲 洋三[1]　([1]三重大院生資，[2]理研 CSRS，[3]富山大和漢研)

3D3a03　アメリカハマグルマ地上部に含まれる昆虫摂食阻害物質
9:52　○成田 覚，森本 正則，辰巳 剛，松田 一彦　(近畿大農)

3D3a04　海浜植物ネコノシタに含まれる昆虫摂食阻害活性物質
10:03　○森本 正則，石川 藍梨，松田 一彦　(近畿大農)

3D3a05　コマツナ内生菌 Arthrobacter sp. BR2S-6 株からの植物免疫を活性化する成分の精製
10:14　○篠原 正賢，島脇 遼，中島 将博，橋本 研志，朽津 和幸，古屋 俊樹　(東京理科大院・創域理工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3D3a06　トウモロコシ実生のみどりの香り受容に関する構造活性相関解析
10:33　○松井 健二[1]，鷹取 雄介[1]，田中 康大[1]，藤田 賢也[1]，伊達 みのり[1]，渡辺 文太[2]　([1]山口大院創成科学，[2]慈恵医大)

3D3a07　イネにおける遺伝子発現と根圏微生物叢の統合解析
10:44　○山崎 真一[1]，山本 敏央[2,3]，林 誠[4]，市橋 泰範[1]　([1]理研 BRC，[2]農研機構，[3]岡山大，[4]理研CSRS)

3D3a08　生物界間接合のカギを握る供与菌染色体遺伝子のゲノムワイドな探索
10:55　○守口 和基[1,2]，中村 和之[1]，高橋 雄大[2]，井上 侑哉[1]，清川 一矢[1]，鈴木 克周[1]　([1]広島大院統合生命，[2]広島大理)

3D3a09　植物発酵物(FBP)による青枯病防除効果の作用機序解明
11:06　○水野 邑里[1]，竹中 航平[1]，館内 雄介[1]，緋田 安希子[2]，加藤 純一[2]，藤岡 耕太郎[1]，鳥居 英人[1]　([1]万田発酵株式会社，[2]広大院統合生命)

3D3a10　植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来の鞭毛タンパク質 flagellin の菌株間に存在するイネ免疫の誘導特異性決定機構
11:17　○松村 ひかり[1]，村上 貴彦[1]，桂木 雄也[2]，平井 洋行[1]，中川 幸彦[1]，蔡 晃植[1,2,3]　([1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3D3a11　共生菌由来の側根形成を誘導する低分子化合物の探索
11:36　○松浦 大空，小川 拓水，岡澤 敦司，太田 大策　(大阪公大院農)

3D3a12　寄生雑草ヤセウツボにおける炭素収奪経路の解明
11:47　○雑賀 恵梨[1]，松本 萌[3]，[1]小川 拓水[3]，福崎 英一郎[2]，太田 大策[3]，岡澤 敦司[3]　([1]大阪府大生命環境，[2]大阪大院工，[3]大阪公大)

3D3a13　根圏合成コミュニティにおいて根粒共生を促進する微生物の解析
11:58　○野村 結南[1]，頼永 萌々佳[1]，西岡 友樹[2]，玉木 秀幸[2]，壽崎 拓哉[1]，竹下 典男[1]　([1]筑波大・生命環境系，[2]産総研・生物プロセス)

3D3a14　微生物接種したダイズにおける 1 細胞レベルの根毛遺伝子発現解析
12:09　○蘇 千雅[1]，松永 浩子[2,3]，SAMUEL Ashok[2]，奥平 美里[2]，濱崎 英史[4]，松井 南[4,5]，竹山 春子[1,2,3,6]　([1]早大院・先進理工，[2]早大・ナノライフ創新研，[3]産総研・早大 CBBD-OIL，[4]理研・CSRS，[5]横浜市大・木原生物学研，[6]早大・生命動態研)

D3 会場　午後の部(13:50〜16:40)

植物——次代謝，二次代謝，メタボローム/生物間相互作用/植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送/タンパク質，酵素-機能，調節/その他—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3D3p01　Relationship among arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization rate, plant growth, nutrient uptakes, and soil bacterial activities
13:50　○YIHAO HUANG，Asuka Okazaki，Quoc Thinh Tran，Motoki Kubo　(Ritsumeikan University)

3D3p02　大腸菌染色体挿入法を用いたアピゲニンの生産
14:01　○小林 美稀[1]，石水 毅[2]，駒 大輔[3]，大橋 貴生[1]　([1]摂南大院，[2]立命館大，[3]大阪産業技術研)

3D3p03　鉄栄養変化がイネ体内の鉄恒常性に及ぼす影響
14:12　○岡村 幸輝，高橋 啓太，長坂 征治　(東洋大院)

3D3p04　鉄過剰条件におけるイネの鉄輸送に関与する化合物の同定
14:23　○高橋 啓太，岡村 幸輝，長坂 征治　(東洋大院生命)

3D3p05　*Synechocystis* sp. PCC 6803 の光合成に関わるイオン輸送体の解析
14:34　○浜本 晋[1,2]，神保 晴彦[3]，田野井 慶太朗[1]，田中 寛[4]，川崎 寿[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構，[3]東大院・総合文化，[4]東工大院・化生研)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3D3p06　ブラシノステロイド新規シグナル伝達因子 BPG4 による葉緑体ホメオスタシス維持メカニズムの解明
14:53　○立花 諒[1]，阿部 晋[2,3]，丸上 萌々[2,3]，山上 あゆみ[1]，明間 莉乃[1]，大橋 隆生[1]，西田 快世[1]，野崎 翔平[4]，宮川 拓也[1]，田之倉 優[5]，Kim Jong-Myong[3,5,6]，関 原明[3]，稲葉 丈人[7]，松井 南[3]，伊福 健太郎[8]，久城 哲夫[2]，浅見 忠男[5]，中野 雄司[1]　([1]京大院生命科学，[2]明治大院農，[3]理研・CSRS，[4]筑波大・院生命環境，[5]東大・院農学生命，[6]アクプランタ株式会社，[7]宮崎大農，[8]京大院農)

3D3p07　塩化コリンと *N*-アリルグリシンによって誘導される植物の生長促進と光合成促進の分子機構
15:04　○池田 直樹[1]，上杉 晃作[1]，神村 麻友[2]，蔡 晃植[1,2,3]　([1]長浜バイオ大院バイオ，[2]長浜バイオ大バイオ，[3]長浜バイオ大 GERI)

3D3p08　向日葵の種の発根断面の ^{1}H-MRI にる水の拡散係数の計測
15:15　○梅田 雅宏，河合 裕子　(明治国際医療大)

3D3p09　Cryo-EM structure of a photosystem I supercomplex from oleaginous green alga *Coccomyxa subellipsoidea*
15:26　○Pi-Cheng TSAI，Fusamichi AKITA，Jian-Ren SHEN　(RIIS，The Univ. of Okayama)

3D3p10　ダイズに対する化学肥料代替としてのリサイクルリン施用効果の検証
15:37　○中務 友明[1]，花田 晶子[1,2]，明戸 剛[1]，新垣 篤史[2]，田中 剛[2]　([1]太平洋セメント株式会社，[2]東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3D3p11　フラボノイド代謝における鍵酵素と生成物特異性を制御するタンパク質の複合体結晶構造
15:56　○今泉 璃城[1]，和氣 駿之[2]，竹下 浩平[3]，安田 あおい[1]，松浦 滉明[3]，中多 舜[1]，坂井 直樹[3]，片岡 邦重[1]，高橋 征司[2]，山本 雅貴[3]，山下 哲[1]，中山 亨[2]　([1]金沢大院自然科学，[2]東北大院工，[3]理研RSC)

3D3p12　天然ゴム貯蔵粒子をコートする膜タンパク質の精製と立体構造解析
16:07　○宮原 一真[1]，吉田 城啓[1]，黒澤 悠太郎[1]，林 文晶[2]，山口 晴彦[3]，服部 良一[4]，齋尾 智英[4]，竹下 浩平[5]，宮城 ゆき乃[3]，高橋 征司[6]，片岡 邦重[1]，山下 哲[1]　([1]金沢大院自然科学，[2]理研BDR，[3]住友ゴム工業(株)，[4]徳島大先端酵素学研究所，[5]理研RSC，[6]東北大院工)

3D3p13　脂質単層膜粒子を導入した無細胞タンパク質発現系の構築
16:18　○黒岩 風[1]，須田 啓[1]，矢吹 眞帆[1]，辻 季美江[2]，山口 晴彦[3]，豊田 正嗣[1]，金子 康子[4]，山下 哲[5]，高橋 征司[6]，戸澤 譲[1]　([1]埼玉大･院･理工，[2]埼玉大･科学分析支援センター，[3]住友ゴム工業（株)，[4]埼玉大･教育，[5]金沢大･院･自然科学，[6]東北大･院･工)

3D3p14　脂質単層膜粒子を導入した無細胞タンパク質発現系によるストリゴラクトン生合成系の解析
16:29　○清水 匠，黒岩 風，戸澤 譲　(埼大院理工)

D4 会場　午前の部(9:30〜11:58)

植物—植物ホルモン，成長調節物質/遺伝子-構造解析，ゲノム，遺伝，変異/遺伝子-機能，発現制御—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3D4a01　シロイヌナズナの亜ヒ酸・カドミウム応答におけるオーキシンの異なる役割
9:30　○浦口 晋平，齋藤 光莉，大城 有香，中村 亮介，高根沢 康一，清野 正子　(北里大薬)

3D4a02　*in planta* Particle Bombardment(iPB)法による実用メロン品種のゲノム編集法の開発と高付加価値化の研究
9:41　○浦野 薫[1]，佐々木 健太郎[1]，耳田 直純[2]，野中 聡子[3,4]，江面 浩[2,3,4]，今井 亮三[1,3]　([1]農研機構･生物研，[2]サナテックシード(株)，[3]筑波大･生命環境系，[4]つくば機能植物イノベーション研究センター)

3D4a03　*in planta* Particle Bombardment 法によるソバのゲノム編集系の開発
9:52　○手塚 大介[1]，平山 裕美子[1]，ルオ ウェイフェン[1]，勝 賢二郎[2]，鈴木 達郎[2]，今井 亮三[1]　([1]農研機構･生物研，[2]農研機構･九沖農研)

3D4a04　TALEN タンパク質を用いた遺伝子組換えを使わない植物ゲノム編集技術の確立
10:03　ルオ ウェイフェン[1]，○竹元 廣大[1]，横井 彩子[1]，加藤 悦子[2]，鈴木 喜大[3]，鈴木 麟太郎[1]，佐々木 健太郎[1]，今井 亮三[1]　([1]農研機構･生物機能利用研究部門，[2]東洋大･食環境科学，[3]農研機構･高度分析センター)

3D4a05　コナラ属植物のイソプレン生産機構の解明
10:14　○小板 青空[1]，福島 健児[2]，永野 惇[3,4]，佐竹 暁子[5]，三浦 謙治[6]，棟方 涼介[1,7]，矢﨑 一史[1]　([1]京大･生存研，[2]Wurzburg大，[3]慶應大，[4]龍谷大，[5]九大，[6]筑波大，[7]JST･さきがけ)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3D4a06　シロイヌナズナ種内雑種で見られる非相加的発現遺伝子とバイオマス増大との関係解析
10:33　○山口 真明[1]，杉 直也[1,2]，鈴木 穣[3]，草野 都[1,4]，柴 博史[1,5]　([1]筑波大院生命，[2]横市木原研究所，[3]東大院新領域，[4]理研CSRS，[5]筑波大T-PIRC)

3D4a07　雑種強勢を示すシロイヌナズナ F1 雑種における光呼吸時に生じる NH4+ の再同化機構に関する研究
10:44　○平山 十右子[1]，山口 真明[1]，野崎 雪乃[1]，桾澤 都月[2]，杉 直也[3]，LE Quynh[4]，鈴木 穣[5]，草野 都[1]，柴 博史[1,6]　([1]筑波大院･理工情報生命学術院，[2]筑波大生物資源，[3]横浜市大･木原生研，[4]トゥイロイ大，[5]東大院･新領域，[6]筑波大つくば機能植物イノベーション研究センター)

3D4a08　酸化ヌクレオチド除去に関与するトマト Nudix hydrolase の探索
10:55　○横山 聡太郎，力石 和英，杉本 学　(岡山大植物研)

3D4a09　生殖様式の転換に関わるコケ植物苔類の性決定遺伝子発現制御の解析
11:06　○安居 佑季子[1]，田中 知葉[1]，下川 瑛太[1]，井上 慎子[1]，嶋村 正樹[2]，河内 孝之[1]　([1]京都大･院･生命科学，[2]広島大･院･統合生命科学)

3D4a10　ジャトロファにおける花成因子 *FT* 遺伝子群の発現挙動の解析
11:17　○河合 弘太，友岡 楓，安藤 佑紘，明石 欣也　(鳥取大院･持社創生)

a11〜a12 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3D4a11　シロイヌナズナの種間不和合性に関わる新規転写調節因子 SPRI2 の機能解析
11:36　○伊藤 星太郎[1]，山本 絵里[1]，Tangpranomkorn Surachat[1]，木村 友香[1]，加藤 義宣[1,2]，新留 真紀[1]，高山 誠司[1]，藤井 壮太[1,3]　([1]東大院農，[2]JSTさきがけ，[3]サントリーSunRiSE)

3D4a12　アマ科植物における異形花型自家不和合性制御遺伝子の解析
11:47　○板倉 健[1]，村瀬 浩司[1,2]，山口 真明[3]，加藤 義宣[1]，安山 成基[1]，藤井 壮太[1]，柴 博史[3]，高山 誠司[1]　([1]東大院農，[2]国立研究開発法人科学技術振興機構，[3]つくば機能植物イノベーション研究センター)

D4 会場　午後の部(13:50〜15:26)

植物—遺伝子-機能，発現制御/植物工学-育種，物質生産，形質転換—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3D4p01　アマ科植物の異形花型不和合性における Thrum 特異的遺伝子のゲノム編集による解析
13:50　○田中 麻紀[1]，村瀬 浩司[1]，山口 真明[2]，板倉 健[1]，加藤 義宣[1]，藤井 壮太[1]，柴 博史[2]，高山 誠司[1]，木村 友香[1]，長江 拓也[1]　([1]東大院農，[2]筑波大院)

3D4p02　センブリカルスの有用物質生産系の開発に向けた培養条件の確立 I
14:01　○松本 紘汰，棟方 快徒，原 光二郎，小峰 正史，川上 寛子　(秋田県大院生物資源)

3D4p03　二次代謝活性化によるセンブリカルスの有用物質生産系の開発
14:12　○棟方 快徒，松本 紘汰，川上 寛子，小峰 正史，原 光二郎　(秋田県大院生物資源)

3D4p04　アグロ浸潤法によるベンサミアナタバコ葉における植物インスリン「コロソリン酸」の異種生産
14:23　○關 光[1,2]，JUTAPAT Romsuk[1]，三浦 謙治[3]，村中 俊哉[1,2]　([1]阪大院･工･生物工学，[2]大阪大学先導的学際研究機構，[3]筑波大学生命環境系)

3D4p05　ゲノム編集藻類の屋外培養を可能にする外来遺伝子フリーゲノム編集システムの開発
14:34　○栗田 朋和[1]，岩井 雅子[2]，岡崎 久美子[3]，前田 真一郎[4]，高見 明秀[4]，坂本 敦[3]，太田 啓之[2,5]，佐久間 哲史[3]，山本 卓[1,3]　([1]広島大ゲノムイノベーションセンター，[2]ファイトリピット･テクノロジーズ(株)，[3]広島大院統合生命，[4]マツダ(株)，[5]東工大生命理工)

p06〜p08 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3D4p06　ゲノム編集作物開発に有用な多重ゲノム編集用プラスミドセットと簡便高密度水耕栽培法
14:53　○黒田 昌治，パク ヒョンジュン，及川 鉄男　（農研機構 生物研）

3D4p07　植物による動物型化糖鎖をもつタンパク質生産
15:04　○大窪 華和[1]，梶浦 裕之[2]，三﨑 亮[2]，藤山 和仁[2]　（[1]阪大院工，[2]阪大生国セ）

3D4p08　Towards Microneedle Array-assisted Delivery in Rice: Assessment of Multiplex CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes Activities Targeting *OsPDS*
15:15　○NAZRUL HISHAM BIN NAZARUDDIN[1,2], AYANA YAMAGISHI[1,2], CHIKASHI NAKAMURA[1,2]　([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]AIST)

D5 会場　午前の部（9:30〜11:28）

酵素―糖質代謝関連酵素/その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3D5a01　がん腫瘍微小環境の破壊を目指した細胞接着阻害剤：非天然型ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の開発
9:30　荒田 七星[1]，本多 航[2]，夏 智弘[2]，平野 貴子[1,2]，○袴田 航[1,2]（[1]日大･生資科，[2]日大院･生資科）

3D5a02　細胞老化関連創薬を目指した新規老化関連糖質分解酵素の探索
9:41　○夏 浩智[1]，那須田 悠太[2]，羽切 保乃華[2]，平野 貴子[1,2]，袴田 航[1,2]　（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

3D5a03　*Vibrio* 属新規ウルバン資化細菌のウルバン分解酵素の解析
9:52　○大西 浩平，長江 麻弥，田邊 海晴，木村 友紀　（高知大農林海洋）

3D5a04　霊長類腸内に棲息するビフィズス菌のユニークな植物由来糖質代謝経路
10:03　○井上 萌[1]，小酒井 智也[1]，佐々木 優紀[1]，中島 有登[1]，阪中 幹祥[1]，藤田 清貴[2]，片山 高嶺[1]　（[1]京大院生命，[2]鹿大院農）

3D5a05　Bifidobacterium bifidum 由来 GH101 酵素の機能解析
10:14　○桝本 麗花子[1]，小酒井 智也[1]，阪中 幹祥[1]，芦田 久[2]，片山 高嶺[1]，加藤 紀彦[1]　（[1]京大院生命，[2]近畿大院･生物理工）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3D5a06　*Arthobacter* sp. KI72 由来ナイロン分解酵素 NylC の基質認識に関わるアミノ酸残基の特定
10:33　○飯笹 さやか，加藤 太一郎　（鹿児島大院理工）

3D5a07　Se 循環に関わる新奇トリメチルセレノニウムメチル基転移酵素 TmsA の基質特異性
10:44　○曽羽 香南子[1]，越智 杏奈[1]，井上 真男[1,2]，青野 陸[1]，佐藤 総一[3]，小椋 康光[4]，三原 久明[1]　（[1]立命大･生命，[2]立命大･R-GIRO，[3]東洋大･理工，[4]千葉大･院薬）

3D5a08　ブロッコリー GAPC の触媒システイン残基の S-セラニル化が酵素機能に及ぼす影響
10:55　○武田 徹[1,2]，南 裕子[2]，大沼 貴之[1,2,3]　（[1]近畿大農，[2]近畿大院バイオ，[3]近畿大アグリ技研）

3D5a09　組換え大腸菌における海洋細菌由来ポリアミド 4 分解酵素の発現と諸性質解明
11:06　○齋藤 祐介[1]，山田 美和[2]　（[1]岩手大院･農，[2]岩手大･農）

3D5a10　ヒトピルビン酸キナーゼ M1 を ATP 再生酵素とするリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法
11:17　○兒島 憲二[1]，森本 健太[2]，JUMA Kevin Maafu[2]，滝田 禎亮[2]，齋藤 一樹[1]，柳原 格[3]，藤原 伸介[4]，保川 清[2]　（[1]姫獨大薬，[2]京大院農，[3]大阪母子医療セ，[4]関学大生命環境）

D5 会場　午後の部（14:01〜16:40）

酵素―タンパク質・ペプチド代謝関連酵素，核酸代謝関連酵素/酸化還元酵素/その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

3D5p02　グルタチオン加水分解酵素 GGP1 の機能と構造
14:01　○曽根 康世[1]，伊藤 岳洋[2]，大津 直子[2]，伏信 進矢[1,3]　（[1]東大院･農，[2]農工大院･連農，[3]東大･CRIIM）

3D5p03　セリンプロテアーゼ *Staphylococcus* exfoliative toxin ExhC の立体構造解析
14:12　○佐藤 柊[1]，小薗 拓馬[1]，西河 淳[1]，郭 旭[2]，F. S. ラガブ ロカイア[2]，西藤 公司[2]，殿塚 隆史[1]　（[1]東京農工大院農応用生命化学，[2]東京農工大院農共同獣医）

3D5p04　リボヌクレオチドレダクターゼをノックアウトした大腸菌の生育評価と代替経路導入の検証
14:23　○出口 賢児[1]，斯 大勇[1]，堀之内 伸行[1]，小園 祥子[1]，竹内 道樹[1]，日比 慎[2]，ポール アンソニー[3]，小川 順[1]　（[1]京大院農，[2]富山県立大工，[3]オークランド大学）

3D5p05　*Kluyveromyces lactis* 由来ラクターゼ製剤中に存在するラクターゼ不安定化因子の精製と諸性質の解明
14:34　○菅原 麻美[1]，吉川 潤[2]，堀口 博文[1]　（[1]合同酒精株式会社，[2]現　東京農業大学）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3D5p06　アンジオテンシン変換酵素 2（ACE2）の硫酸化解析
14:53　○黒木 勝久[1]，出向 みほ[1]，遠藤 順子[1]，池田 有輝[1]，柳井 健太郎[1]，寺本 岳大[2]，角田 佳充[2]，水光 正仁[1]，榊原 陽一[1]（[1]宮崎大農，[2]九大院農）

3D5p07　組換え生産したヒメツリガネゴケ由来ペルオキシダーゼ（rPrx34）はルミノールと強く反応し，ポリマーを形成する。
15:04　○伊藤 健司[1]，松本 虎太郎[2]，秋田 求[2]　（[1]近畿大院　生物工学，[2]近畿大　生物工）

3D5p08　立体選択的 5-hydroxylysine 合成酵素及び脱水素酵素の発見と機能解析
15:15　○川合 誠司[1]，勝山 陽平[1,2]，原 良太郎[3]，若松 美紀[4]，阪本 剛[4]，高松 杏壮[5]，井浦 崇敦[5]，小川 順[6]，大西 康夫[1,2]　（[1]東大院･農生科･応生工，[2]東大･微生物イノベ連携機構，[3]京大院農･産業微生物，[4]三菱ケミカル･SIC，[5]APIコーポレーション･技術セ，[6]京大院農･応用生命）

3D5p09　放線菌由来 P450（CYP105A1）の R84A 変異体による非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）の代謝
15:26　○滝田 禎亮[1]，和田 萌加[1]，山形 昌也[1]，鎌田 成栄[1]，水谷 公彦[1]，三上 文三[3,4]，余語 祐哉[2]，安田 佳織[2]，濱田 昌弘[2]，榊 利之[2]，保川 清[1]　（[1]京大院農，[2]富山県立大，[3]京大生存圏研，[4]京大エネルギー研）

3D5p10　構造生物学と電気化学で解明する酢酸菌由来フルクトース脱水素酵素の直接電子移動
15:37　○鈴木 洋平[1]，宋和 慶盛[1]，加納 健司[2]，北隅 優希[1]，白井 理[1]　（[1]京大院農，[2]京大産官学連携本部）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3D5p11　*Myrothecium verrucaria* 由来ビリルビンオキシダーゼの *Aspergillus* 属糸状菌での高生産と特性解析
15:56　○加戸 悠[1,2]，仙波 弘雅[1]，山田 浩之[1]，坪井 宏和[1]，坊垣 隆之[1]，幸田 明生[1]，片岡 邦重[3]，高木 昌宏[4]，辻野 義雄[1,2,4]（[1]大関総研，[2]神戸大院科技イノベ，[3]金沢大理工，[4]北陸先端大マテリアル）

3D5p12　*Pseudomonas* sp. SCT 株由来の異化的ヨウ素酸還元酵素 Idr に関する研究
16:07　○佐藤 陽彦[1]，久保 拓舞[2]，天知 誠吾[2]　（[1]千葉大園芸，[2]千葉大院園芸）

3D5p13　酵素活性と基質への結合親和性に関するバイオインフォマティクス解析
16:18　○田村 太陽[1,2]，大岡 英史[2]，藤島 皓介[1,3]　([1]慶應大，[2]理研 CSRS，[3]東工ELSI)

3D5p14　放線菌由来 hydrazidase のパラベン分解活性に関する解析
16:29　○竹野谷 美穂子，伊藤 晋作，佐々木 康幸，矢嶋 俊介　(東農大生命)

D6 会場　午前の部(9:30〜11:06)

動物―個体-生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3D6a01　骨格筋における新たなカルシウムイオン制御因子の発見
9:30　○佐々木 崇，佐藤 隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

3D6a02　骨格筋における新規カルシウムイオン制御因子の発現制御機構解析
9:41　○魯 意，山内 祥生，佐藤 隆一郎，佐々木 崇　(東大院・農生科・応生化)

3D6a03　骨格筋における Store Operated Calcium Entry 応答性遺伝子の探索
9:52　○後藤 舞奈，山内 祥生，佐藤 隆一郎，佐々木 崇　(東大院・農生科・応生化)

3D6a04　廃用性筋萎縮モデルマウスにおける線維化関連因子の発現の特徴について
10:03　○阿部 瑞樹[1]，松本 乃乃花[1]，天部 雅貴[2]，森田 暁大[2]，増澤(尾﨑) 依[3]，細野 崇[2,3]，関 泰一郎[2,3]　([1]日大・生資科・生命化，[2]日大院・生資科・応生科，[3]日大・生資科・バイオ)

3D6a05　各種筋萎縮モデルマウスにおける骨格筋の萎縮と筋萎縮関連因子の発現の特徴について
10:14　○松本 乃乃花[1]，阿部 瑞樹[1]，天部 雅貴[2]，森田 暁大[2]，増澤(尾﨑) 依[3]，細野 崇[2,3]，関 泰一郎[2,3]　([1]日大・生資科・生命化，[2]日大院・生資科・応生科，[3]日大・生資科・バイオ)

a06〜a08 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3D6a06　酢酸イソアミルの香り知覚に寄与するヒト嗅覚受容体の同定
10:33　○伊原 さよ子[1]，新村 芳人[2]，白須 未香[1]，岡本 雅子[1]，小川 芳幸[3]，高山 文博[3]，東原 和成[1]　([1]東大院農，[2]宮崎大農，[3]株式会社NTTデータ経営研究所)

3D6a07　栄養，熱及びその複合刺激による骨格筋マイオカインの動態変化
10:44　○矢澤 望実[1]，水関 祐歩[2]，石内 友里[2]，平岩 絵梨花[1]，篠崎 綾香[1]，村田 圭吾[2]，根建 拓[2]　([1]東洋大生命科，[2]東洋大院生命科)

3D6a08　暑熱順化における骨格筋マイオカインの動態変化
10:55　○工藤 優華[1]，水関 祐歩[2]，村田 圭吾[2]，根建 拓[2]　([1]東洋大生命，[2]東洋大院生命)

D6 会場　午後の部(13:50〜16:18)

動物―タンパク質-構造，機能，活性制御，分解，局在制御，プロテオーム/細胞工学-物質生産，タンパク質工学，細胞培養技術，幹細胞技術，ゲノム編集技術/その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3D6p01　大腸菌の細胞壁合成に必須な脂質フリッパーゼ MurJ を阻害する抗菌ペプチド Lys^{M} の生化学的解析
13:50　○甲賀 栄貴，Napathip LERTPREEDAKORN，田中 宏幸，宮崎 亮次，塚崎 智也　(奈良先端大)

3D6p02　脂質代謝制御因子 MIG12 のユビキチン化修飾機構解析
14:01　○行川 朋花[1]，西山 僚介[2]，鈴木 司[1]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大・応生科・農化，[2]東農大院・応生科・農化)

3D6p03　ホタテ(*Mizuhopecten yessoensis*)におけるシステンリッチのメタロチオネイン様カドミウム結合タンパク質の同定と機能解析
14:12　○鄭 澤華[1]，加藤 由悟[1]，根岸 瑠美[2]，胡桃坂 仁志[2]，中木戸 誠[3]，津本 浩平[3]，鈴木 道生[1]　([1]東大院農，[2]東大定量研，[3]東大院工)

3D6p04　自己免疫疾患において観察されたリジンモノメチル化の特異的変化
14:23　○山口 公輔，内田 浩二　(東大院農)

3D6p05　小胞体ストレス依存的な PGRN の発現制御およびその生理的意義
14:34　○王 泊鈞[1]，沈 玉菠[2]，根建 拓[2]　([1]東洋大生命，[2]東洋大院生命)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3D6p06　小胞体ストレスセンサー IRE1 による活性酸素種の直接的感知と分子シャペロンによるその制御
14:53　○松崎 元紀[1,2,3]，金村 進吾[4]，齋尾 智英[1]，稲葉 謙次[3,5]，奥村 正樹[2,3]　([1]徳大先端酵素，[2]東北大学際研，[3]東北大多元研，[4]関学大理，[5]九大生医研)

3D6p07　ダイズシストセンチュウの温度走性撹乱物質の探索
15:04　○福田 純太，佐々木 康幸，矢嶋 俊介，伊藤 晋作　(東農大院バイオ)

3D6p08　食用培養肉に向けた無血清筋成熟誘導培地の探索
15:15　○野田 笙太[1,2]，澤山 淳[3]，古橋 麻衣[4]，池尾 聡[2]，竹内 昌治[1,2,3,4]　([1]東京大学大学院 総合文化研究科，[2]東京大学 生産技術研究所，[3]東京大学大学院 情報理工学系研究科，[4]東京大学大学院 工学系研究科)

3D6p09　In vitro におけるヒト iPS 細胞由来星細胞が膵がん抗がん剤感受性に及ぼす影響解析
15:26　○加茂 皓基[1]，米谷 達哉[2]，千葉櫻 拓[1]　([1]東農大院・バイオ，[2]東農大院・健康)

3D6p10　ヒト肝臓オルガノイドの培養技術開発と生理機能評価
15:37　○XIA Chen，髙橋 裕，久保山 文音，廣 佳穂里，山内 祥生，佐藤 隆一郎　(東大院農)

p11〜p12 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3D6p11　培養肉作製へ有用な果実抽出液の探索
15:56　○角野 陽奈美[1]，野田 笙太[2,3]，古橋 麻衣[5]，池尾 聡[3]，澤山 淳[4]，竹内 昌治[2,3,4,5]　([1]三田国際学園高等学校，[2]東京大学大学院 総合文化研究科，[3]東京大学 生産技術研究所，[4]東京大学大学院 情報理工学系研究科，[5]東京大学大学院 工学系研究科)

3D6p12　DAAO Engineering for Specific D-Alanine Detection: A single-molecule display approach
16:07　○Kalhari Munaweera，Kakeru Ikeda，Jasmina Damnjanovic，Hideo Nakano　(Graduate school of Bioagricultural sciences，Nagoya University)

D7 会場　午前の部(9:30〜12:09)

生物科学―タンパク質・ペプチド科学-構造，機能，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3D7a01　Heterologous expression of the Cameria cinensis ammonium transporter CsAMT1.3，the major transporter in tea leaves
9:30　○Han WANG，Suguru OKUDA，Hideaki ITOH，Ken OKAMOTO，Peng LU，Koji NAGATA　(The Univ. of Tokyo)

3D7a02　Biochemical and biophysical analyses reveal weak and transient interaction between bacterial cellulose synthase (Bcs) subunits E and F
9:41　○Audrey Mae Orillaza[1], Hideaki Itoh[1], Peng Lu[1], Ken Okamoto[1], Michio Suzuki[2], Suguru Okuda[1], Koji Nagata[1] ([1]Laboratory of Food Biotechnology and Structural Biology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [2]Laboratory of Analytical Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

3D7a03　Identification of a novel subtilisin-derived peptide with cytotoxic activity
9:52　○Sibo WEI, Li LI, Michio SUZUKI, Peng LU, Suguru OKUDA, Ken OKAMOTO, Hideaki ITOH, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

3D7a04　The cytotoxicity, localization, and interaction with host-protein of proteins encoded by ORFs from ASFV strain Georgia
10:03　○Yuxue NIU[1], Hayato MASUTANI[1], Shiho SAITO[1], Peng LU[1], Ken OKAMOTO[1], Suguru OKUDA[1], Michio SUZUKI[1], Takehiro KOKUHO[2], Hideaki ITOH[1], Koji NAGATA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]NARO)

3D7a05　アクロレイン-リジン付加体に対する抗体による抗原認識機構の解析
10:14　○牧野 航大, 隋 苗苗, 齋藤 志ほ, 奥田 傑, 伊藤 英晃, 岡本 研, 鈴木 道生, 陸 鵬, 内田 浩二, 永田 宏次 (東大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3D7a06　アルデヒド修飾アミノ酸 Methylglyoxal-arginine の mAb 6B による認識機構の可視化
10:33　○野坂 柚奈, 隋 苗苗, 齋藤 志ほ, 陸 鵬, 伊藤 英晃, 岡本 研, 鈴木 道生, 奥田 傑, 内田 浩二, 永田 宏次 (東大院農)

3D7a07　アフリカ豚熱ウイルスの高効率 DNA 複製に重要と考えられるチミジンキナーゼの調製
10:44　○神 さくら[1], 髙田 幸之介[1], 劉 暢[1], 奥田 傑[1], 岡本 研[1], 伊藤 英晃[1], 鈴木 道生[1], 陸 鵬[1], 國保 健浩[2], 永田 宏次[1] ([1]東大院農, [2]農研機構)

3D7a08　モジュラーポリケチド合成酵素の立体構造推定
10:55　○齋藤 怜奈[1,2], 武田 知己[1,2], 湯澤 賢[1,2] ([1]慶大･先端生命研, [2]慶大院･政策メディア･先端生命)

3D7a09　シガテラ中毒の治療のためのヒト化抗シガトキシン抗体の創製
11:06　○山口 亜佐子, 相野 弘明, 円谷 健, 平間 正博, 藤井 郁雄 (阪公大理)

3D7a10　スギヒラタケが引き起こす急性脳症に関与する毒性タンパク質の生化学的研究
11:17　○佐藤 匠[1], 中村 瑠奈[1], 茅谷 佳祐[1], 小野 晶子[1,2], 田中 裕基[1], 崔 宰熏[3,4,5], 道羅 英夫[3,5], 平井 浩文[3,4,5], 深沢 嘉紀[1], 河岸 洋和[3,5], 鈴木 智大[1,5] ([1]宇都宮大･バイオ, [2]森林総合研究所, [3]静岡大･グリーン研, [4]静岡大･農, [5]静大･キノコ科研)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3D7a11　脱アミド化した β 2-ミクログロブリンの全合成
11:36　○川上 隆治, 高尾 敏文, 伊藤 駿, 北條 裕信 (阪大　蛋白研)

3D7a12　ヤナギマツタケ(*Agrocybe cylindracea*)の子実体特異的タンパク質がもつ生体防御機能の解析
11:47　○蔵谷 大和[1], 宮原 浩二[1], 松本 顕[2], 浴野 圭輔[1], 岩田 眞人[3], 太田 広人[1], 安藤 祥司[1] ([1]崇城大･生物生命, [2]順天堂大･医, [3]アイエムビー(株))

3D7a13　キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素のキノン補酵素生合成に果たすヘム含有サブユニットの役割
11:58　○中島 代詠[1], 大関 俊範[1], 中井 忠志[2], 谷澤 克行[1], 岡島 俊英[1] ([1]阪大産研, [2]広島工大生命)

D7 会場　午後の部(13:50〜16:40)

生物科学—タンパク質・ペプチド科学-構造，機能，その他—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3D7p01　アコヤガイ貝殻真珠層におけるキチン分解酵素の役割の解明
13:50　○朱 凌霄, 鈴木 道生 (東大院農)

3D7p02　貝殻タンパク質 BMSP の T リッチ領域と炭酸カルシウム結晶の関係についての研究
14:01　○志田 晶[1], 二川 慶[2], 大嶋 啓介[2], 加藤 由悟[2], 鈴木 道生[2] ([1]東大農, [2]東大院農)

3D7p03　アコヤガイ貝殻真珠層から発見された新規バイオミネラルタンパク質の機能解析
14:12　○大嶋 啓介, 鈴木 道生 (東大院農)

3D7p04　アコヤガイ靭帯の酸性ペプチド LICP の溶液 NMR 法を用いた構造・機能解析
14:23　○二川 慶[1], 森岡 太一[1], 池谷 鉄兵[2], 伊藤 隆[2], 片山 秀和[3], 永田 宏次[1], 鈴木 道生[1] ([1]東大院農, [2]都立大院理, [3]東海大工)

3D7p05　LC/MS による日本人の母乳中のペプチドの網羅的分析
14:34　○津田 智弘[1], 野尻 恵資[2], 鈴木 菜那[1], 日暮 聡志[2], 上西 寛司[1] ([1]雪印メグミルク株式会社, [2]雪印ビーンスターク株式会社)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3D7p06　AAA+ ATPase 複合体による化学合成独立栄養性細菌の Rubisco 再活性化の構造基盤
14:53　○廖 増威[1], ゴパラシンガム チャイ[2], ゲーレ クリストフ[2], 重松 秀樹[3], 亀谷 将史[1,4], 新井 博之[1,4], 伏信 進矢[1,4] ([1]東大院農, [2]理研, [3]高輝度光科学研究セ, [4]東大･CRIIM)

3D7p07　大腸菌翻訳アレストペプチドの探索とリボソームディスプレー法への適用
15:04　○牧野 祥嗣, 金井 保 (富山県大工)

3D7p08　アデノシン三リン酸によるアミロイドβの分子運動速度の上昇と線維化の抑制
15:15　○中村 桃佳[1], 倉持 晶弘[2], 髙橋 大翔[2], 小森谷 友絵[1], 吉宗 一晃[1] ([1]日大院生産工, [2]茨城大工)

3D7p09　超好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* 由来アルコール脱水素酵素の機能と溶液中での立体構造変化の解析
15:26　○岩村 陽子, 郷田 秀一郎 (創価大院理工)

3D7p10　tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構に見出した酸素感受性の反応とその環境適応進化
15:37　○鳴 直樹 (産総研･早大OIL)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3D7p11　分子表面の芳香族アミノ酸クラスターがデンプン結合ドメインの構造安定性とフォールディングにおよぼす影響
15:56　○杉本 華幸, 福富 瑚乃, 赤澤 由布, 長田 拓己, 鈴木 一史 (新潟大農)

3D7p12　クロガケジグモ(*Badumna insignis*)の毒液に含まれるペプチド成分の構造決定
16:07　○山本 怜[1], Alhussin M.A. Megaly[2], 中川 好秋[1], 宮下 正弘[1] ([1]京大院農, [2]Al-Azhar Univ.)

3D7p13　大腸菌で機能する *Physcomitrium patens* 由来ペルオキシダーゼ Prx34 のシグナルペプチド
16:18　○松本 虎太郎[1], 伊藤 健司[2], 秋田 求[1] ([1]近畿大　生物工, [2]近畿大院　生物工学)

3D7p14　酵母ツーハイブリッド法によるヒトフィラグリンと相互作用するヒトケラチン 10 のドメインの同定
16:29　○河合 甚八，渡邊 哲也，佐藤 知樹，奥村 裕紀，氏田 稔（名城大院農）

E1 会場　午前の部（9:30〜11:28）

微生物―物質生産-醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3E1a01　麹菌および乳酸菌を用いた麦茶粕の発酵および風味の変化
9:30　○折居 千賀　（（公財）東洋食品研究所）
3E1a02　生酛における酒造年度ごとの乳酸菌叢の多様性
9:41　○竹内 赴登[1]，伊藤 一成[1]，三宅 祐治[2]，谷野 有佳[1]，渡邊 秀造[2]，渡邊 酵造[2]，三宅 剛史[1]　（[1]岡山県工技セ，[2]白菊酒造（株））
3E1a03　奈良県ゆかりの植物からの清酒用酵母の分離とその特性
9:52　○都築 正男，桒原 智也，立本 行江　（奈良県産振セ）
3E1a04　奈良漬の伝統的製法に固有の微生物叢を形成する乳酸菌
10:03　○吉岡 求[1]，増田 幸彦[2]，渡辺 大輔[1]　（[1]奈良先端大バイオ，[2]奈良屋本店）
3E1a05　ラム酒の発酵醪およびダンダー中の微生物群集構造の解析
10:14　○黒木 葉菜[1]，堀越 美晴[1]，青木 大成[2]，天知 誠吾[3]　（[1]千葉大園芸，[2]ペナシュール房総株式会社，[3]千葉大・院園芸）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3E1a06　複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御：pH 制御による メタ連続発酵における 細菌叢と有機酸生産の動的変化の追跡
10:33　○古閑 友紀[1]，梶本 寛太[1]，宮本 浩邦[2,3,4]，酒井 謙二[1]，大城 麦人[1]，濱田 浩幸[1]，田代 幸寛[1]　（[1]九大院生資環，[2]千葉大園芸，[3]理研生命医科学，[4]サーマス）
3E1a07　鰹節カビに内在するマイコウイルスが宿主に与える影響
10:44　○武馬 聖二[1,2]，浦山 俊一[3,4]，周防 玲[1]，糸井 史郎[1]，岡田 茂[5]，二宮 章洋[5]　（[1]日大生物資源，[2]東大農，[3]筑波大生命環境，[4]筑波大MiCS，[5]東大院農）
3E1a08　野生国酒酵母による醸造法
10:55　薄井 周太，村上 義揮，雑賀 俊多，渡 彦大，森谷 千星，渡邉 康太，中山 俊一，○門倉 利守　（東京農大　醸造）
3E1a09　レーズンと水からワインができる仕組み
11:06　○日尾 守[1]，村田 憲亮[1]，髙瀬 隆一[1]，渡辺 大輔[2]，小倉 康平[1]，橋本 渉[1]　（[1]京大院・農，[2]奈良先端大・バイオ）
3E1a10　イソブタノール生産を評価する酵母バイオアッセイ系の確立と生産量向上に向けた代謝酵素改変への応用
11:17　○佐藤 源気[1]，黒田 浩一[2]　（[1]京大院・農・応用生命，[2]京都工繊大・分子化学）

E1 会場　午後の部（14:01〜16:40）

微生物―代謝-発酵生理，代謝調節/物質生産-醸造，発酵（一次代謝産物）―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:53〜14:01

3E1p02　Corynebacterium glutamicum の CS 集合化とグルタミン酸生産との機能的関連
14:01　○長岡 誠[1]，古園 さおり[1,2,3]，西山 真[1,2]　（[1]東大院農，[2]東大CRIIM，[3]理研CSRS）
3E1p03　大腸菌を用いた *N*-アセチルノイラミン酸発酵生産プロセスの構築
14:12　○氏原 哲朗，直江 大樹，吉岡 登希夫，社納 貴文，福本 一成　（協和発酵バイオ）
3E1p04　アミノ酸源の添加は *Shewanella oneidensis* MR-1 株の嫌気条件での増殖を促進する
14:23　○富田 啓介，池田 壮汰，高妻 篤史，渡邉 一哉　（東薬大生命）
3E1p05　*Gluconobacter* 属酢酸菌 CHM43 株の変異株を用いた 2-ケトグルコン酸生産
14:34　○中島 さくら[1]，片岡 尚也[1,2]，松谷 峰之介[3]，ムサド・ティッパヤサク ウライワン[4]，ティーラーグール ガンジャナ[4]，松下 一信[1,2]，薬師 寿治[1,2]　（[1]山口大・院創成科学，[2]山口大・中高温微研セ，[3]東京農業大・ゲノム，[4]カセサート大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3E1p06　オリーブ葉を基材とした固体培養における麹菌の生育とオリーブ葉麹の酵素活性
14:53　○谷野 有佳[1]，伊藤 一成[1]，竹内 赴登[1]，三宅 剛史[1]，橋本 敦子[2]，奥川 日菜乃[2]，山下 秀行[3]，吉田 靖弘[4]，徐 恵美[4]，菊地 敬一[4]，深野 夏暉[2]，仁戸田 照彦[2]，神崎 浩[2]　（[1]岡山県工技セ，[2]岡山大院・環境生命，[3]樋口松之助商店，[4]日本オリーブ）
3E1p07　小型通気式固体培養装置を用いた麹菌固体培養によるワインパミス成分の微生物変換
15:04　○岡 深雪[1]，藤田 彩楓[1]，奥川 日菜乃[2]，橋本 敦子[2]，三宅 剛史[3]，伊藤 一成[3]，谷野 有佳[3]，山下 秀行[4]，中川 拓郎[4]，平野 幸司[5]，深野 夏暉[2]，仁戸田 照彦[1,2]，神崎 浩[1,2]　（[1]岡山大農，[2]岡山大院・環境生命，[3]岡山県工技セ，[4]樋口松之助商店，[5]果実工房）
3E1p08　Microbial Conversion of Unpolished Thai-Coloured Rice by *Aspergillus* Solid-State Cultivation: Effect on Amino Acid Composition
15:15　○Jirayu Jitpakdee[1]，Kazunari Ito[2]，Yuka Tanino[2]，Hayato Takeuchi[2]，Hideyuki Yamashita[3]，Takuro Nakagawa[3]，Teruhiko Nitoda[1]，Hiroshi Kanzaki[1]　（[1]Grad. Sch. Environ. Life Sci.，Okayama Univ.，[2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture，[3]Higuchi Matsunosuke Shoten）
3E1p09　清酒製造現場での製麹を再現した培養における醸造関連酵素の遺伝子発現
15:26　○伊藤 一成[1]，谷野 有佳[1]，竹内 赴登[1]，五味 勝也[2]，狩山 昌弘[3]，三宅 剛史[1]　（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農，[3]（株）フジワラテクノアート）
3E1p10　Comparative study of triacylglycerol lipase in *Aspergillus oryzae* associated with adjunct use for dairy application
15:37　○Napaporn CHINTAGAVONGSE[1]，Yukina KAWAKAMI[1]，Koichi TAMANO[2]，Toru HAYAKAWA[1]，Jun-ichi WAKAMATSU[1]，Haruto KUMURA[1]　（[1]Applied Food Science Laboratory，Graduate School of Agriculture，Hokkaido Univ.，[2]Bioproduction Research Institute，AIST Hokkaido）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3E1p11　*β*-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine による *Vibrio* 属細菌のキチン代謝活性化システムの推測
15:56　○平野 貴子[1,2]，津田 紘伸[2]，西尾 俊幸[1]，袴田 航[1,2]　（[1]日大生資科，[2]日大院生資科）
3E1p12　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞膜ミクロドメイン形成におけるミクロリポファジーの役割
16:07　○中辻 拓実[1]，白石 晃將[1]，奥 公秀[2]，阪井 康能[1]　（[1]京大院農，[2]京都先端科学大学）
3E1p13　*Citrobacter braakii* TB-96 株における グリセロール存在下での高発現かつ安定的なプロモーター選抜
16:18　○木村 武蔵[1]，鮫島 礼[1]，柳瀬 卓馬[1]，吉田 ナオト[1]，中島（神戸） 敏明[2]，清 啓自[1]　（[1]宮大院農，[2]筑波大院生命環境系）

3E1p14　*Gluconobacter japonicus* が持つ PQQ5 は D-乳酸を基質にする膜結合型キノプロテインである
16:29　○竹内 秀[1]，片岡 尚也[1,2]，松下 一信[1,2]，薬師 寿治[1,2]　([1]山口大･院創成科，[2]山口大･中高温微セ)

E2 会場　午前の部(9:30〜11:28)

微生物―細胞-細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3E2a01　A gene cluster coding for multiple predicted glycosyl transferases is involved in the biogenesis of extracellular membrane vesicles of *Shewanella vesiculosa* HM13
9:30　○Mengshan Zhu，Jun KAWAMOTO，Takuya OGAWA，Tatsuo KURIHARA　(Institute for Chemical Research，Kyoto University)

3E2a02　*Shewanella vesiculosa* HM13 の細胞外膜小胞生産におけるダイナミン様タンパク質遺伝子クラスターの役割
9:41　○井上 宙夢，川本 純，小川 拓哉，栗原 達夫　(京大化研)

3E2a03　X-ray crystallographic analysis of a major cargo protein of extracellular membrane vesicles of a hypervesiculating bacterium，*Shewallena vesiculosa* HM13
9:52　○Yuanzheng YANG[1]，Jun KAWAMOTO[1]，Takuya OGAWA[1]，Kimihiko MIZUTANI[2]，Bunzo MIKAMI[3,4]，Tatsuo KURIHARA[1]　([1]Institute for Chemical Research，Kyoto University，[2]Graduate School of Agriculture，Kyoto University，[3]Research Institute for Sustainable Humanosphere，Kyoto University，[4]Institute of Advanced Energy，Kyoto University)

3E2a04　好気条件における膜小胞高生産乳酸菌の探索
10:03　○稲垣 日奈子[1]，菅野 美月[2]，二又 裕之[2,3,4]，田代 陽介[2,4]　([1]静大工，[2]静大院創造，[3]静大グリーン研，[4]静大院総合科技)

3E2a05　腸内細菌が産生する膜小胞の特性解析
10:14　○杜 昊聡，片倉 啓雄，山崎 思乃　(関西大･生化工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3E2a06　微生物間コミュニケーションを介した細胞外膜小胞の放出
10:33　○伊藤 碧美[1]，山本 千佳[1]，永沢 亮[2]，原田 潤[1]，鵜木 海緒[1]，尾花 望[3,5]，野村 暢彦[4,5]，豊福 雅典[4,5]　([1]筑波大院･生物資源科学学位P，[2]愛知医科大･医，[3]筑波大･医学医療系，[4]筑波大･生命環境系，[5]筑波大･MiCS)

3E2a07　Corynebacterium glutamicum における膜小胞を介した鉄獲得に関与する遺伝子の探索
10:44　○藤田 真愛[1]，永久保 利紀[3,4]，川島 花雪[2]，山本 達也[3]，野村 暢彦[3,4,5]，豊福 雅典[3,4]　([1]筑波大･生物資源，[2]筑波大院･生物資源科学，[3]筑波大院･生命環境，[4]筑波大･MiCS，[5]筑波大･TARA)

3E2a08　細菌における MV の受け取り因子の探索
10:55　○柏俣 青葉[1]，野村 暢彦[2,3]，豊福 雅典[2,3]　([1]筑波大院　生物資源学位，[2]筑波大　生命環境系，[3]筑波大　微生物サスティナビリティ研究センター)

3E2a09　大腸菌のセレンナノ粒子は細胞内で形成され膜に包まれて排出される
11:06　○越智 杏奈[1]，芝本 佳永[1]，豊竹 洋佑[1]，藤岡 大毅[1]，岡西 広樹[2]，青野 陸[1]，井上 真男[1,3]，金井 好克[2]，今井 友也[4]，三原 久明[1]　([1]立命大 生命，[2]大阪大 院医，[3]立命大 R-GIRO，[4]京大 生存研)

3E2a10　曲率認識ペプチドを用いた乳酸菌の膜小胞産生条件の検討
11:17　○中村 めい[1]，前川 沙喜子[2]，河野 健一[3]，片倉 啓雄[2]，山崎 思乃[2]　([1]関西大院･理工，[2]関西大･化生工，[3]京大院･薬学)

E2 会場　午後の部(13:50〜16:40)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3E2p01　グラム陽性細菌によるグラム陰性細菌の QS 誘導
13:50　○杉本 翠[1]，佐野 千佳歩[2]，永久保 利紀[3,4]，野村 暢彦[3,4]，豊福 雅典[3,4]　([1]筑波大･生命環境学群 生物資源学類，[2]筑波大院･生命地球科学研究群，[3]筑波大･生命環境系，[4]筑波大･微生物サスティナビリティ研究センター)

3E2p02　細菌間コミュニケーションによって制御される緑膿菌プロファージの解析
14:01　○上原 礼佳[1]，吉澤 晋[2]，木暮 一啓[2]，野村 暢彦[3,4]，豊福 雅典[3,4]　([1]筑波大院･理工情報生命学術院，[2]東京大･大気海洋研，[3]筑波大･生命環境系，[4]筑波大･MiCS)

3E2p03　細菌集団の一部で出現する新規生存形態の解明
14:12　○原田 潤[1]，兼松 周作[1]，野村 暢彦[2,3]，豊福 雅典[2,3]　([1]筑波大院･生物資源科学学位プログラム，[2]筑波大･生命環境系，[3]筑波大･微生物サステイナビリティー研究センター)

3E2p04　大腸菌細胞の配向秩序による細胞外マトリクス生産の不均一性
14:23　○横山 文秋，竹内 一将　(東大･理･物理)

3E2p05　トリプトフォールによる酵母のスフィンゴ脂質合成阻害とクオラムセンシング
14:34　○崎濱 由梨[1]，三岡 哲生[1]，望月 貴博[1]，加藤 拓[2]，只見 秀代[2]，三好 美穂[2]，永富 康司[2]，阿部 文快[1]　([1]青山学院大学，[2]サヒクオリティーアンドイノベーションズ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3E2p06　濃度応答性メタノール誘導において転写因子 KpMxr1 のリン酸化制御に関わるシグナル伝達因子の探索
14:53　○北山 岳人，井上 紘一，由里本 博也，阪井 康能　(京大農)

3E2p07　酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA 顆粒の時空間制御と特性評価
15:04　○関岡 風花，白石 晃將，赤木 美穂，幅田 亜香莉，由里本 博也，阪井 康能　(京大院農)

3E2p08　*Saccharomyces cerevisiae HKR1* 遺伝子のエキソン内在プロモーターによる発現制御機構
15:15　○今藤 俊宏，小澤 良太郎，細川 佑奈，笠原 紳　(宮城大･食産業)

3E2p09　*Saccharomyces cerevisiae HKR1* のエキソンに内在するプロモーターと発現産物の蛍光タンパク質による解析
15:26　○細川 佑奈，今藤 俊宏，小澤 良太郎，笠原 紳　(宮城大･食産業)

3E2p10　*Saccharomyces cerevisiae HKR1* 遺伝子のエキソン内在プロモーター領域の解析
15:37　○小澤 良太郎，今藤 俊宏，細川 佑奈，笠原 紳　(宮城大･食産業)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3E2p11　光によって誘導できる放線菌高生産系 iLiEX システムによる有用酵素の生産
15:56　○渡部 あいり[1]，野谷 龍太[1]，木船 智尋[2]，佐久間 祥吾[2]，山田 理緒[2]，髙野 英晃[1,2]　([1]日大院生資科，[2]日大生資科)

3E2p12　放線菌 *Streptomyces griseus* をホストとする光誘導型酵素生産システムの開発
16:07　村越 恭平，野谷 龍太，○高野 英晃　(日大院生資科)

3E2p13　枯草菌宿主での T7 発現系を利用したタンパク質分泌生産の検討
16:18　福原 大空，吉永 悠太，田中 智教，高橋 誉親，○広岡 和丈　(福山大生命工･生物工)

3E2p14　枯草菌におけるヘリオバクテリア光合成遺伝子クラスターの導入と異種発現
16:29　○天野 克海[1]，浅井 智広[2]，荷村 かおり[1]，高橋 裕貴[1]，板谷 光泰[3]，朝井 計[1]，渡辺 智[1]　([1]東農大生命，[2]中央大理工，[3]信州大工)

E3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

有機化学，天然物化学―生合成―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3E3a01　データーベースからの ATP 依存型ジアゾ化酵素の探索及び基質特異性評価
9:30　○寧 嘉宇[1]，川合 誠司[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)
3E3a02　放線菌二時代謝における亜硝酸を用いた芳香環アミノ化酵素の機能解析
9:41　○桑原 康[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)
3E3a03　Alazopeptin 生合成由来 *N*-acetyl-6-diazo-5-oxo-$_L$-norleucine 認識アデニル化酵素 AzpC の基質特異性の改変
9:52　○丸山 崇史[1]，三宅 恒輝[1]，川合 誠司[1]，森脇 由隆[1,2]，寺田 透[1,2]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)
3E3a04　*Streptomyces* 由来 cyclopenta[*b*]pyridine 含有ポリケタイド streptazone 類生合成の *in vitro* 解析
10:03　○平松 太地[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)
3E3a05　ジアゾ基含有アミノ酸 azaserine の生合成経路の *in vitro* 解析
10:14　○四海 佑亮[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3E3a06　細菌の中鎖 *Z* 型イソプレニルニリン酸合成酵素の鎖長制御機構の解析
10:33　○阿部 透，山之内 菜央，山崎 智也，上田 大次郎，佐藤 努　(新潟大院自然)
3E3a07　非末端環化型トリ / セスクアテルペン環化酵素の同定
10:44　○上田 大次郎[1]，鈴木 和佳奈[1]，寒河江 侑加[1]，井上 真央[1]，品田 哲郎[2]，佐藤 努[1]　([1]新潟大農，[2]阪公大理)
3E3a08　昆虫由来新規テルペン合成酵素の生成物の構造と諸性質の解析
10:55　○柴 逸，上田 大次郎，冨士川 成美，佐藤 努　(新大院農)
3E3a09　糸状菌 *Aspergillus lentulus* 由来の新規天然物 lentoclavine の生合成研究
11:06　○鈴木 亮大，永井 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)
3E3a10　真菌由来ニトリル基含有化合物 auranthine の生合成研究
11:17　○田村 翼，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3E3a11　コリバクチン生産菌の検出除菌による大腸がん予防法の確立
11:36　○小林 裕輝[1]，新貝 龍旦[1]，吉岡 泰淳[2]，三好 規之[2]，永翁 一代[1]，佐藤 道大[1]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]静岡県大食)
3E3a12　カキシメジの有毒成分ウスタル酸の生合成研究
11:47　○増山 侑哉，青木 聡樹，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)
3E3a13　Uncovering the reaction mechanism of unique dehydration in cochliodone biosynthesis
11:58　○Christopher Sarmales-Murga，Motoki Kosaka，Michio Sato，Kenji Watanabe　(Department of Pharmaceutical Sciences，University of Shizuoka)
3E3a14　遺伝子破壊法による渦鞭毛藻由来 SCCM 生合成遺伝子の解明
12:09　○本田 雅人[1]，安藤 知佳[2]，北 将樹[2]，恒松 雄太[2]　([1]名大農，[2]名大院生命農)

E3 会場　午後の部(13:50〜16:29)

有機化学，天然物化学―生合成―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3E3p01　抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成解析
13:50　○高橋 佑大[1]，角田 毅[2]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工)
3E3p02　イソキサゾリン構造を有するアシビシンの生合成解析
14:01　○布田 大志[1]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工)
3E3p03　ヒドラジド含有型天然物の生合成に関する研究
14:12　○西田 壮吾[1]，成冨 駿[1]，小倉 勇輝[1]，山崎 陽香[1]，角田 毅[2]，勝山 陽平[3,4]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工，[3]東大院農生科応生工，[4]東大・微生物イノベ連携機構)
3E3p04　ゲノムマイニングによる新規 GTP シクロヒドロラーゼの同定
14:23　○梅澤 朱理[1]，角田 毅[2]，新宅 一平[1]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工)
3E3p05　プロテアソーム阻害剤の生合成研究
14:34　○角田 毅[1]，古村 淳吉[2]，山崎 陽香[2]，小笠原 泰志[1]，大利 徹[1]　([1]北大院工，[2]北大院総化)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3E3p06　微細藻類由来 DHA 合成酵素の ketosynthase ドメインの機能解析
14:53　○尾形 海斗[1]，仲間 陸[1]，小林 飛悠[1]，角田 毅[2]，丸山 千登勢[3]，濱野 吉十[3]，氏原 哲朗[4]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工，[3]福井県大院生物資源，[4]協和発酵バイオ)
3E3p07　微細藻類由来 DHA 合成酵素の dehydratase ドメインの機能解析
15:04　○川田 智哉[1]，小林 飛悠[1]，大塚 慎[1]，角田 毅[2]，丸山 千登勢[3]，濱野 吉十[3]，氏原 哲朗[4]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工，[3]福井県大院生物資源，[4]協和発酵バイオ)
3E3p08　Vinigrol の生合成に関与する新規テルペン環化酵素の発見と機能解析
15:15　○佐藤 史都，塚田 健人，古村 翔，森下 陽平，菅原 章公，尾﨑 太郎，浅井 禎吾　(東北大院薬)
3E3p09　ゲノムマイニングの効率化を実現する長鎖遺伝子の麹菌内迅速再構築法の検討
15:26　○青木 翔吾，尾崎 太郎，菅原 章公，森下 陽平，浅井 禎吾　(東北大院薬)
3E3p10　*ustYa* 遺伝子のゲノムマイニングにより見出した cyclochlorotine 類縁生合成遺伝子クラスターの機能解析
15:37　○岡本 春太，尾崎 太郎，森下 陽平，菅原 章公，浅井 禎吾　(東北大院薬)

p11〜p13 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3E3p11　テトラエーテル脂質合成酵素ホモログの機能および生成物特異性の解明
15:56　○石原 和華[1]，井深 達哉[2]，伊藤 智和[1]，浅川 晋[1]，横川 隆志[2]，邊見 久[1]　([1]名大院生命農，[2]岐阜大工)

3E3p12　古細菌祖先型プレニル化フラビンモノヌクレオチド合成酵素の基質特異性
16:07　○伊志嶺 壮真[1]，星野 洋輔[2]，伊藤 智和[1]，邊見 久[1]　([1]名大農，[2]GFZドイツ地球科学研究センター)

3E3p13　ササラダニ類におけるシアン化水素生成のメカニズムに関する研究
16:18　○森山 太介[1]，高原 千尋[1]，島野 智之[2]，清水 伸泰[1]　([1]京都先端大バイオ環境，[2]法政大学自然科学センター)

E4 会場　午前の部(9:30〜12:20)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3E4a01　コロナウイルス感染患者における腸内細菌叢の変化
9:30　○中村 仁俊，池松 真也　(沖縄高専)

3E4a02　表面増強ラマン散乱におけるノロウイルス検出応答の安定性に関する研究
9:41　○前畑 秀叡[1]，Boonyakida Jirayu[2]，Memdi Indra[2]，朴 龍洙[1,2]　([1]静大院総合科技，[2]静大グリーン研)

3E4a03　DNA 結合タンパク質 gp32 に対する抗体を用いた迅速簡便な遺伝子検査法の開発
9:52　パム ニアンテイキム[1]，平川 由紀[2]，滝田 禎亮[3]，門間 敬子[2]，保川 清[2]，○吉宗 一晃[1]　([1]日大生産工，[2]京女大家政，[3]京大農)

3E4a04　微生物染色体 DNA 中のポリプリン / ポリピリミジン配列の解析と遺伝子型別へ の応用
10:03　○安川 和志　(富山県衛生研究所)

3E4a05　終末糖化産物受容体を活用した評価技術の開発と応用
10:14　○小堀 俊郎[1,2]，ガネーシュ ディーパック[1,2]，熊野 みゆき[1]，町田 幸子[1]　([1]農研機構食品研，[2]筑波大生命環境)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3E4a06　粉体工学的アプローチと機械学習を用いたカブトムシ三齢幼虫の雌雄分類
10:33　○高井 千加[1,2]，山下 誠司[3]　([1]岐阜大工，[2]東北大多元研，[3]名大工)

3E4a07　ポリシアル酸とドーパミン誘導体の相互作用解析
10:44　○早川 開都[1,2]，羽根 正弥[1,2,3]，田中 浩士[4]，呉 迪[1,2,3]，北島 健[1,2,3]，佐藤 ちひろ[1,2,3]　([1]名大院・生命農学，[2]名大・生物機能セ，[3]名大・iGCORE，[4]東工大・物理工学院)

3E4a08　ポリシアル酸と低分子化合物の新規相互作用解析法の開発
10:55　○羽根 正弥[1,2,3]，早川 開都[2,3]，田中 浩士[4]，呉 迪[1,2,3]，北島 健[1,2,3]，佐藤 ちひろ[1,2,3]　([1]名大・iGCORE，[2]名大院・生命農学，[3]名大・生物機能セ，[4]東工大・物理工学院)

3E4a09　糖供与体 4,6-*O*-フェニルボロン酸エステル保護基がグリコシル化反応の立体選択性に与える影響の検証
11:06　○梅村 悠太[1]，河村 奈緒子[2]，今村 彰宏[1,2,3]，石田 秀治[1,2,3]，安藤 弘宗[1,2]，田中 秀則[1,2]　([1]岐阜大院連合農学，[2]岐阜大iGCORE，[3]岐阜大応用生命)

3E4a10　1,5-ラクタム化シアル酸橋頭位ラジカルを利用した *C*-シアロシド合成法の開発
11:17　○小林 萌々香[1]，河村 奈緒子[2]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2]，安藤 弘宗[2]，田中 秀則[2]　([1]岐阜大応用生命，[2]岐阜大学iGCORE)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3E4a11　立体選択的 N 結合型 ADP-リボシル化分子の合成法の開発
11:36　○田中 秀則[1,2]，萩野 瑠衣[2]，河村 奈緒子[1]，今村 彰宏[1,2,3]，石田 秀治[1,2,3]，安藤 弘宗[1,2]　([1]岐阜大iGCORE，[2]岐阜大院連合農学，[3]岐阜大応用生命)

3E4a12　完全なα選択的シアリル化を用いた *N. meningitidis* W135 由来多糖の合成研究
11:47　山本 洋[1]，○河村 奈緒子[2]，加藤 雅大[1]，田中 秀則[2]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2]，安藤 弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・iGCORE)

3E4a13　レジオナミン酸の完全なα選択的グリコシド化法の開発研究
11:58　○桃澤 颯馬[1]，田中 秀則[2]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2]，安藤 弘宗[2]，河村 奈緒子[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・iGCORE)

3E4a14　カキ中に見いだされたメチル化 A 型糖鎖抗原の合成
12:09　山口 江利子[1]，ビフーテ プラティクシャ[1]，河村 奈緒子[1]，田中 秀則[1]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2]，ゲラルデル ヤン[1,3]，○安藤 弘宗[1]　([1]岐阜大・iGCORE，[2]岐阜大・応用生物，[3]リール大CNRS・UGSF)

E4 会場　午後の部(13:50〜16:18)

動物—細胞構造-細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，生体膜，メンブレントラフィック，相分離 / タンパク質-構造，機能，活性制御，分解，局在制御，プロテオーム / 個体-生理・栄養・代謝，神経，生体機能，生体制御，メタボローム，病理，発生—

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3E4p01　条鰭類アクアポリン 10 パラログの輸送基質選択における機能分岐
13:50　○永嶌 鮎美[1]，潮 和敬[1]，今泉 元岐[1]，西原 秀典[1,5]，古田 忠臣[1]，インゴ ブラーシュ[2]，松崎 浩二[3]，マイケル・F ロメロ[4]，加藤 明[1]　([1]東工大・生命理工，[2]ミシガン州立大学，[3]ふくしま海洋科学館(アクアマリンふくしま)，[4]メイヨー医科大学，[5]近大・農・生物機能)

3E4p02　高速原子間力顕微鏡を用いたビンキュリン活性化機構の解明
14:01　○黒田 美都[1]，松山 大輝[1]，古寺 哲幸[2]，木岡 紀幸[1]　([1]京大院農，[2]金沢大NanoLSI)

3E4p03　高浸透圧ストレス下で形成される p62 body の解明
14:12　○田村 直輝，和栗 聡　(福島医大)

3E4p04　ヒト ABC タンパク質の脂質，脂溶性ビタミン輸送能評価系の開発
14:23　○木村 泰久，藤村 大河，木岡 紀幸　(京大・院農・応用生命)

3E4p05　近接依存性ビオチン標識法を用いて同定された初期分泌経路局在タンパク質 PRRC1 の機能解析
14:34　中山 菜月，尾関 希美，山田 彩和，牧 正敏，高原 照直，○柴田 秀樹　(名大院)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3E4p06　マウス由来の抗がん剤等のトランスポーター Abcg2 の糖鎖付加部位変異体の機能解析
14:53　○田口 善智，田中 友恵，廣森 竣，河合 朋優，何 依潔，和田 佳奈美，永見 宏樹　(近畿大 生物理工 遺伝子工)

3E4p07　がん細胞における接着斑の脂質組成改変を目指した酵素局在化システムの構築
15:04　○山﨑 頌子，増元 亮裕，木村 泰久，黒田 美都，木岡 紀幸　(京大院農)

3E4p08　酸化ストレス依存的な HT22 細胞内 MLV-Gag の動態変化と生理的意義
15:15　○葛西 柚月[1]，田辺 岳海[1]，水木 徹[2]，根建 拓[1]　([1]東洋大院生命，[2]東洋大バイオナノセンター)

3E4p09　肝線維化が誘導される肝臓特異的 67-kDa laminin receptor ノックアウトマウスのメタボローム解析
15:26　○一瀬 智美，米山 拓良，竹下 菜津子，錦戸 里紗，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文　(九大院農院･生機科)

3E4p10　細胞内におけるマンガンと亜鉛代謝の相関性に関する解析
15:37　○西藤 有希奈[1]，安井 裕之[2]，神戸 大朋[1]　([1]京大院生命，[2]京都薬科大)

p11〜p12 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3E4p11　MMP2 制御は酸化ストレスによる老化様皮膚病態を改善する
15:56　○澁谷 修一，上條 真弘，渡辺 憲史，清水 孝彦　(国立長寿研　ジェロサイエンス)

3E4p12　Comparative study of the enzymatic properties of CMP-sialic acid synthetases in deuterostome
16:07　○Di Wu[1,2,3]，Misato Bessho[1,2]，Masaya Hane[1,2,3]，Chihiro Sato[1,2,3]，ken kitajima[1,2,3]　([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ.，[2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.，[3]iGCORE, Nagoya Univ.)

E5 会場　午前の部(9:30〜12:20)

微生物―物質生産-微生物変換，酵素反応，機能性高分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3E5a01　*Aspergillus sydowii* が生産するタンパク質分解酵素群の異種発現と特性解析
9:30　○織部 恭宏[1]，西村 龍星[1]，木村 行宏[1]，田中 伸一[2]，土居 幹治[2]，竹中 慎治[1]　([1]神戸大院農，[2]マルトモ株)

3E5a02　鰹節カビが生産する脂質分解酵素群の異種発現と特性解析
9:41　○竹中 慎治[1]，梅木 智哉[1]，豊嶋 瞭太[1]，木村 行宏[1]，田中 伸一[2]，土居 幹治[2]　([1]神戸大院農，[2]マルトモ株)

3E5a03　種々の *Paenibacillus* 属由来 *nif* クラスターを導入した大腸菌でのニトロゲナーゼ活性
9:52　○竹内 琴音[1]，早川 紗和子[1]，本田 裕樹[1]，駒 大輔[2]，藤井 浩[1]　([1]奈良女大理，[2]大阪技術研)

3E5a04　大腸菌における Azotobacter vinelandii 由来ニトロゲナーゼの活性改善
10:03　○伊藤 有亮[1,2]，吉留 大輔[1]，日髙 真誠[1]，荒木 康子[2]，伊藤 考太郎[2]，古園 さおり[1,3]，西山 真[1,3]　([1]東大院･農生科，[2]キッコーマン株式会社，[3]東大･微生物連携機構)

3E5a05　界面胞子変換システムの位置選択的微生物酸化への応用
10:14　○小田 忍，杉本 恭子　(金沢工大･ゲノム研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3E5a06　*Lysobacter* sp. MK9-1 由来キチナーゼ Chi19MK の構造解析
10:33　○横道 萌，菅野 春樹，真壁 幸樹，今野 博行，矢野 成和　(山形大学理工)

3E5a07　糸状菌 *Trichoderma asperellum* 由来キチナーゼに関する研究
10:44　○新谷 昌紘，豊田 陵介，金政 真　(中部大院･応生)

3E5a08　計算科学を用いた真菌由来テルペン環化酵素の反応機構解析
10:55　○烏野 祐作[1]，佐藤 玄[2]，白石 太郎[1]，葛山 智久[1]　([1]東大院農，[2]山梨大院総合)

3E5a09　ゲノム編集因子 ST8 を用いた産業用酵母におけるゲノム編集技術の開発
11:06　○沢津橋 俊[1]，中島 俊雄[2]，藤田-竹下 結衣[2]，穂積 俊矢[2]　([1]徳島大先端酵素研，[2](株)セツロテック)

3E5a10　セルロース結合ドメインを多連結に付加した *Candida antarctica* lipase B の構築とセルロースへの固定化
11:17　○久恒 光輝，真壁 幸樹，矢野 成和　(山形大院理工)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3E5a11　Methane oxidation in non-methanotrophs
11:36　○Oktay Gafarov，Kohei Kida，Koji Iwasaki，Hiroya Yurimoto，Yasuyoshi Sakai　(Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

3E5a12　二段階発酵を用いたウイスキー廃液からのバイオ水素生産
11:47　○日比野 政裕[1]，宮本 工聖[2]，清水 裟捺[2]　([1]室蘭工大院環境創生，[2]室蘭工大システム理化)

3E5a13　炭素源が海洋細菌 *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) の生育およびポリ(3-ヒドロキシブタン酸) 合成に及ぼす影響
11:58　○小森 美花[1]，梅林 勇気[2]，河合 盛進[2]，鈴木 宏昭[2]，山田 美和[1]　([1]岩手大･農，[2]トヨタ紡織･新領域開拓部)

3E5a14　洗濯後衣類から単離したバクテリアによる不快臭発生調査と殺菌処理による影響
12:09　○奥田 裕暁[1,2]，松村 吉信[1,3]，池水 麦平[2]　([1]関西大 生命･生物工，[2]パナソニック株式会社，[3]関西大 ORDIST)

E5 会場　午後の部(13:50〜15:48)

微生物―物質生産-微生物変換，酵素反応，機能性高分子―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3E5p01　Screening of Microbial Serine Palmitoyltransferase (SPT) with Coupled ATP Regeneration
13:50　○Amelia Atmowidjojo[1]，Michiki Takeuchi[2]，Jun Ogawa[1]　([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University，[2]Industrial Microbiology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

3E5p02　*Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213^T におけるウロリチン 4 位脱水酸化を触媒する新規誘導酵素系の解析
14:01　○片所 杏野[1]，渡邊 寛子[1]，中島 賢則[2]，山本 浩明[2]，小川 順[1]，岸野 重信[1]　([1]京大院農，[2]ダイセル･事業創出センター)

3E5p03　新規耐熱性酵素の導入による，水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 を用いた 3-hydroxybutyrate の生産
14:12　○木村 蒼一郎[1]，亀谷 将史[2,3]，新井 博之[2,3]，石井 正治[2,3]　([1]東大農･生命化学工学，[2]東大院･農生科･応生工，[3]東大微生物連携機構)

3E5p04　核酸医薬品原料である dNTP の組換え酵素を用いた One-pot 合成
14:23　○土肥 優希[1]，美澄 幸恵[2]，寺内 裕貴[3]，星田 尚司[1,2,3]，赤田 倫治[1,2,3]　([1]山口大院創成，[2]山口大工，[3]山口大中高温)

3E5p05　*Bacillus subtilis* 由来 P450 酸化酵素 CYP107J1 のアルキル安息香酸に対する活性の解析
14:34　○加藤 秀樹[1]，Stephen G. Bell[2]，古屋 俊樹[1]　([1]東京理科大院･創域理工，[2]アデレード大)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3E5p06　リパーゼを用いたゼルンボール誘導体の立体選択的トランスエステル化
14:53　○髙橋 亮大[1]，柏﨑 玄伍[1,2]，寺田 百合香[2]，渡部 朋子[2]，平本 梨花子[2]，河合 靖[3]，北山 隆[1,2]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農，[3]長浜バイオ)

3E5p07　微生物由来アミノ酸水酸化酵素に見いだした希少 alliin 異性体の合成活性
15:04　○水谷 拓[1]，勘澤 良介[1]，原 良太郎[2]，上田 誠[2,3]，小川 順[1]（[1]京大院農·応用生命，[2]京大院農·産業微生物，[3]小山高専·物質工学）

3E5p08　脂肪酸アミド合成に有用な微生物酵素の探索および基質特異性の解析
15:15　深尾 達夫[1]，○横尾 航平[1]，森 雅輝人[1]，原 良太郎[2]，上田 誠[2,3]，小川 順[1]（[1]京大院農·応用生命，[2]京大院農·産業微生物，[3]小山高専·物質工学）

3E5p09　大腸菌による Fab 抗体の生産と自動リフォールディング技術の開発
15:26　○HOANG ANH TUNG，加藤 晃代，中野 秀雄（名大院生命農）

3E5p10　出芽酵母における天然ゴム生合成関連タンパク質の発現と脂肪滴形態への影響
15:37　○横田 早希[1]，後藤 猛[2]（[1]秋田大院理工，[2]秋田大）

E6 会場　午前の部（9:30〜12:09）

微生物―細胞-複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

3E6a01　Sphingobium-Cupriavidus 属細菌株による有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティ形成
9:30　○XIONG ZHIYU，平野 翔子，岸田 なつみ，加藤 広海，岸田 康平，大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院·生命科学）

3E6a02　*Cupriavidus* 属細菌株のコロニー周辺部が大きく広がる突然変異株の取得と解析
9:41　○平野 翔子，Xiong Zhiyu，加藤 広海，岸田 康平，大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院·生命科学）

3E6a03　メタン発酵システムから分離された *Segatella* 属近縁菌種の特異的な炭素源要求性と *Dialister hominis* のコハク酸を介した共生関係
9:52　○牧浦 知輝，松谷 峰之介，曽 厚嘉，藤本 尚志，大西 章博（東京農大）

3E6a05　ヒト腸内細菌叢の大規模継代培養実験による微生物相互作用の解析
10:14　○前田 智也[1,2]，吹谷 智[2]，古澤 力[2,3]（[1]北大院農，[2]理研，[3]東大院理）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

3E6a06　液液共培養法による腸内細菌の分離と同定
10:33　○久富 敦，大熊 盛也，坂本 光央（理研 BRC-JCM）

3E6a07　ピレン分解菌の分解能を変化させる環境細菌の効率的な取得とその同定
10:44　○鈴木 仁子[1]，ベハラノ フェリペ[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，ピンヤコン オルタイ[3]，野尻 秀昭[1,2]（[1]東大院·農生科·AgTECH，[2]東大·微生物連携機構，[3]Chulalongkorn Univ.）

3E6a08　ニホンミツバチの菌叢解析と有用乳酸菌の単離
10:55　○櫻間 晴子[1]，田中 舞[1]，坂本 文夫[1,2]，萩下 大郎[1]（[1]京都先端大バイオ環境，[2]京都ニホンミツバチ研究所）

3E6a09　米ぬか摂取マウス腸内細菌叢における大腸炎抑制性芽胞形成細菌の単離
11:06　○沖 梨咲子[1]，田中 一己[2,3,4]，野村 暢彦[5]，尾花 望[6,7]，福田 真嗣[3,4,6,8,9]（[1]筑波大·生物資源，[2]慶大·院·政策·メディア，[3]神奈川産技総研，[4]順天大院·医学研究科·細菌叢再生講座，[5]筑波大·生命環境系，[6]筑波大·医学医療系·トランスボーダー医学研究センター，[7]筑波大·微生物サステイナビリティ研究センター，[8]慶大·先端生命研，[9]メタジェン）

3E6a10　Evaluation of optimal cultivation conditions for the isolation of nitrifying bacteria
11:17　○Htun Inzali[1]，Wakako Okada[1]，Akinori Ando[1,2]，Jun Ogawa[1,2]（[1]Div. Appl. Life Sci.，Grad. Sch. Agric.，Kyoto Univ.，[2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:28〜11:36

3E6a11　活性汚泥微生物コミュニティにおける微生物間捕食とその促進
11:36　○佐藤 由也，稲葉 知大，羽部 浩（産総研）

3E6a12　イネ·オオムギ二毛作における根圏微生物叢の機能とネットワーク
11:47　○谷 明生[1]，最相 大輔[1]，山地 直樹[1]，山下 純[1]，小橋 理絵子[1]，山本 敏央[1]，門田 有希[2]，中川 智行[3]，持田 恵一[4]（[1]岡大植物研，[2]岡大環境生命，[3]岐阜大応生科，[4]長崎大情報データ科学）

3E6a13　*Bradyrhizobium* sp. RB-1 株の感染によるミヤコグサの根粒形成には III 型エフェクターが関与する
11:58　○木村 円香[1]，川原田 泰之[2]，齋藤 宏昌[1]（[1]東京農大院生命，[2]岩手大院農）

E6 会場　午後の部（13:50〜16:40）

微生物―細胞-栄養，生育，増殖，培養―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:42〜13:50

3E6p01　木材腐朽菌の細胞壁構造及びその合成機構を目指したβグルカン合成酵素の機能解析
13:50　○河内 護之[1]，大塚 唯[1]，SCHIPHOF Kim[1]，名和 義順[1]，辻 健也[1]，吉見 啓[1,2]，中沢 威人[1]，田中 千尋[1,2]，本田 与一[1]（[1]京大院農，[2]京大院地環学）

3E6p02　葉面細菌 Methylobacterium のバクテリオクロロフィル生産と遺伝子発現
14:01　○井口 博之[1]，宮部 業[1]，吉田 朱里[1]，谷 明生[2]（[1]京都先端大·バイオ環境，[2]岡山大·植物研）

3E6p03　新規 CO 資化性微生物の探索―好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の CO 耐性および資化性の検証
14:12　○千葉 洋子[1,2]，常松 奈緒[1]，亀谷 将史[3,4]，若島 朋幸[1,5]，島村 繁[6]，福山 宥斗[7]，布浦 拓郎[7]（[1]理研環境資源科学，[2]筑波大生命環境，[3]東大院農，[4]東大微生物連携機構，[5]筑波大院生物，[6]JAMSTEC超先鋭，[7]JAMSTEC生命理工）

3E6p04　Na^+ が支える藍藻の光合成電子伝達系
14:23　○辻井 雅[1]，小林 歩夢[1]，狩野 文香[1]，解良 康太[1]，児島 征司[2]，彦坂 幸毅[2]，小口 理一[3]，園池 公毅[4]，浅井 智広[5]，稲垣 知実[6]，石丸 泰寛[1]，魚住 信之[1]（[1]東北大院工，[2]東北大院生命，[3]公大院理，[4]早大教，[5]中央大理工，[6]立命大院生命）

3E6p05　好酸性緑藻による粗放開放型油脂生産系確立の可能性
14:34　○岡澤 空汰[1]，邱 泰永[2]，小西 正朗[2]（[1]北見工大院工，[2]北見工大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:53

3E6p06　円石藻 *Chrysotila haptonemofera* NIES-1813 の低凝集性変異株の解析
14:53　○加藤 明宏，武田 誠也，豊田 直之（セイコーエプソン株式会社）

3E6p07　重水素耐性大腸菌変異株の分離と変異の解析
15:04　○正木 春彦[1]，松谷 峰之介[2]，石井 大輔[1]，矢嶋 俊介[3]（[1]東農大生命，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]東農大生命, 東農大ゲノム解析セ）

3E6p08　*oxyR* 欠損した大腸菌細胞のゲル化剤によるコロニー形成の影響
15:15　○坂元 仁[1,2]，朝田 良子[1,3]，古田 雅一[1,3]，土戸 哲明[1]（[1]大阪公大·微制研セ，[2]関西大·化生工，[3]大阪公大院工）

3E6p09　フッ素系不活性溶媒による大腸菌の鉄取込み亢進と増殖促進
15:26　○細木 亮輔[1]，井澤 克秋[1]，山重 貴久[2]，川田 晃士[1]，日高 將文[1]，尾間 由佳子[1]，菊池 正二郎[3]，瀬戸山 寛之[4]，廣沢 一郎[4]，原田 昌彦[1]　([1]東北大院農，[2]京大院農，[3]兵庫医科大･先端医，[4]九州シンクロトロン光研究センター)

3E6p10　緑膿菌の硝酸イオン／亜硝酸イオントランスポーター NarK1 と NarK2 の機能解析
15:37　○岡本 洸彰[1]，亀谷 将史[1,2]，石井 正治[1,2]，新井 博之[1,2]　([1]東大院農，[2]東大微生物連携機構)

p11～p14 発表者の接続時間 15:48～15:56

3E6p11　亜塩素酸不均化酵素様タンパクが *Pseudomonas* sp. SCT 株のヨウ素酸呼吸に与える影響
15:56　○久下 陽菜[1]，天知 誠吾[2]　([1]千葉大園芸，[2]千葉大院園芸)

3E6p12　枯草菌芽胞に対する過酢酸の殺滅作用の相対湿度依存性とスポアコートの防御機能
16:07　○湯川 璃子[1]，Khanh VO[2]，茂田 誠[1]，大西 陽子[1]，佐野 義哉[1]，池田 卓司[1]，朝田 良子[2,3]，坂元 仁[2,4]，古田 雅一[2,3]，土戸 哲明[2]　([1]ニッタ(株)，[2]大阪公大･微制研，[3]大阪公大･院･工，[4]関西大･化生工)

3E6p13　*Paraprevotella xylaniphila* におけるフコイダン資化能の検討
16:18　○野口 蒼來[1]，遠藤 万里[2]，小島 楽叶[2]，林 秀謙[1,2]，星 淡子[1,2]　([1]前工大院工，[2]前工大工)

3E6p14　腸内細菌 *Paraprevotella clara* におけるフコイダン資化能の検討
16:29　○小島 楽叶[1]，野口 蒼來[2]，林 秀謙[1,2]，星 淡子[1,2]　([1]前工大工，[2]前工大院工)

E7 会場　午前の部(9:30～11:58)

食品―食品化学-色素，香料―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

3E7a01　ムラサキイモ由来アントシアニンとポリフェノールの分子間コピグメンテーションを活用する白髪染め
9:30　○松原 孝典，長濵 沙苗，髙橋 涼，日野 真理　(産業技術短大)

3E7a02　紫カリフラワーに含まれるアントシアニンとその青色錯体形成
9:41　○馬渕 大貴，秋山 唯，本田 千尋，熊澤 茂則　(静岡県立大食品栄養)

3E7a03　国内外の黒砂糖の物理化学特性，呈味成分，ミネラル及びポリコサノールの分析
9:52　○天野 遼，アシキン ヨナタン，高良 健作，和田 浩二　(琉大農)

3E7a04　緑茶の光退色に及ぼす乳化剤の影響
10:03　○安田 みどり[1]，高祖 修一[1]，田端 正明[2]　([1]西九州大健栄，[2]佐賀大理工)

3E7a05　ビール中の塩基性色素の単離と性状
10:14　○東 優汰[1]，野田 響子[2]，辻井 良政[3]，村田 容常[3]　([1]東京農大院･農化，[2]お茶大･食物，[3]東京農大応生･農化)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

3E7a06　TRPA1/TRPV1 アゴニストによる炭酸感の増強
10:33　○柏木 貴裕，赤井 千恵，細川 陽子，寺田 育生，山崎 雄一朗，佐野 昇，星野 邦秀　(高砂香料工業株式会社研究開発本部)

3E7a07　珈琲による脂っこさのリセット作用の科学的検証
10:44　○井関 菜月[1]，古居 優季[1]，浅田 智恵[2]，藤田 綾香[2]，坂本 裕香[2]，赤川 貢[3]，石井 剛志[1,2]　([1]神院大院栄養，[2]神院大栄養，[3]徳島大院医歯薬)

3E7a08　小麦生地調製時における揮発性成分生成と連動した水溶性成分の変化
10:55　○成澤 朋之[1]，仲島 日出男[1]，朝倉 富子[2]　([1]埼玉産技セ北部，[2]東大院農)

3E7a09　山形県産そばの香気成分の分析
11:06　○網干 貴子[1]，樋口 あかり[2]，太田 智弥[1]，遠藤 直輝[2]　([1]山形大農，[2]山形県農総研セ)

3E7a10　納豆製造におけるピラジン類生成と納豆菌およびスレオニンとの関連
11:17　○野田 響子[1]，五十嵐 舞乃[1]，筒浦 さとみ[2]，村田 容常[3]　([1]お茶大院ライフ，[2]新潟大農，[3]東農大農化)

a11～a12 発表者の接続時間 11:28～11:36

3E7a11　咀嚼模擬装置を用いた時のフレーバーリリースの検討
11:36　○堀江 芙由美，日下部 裕子　(農研機構)

3E7a12　AI 解析を基盤としたフレーバーホイール自動作成法の開発
11:47　○辻 凌希[1,2]，伊藤 豊実[1,2]，寺田 祐子[1]，伊藤 圭祐[1,2]　([1]静岡県大食品栄養，[2]合同会社 DigSense)

E7 会場　午後の部(13:50～16:40)

食品―食品化学-その他―

p01～p05 発表者の接続時間 13:42～13:50

3E7p01　薄切およびマトリックス不要の MS イメージングを可能にする転写プレート
13:50　○池田 貴将，小谷 政弘　(浜松ホトニクス)

3E7p02　転写プレートを用いたヨモギ葉含有成分の MS イメージング
14:01　○十一 浩典[1]，道下 理加[1]，池田 貴将[2]，小谷 政弘[2]，山本 卓志[3]，田中 福代[1]　([1]農研機構 分析研，[2]浜松ホトニクス，[3]島津製作所)

3E7p03　転写プレートを用いたミニトマトの機能性成分の MS イメージング
14:12　○田中 福代[1]，道下 理加[1]，池田 貴将[2]，小谷 政弘[2]，山本 卓志[3]，十一 浩典[1]　([1]農研機構分析研，[2]浜松ホトニクス，[3]島津製作所)

3E7p04　LC-MS/MS 分析によるアシタバの葉と茎の代謝物プロファイリング
14:23　○田中 啓介[1,2]，吉瀬(新井) 祐子[2]，志波 優[3,2]　([1]東情大情報，[2]東農大ゲノムセ，[3]東農大微生物)

3E7p05　サトウキビ交配後代集団における搾汁液中成分プロファイル
14:34　○石川 千秋[1]，大久保 めぐみ[2]，伊達 康博[3]，梅田 周[2]，樽本 祐助[2]，小野 裕嗣[3]　([1]農研機構･食品研，[2]農研機構･九沖研，[3]農研機構･分析研)

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:53

3E7p06　NMR による清酒の安定同位体比分析
14:53　○水谷 廉，水内 らん，奥 亜祐美，宮下 昌樹，小椋 賢治　(石川県大生物資源環境)

3E7p07　ピロカテコールのダンシル誘導体化による微量分析法の開発
15:04　○横溝 永矢，中谷 祥恵，古旗 賢二　(城西大院･薬･薬科)

3E7p08　キシロース含有高配糖化ステビオールの探索と構造推定
15:15　○渡辺 健宏[1]，藤川 紘樹[1]，浦井 聡一郎[2]，岩城 一考[3]，平井 正良[4]，宮川 克郎[4]，浦谷 宏[1]，山垣 亮[1]，長尾 浩二[3]，横尾 芳明[3]，島本 啓子[1]　([1]公益財団法人サントリー生命科学財団，[2]サントリー株式会社，[3]サントリー食品インターナショナル株式会社，[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社)

3E7p09　キシロース含有高配糖化ステビオールの合成と甘味評価
15:26　○藤川 紘樹[1]，渡辺 健宏[1]，浦井 聡一郎[2]，岩城 一考[3]，平井 正良[4]，宮川 克郎[4]，浦谷 宏[1]，山垣 亮[1]，長尾 浩二[3]，横尾 芳明[3]，島本 啓子[1]　([1]公益財団法人サントリー生命科学財団，[2]サントリー株式会社，[3]サントリー食品インターナショナル株式会社，[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社)

3E7p10　藻類からのフコキサンチンの効率的抽出法の検討
15:37　○鵜沼 心吾，広川 安孝，細谷 孝博　(東洋大院食環境)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:48〜15:56

3E7p11　静岡県内の 6 茶工場から回収した製茶副産物の呈味・機能性成分の特性評価
15:56　○豊泉 友康[1]，藤井 拓[1]，三宅 健司[1]，九島 祥弘[2]，小林 利彰[1]，大場 聖司[1]，小林 栄人[1]　([1]静岡県茶研，[2]ChaOI フォーラム事務局)

3E7p12　乳酸菌を用いた新規微生物発酵茶の解析
16:07　○志村 大輝[1]，山澤 倫子[2]，柴田 貴子[3]，高橋 淳[3]，椎葉 究[1]，安部 智子[1]　([1]東京電機大院･理工，[2]東京電機大･理工，[3]埼玉県茶業研究所)

3E7p13　UF 法による焙煎大麦食品(麦茶)のキサンチンオキシダーゼ阻害物質の探索
16:18　○谷口 明日香，大久保 花梨，増田 晃子，亀田 和美，増田 俊哉　(大阪公立大院生活科学)

3E7p14　大麦穀粒へのパーリング(精麦)処理が麦芽やビールの品質に及ぼす影響
16:29　○木原 誠，時園 佳朗，丸海老 純也，佐藤 千鶴，七森 理仁，保木 健宏　(サッポロビール)

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名(所属)

B2 会場　午前の部(9:30〜12:20)

食品—食品機能・栄養-脂質代謝，糖質代謝—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4B2a01　ラクトスタチン(IIAEK)による腸アルカリ性ホスファターゼを介した コレステロール吸収調節系の分子機構解析
9:30　○小田 夏暉[1]，竹内 朝陽[1]，海老原 章郎[3]，本多 裕之[2]，長岡 利[1]　([1]岐阜大応生食品分子機能学，[2]名古屋大工生命分子，[3]岐阜大応生生体分子機能学)

4B2a02　脂質代謝改善ペンタペプチド IIAEK が誘導するコレステロール吸収抑制には，腸アルカリ性ホスファターゼとの相互作用が必須である
9:41　○竹内 朝陽[1]，小田 夏暉[1]，久松 賢太郎[1]，奥村 菜月[1]，杉光 祐紀[1]，葉 宇陽[1]，高田 敬梧[1]，森 崚輔[1]，會田 拓巳[1]，柳瀬 笑子[2]，上野 義仁[2]，長岡 利[1]　([1]岐阜大応生食品分子機能学，[2]岐阜大応生生物有機化学)

4B2a03　肥満，高コレステロール血症，非アルコール性脂肪肝を改善する 新規プロタミン由来トリペプチド RPR(Arg-Pro-Arg)の発見
9:52　○松葉 翔也[1]，森 崚輔[1]，MIJITI Maihemuthi[1]，中南 健太郎[2,3]，藤田 美華[2,3]，須藤 慶太[2,3]，長岡 利[1]　([1]岐阜大応生食品分子機能学，[2]フォーデイズ(株)，[3]東京農工大 農学)

4B2a04　新規脂質代謝改善ジペプチド Phe-Pro(FP)の作用機構解析
10:03　○西野 七海[1]，山本 真子[1]，小田 夏暉[1]，兪 蘭花[1]，坂野 新太[1]，海老原 章郎[2]，長岡 利[1]　([1]岐阜大応生食品分子機能学，[2]岐阜大応生生体分子機能学)

4B2a05　麦茶に含まれる PPAR γ活性化物質の探索
10:14　○松浦 信康[1]，長島 陽生[2]，張 智偉[3]，五十嵐 康弘[3]，社本 基宏[4]，松浦 浩一[4]　([1]岡山理大生命科学，[2]岡山理大理，[3]富山県大，[4]福玉米粒麦(株))

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4B2a06　SREBP 活性抑制能を指標とした抗肥満作用を有するブロッコリー品種の選別
10:33　○増尾 翼[1]，二瓶 遥[1]，藤巻 貴宏[2]，島田 康彦[3]，鈴木 司[2]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大院・応生科，[2]東農大・応生科・農化，[3]株式会社サカタのタネ)

4B2a07　SREBP 活性を抑制する化合物のブロッコリー抽出物からの探索
10:44　○兼行 紗矢[1]，藤巻 貴宏[2]，鈴木 司[2]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大院，[2]東農大)

4B2a08　脂質代謝を制御する転写因子 SREBP の活性を低下させる化合物の探索
10:55　○寺田 晴哉[1]，小高 愛未[1]，松永 優輝[2]，鈴木 司[1]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大・応生科・農化，[2]東農大院・応生科・農化)

4B2a09　Role of Gnetin C in Regulating Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathology in Mice
11:06　○Tohfa Kabir[1]，Haruki Yoshiba[1]，Afifah Zahra Agista[1]，Halima Sultana[1]，Yusuke Ohsaki[1]，Chiu-Li Yeh[1,2]，Suh-Ching Yang[1,2]，Michio Komai[1]，Hitoshi Shirakawa[1]　([1]Lab. Nutr.，Grad. Sch. Agri. Sci.，Tohoku Univ.，[2]Sch. Nutri. Health Sci.，Taipei Med. Univ.)

4B2a10　アデノシン皮下投与がインスリンの分泌と作用に及ぼす影響
11:17　○三宅 絢女，小西 良子，服部 一夫，只石 幹　(東農大応生)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4B2a11　かまぼこ製造時の廃棄物「水さらし液」は血中 GLP-1 およびインスリン量を制御することにより血糖値上昇を抑制する
11:36　○八田 日和[1]，田中 照佳[1,2]，池田 くる美[1]，藤井 有希[1]，福田 隆志[1,2,3]，安藤 正史[1,2]　([1]近大農・水産，[2]近大院農・水産，[3]アグリ技研)

4B2a12　脂肪細胞におけるオレアミドの機能性解明
11:47　○日向 宏成[1]，櫃石 香菜[1]，中島 史恵[1]，内田 浩二[2]，柴田 貴広[1]　([1]名大院生命農，[2]東大院農)

4B2a13　カツオエラスチンペプチド摂取が日本人型 DOHaD モデルのインスリン抵抗性発症に及ぼす影響
11:58　○田口 達博[1]，増田 誠司[1,2,3]，竹森 久美子[1,2]　([1]近畿大学院農学研究科応用生命化学専攻，[2]近畿大学農学部食品栄養学科，[3]近畿大学アンチエイジングセンター)

4B2a14　トルコ伝統食材「ブルグル」の血糖値変動に及ぼす影響
12:09　○伊井 桃子[1]，東口 夢[1]，廣田 安美[1]，鈴木 靖志[1,2]　([1]武庫川女子大学食物栄養科学部食創造科学科，[2]武庫川女子大学バイオサイエンス研究所)

B3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

動物—細胞機能-シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム/遺伝子-発現制御，ノンコーディングRNA，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス，ゲノミクス/その他—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4B3a01　5-Hydroxy-7-methoxyflavone による GPR97 を介した筋肥大促進機構の解明
9:30　○木村 彩乃[1]，北風 智也[1]，原田 直樹[1]，山地 亮一[1,2]　([1]大阪公大院農，[2]大阪公大院生資)

4B3a02　骨格筋形成におけるレチノイン酸受容体γの機能の解析
9:41　○岡野 結衣[1]，大場 智貴[2]，北風 智也[1,2]，原田 直樹[1,2]，山地 亮一[1,2,3]　([1]大阪公大院・農，[2]大阪府大・生命環境，[3]大阪公大・生資センター)

4B3a03　分泌型セリンプロテアーゼ HtrA3 の骨格筋における機能について
9:52　○北風 智也[1]，原田 直樹[1]，山地 亮一[1,2]　([1]阪公大院・農，[2]阪公大・生資センター)

4B3a04　霊長類膵管 tuft 細胞 in vitro 分化誘導および機能評価系の開発
10:03　○米谷 達哉[1]，坂口 恒介[1]，今井 啓雄[2]，岩槻 健[1]　([1]東農大・応生，[2]京大・霊長類研)

4B3a05　膵臓β細胞においてインスリンは caspase-12 の発現抑制を介して小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する
10:14　○村田 菜々子[1]，西村 佳那[2]，原田 直樹[1,2]，北風 智也[1,2]，乾 博[1,2,3]，山地 亮一[1,2,4]　([1]阪公大院農，[2]阪府大院生環，[3]大手前健栄，[4]阪公大生資開発センター)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4B3a06　鼓索神経と舌咽神経支配の NaCl 応答細胞の特性
10:33　○井上 心，林 由佳子　(京大院農)

4B3a07　抗酸化応答マスター転写因子 NRF2 の欠損が及ぼすマスト細胞機能への影響
10:44　○野口 桜花[1]，長田 和樹[1]，杉原 彩夏[1]，芦刈 翼[1]，荒海 咲苗[1]，中野 信浩[2]，原 むつ子[2]，西山 千春[1]　([1]東理大院先進工生命システム，[2]順大院アトピー疾患研究センター)

4B3a08　I 型アレルギー反応を標的とした新規免疫抑制化合物の開発
10:55　○関 健人[1]，長田 和樹[1]，沼田 向陽[1]，坂田 文弥[1]，平野 弘之[2]，長田 裕之[2,3]，吉田 優[1]，西山 千春[1]　([1]東理大院先進工生命システム，[2]理研環境資源科学研究センター，[3]静県大薬)

4B3a09　NK 活性制御因子 NKG7 の発現メカニズムの解析
11:06　○柾 明弘，阿蘇 晴香，新妻 史絵，遠藤 勝紀，田中 沙智（信州大院）

4B3a10　細胞内 Ca^{2+} 量による mTORC1 制御メカニズムの解明
11:17　○雨宮 優奈，池田 奈央，牧 正敏，柴田 秀樹，高原 照直（名大院･生命農）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4B3a11　好塩基球特異的プロテアーゼの遺伝子発現を制御する転写因子とエピジェネティック修飾
11:36　○戸島 遼太郎，長田 和樹，新井 貴大，伊藤 直人，笠倉 和巳，西山 千春　（東理大院先進工）

4B3a12　脳の虚血再灌流障害におけるミトコンドリアカルパイン -5 の役割
11:47　○忠海 優作，伊藤 銀河，尾崎 拓　（岩大院･理工）

4B3a13　リコテトラオース処理における正常ヒト皮膚線維芽細胞の遺伝子発現の解析
11:58　○窪田 愛華[1]，西光 由真[1]，赤井 美帆[1]，神保 有亮[3]，角谷 晃司[1,2]　([1]近畿大･薬学総合研，[2]近畿大･アンチエイジングセ，[3]クレハ中央研)

4B3a14　ダイズシストセンチュウの化学走性を制御する G タンパク質
12:09　○佐伯 靖将[1]，細井 昂人[2]，内山 博允[2]，佐々木 康幸[1]，矢嶋 俊介[1]，伊藤 晋作[1]　([1]東農大バイオ，[2]東農大GRC)

B4 会場　午前の部（9:30〜12:20）

微生物―遺伝子-構造，機能/代謝-代謝経路，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4B4a01　糸状菌 *Aspergillus nidulans* の生育におけるスーパーオキシドジスムターゼの機能的重要性
9:30　○金丸 京子[1]，前田 祐未子[2]，木村 真[2]，小林 哲夫[2]　([1]中部大応用生物，[2]名大院生命農)

4B4a02　アカパンカビにおける分泌型ホスホリパーゼ A_2 の生理機能の解析
9:41　○中野 美羽[1]，有岡 学[1,2]　([1]東大院農･応生工，[2]東大･微生物連携機構)

4B4a03　麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPCR-G *α*間相互作用の網羅的解析
9:52　○坂元 勇月[1]，有岡 学[1,2]　([1]東大院農･応生工，[2]東大･微生物連携機構)

4B4a04　冬虫夏草サナギタケの *veA* 遺伝子破壊株の作出とその機能解析
10:03　○張 吉麗[1]，小野 晶子[1,2]，森井 風詩[3]，松田 里菜[1]，佐藤 匠[1]，三ッ國 佳祐[1]，崔 宰熏[3,4,5]，河岸 洋和[3,5]，道羅 英夫[4,5]，鈴木 智大[1,5]　([1]宇都宮大･バイオ，[2]森林総合研究所，[3]静大･農，[4]静大･グリーン研，[5]静大･キノコ科研)

4B4a05　出芽酵母 *Ogataea naganishii* の一次ホモタリズムによる有性生殖の制御
10:14　○前川 裕美　（九大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4B4a06　エタノールは *adh1* 依存的に資化されアフラトキシン産生を増加させてしまう
10:33　○古川 智宏[1]，久城 真代[1]，中川 博之[2]，榎元 廣文[3]，作田 庄平[3]　([1]農研機構食品研，[2]農研機構分析研，[3]帝京大理工)

4B4a07　希少糖 5-ケト-D- フルクトースの油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における代謝経路の解析
10:44　○田中 吾朗[1]，野寄 裕暉慧[1]，佐藤 里佳子[2]，高久 洋暁[2]，竹下 圭[3]，竹川 薫[1]　([1]九大院 生資環，[2]新潟薬科大 応生科，[3]伏見製薬所)

4B4a08　分裂酵母のミトコンドリア局在型 NAD(H) kinase Pos5 は CoQ 合成に関与する
10:55　○西原 昇瑚[1]，西田 郁久[2]，柳井 良太[3]，松尾 安浩[1,3,4]，戒能 智宏[1,3,4]，川向 誠[1,3,4]　([1]島根大院･自然科学，[2]新潟大･日本酒学，[3]島根大･生物資源，[4]島根大･農生命科学系)

4B4a09　独立栄養性細菌 *Thermodesulfatator indicus* が有する未知のセリン生合成経路の探索
11:06　○若島 朋幸[1,2]，福山 宥斗[3]，島村 繁[4]，常松 奈緒[1]，布浦 拓郎[3]，千葉 洋子[1,5]　([1]理研環境資源科学，[2]筑波大院生物，[3]JAMSTEC生命理工，[4]JAMSTEC超先鋭，[5]筑波大生命環境)

4B4a10　プラスミド保持に伴う負荷を回避するための代謝制御様式の解明
11:17　○日高 聖覚[1]，水口 千穂[1,2]，鈴木 研志[1,2]，岡田 憲典[1]，岡橋 伸幸[3]，野尻 秀昭[1,2]　([1]東大院･農生科，[2]東大･微生物連携機構，[3]阪大院･情報)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4B4a11　代謝改変によるリグニン由来芳香族分解菌 *Sphingobium lignivorans* SYK-6 株へのグルコース資化能の付与とメチオニン要求性の解除
11:36　○水出 暁登，加藤 諒，上村 直史，政井 英司　（長岡技科大･物質生物）

4B4a12　*Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株の *n*-アルカン分解機構の解明
11:47　○佐藤 佑香[1]，小尾 信博[1]，吉田 信行[1]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2]　([1]静大･院総合科技，[2]静大･グリーン研)

4B4a13　*Rhodococcus* sp. LC-2 株のルミクロム分解機構の解明
11:58　○塩田 大地[1]，土肥 裕希[1,2]，高谷 直樹[1,2]　([1]筑波大･生命環境，[2]筑波大･MiCS)

4B4a14　ダイズ根由来のイソフラボン分解菌の単離と分解特異性の解析
12:09　○佐藤 友昭[1]，松田 陽菜子[1]，高松 恭子[1]，青木 愛賢[1]，安藤 晃規[2]，岸野 重信[2]，小川 順[2]，増田 幸子[3]，柴田 ありさ[3]，白須 賢[3]，島﨑 智久[4]，矢崎 一史[1]，杉山 暁史[1]　([1]京大生存圏，[2]京大院農･応用生命，[3]理研 CSRS，[4]北大院理)

B5 会場　午前の部（9:30〜12:20）

有機化学，天然物化学―作用機構，構造と活性/その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4B5a01　共有結合型核内受容体リガンドの抗炎症作用における構造－活性研究
9:30　○宮澤 しなの[1]，酒井 美紗[1]，大前 勇馬[2]，繁森 英幸[3,4]，宮前 友策[3]　([1]筑大院T-LSI，[2]筑大院SIGMA，[3]筑大生命環境，[4]筑大MiCS)

4B5a02　アゾ基を導入した核内受容体リガンドの合成と生物活性評価
9:41　○酒井 美紗[1]，繁森 英幸[2,3]，宮前 友策[2]　([1]筑大院T-LSI，[2]筑大生命環境，[3]筑大MiCS)

4B5a03　褐藻ノコギリモク由来メロテルペノイド化合物のアミロイドポリペプチド凝集阻害活性
9:52　○戸澤 悠太[1]，堀内 真郁[2]，篠田 清哉[2]，栗本 慎一郎[3]，関口 光広[2]，宮前 友策[4]，繁森 英幸[4,5]　([1]筑波大理工情報生命，[2]石川県大生物資源環境，[3]岡山大医歯薬，[4]筑波大生命環境，[5]筑波大MiCS)

4B5a04　細菌ヒスチジンキナーゼを阻害するナフトキノン誘導体の合成と生物活性評価
10:03　○石川 彰彦[1]，江口 陽子[2]，五十嵐 雅之[3]，岡島 俊英[4]，林 千草[3]，谷 昭義[5]，小早川 千衣[5]，春田 純一[5]，内海 龍太郎[4]　([1]岡大院教育，[2]近大生物理工，[3]微化研，[4]阪大産研，[5]阪大院薬)

4B5a05　細菌ヒスチジンキナーゼを阻害するナフトキノン誘導体の阻害メカニズム
10:14　○江口 陽子[1]，櫻井 一正[2]，玉置 和也[1]，石川 彰彦[3]，岡島 俊英[4]，五十嵐 雅之[5]，内海 龍太郎[4]　([1]近大生物理工，[2]近大先端技術研，[3]岡大院教育，[4]阪大産研，[5]微化研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4B5a06　コレラ菌 Na^+ 輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素に対する阻害剤の作用機構の解明
10:33　○石川 萌[1]，岸川 淳一[2]，桝谷 貴洋[1]，村井 正俊[1]，加藤 貴之[3]，Barquera Blanca[4]，三芳 秀人[1]　([1]京大院農，[2]京都工繊大応生，[3]阪大蛋白研，[4]レンセラー工科大)
4B5a07　アオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化ペプチド Pc-1 の活性化部位の探索
10:44　○川村 有，岡咲 洋三，勝崎 裕隆　(三重大院生資)
4B5a08　ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液「Pll-3」の TRPV1 活性化部位の探索
10:55　○井畑 柊馬，大西 真吾，岡咲 洋三，勝崎 裕隆　(三重大院生資)
4B5a09　ヤエヤマサソリ毒液に含まれる K^+ チャネル毒素類似ペプチドの殺虫活性の評価
11:06　○熊谷 木香，岸本 拓実，中川 好秋，宮下 正弘　(京大院農)
4B5a10　*Androctonus australis* サソリ毒液由来の殺虫性ペプチドである AaIT5 の化学合成
11:17　○堺 祥一，中川 好秋，宮下 正弘　(京大院農)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4B5a11　MA026 の TJ 開口における Claudin-1 依存性検討
11:36　○向山 海凪，南雲 陽子，臼井 健郎　(筑波大･生命環境)
4B5a12　プレニルフラボノイド化合物モルシン処理したマウス精子の運動能および体外受精で得た胚の発生に対する影響
11:47　○荒舘 忠，谷井 一郎　(富山大･教養教育院　生物学)
4B5a13　イネにおける非タンパク質性アミノ酸*β*-チロシンのジャポニカ品種特異性についての遺伝学的・化学的研究
11:58　○阪本 駿太[1]，吉川 貴徳[2]，吉永 直子[1]，佐藤 豊[2]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]遺伝研ゲノム･進化)
4B5a14　代謝フロー研究を見据えた Dead carbon 化コオロギの作出の試み
12:09　○永田 晋治[1]，清家 瞳[1]，祝 貞[1]，伊藤 茂[2]，河野 重行[3]　([1]東大院新領域，[2]パレオ･ラボ，[3]機能性バイオ)

C2 会場　午前の部(9:30〜12:20)

有機化学，天然物化学—単離構造決定(微生物)/代謝/農薬，医薬—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4C2a01　耐熱性カビ *Hamigera avellanea* と動物細胞との共培養による新規天然物の探索
9:30　○岩田 千怜[1]，齋藤 駿[1]，矢口 貴志[2]，荒井 緑[1]　([1]慶應大理工，[2]千葉大真菌セ)
4C2a02　休眠遺伝子活性化を目指した病原真菌と免疫細胞の共培養
9:41　○氏江 優希子[1]，齋藤 駿[1]，桑原 るり[2]，原 康雅[2,3]，深谷 圭介[4]，占部 大介[4]，矢口 貴志[5]，石橋 正己[2,6]，荒井 緑[1]　([1]慶大理工，[2]千葉大院薬，[3]香川大農，[4]富山県大工，[5]千葉大真菌セ，[6]国際医福大福岡薬)
4C2a03　神経幹細胞を若返らせる転写因子 Plagl2 の天然物由来転写活性化剤の探索
9:52　○目細 航，齋藤 駿，荒井 緑　(慶應理工)
4C2a04　ヤマカガシ・ヒキガエルにおける遺伝的境界と防御用毒組成の関係
10:03　○内藤 正成[1]，井上 貴斗[2]，森 哲[3]，森 直樹[2]　([1]京大農，[2]京大院農，[3]京大院理)
4C2a05　ヤマカガシ属ヘビの毒組成におけるヒキガエルの影響とヘビ自身の変換能力による影響の比較
10:14　○井上 綾[1]，井上 貴斗[1]，森 哲[2]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]京大院理)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4C2a06　母ヤマカガシ(*Rhabdophis tigrinus*)の毒による子孫への化学的ケア—餌由来毒素の供給におけるトレードオフ—
10:33　○井上 貴斗[1]，森 哲[2]，堀中 真野[3]，吉永 直子[1]，酒井 敏行[3]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]京大院理，[3]府立医大院医)
4C2a07　昆虫エクジステロイド生合成酵素を標的とした新規蚊用殺虫化合物の構造解析に基づく研究
10:44　○海老原 佳奈[1]，稲葉 和恵[1]，千田 美紀[2]，安孫子 ユミ[3]，佐久間 知佐子[4]，小祝 孝太郎[2]，高谷 大輔[5]，渡邉 千鶴[4]，今村 理世[6]，岡部 隆義[6]，小島 宏建[6]，大野 修[5]，半田 佑磨[5]，福澤 薫[5]，小田川 太一[7]，嘉糠 洋陸[7]，藤川 雄太[8]，井上 英史[8]，本間 光貴[4]，千田 俊哉[2]，丹羽 隆介[1]　([1]筑波大，[2]KEK，[3]長崎大，[4]理研，[5]阪大，[6]東大，[7]慈恵医大，[8]東薬大)
4C2a08　天然化合物ライブラリーから見出した 3 種の原虫に対する抗寄生虫化合物
10:55　○森 美穂子[1]，大野 春香[1]，カルティカ　サリ デフィ[1]，ジラーニ グラム[1]，村松 秀行[2]，五十嵐 雅之[2]，塩見 和朗[2]，野崎 智義[1]　([1]東大院医，[2]微化研)
4C2a09　*Fusarium* 属真菌によるタイプ A トリコテセン系カビ毒の産生に対する抗真菌剤の影響
11:06　○吉成 知也，永井 望美，渡辺 麻衣子，工藤 由起子　(国立医薬品食品衛生研究所)
4C2a10　クマリン系化合物を基礎としたがん転移抑制薬の探索
11:17　○服部 恭尚，杉山 雄輝，戸田 侑紀，細木 誠之，中村 誠宏，芦原 英司　(京都薬大)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4C2a11　*α*-グルコシダーゼを創薬標的とした新規フラボノイド誘導体の開発
11:36　○水野 美麗，福原 潔　(昭和大薬)
4C2a12　SARS-CoV 3CL protease を標的としたフタルイミド型阻害剤の合成研究
11:47　○佐野 陽菜[1]，遠藤 龍生[1]，照屋 健太[2]，服部 恭尚[3]，矢野 成和[1]，今野 博行[1]　([1]山形大院理工，[2]東北大院医，[3]京都薬科大)
4C2a13　プラディミシン A はオリゴマンノース含有糖鎖に結合して SARS-CoV-2 の感染を抑制する
11:58　○中川 優[1,2]，藤井 将人[1]，伊藤 那奈香[1]，小鹿 一[1]，木下 貴明[3]，櫻井 康晃[3]，安田 二朗[3]，五十嵐 康弘[4]，伊藤 幸成[5]　([1]名大院生命農，[2]名大iGCORE，[3]長崎大CCPID，[4]富山県大生工，[5]阪大院理)
4C2a14　ブラジル産プロポリスのアトピー性皮膚炎モデルマウスに対する効果
12:09　○日高 宗明[1]，菊池 恭[1]，黒川 昌彦[1]，堤 重敏[2]，鈴木 彰人[1]　([1]九州保健福祉大学，[2](株)アマゾンフード)

C3 会場　午前の部(9:30〜12:20)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4C3a01　セシウム蓄積細菌 Rhodococcus sp. RD011135 の固定化菌体による溶液中からのセシウム除去の検討
9:30　○乗安 奏斗[1]，木暮 優冴[1]，吉岡 潤一[2]，林 秀謙[1,2]　([1]前橋工科大工，[2]前橋工科大院工)

4C3a02　Acid Orange7 の微生物による脱色及び完全分解
9:41　○三好 望実，喜多 晃久，早瀬 伸樹　（新居浜高専）

4C3a03　鉱山廃水生物処理法導入の基礎データとなる 40 種坑廃水中の微生物叢解析
9:52　○羽部 浩[1]，青柳 智[1]，堀 知行[1]，稲葉 知大[1]，佐藤 由也[1]，保高 徹生[2]　([1]産総研･環境創生，[2]産総研･地圏資源)

4C3a04　腐植を用いた廃水浄化技術のメカニズムに関する研究
10:03　○川合 隆博[1]，谷津 大気[1]，謝 小毛[1]，並木 伸明[1]，前 一廣[2]　([1]JNCエンジニアリング株式会社，[2]京大名誉教授)

4C3a05　油脂廃水処理に優れる *Kinneretia* sp. E2 株の凝集能発現に関わるバイオフィルムの解析
10:14　○梅田 郁斗，伊藤 貴文，木元 久，日ビ 隆雄　（福井県大院生物資源）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4C3a06　Isolation of crude glycerol-utilizing oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* mutants
10:33　○Bhismo Srenggoro Kuntonugroho[1], Hiroyuki Kajiura[2], Ryo Misaki[2], Kazuhito Fujiyama[2]　([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech)

4C3a07　Elucidation of the Genes Affecting Lipid Overproduction in *Rhodotorula mucilaginosa*
10:44　○Ma. Christine Cabatlao[1], Ryuto Masui[1], Sayaka Maeda[1], Chih-Chan Wu[1], Hiroyuki Kajiura[2], Ryo Misaki[2], Savitree Limtong[3], Kazuhito Fujiyama[2]　([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech, [3]Kasetsart Univ.)

4C3a08　海洋利用型微生物燃料電池の開発
10:55　○梶原 将[1]，陳 馨玥[1]，佐藤 宏樹[1]，高橋 慧[1]，横山 浩[1,2]　([1]東工大生命理工学院，[2]農研機構畜産研究部門)

4C3a09　酸化チタン光アノードと組換え大腸菌の全細胞反応を用いたバイオカソード系による光電気化学的水素生産
11:06　○濵川 怜那，結城 里沙，本田 裕樹，藤井 浩　（奈良女大理）

4C3a10　フラボノイド分子の自発配向分極
11:17　○赤池 幸紀[1]，細貝 拓也[1]，小野 裕太郎[2]，鶴田 諒平[2]，山田 洋一[2]　([1]産総研，[2]筑波大)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4C3a11　微生物存在下での電位走査によるステンレス鋼腐食のタイムラプス観察
11:36　○若井 暁，小川 真弘　（海洋研･超先鋭）

4C3a12　円石藻 *Pleurochrysis carterae* の結晶成長制御に関与する酸性多糖 PS-2 の構造機能解析
11:47　○上野 友紀[1]，岡村 幸輝[1]，駱 衍祺[1]，千田 陸[2]，馳平 加代[2]，宮西 伸光[2]，長坂 征治[1]　([1]東洋大院生命，[2]東洋大院食環)

4C3a13　異なる Ca 濃度で培養した円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリス形成の分子メカニズム解明
11:58　○駱 衍祺，上野 友紀，岡村 幸輝，長坂 征治　（東洋大院生命）

4C3a14　堆肥化施設由来試料の非培養と培養における微生物群集構造
12:09　○森本 一，西山 すの　（株式会社komham）

C4 会場　午前の部(9:30〜12:20)

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4C4a01　Herbarumin IV の合成研究
9:30　○橋本 拓郎，勝田 亮，若森 晋之介，石神 健　（東農大･生命）

4C4a02　WNT-5A 誘導阻害を有する(±)-pochonin I の合成
9:41　○柴田 夏帆，鈴木 悠生，勝田 亮，若森 晋之介，矢島 新，額田 恭郎，石神 健　（東農大･生命）

4C4a03　Decarestrictine K 及び B の合成研究
9:52　○上羽 隼平，鈴木 隆之介，勝田 亮，若森 晋之介，石神 健　（東農大･生命）

4C4a04　アシルパラデーションを用いた(-)-stagonolide E の合成研究
10:03　○日野 瑞希[1]，河村 篤[2]，真壁 秀文[2]　([1]信大院総合理工農，[2]信大バイオメディカル研)

4C4a05　2'-デメチル-7'-ヒドロキシ-2- メチルタンザワ酸 B アミド縮環部異性体の全合成
10:14　○臼倉 大輝，村田 貴嗣，筒井 久澄，渡部 史也，平田 諒，岡野 宙輝，金井 大和，塩釜 龍之介，夏目 美祐希，市川 翔，陸 穎佳，岡本 卓真，下仲 基之，椎名 勇　（東理大理）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4C4a06　多様な生物活性を有する Amorfrutin 類の化学酵素合成研究
10:33　○QIU JIHAN，福田 夢月，白石 太郎，葛山 智久，滝川 浩郷，小倉 由資　（東大院農生科）

4C4a07　プレニル基転移酵素を用いたプテロカルパン型天然物の化学酵素合成
10:44　○三浦 勇輝，福田 夢月，白石 太郎，葛山 智久，滝川 浩郷，小倉 由資　（東大院農生科）

4C4a08　ユニークな多環式ベンゾキセピン骨格を有する新規リグナン 2',9-epoxylyoniresinol の合成
10:55　○橋爪 玲那，河地 貴利，須戸 雅弘，山田 真希人，倍 詩織，奥田 和真，奥野 祥治　（和歌山高専）

4C4a09　海洋生物由来のテルペン合成
11:06　○市川 善康[1]，越智 里香[1]，増田 俊哉[2]　([1]高知大理工，[2]大阪公立大学大学院生活科学研究科)

4C4a10　Halichonadin 類の合成研究
11:17　○藤田 遼平[1]，大岡 海斗[1]，市川 善康[2]，細川 誠二郎[1]　([1]早大理工，[2]高知大理工)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4C4a11　(+)-Karanone の不斉全合成
11:36　○祷 雄太，滝川 浩郷，小倉 由資　（東大院農）

4C4a12　電子環状反応を基盤とした orobanchol 類の合成
11:47　○内田 聖乃，小倉 由資，岡村 仁則，滝川 浩郷　（東大院農生科）

4C4a13　ベンジリデングルコシドの合成とその光学分割剤としての可能性
11:58　○齋藤 さら，小林 萌，二瓶 賢一　（宇都宮大農）

4C4a14　ヤマブシタケの fruiting liquid 由来のアラビトール誘導体の化学合成
12:09　○上野 真澄[1]，石井 瑞樹[1]，呉 静[2,3]，河岸 洋和[2,3]，二瓶 賢一[1]　([1]宇都宮大農，[2]静大･農，[3]静大･キノコ科研)

C5 会場　午前の部(9:30〜12:20)

微生物―遺伝子-ゲノム，メタゲノム，プロテオーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4C5a01　ラガービール酵母 *Saccharomyces pastorianus* の長期継代培養時におけるゲノム不安定性の解析
9:30　○石井 優人[1]，宮澤 紘輔[1]，高橋 朋子[2]，岩間 亮[1,3]，福田 良一[1,3]，堀内 裕之[1,3]，野田 陽一[1,3]　([1]東大院･農生科，[2]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ(株)，[3]東大･微生物連携機構)

4C5a02　*Saccharomyces pastorianus* のモデル株を用いたミトコンドリアと低温増殖性の関係
9:41　○福西 鈴穂[1,2]，高橋 朋子[5]，岩間 亮[3,4]，福田 良一[3,4]，堀内 裕之[3,4]，鎌倉 高志[2]，野田 陽一[3,4]　([1]東大･農，[2]東理大･理工，[3]東大院･農生科，[4]東大･微生物連携機構，[5]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ(株))

4C5a03　Cas9 ニッケースの複数遺伝子座への同時誘導による高度な遺伝子増幅系の構築
9:52　○武居 宏明，岡田 悟，伊藤 隆司　(九大院医)

4C5a04　枯草菌ゲノムベクターを用いたヒト TCR 遺伝子座の再構築
10:03　○諸角 光祐[1]，岩田 哲郎[1]，山崎 憲政[2]，神沼 修[3]，廣田 順二[1]　([1]東工大院生命理工学院，[2]広島大技術センター，[3]広島大原爆放射線医科学研究所)

4C5a05　セルロース分解性放線菌のキシランによるグリオキシル酸回路の誘導
10:14　○長野 竜也[1]，大橋 慧介[1]，林 直希[2]，クマール ビジェイ[2]，高須賀 太一[2]　([1]北大院国際食資源，[2]北大院農)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4C5a06　微生物有害情報データベース Microbial Risk Information Database: M-RINDA
10:33　○木村 明音，黄地 祥子，宮澤 せいは，藤田 真澄，魚原 文，山本 美佳，中谷 諒介，市川 夏子　(NITE･NBRC)

4C5a07　QTL 解析を用いたシイタケの収量性に関わる因子の探索
10:44　○木津川 結奈[1]，張 吉麗[1]，佐藤 匠[1]，三ッ國 佳祐[1]，柳田 かりん[2]，田中 祐生[2]，田村 孝史[2]，小野 晶子[1]，鈴木 智大[1]　([1]宇都宮大･バイオ，[2]森産業株式会社)

4C5a08　皮膚常在細菌叢と肌状態との関連性
10:55　○門屋 亨介，近藤 彩乃，松川 彩花　(椙山女大)

4C5a09　後発酵茶由来 *Lactiplantibacillus plantarum* のゲノム解析とその遊牧民的性質
11:06　○佐藤 杏香[1]，五十川 祐一郎[1]，丹羽 諒[2]，西岡 浩貴[3]，堀江 祐範[4]，岩橋 均[1]　([1]岐阜大院自，[2]京大院医，[3]徳島工技セ，[4]産総研)

4C5a10　腸内細菌を対象とした生菌微生物の検出方法の開発
11:17　○土田 咲絵[1]，西山 依里[1]，相原 浩揮[1]，生井 楓[2,3]，西山 啓太[2,3]，北澤 春樹[2,3]　([1]株式会社ファスマック，[2]東北大院農，[3]CFAI)

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

4C5a11　コンパニオン植物栽培土壌における土壌生物相解析
11:36　○鈴木 美緒[1]，村上 純哉[1]，近藤 侑希[1]，森本 早貴[1]，飯沼 辰也[1]，広瀬 侑[1,2]，山内 高広[2]，熊崎 忠[2]，園原 詩野[3]，岡田 知之[3]，継国 孝司[3]，浴 俊彦[1,2]　([1]豊橋技術科学大学　応用化学･生命工学系，[2]豊橋技術科学大学　先端農業･バイオリサーチセンター，[3]武蔵精密工業株式会社　植物バイオ事業部)

4C5a12　Deterministic Shaping of Soil Bacterial Communities: Interplay of Rare Species and Environmental Selection
11:47　○Leonardo Stari，Hiromi Kato，Yoshiyuki Ohtsubo，Yuji Nagata　(Tohoku University)

4C5a13　植物生育促進細菌の機能解明に向けたダイズ根内生菌のゲノム解析
11:58　○大西 雄貴[1]，西川 洋平[2,3]，木伏 真子[1,2]，細川 正人[1,2,3,4]，松本 厚子[3]，柏木 康熙[1]，穴井 豊昭[5]，竹山 春子[1,2,3,4]　([1]早大院･先進理工，[2]産総研･早大 CBBD-OIL，[3]早大･ナノライフ創新研，[4]早大･生命動態研，[5]九大院･農)

4C5a14　多様な環境微生物に存在する機能未知呼吸酵素複合体 Ehr のバイオインフォマティクス解析
12:09　○高野 将光[1]，井上 真男[1,2]，青野 陸[1]，三原 久明[1]　([1]立命大･生命，[2]立命大･R-GIRO)

C6 会場　午前の部(9:30～12:20)

食品―食品機能・栄養-免疫，炎症/食品機能・栄養-アレルギー・アレルゲン―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

4C6a01　フラクトオリゴ糖摂取が腸管の樹状細胞と抗体産生に与える影響
9:30　○森 清彰，古川 凱斗，津田 真人，細野 朗　(日本大学生物資源科学部)

4C6a02　酪酸は IgE 非依存的マスト細胞活性化を抑制する
9:41　○森田 莉加[1]，長田 和樹[1]，谷萩 祐太[1]，岡村 穂丘[1]，山崎 憲政[2]，三浦 健人[2]，神沼 修[2]，西山 千春[1]　([1]東理大院先進工生命システム，[2]広大･原医研)

4C6a03　複数の食品因子の組み合わせに着目した抗炎症作用の相乗効果
9:52　○吉岡 正樹，平出水 貴子，大塚 桃佳，服部 誠，好田 正　(東農工大院･応生化)

4C6a04　腸上皮において誘導される GABA シグナルの解析
10:03　○池上 美音[1]，山下 未夢[1]，富永 帆南[1]，原田 岳[2]，依田 一豊[2]，宮澤 賢司[2]，中西 祐輔[1]，高橋 恭子[1]　([1]日大生物資源，[2]タカナシ乳業･商品研究所)

4C6a05　樹状細胞の分化およびインテグリン遺伝子発現に対する短鎖脂肪酸の影響
10:14　○趙 維霆，長田 和樹，伊藤 直人，西山 千春　(東理大院先進工生命システム)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4C6a06　腸間膜リンパ節及びパイエル板における *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 による樹状細胞を介した IgA 抗体産生増強作用
10:33　○小寺 修平[1]，溝渕 響子[1]，曽我 皓平[1]，藤岡 郁美[2]，内田 健治[2]，薩 秀夫[3]，足立(中嶋) はるよ[1]，八村 敏志[1]　([1]東大院農生科･食の安全研究セ，[2]よつ葉乳業株式会社，[3]前橋工科大･生物工)

4C6a07　藻類由来多糖によるアレルギー抑制効果の検証とその作用機序の解明
10:44　○安井 悠人[1]，白井 康仁[1]，水野 雅史[2]　([1]神大院農学研究科，[2]大阪青山大健康科学部)

4C6a08　免疫細胞のフェロトーシスにおけるアクロレインの関与
10:55　○川尻 海斗，糸井 海星，内田 浩二　(東大院農)

4C6a09　食事バランスが腸管抗体特異性に及ぼす影響の解析
11:06　○近澤 未歩，湊 健一郎　(名城大農)

4C6a10　小腸パイエル板細胞が誘導する IgA 抗体産生応答におけるクルクミン・短鎖脂肪酸・腸内細菌による協調作用
11:17　○大鐘 大士[1]，舘岡 楓[1]，柴崎 涼太[1]，津田 真人[1]，小寺 修平[2]，吉田 有佐[2]，WANG YIMEI[2]，戸塚 護[3]，足立(中嶋) はるよ[2]，八村 敏志[2]，細野 朗[1]　([1]日大生資科，[2]東大院農生科･食の安全研セ，[3]東京農大生命科学･分子微生物)

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

4C6a11　酪酸は T 細胞機能調節を介して皮膚疾患乾癬を改善する
11:36　○時田 隆世，廣木 郁美，鈴木 勝大，長田 和樹，西山 千春　(東理大院先進工生命システム)

4C6a12　フラクトオリゴ糖の構成糖がマウス腸内細菌叢と IgA 産生に与える影響
11:47　○大村 蓮，津田 真人，京井 大輔，細野 朗　(日大生資科)

4C6a13　漬物由来乳酸菌 SSL-1 による IL-10 発現亢進の解析
11:58　○藤原 唯信[1]，柴田 奈那[1]，村田 美樹[2]，浅見 進也[2]，薩 秀夫[3]　([1]前工大院工，[2]株式会社新進，[3]前工大工)

4C6a14　食品アレルギーモデルマウスにおける FTY720 の影響
12:09　○齊木 理央，服部 誠，好田 正　(東農工大院･応生化)

C7 会場　午前の部（9:52〜12:09）

微生物—物質生産-発酵（二次代謝産物）—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:44〜9:52

4C7a03　マレイマイシン生合成におけるマレイミド環形成機構
9:52 ○原田 陽道[1]，曽根 祐輔[1]，吉田 彩子[1,2]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]（[1]東大院農，[2]東大・微生物連携機構）

4C7a04　放線菌 *Streptomyces lydicus* ATCC 25470 におけるアミノ基キャリアタンパク質を介して生産される新規二次代謝産物の生合成に関する研究
10:03 ○林 勇太[1]，曽根 祐輔[1]，吉田 彩子[1,2]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]（[1]東大院農，[2]東大・微生物連携機構）

4C7a05　グラム陰性菌に効く新規抗生物質の探索
10:14 ○河野 裕太，鶴貝 龍聖，大土 光経，秦田 勇二（埼玉工大工）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4C7a06　*Streptomyces* sp. TSO12 株の生産する抗菌活性物質の解析
10:33 ○鶴貝 龍聖，大土 光経，中島 美咲，河野 裕太，石川 正英，岩崎 政和，秦田 勇二（埼玉工大工）

4C7a07　新規抗菌活性物質生産菌を対象とした量産化の検討
10:44 ○大土 光経，中島 美咲，鶴貝 龍聖，河野 裕太，秦田 勇二（埼玉工大工）

4C7a08　八丈島産高塩濃度「くさや汁」からの放線菌分離による「くさや汁」中の微生物由来抗生物質の解明
10:55 ○真崎 祥子[1]，長田 隆弘[2]，平田 朝陽[3]，野木村 さくら[1]，海野 良輔[1]，石川 森夫[1]，荒川 賢治[3]，鈴木 敏弘[1]（[1]東農大院・醸造，[2]長田商店，[3]広大院・統合生命）

4C7a09　放線菌 *S. incarnatus* の *rpoB* 変異によるシネフンギン増産効果の検討
11:06 長谷川 広夢，根本 理子，金尾 忠芳，○田村 隆（岡山大院）

4C7a10　機能性改善を目指した非天然型 goadsporin の作製とその生物活性評価
11:17 ○星野 千優，星野 翔太郎，尾仲 宏康（学習院大理）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4C7a11　コリネ型細菌を用いたハイドロキノン高生産技術の開発
11:36 ○澁谷 信司[1]，橋本 龍馬[2]，須田 雅子[2]，乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

4C7a12　コリネ型細菌におけるイソプレン発酵生産
11:47 ○天川 薫[1]，横野 里佳[1]，Theresia Natalia Maria[2]，猿谷 直紀[2]，須田 雅子[2]，平賀 和三[2]，乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

4C7a13　コリネ型細菌を用いたエルゴチオネインの発酵生産に対する浸透圧の影響
11:58 ○高橋 優乃，平沢 敬（東工大院生命理工）

D1 会場　午前の部（9:30〜12:20）

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

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4D1a01　糞便培養系を用いたエクオール代謝における食物繊維の影響
9:30 ○小寺 美有紀[1,2]，中村 浩平[2]，横山 慎一郎[1]（[1]岐阜食科研，[2]岐阜大学）

4D1a02　カルノシンによるエクソソームを介した脳機能改善
9:41 ○里 桃花[1]，宮園 素直[1]，鵜殿 美弥子[2]，片倉 喜範[2]（[1]九大院生資環，[2]九大院農院）

4D1a03　福島県産の発酵物から分離された乳酸菌のγアミノ酪酸生成と食品への応用
9:52 ○熊谷 武久，中山 未菜，芦澤 翔，鈴木 皓介（福島大食農）

4D1a04　ペプチドによる GLP-1 分泌促進作用における Trp-Tyr 配列の重要性について
10:03 ○船橋 周倖[1]，田口 颯[2]，比良 徹[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

4D1a05　抹茶の新たな機能性食品因子の探索に向けたマイクロ RNA 解析
10:14 ○黄 苡嵐[1]，一瀬 智美[1]，渡邉 凌矢[1]，辰己 由華[2]，一谷 正己[2]，衣笠 仁[2]，瀧原 孝宣[2]，春尾 守一[3]，熊添 基文[1]，立花 宏文[1]，藤村 由紀[1]（[1]九大院農院・生機科，[2]（株）伊藤園・中央研究所，[3]（株）あいや）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D1a06　高食物繊維小麦粉による腸内環境改善効果の検証
10:33 ○大友 雄登[1]，野間 聡[1]，貴島 聡[2]，菊池 洋介[1]，青江 誠一郎[3]（[1]（株）日清製粉グループ本社，[2]日清製粉（株），[3]大妻女子大家政）

4D1a07　溶解度分別法を利用したグリチルリチン精製法の開発
10:44 ○本夛 峻資，西野 蛍汰，福田 悠作，片野 肇，高橋 正和（福井県大院生物資源）

4D1a08　ピセアタンノール摂取による皮膚粘弾性へ及ぼす影響—ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験—
10:55 ○吉原 瑞樹（森永製菓株式会社）

4D1a09　ペンタガロイルグルコースは miR-191-5p を介して脳機能調節作用を発揮する
11:06 ○李 寛雨，松井 優樹，麻生 菜帆，高木 基光，岸 洸聖，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文（九州大学）

4D1a10　細胞内における新型コロナウイルス酵素 Main protease への茶成分の結合
11:17 ○鈴木 咲子[1]，赤川 貢[2]，西川 美宇[3]，生城 真一[3]，金子 一郎[1,4]，加藤 陽二[1,4]（[1]兵庫県大環境人間，[2]徳島大学院医歯薬，[3]富山県大工，[4]兵庫県大先端食セ）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4D1a11　機械学習とビッグデータを用いた食品の機能性および微生物を介した作用メ カニズムの推定
11:36 ○三枝 奈々子[1]，柴田 友和[1]，澤田 隆介[2]，関谷 拓海[1]，山西 芳裕[3]（[1]九州工業大学，[2]岡山大学，[3]名古屋大学）

4D1a12　愛知県幸田町産・筆柿の葉に含まれる機能性成分アストラガリンに関する検討
11:47 ○保田 倫子[1]，田中 美帆[1]，小野 綾巳[1]，村瀬 晴香[1]，矢田 友和[2]（[1]椙山大生活，[2]JAあいち三河）

4D1a13　習慣的な紅茶の飲用が腸内細菌叢に与える影響
11:58 ○冨岡 玲乃[1]，田中 裕子[1]，鈴木 壮幸[1]，海老原 淑子[2]（[1]三井農林株式会社，[2]チヨダパラメディカルケアクリニック）

4D1a14　分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に及ぼす影響：バリン欠乏が腸管幹細胞を減少させるメカニズムの解明
12:09 ○香西 歩[1]，岩槻 健[1]，隈本 宗一郎[2,3]，清水 誠[4]，小西 良子[1]，只石 幹[1]，服部 一夫[1]（[1]東農大・応生，[2]早大・院先進・化学生命化学，[3]金沢大・がん研・がん・老化生物学，[4]東農大）

D2 会場　午前の部（9:30〜12:20）

食品—食品工学-保蔵，安全性/食品機能・栄養-ビタミン・ミネラル/食品機能・栄養-メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4D2a01　高静水圧酵素処理で作成したシカ肉の超短期仕込肉醤の安全性と機能性
9:30　○小木曽 加奈[1,2]，中嶌 岳郎[3]，山崎 慎也[4]，古田 一匡[5]
（[1]長野県立大健康発達，[2]長野県立大院健康栄養科学，[3]信大医，[4]長野県工技センター，[5]富士通株式会社）

4D2a02　ドライ熟成中の湿度条件が牛肉の微生物学的品質に与える影響
9:41　○鳥丸 碧里[1]，豊留 孝仁[2,3]，田村 健一[4]，三上 奈々[1]（[1]帯畜大·畜産，[2]帯畜大·獣医，[3]千葉大·真菌セ，[4]北一ミート（株））

4D2a03　糖添加カッテージチーズにおけるリステリアの挙動
9:52　○林崎 菜月[1]，佐藤 朱嶺[2]，津田 治敏[1,2]（[1]弘大院·地域共創，[2]弘大·農生）

4D2a04　Antimicrobial properties of active compounds derived from natural food extracts for preventing beverage non-alcoholic beverage spoilage microorganisms
10:03　○Chang LIU[1]，Jiale TANG[1]，Satoka TAKABAYASHI[1]，Saki TOYOTA[2]，Hidenori MATSUKURA[2]，Masaki SHIMOKAWA[2]，Suguru OKUDA[1]，Hideaki ITOH[1]，Peng LU[1]，Koji SUZUKI[3]，Koji NAGATA[1]（[1]The Univ. of Tokyo，[2]Asahi Breweries，Ltd.，[3]Asahi Quality and InnovationsLtd.）

4D2a05　アクアポニックスで栽培されたリーフレタスの栄養・機能性成分含量とその季節変動評価
10:14　○榎 康明[1]，筒浦 さとみ[2]，大竹 憲邦[2]，三亀 啓吾[2]，淺倉 瑠奈[3]，毒嶌 成美[2]，山口 智子[3]（[1]株式会社プラントフォーム，[2]新潟大·農，[3]新潟大·教育）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D2a06　スクシニル CoA 合成酵素欠損線虫（*Caenorhabditis. elegans*）の寿命の短縮または MMA の増加は認められなかった。
10:33　○橋本 航，美藤 友博，渡邉 文雄，藪田 行哲（鳥取大院持続）

4D2a07　パーキンソン病モデル線虫（*Caenorhabditis elegans*）におけるビタミン B_{12} 不足の影響
10:44　○山﨑 大幹，美藤 友博，渡邉 文雄，藪田 行哲（鳥取大院持続）

4D2a08　麹菌を使った発酵食品に含まれるビタミン B_{12} 化合物の特徴
10:55　○小関 喬平[1]，渡邉 文雄[2]（[1]石川県大·生資環，[2]鳥取大·農）

4D2a09　ビタミン B6 サプリメント が筋再生及び筋衛星細胞に与える影響
11:06　○小牟田 陽香[1]，矢中 規之[2]，カムランシー タナッチャポーン[2]（[1]広島大·生生，[2]広島大院·統合生命）

4D2a10　1,25（OH）2D3 を含む VD 代謝物の同時定量法の検討
11:17　○高橋 康司[1]，滝脇 正貴[1]，福沢 世傑[1]，堤 遊[1]，菊谷 善国[1]，永田 亜希子[2]，飯島 一翔[2]，坂本 良太[2]，長澤 和夫[2]（[1]日本電子，[2]東農工大院工）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4D2a11　PQQ によるコロナウイルスの破壊と凝集による感染抑制
11:36　○池本 一人，辻 シャフィカ，沼口 友恵（三菱ガス化学新潟研）

4D2a12　必須微量栄養素セレンの恒常性維持における腸内細菌叢の関与
11:47　○髙橋 一聡[1]，小椋 康光[2]（[1]千葉大院園芸，[2]千葉大院薬）

4D2a13　食塩の過剰摂取による腸管炎症が耐糖能，動脈硬化に及ぼす影響
11:58　○毛利 瑠那[1]，増澤（尾﨑）依[2]，細野 崇[2,3]，関 泰一郎[2,3]（[1]日大·生資科·生命化，[2]日大·生資科·バイオ，[3]日大院·生資科·応生科）

4D2a14　油脂によるミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性の増強と抗肥満作用に関する研究
12:09　○吉田 実由[1]，森田 華[1]，増澤（尾﨑）依[2]，細野 崇[2,3]，関 泰一郎[2,3]（[1]日大·生資科·生命化，[2]日大·生資科·バイオ，[3]日大院·生資科·応生科）

D3 会場　午前の部（9:30〜12:20）

植物—タンパク質，酵素-機能，調節/環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化/その他—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4D3a01　ローマカミツレの花に存在し，アピゲニン配糖体に作用する酵素の同定
9:30　○鎌田 成栄[1]，山澤 由佳[2]，土居 陽彦[2]，滝田 禎亮[1]，保川 清[1]（[1]京大院·農，[2]花王）

4D3a02　紅藻類オゴノリ科オゴノリ由来のヘマグルチニンの季節変動
9:41　○垣田 浩孝[1]，岸野 愛[1]，柳岡 直樹[1]，小比賀 秀樹[2]（[1]日大院総合基，[2]産総研健康工学）

4D3a03　イネのシリカ形成を促進する有機マトリックスの探索と機能解析
9:52　○風見 菜月[1]，片山 秀和[2]，尾﨑 紀昭[1]（[1]秋田県大生物資源，[2]東海大工）

4D3a04　紅藻類オゴノリ科ユミガタオゴノリ由来のヘマグルチニンの抽出
10:03　○小池 航平[1]，黒須 泰行[2]，本間 悠里[2]，須藤 裕介[3]，垣田 浩孝[2]（[1]日大文理，[2]日大院総合基，[3]沖縄県水産海洋技術センター）

4D3a05　イネにおけるプロゲステロン生合成酵素の機能解析
10:14　○桑田 佳明，佐々木 康幸，矢嶋 俊介，伊藤 晋作（東農大院バイオ）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D3a06　紅藻類クビレオゴノリの水溶性画分中の赤血球凝集活性
10:33　○齋藤 俊介[1]，緑川 英里香[2]，黒須 泰行[2]，本間 悠里[2]，垣田 浩孝[2]（[1]日大文理，[2]日大院総合基）

4D3a07　イネ葉身のファン型ケイ酸体に含まれるタンパク質の機能解析
10:44　○千葉 優吏，村口 元，尾﨑 紀昭（秋田県大生物資源）

4D3a08　トマト固定品種を用いた二種のイソレクチンの性質の解析
10:55　○小栗 秀，八十 悠樹，石原 彰子，坂本 光（東農大生物産業）

4D3a09　ホップ（*Humulus lupulus* L.）ルプリンに発現する LTP1 の同定と機能
11:06　○八十 悠樹，小栗 秀，坂本 光（東農大院生物産業学研究科）

4D3a10　ドラゴンフルーツ *Hylocereus undatus* 果皮の植物由来キチナーゼの精製
11:17　○新里 守礼，田邊 俊朗（沖縄高専）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4D3a11　MeJA 空気伝播による新たな代謝産物の探索
11:36　○鵜飼 夕菜[1]，榎 亜加音[2]，北岡 直樹[3]，松浦 英幸[3]（[1]北大農，[2]北大院農，[3]北大農学研究院）

4D3a12　9-LOX 依存で生合成される death acid の生物活性に関する生物有機化学的研究
11:47　○草野 春香[1]，宮脇 寛治[2]，北岡 直樹[3]，松浦 英幸[3]　([1]北大農，[2]北大院農，[3]北大農学研究院)

4D3a13　ナショナルバイオリソースプロジェクト・トマトの病徴様表現型解析への利用
11:58　○杉本 貢一，藤森 陽子，江面 浩　(筑波大T-PIRC)

4D3a14　葉緑体ゲノム情報に基づくムラサキ在来種の母系の理解
12:09　○岡田 貴裕[1]，矢崎 一史[2]，佐々木 健郎[3]，渡邉 啓一[4]　([1]佐賀大医，[2]京都大生存研，[3]東北医科薬科大，[4]九州栄養福祉大)

D4 会場　午前の部(9:41〜12:09)

食品—食品機能・栄養-タンパク質・アミノ酸代謝/食品機能・栄養-癌，抗癌—

a02〜a05 発表者の接続時間 9:33〜9:41

4D4a02　小麦グルテン加水分解物の高齢者に対する運動機能改善効果の検証
9:41　○野出 純一[1]，浅田 憲一[2]，高橋 絵里歌[1]，菊池 洋介[1]　([1]株式会社日清製粉グループ本社，[2]日清ファルマ株式会社)

4D4a03　ポリアミンがキイロショウジョウバエの生育段階・活動量に及ぼす影響
9:52　○藤田 剛士[1]，下川 ひろみ[1]，堀 亜紀[2]，門口 響[2]，倉石 貴透[2]，栗原 新[1]　([1]近畿大･生物理工，[2]金沢大･医薬保健)

4D4a04　Roles of hepatic GABA transaminase in food intake suppression
10:03　○Thanutchaporn KUMRUNGSEE，Tomoka NAGAO，Noriyuki YANAKA　(Hiroshima Univ.，Graduate School of Integrated Sciences for Life)

4D4a05　大腸上皮における Cyp2c55 発現と腸内細菌との相互作用
10:14　○藤村 颯[1]，佐藤 哲[1]，松井 伸祐[2]，山本 祥也[1]，岩槻 健[2]，鈴木 卓弥[1]　([1]広大院統合生命，[2]東農大応生)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D4a06　がん細胞の上皮間葉転換(EMT)におけるニンニク由来硫黄化合物の役割
10:33　○西塚 誠，佐々木 歩海　(弘前大農生)

4D4a07　ニンニク臭気前駆体が誘導するメラノーマの細胞死の形態
10:44　○望月 創一朗，矢嵜 友章，山口 勇将，熊谷 日登美　(日本大学 生物資源科学部)

4D4a08　中国産食用茸ツブイボタケ含有 vialininA 及び DMT の HCT116 細胞におけるアポトーシス誘導効果の検討
10:55　○鈴木 健斗，紙谷 昌妙，菅谷 紘一，小野瀬 淳一，阿部 尚樹　(東京農業大学大学院)

4D4a09　Arctigenin，Nobiretin の併用によるヒト肺腺がん細胞(A549)の代謝変化に関する研究
11:06　○岩崎 公典　(琉大熱生研)

4D4a10　ラズベリー花弁に含まれるフラバン-3- オール誘導体の細胞内ターゲットの検討と花弁抽出液の活性評価
11:17　○青木 環[1]，堀口 諒太[1]，井本 風馬[2]，宮前 友人[2]，道下 僚[1]，小堀 亮[1]，齊藤 安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院工，[2]大阪電通大工)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4D4a11　ケルセチンのがん抑制性マイクロ RNA 発現調節作用
11:36　○村田 希[1]，丸亀 裕貴[2]，藤村 由紀[2]，立花 宏文[2]　([1]愛媛大･ADRES，[2]九大院農院･生機科)

4D4a12　野沢菜漬け由来乳酸菌株による抗腫瘍効果メカニズムの解析
11:47　○阿蘇 晴香[1]，新妻 史絵[1]，柾 明弘[1]，遠藤 勝紀[1]，北村 秀光[2,3]，田中 沙智[1]　([1]信州大院，[2]東洋大･理工，[3]北大･遺制研)

4D4a13　Inhibitory effect of colostrum-derived Lacticaseibacillus rhamnosus Probio-M9 on colitis-related carcinogenesis
11:58　○Lin Kurahara[1]，Feiyan Zhao[2]，Xiaodong Li[1]，Zhihong Sun[2]，Heping Zhang[2]，Katsuya Hirano[1]　([1]Department of Cardiovascular Physiology，Faculty of Medicine，Kagawa University，[2]Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering; Key Laboratory of Dairy Products Processing，Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering，Ministry of Education，Inner Mongolia Agricultural University)

D5 会場　午前の部(9:30〜12:20)

酵素—糖質代謝関連酵素—

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4D5a01　微生物由来α-(1 → 3)-glucan の資化に関与する糖質加水分解酵素の機能解析
9:30　○岡 希望[1]，木村 聡[2]，岩田 忠久[2]，宮崎 剛亜[1,3]　([1]静大院･総科技･農，[2]東大院･農，[3]静大･グリーン研)

4D5a02　Bacteroidota 門細菌由来 GH13_38 酵素のX線結晶構造解析
9:41　○中村 駿太郎[1]，宮崎 剛亜[1,2]　([1]静大･創造院･バイオサイエンス，[2]静大･グリーン研)

4D5a03　β-1,2-グルカン代謝に関連する Glycoside hydrolase family 1 β-グルコシダーゼの機能と構造
9:52　熊倉 悠人[1]，元内 省[1]，中井 博之[2]，○中島 将博[1]　([1]東京理科大･創域理工，[2]新潟大農)

4D5a04　α-1,6-Cyclized β-1,2-glucohecadecaose 合成酵素の発見；*Xanthomonas* 属に汎用な新農薬ターゲット
10:03　○元内 省[1]，今場 司朗[2]，中井 博之[3]，中島 将博[1]　([1]東京理科大･創域理工，[2]農研機構，[3]新潟大･農)

4D5a05　子嚢菌 *Fusarium oxysporum* の GH131 タンパク質の発現系の構築と結晶構造解析
10:14　○佐野 遼太郎[1]，小薗 拓馬[1]，西河 淳[1]，小松 健[2]，有江 力[2]，殿塚 隆史[1]　([1]東京農工大院農応用生命化学，[2]東京農工大院農生物制御科学)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D5a06　結核菌の細胞壁多糖を分解する新規酵素 ExoMA2 の反応機構
10:33　○福島 陸[1]，石渡 明弘[2]，鹿島 騰真[1]，宮永 顕正[1,4]，藤田 清貴[3]，伏信 進矢[1,4]　([1]東大院･農生科，[2]理研，[3]鹿児島大･農，[4]東大CRIIM)

4D5a07　ゴマリグナン配糖体加水分解酵素の X 線結晶構造と C 末端ドメインの新奇機能
10:44　○矢内 太朗[1]，高橋 由季乃[1]，坂井 直樹[2]，竹下 浩平[2]，今泉 璃城[1]，松浦 滉明[2]，和氣 駿之[3]，高橋 征司[3]，山本 雅貴[2]，片岡 邦重[1]，中山 亨[3]，山下 哲[1]　([1]金沢大院 自然科学，[2]理研 RSC，[3]東北大院 工)

4D5a08　新奇酵素ガラクトース 2-エピメラーゼの X 線結晶構造とα 7-α8 ループ変異酵素の解析
10:55　○内山 昌典[1]，佐分利 亘[1]，武井 梓穂[2]，尾瀬 農之[2]，森 春英[1]　([1]北大院農，[2]北大院生命)

4D5a09　イネ GH1 β-グルコシダーゼ TAGG2 の基質アグリコン依存的なグリコシド特異性の各種配糖体と変異酵素を用いた解析
11:06　○宇野 裕弥，堀越 秀，佐分利 亘，森 春英　(北大院農)

4D5a10　*Rhodothermus marinus* 由来セロビオース 2-エピメラーゼにおける還元末端糖残基の 2-OH 基との相互作用残基の反応特異性への寄与の解析
11:17　○佐分利 亘，森 春英　(北大院農)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4D5a11　シアノバクテリア由来ホスホリラーゼの構造機能解析
11:36　生田 あいり，○鈴木 龍一郎，鈴木 英治 （秋田県大生物資源）

4D5a12　*Pseudomonas stutzeri* L-ラムノースイソメラーゼの1-デオキシ希少糖の基質認識の理解
11:47　○吉田 裕美[1,2]，吉原 明秀[2,3]，何森 健[2,3]，神鳥 成弘[1,2]（[1]香川大･医･総合生命，[2]香川大･国際希少糖研究教育，[3]香川大･農）

4D5a13　ラフィノース合成酵素の予測立体構造に基づく基質選択機構の推定
11:58　○前田 美紀，戸田 恭子 （農研機構･資源研）

4D5a14　Paenibacillus 属細菌由来キチンセンサータンパク質の機能解析
12:09　○小川 朋希，伊藤 貴文，日び 隆雄，木元 久 （福井県立大 生物資源）

D6 会場　午前の部（9:30〜12:09）

動物―遺伝子-発現制御，ノンコーディングRNA，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス，ゲノミクス/細胞機能-シグナル伝達，細胞応答，細胞分化，細胞死，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4D6a01　新規ヒトビタミン D 標的 non-coding RNA 遺伝子群の同定
9:30　○金本 義明[1,2]，早川 哲[1,2]，澤田 崇広[1,2]，森 甚一[2]，黒川 友博[2,3]，加藤 茂明[1,2,3]（[1]医療創生大学　健康科学リサーチセンター，[2]ときわ会先端医学研究センター，[3]福島県立医科大学）

4D6a02　ビタミン D 誘導性エンハンサー RNA（eRNA）を介した核内ビタミン D 受容体による転写制御機構の解明
9:41　早川 哲[1,2]，野尻 光希[1,2]，金本 義明[1,2]，澤田 崇広[1,2]，黒川 友博[2,3]，○加藤 茂明[1,2,3]（[1]医療創生大学　健康科学リサーチセンター，[2]ときわ会先端医学研究センター，[3]福島県立医科大学）

4D6a03　PGC1 αは神経筋接合部の形成に重要な Dok-7 の発現を正に制御する
9:52　○酒巻 千広[1]，杉本 拓海[1]，木村 徳士[1]，江口 貴大[2]，三浦 進司[3]，亀井 康富[1]（[1]京都府大院，[2]国立長寿研，[3]静県大院）

4D6a04　転写因子 POU2F3 による 2 型味細胞分化誘導のメカニズム解明
10:03　○大原 麻美絵[1]，竹村 孝一[1]，松井 伸祐[1]，渡邉 晴也[2]，米谷 達哉[1]，千葉櫻 拓[2]，今井 啓雄[3]，岩槻 健[1]（[1]東農大応生，[2]東農大生命科学，[3]京大進化研）

4D6a05　高嗜好性食品摂取による快情動産生機序の組織学的解析
10:14　○相原 史佳，福山 雄大，程 曦，喜田 聡 （東大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D6a06　cAMP 情報伝達過活性化を原因とする心的外傷後ストレス障害（PTSD）の分子機構
10:33　○石川 理絵[1]，長葭 大海[1]，福島 穂高[2]，Zhuo Min[3]，岡本 賢一[3,4]，喜田 聡[1]（[1]東大院農，[2]東農大生命科学，[3]トロント大医，[4]マウントサイナイ病院ルーネンフェルド･タネンバウム研）

4D6a07　高嗜好性食物を摂食するエピソード記憶形成に対する海馬の役割の解析
10:44　○高島 咲希，桑鶴 良文，喜田 聡 （東大院農）

4D6a08　生体由来マスト細胞における接着分子 CD103 の発現調節機構
10:55　○石井 健大，長田 和樹，西山 千春 （東理大院先進工生命システム）

4D6a09　核内受容体 NR4A3 は樹状細胞の転写調節を制御し，その欠損は接触性皮膚炎の緩和と乾癬の増悪化をもたらす
11:06　○片桐 万由佳[1]，伊藤 直人[1]，南川 夏己[1]，長田 和樹[1]，吉村 昭彦[2]，西山 千春[1]（[1]東理大院先進工生命システム，[2]慶大医）

4D6a10　筋再生過程における酸化ステロール受容体 LXR の新規機能解析
11:17　○髙瀬 飛天[1]，清水 誠[2]，堂前 純子[3]，山内 祥生[1]，佐藤 隆一郎[1]，佐々木 崇[1]（[1]東大院･農生科･応生化，[2]お茶大･基幹研究院，[3]中部大院･応生）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4D6a11　前頭前野における新規食物摂食経験を記憶するエングラムニューロンの発見
11:36　○福山 雄大[1,2]，石川 理絵[1]，山本 航史[1]，喜田 聡[1]（[1]東大院農，[2]学振特別研究員）

4D6a12　時間帯依存的記憶想起制御に対する海馬グリコーゲンホスホリラーゼの役割の解析
11:47　○張 思南，ボーグ ジェームス，喜田 聡 （東大院農）

4D6a13　*Caenorhabditis elegans* の生殖線発達におけるヒストンバリアント H2A.Z の機能解析
11:58　○堀井 菜摘[1]，北川 紗帆[2]，原田 昌彦[1]（[1]東北大院農，[2]金沢大ナノ生命）

D7 会場　午前の部（9:30〜11:58）

生物科学―タンパク質・ペプチド科学-構造，機能，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4D7a01　麹菌ハイドロフォビン RolA の自己組織化経路とその制御機構の解明
9:30　○高橋 尚央[1]，寺内 裕貴[2]，田中 拓未[3]，吉見 啓[4]，藪 浩[5]，阿部 敬悦[1]（[1]東北大院農，[2]山口大中高温研，[3]阪大院工，[4]京大院地環学，[5]東北大AIMR）

4D7a02　耐性機構から紐解く節足動物由来抗菌ペプチドの作用メカニズム
9:41　○下田 蒼[1]，小川 拓也[2]，川本 純[2]，戸部 隆太[1]，栗原 達夫[2]，米山 裕[1]（[1]東北大院農，[2]京大院農）

4D7a03　クライオトラップ法によるセルロース分解酵素 BcsZ の反応中間体構造解析
9:52　○高崎 佑也[1]，藤原 孝彰[1,2]，南後 恵理子[1,2]（[1]東北大院理，[2]東北大多元研）

4D7a04　The anti-COVID-19 function research of lectins from microalgae.
10:03　○ZHENGGUANG WANG （Graduate School of Agricultural ScienceTohoku University.）

4D7a05　プロテオーム解析によるヒ素凝集タンパク質の同定
10:14　○河合 野間 繁子[1]，大塚 康児[1]，後藤 千穂[1]，丹羽 達也[2]，田口 英樹[2]，神谷 克政[3]，佐藤 成樹[4]，田中 佑樹[5]，小椋 康光[5]，梅野 太輔[6]（[1]千葉大工，[2]東工大生命理工，[3]神奈川工大，[4]千葉大理，[5]千葉大薬，[6]早大理工）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4D7a06　甲殻類の赤色色素凝集ホルモンのレトロインベルソペプチドの化学合成と機能解析
10:33　○片山 秀和[1]，古川 雄裕[2]，竹内 梨乃[2]，筒井 直昭[2]，山根 史裕[3]，大平 剛[4]（[1]東海大工，[2]三重大院生資，[3]三重栽培セ，[4]神奈川大理）

4D7a07　麹菌 *A. oryzae* の酸性ハイドロフォービン HypG および融合酵素の精製と物性解析
10:44　○増子 綾乃[1,2]，錦見 京樹[1,2]，藤原 里緒[1,2]，中島 春紫[1,2]（[1]明大，[2]農化）

4D7a08　超好熱性サチライシン様プロテアーゼの大量生産系の開発
10:55　○上原 了[1]，西崎 柊登[1]，雨坂 心人[2]，高野 和文[2]，松村 浩由[1]，田中 俊一[2]　([1]立命館大･院生命，[2]京都府大･院生環)

4D7a09　タンパク質性足場 CutA1 を利用したナノバイオ界面における高次構造体の設計と利用
11:06　○今中 洋行，川上 達磨，光成 麻耶，今村 維克　(岡山大環生自科)

4D7a10　サンゴ由来レクチン AML-I の活性制御と多量体化による構造変化の解明
11:17　○高橋 優希，郷田 秀一郎　(創価大院理工)

a11～a12 発表者の接続時間 11:28～11:36

4D7a11　アミロイドベータの線維伸長抑制に関与する分子シャペロン GRP78 ドメインの同定
11:36　○渡邉 和久[1]，迫野 昌文[2]　([1]富山大工，[2]富山大院理工)

4D7a12　ER 内在分子シャペロンと ERp29 の複合体形成に関する検討
11:47　○金 博恩，迫野 昌文　(富山大院理工)

E1 会場　午前の部(9:30～12:20)

微生物―代謝-発酵生理，代謝調節/物質生産-醸造，発酵(一次代謝産物)―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

4E1a01　*Streptomyces coelicolor* A3(2)の抗生物質生産に及ぼすアセトフェノンの影響
9:30　○中島 菜々海[1]，石井 花奈[2]，本間 颯太[1]，伊藤 晋作[1,2]，矢嶋 俊介[1,2]，佐々木 康幸[1,2]　([1]東農大院バイオ，[2]東農大バイオ)

4E1a02　SCO0199 は放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の NO ホメオスタシスを維持する
9:41　○向後 美野里，吉住 友希，渋井 佑生子，本間 颯太，伊藤 晋作，矢嶋 俊介，佐々木 康幸　(東農大院バイオ)

4E1a03　酢酸菌に特徴的な細胞表層酸化代謝が生育に与える効果
9:52　吉冨 宙[1]，平田 花織[1]，○片岡 尚也[1,2]，松下 一信[1,2]，薬師 寿治[1,2]　([1]山口大･院創成科，[2]山口大･中高温微セ)

4E1a04　*Acetobacter pasteurianus* の C3 化合物代謝におけるコハク酸：アセチル CoA CoA 転移酵素(AarC)の役割
10:03　村上 果穂[1]，片岡 尚也[1,2]，松下 一信[1,2]，松谷 峰之介[3]，○薬師 寿治[1,2]　([1]山口大･院創成科学，[2]山口大･中高温微研セ，[3]東京農大･ゲノム)

4E1a05　発酵細菌 *Pelosinus* sp. IPA-1 株がヒ素存在下で発現するタンパク質の網羅的解析
10:14　○松尾 晏佳[1]，山村 茂樹[2]，黒田 真史[3]，天知 誠吾[4]　([1]千葉大園芸，[2]国環研，[3]常葉大社会環境，[4]千葉大院園芸)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4E1a06　味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. における接合性 a 特異的発現機構の解析
10:33　○小出 琴理，尾形 智夫　(前工大院･生物工学専攻)

4E1a07　味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の転写因子 Ste12 の天然変性領域の解析
10:44　○木村 和佳奈，尾形 智夫　(前工大院･生物工学専攻)

4E1a08　高塩条件が味噌・醤油酵母の接合に与える影響について
10:55　○須藤 美羽，藤井 聖愛，瀬戸 菜々子，尾形 智夫　(前工大･生物工)

4E1a09　清酒における真性火落菌の迅速な定量法の開発と火落ちリスクの評価に関する検討
11:06　○高橋 正之，森川 佳奈，赤尾 健　(酒総研)

4E1a10　麹菌ゲノム編集育種用マーカーの開発
11:17　○織田 健[1]，上田 佳佑[1,2]，島本 和美[1]，林 梨咲[1]，赤尾 健[1,2]　([1]酒総研，[2]広大院統合生命)

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

4E1a11　Production of glyceric acid using engineered Escherichia coli
11:36　○Sarah Abdelnaser，Long Bui Hoang Dang，Yuji Aso　(Kyoto institute of technology)

4E1a12　ナフタレンボロン酸を用いた培養液からのグリセリン酸の反応抽出
11:47　○青木 啓太朗，リソ リカルド，麻生 裕司　(京工繊大院･バイオベース)

4E1a13　フォトクリック反応とフルオラスタグ法を用いたイタコン酸類縁体生産菌の迅速分離
11:58　○數土 綾乃，片岡 親良，麻生 祐司　(京工繊大院･バイオベース)

4E1a14　タルク添加によるヒドロキシヘキシルイタコン酸の発酵生産性向上
12:09　○麻生 祐司，片岡 親良，數土 綾乃　(京工繊大院･バイオベース)

E2 会場　午前の部(9:30～12:20)

微生物―細胞-細胞応答，ストレス応答，情報伝達，細胞外膜小胞―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

4E2a01　出芽酵母 TORC1 の上流因子 SEACAT と相互作用するタンパク質の同定
9:30　○市川 宙[1]，芝田 篤史[1]，加藤 祐介[1]，三岡 哲生[1]，井野 洋子[2]，木村 弥生[2]，阿部 文快[1]　([1]青山学院大･理工，[2]横浜市大･先端研)

4E2a02　*Saccharomyces cerevisiae* プロテインキナーゼ C の HR1 ドメインの機能解析
9:41　○井澗 和也[1]，野村 亘[1,2]，井上 善晴[1]　([1]京大院農，[2]京大･生理化学研究ユニット)

4E2a03　グルタチオンは分裂酵母の栄養制御に関わる細胞間コミュニケーション分子である
9:52　○吉住 僚太朗[1,2]，三浦 俊一[1]，松山 晃久[1,2]，八代田 陽子[2]，吉田 稔[1,2,3]，西村 慎一[1,3,4]　([1]東大院･農，[2]理研CSRS，[3]東大･微生物連携機構，[4]広島大院･統合生命)

4E2a04　マクロファージにおけるアラキドン酸代謝物 PGE_2 を介した酸化ステロール産生のフィードバック調節機構
10:03　○西村 瑞希[1]，齋藤 穂高[1]，落合 翔[2]，原 俊太郎[2]，佐藤 隆一郎[1]，山内 祥生[1]　([1]東大院･農生科･応生化，[2]昭和大薬)

4E2a05　分裂酵母の核肥大化メカニズムの解析
10:14　○久米 一規[1]，Nurse Paul[2]　([1]広島大学，[2]フランシスクリック研究所)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4E2a06　出芽酵母の *S*-アデノシルホモシステインによる寿命延長機構の解析
10:33　○吉田 未来[1]，益村 晃司[2]，古原 優希[2]，小川 貴史[2]，水沼 正樹[2]　([1]広島大工，[2]広島大院統合生命)

4E2a07　*S*-アデノシルホモシステインによる酸化ストレス耐性機構の解析
10:44　○金地 美由子[1]，小川 貴史[2]，益村 晃司[2]，水沼 正樹[2]　([1]広島大工，[2]広島大院統合生命)

4E2a08　Aspergillus 属糸状菌における異種タンパク質生産に対する応答
10:55　○野口 絵理奈[1]，三澤 恒汰[2]，張 斯来[2]，五味 勝也[2]，新谷 尚弘[2]　([1]東北大農，[2]東北大院農)

4E2a09　麹菌 *Aspergillus oryzae* の同株のコロニー間で生じる増殖抑制の制御メカニズムの解明
11:06　○浜中 祐弥[1]，片山 琢也[1,2]，黒田 裕樹[3]，丸山 潤一[1,2]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]東大･微生物連携機構，[3]慶應大･環境情報)

4E2a10　糸状菌間相互作用に関与する *Trichoderma* 属の揮発性化合物（VOCs）の解析
11:17　○中村 洸[1]，浦山 俊一[2,3]，萩原 大祐[2,3]　([1]筑波大･生命農学，[2]筑波大･生命環境系，[3]筑波大･MiCS)

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

4E2a11　*Aspergillus nidulans* における 2 つの遺伝子クラスターを介した NO ストレス耐性機構の機能解明
11:36　○進士 恭誠，天久 まどか，桝尾 俊介，高谷 直樹　(筑波大･生命環境/ MiCS)
4E2a12　*Aspergillus* 属糸状菌における糖アナログによるアミラーゼ生産誘導の差異
11:47　○沼本 穂[1]，森山 貴博[2]，田邉 理子[2]，寄立 麻琴[2]，平井 剛[2]，加藤 直樹[1]　([1]摂大農，[2]九大院薬)
4E2a13　ST 合剤を用いた大腸菌の二剤併用薬剤耐性進化実験
11:58　○後藤 琉[1]，小谷 葉月[2]，吹谷 智[1]，古澤 力[2,3]，前田 智也[1,2]　([1]北大院農，[2]理研，[3]東大院理)
4E2a14　他の腸内細菌存在下における大腸菌の薬剤耐性進化実験
12:09　○永野 有佳理[1]，小谷 葉月[2]，吹谷 智[1]，古澤 力[2,3]，前田 智也[1,2]　([1]北大院農，[2]理研，[3]東大院理)

E3 会場　午前の部（9:30～12:20）

有機化学，天然物化学―生合成―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

4E3a01　フタホシコオロギの ELOVL の同定と機能解析
9:30　○寺坂 優里，永田 晋治　(東大院新領域)
4E3a02　エクダイソン生合成候補中間体の脱皮活性評価
9:41　○小野 肇[1]，船橋 智輝[1]，藤永 大輝[2]，齊藤 惇基[1]，片岡 宏誌[2]　([1]京大院農，[2]東大院新領域)
4E3a03　ハロ酸デハロゲナーゼ様フォスファターゼと融合したバクテリア由来テルペン環化酵素の構造的洞察
9:52　○藤山 敬介，髙木 海，VO Nhu Ngoc Quynh，森田 直子，高橋 俊二　(理研CSRS)
4E3a04　Iron-sulfur protein catalyzed [4+2] cycloadditions in verticilactam biosynthesis
10:03　○Yu ZHENG[1]，Katsuyuki Sakai[1]，Kohei Watanabe[2]，Hiroshi Takagi[1]，Yumi Sato-Shiozaki[1]，Yuko Misumi[3]，Yohei Miyanoiri[3]，Genji Kurisu[3]，Toshihiko Nogawa[1]，Ryo Takita[2,4]，Shunji Takahashi[1]　([1]RIKEN CSRS，[2]The Univ. of Tokyo，[3]Osaka Univ.，[4]Univ. of Shizuoka)
4E3a05　維管束植物とは全く異なる進化を遂げた蘚類イソプレン合成酵素の解析
10:14　○川上 哲也[1]，野中 彩智[2]，宮崎 翔[3]，川出 洋[1,2]　([1]東農工大院農，[2]東農工大農，[3]東農工大GIR)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4E3a06　ゲノム比較解析を用いたアゾキシアルケン化合物の生合成機構に関する研究
10:33　○福森 海人[1]，長野 遥[1]，田中 悠[1]，岸本 拓也[2]，國武 博文[2]，荒川 賢治[1,2]　([1]広島大院･統合生命，[2]広島大院･先端研)
4E3a07　放線菌由来 2,3-二置換ブテノライド型シグナル分子 SRB の分子多様性
10:44　○秋元 萌々子[1]，平田 朝陽[1]，藤田 葉月[1]，住吉 美保[2]，大塚 みゆき[3]，松浦 舞紀[3]，手島 愛子[1]，荒川 賢治[1,2]　([1]広島大院･統合生命，[2]広島大院･先端研，[3]玉川大･農)
4E3a08　放線菌由来の新規トリプトファンプレニルトランスフェラーゼの発見
10:55　○辻 瑞紀，薛 飛，師 嘉辰，澄本 慎平，岡田 正弘　(神奈川大院工)
4E3a09　The structural-guided studies for Amaryllidaceae O-methyltransferases
11:06　○Sawyuyu Hnin，Yu Nakashima，Takeshi Kodama，Hiroyuki Morita　(Univ. of Toyama)
4E3a10　祖先型設計法を活用したモジュール型ポリケタイド合成酵素の構造解析
11:17　○千菅 太一[1]，滝浪 翔太[1]，廖 増威[2]，中野 祥吾[1]，伊藤 創平[1]，工藤 史貴[3]，江口 正[3]，宮永 顕正[2,4]　([1]静県大院･薬食生命，[2]東大院農生科，[3]東工大理，[4]東大CRIIM)

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

4E3a11　非リボソームペプチオ環化酵素を用いた head-to-side chain 型環状ペプチドの化学－酵素合成
11:36　小林 雅和，○松田 研一，脇本 敏幸　(北大院薬)
4E3a12　カイトセファリンの生合成研究
11:47　○前野 優香理[1]，齋藤 直也[1]，白石 太郎[1,2]，小川 哲弘[1,2]，丸山 潤一[1,2]，新家 一男[3]，葛山 智久[1,2]　([1]東大院農，[2]東大･微生物連携機構，[3]産総研)
4E3a13　Studies on terpene synthases from cyanobacteria
11:58　○JIAYI YU[1]，TARO SHIRAISHI[1,2]，AYAKO YOSHIDA[1,2]，TOMOHISA KUZUYAMA[1,2]　([1]GSALS，Dept. Biotechnol.，Univ. Tokyo，[2]CRIIM，Univ. Tokyo)
4E3a14　Studies on the biosynthesis of phenazine derivatives from Streptomyces purpeofuscus and S. prunicolor
12:09　○Dan XIA[1]，Qi LUO[1]，Taro SHIRAISHI[1,2]，Shin-ya Kazuo[3]，Tomohisa KUZUYAMA[1,2]　([1]GSALS，Dept. Biotechnol.，Univ. Tokyo，[2]CRIIM，Univ. Tokyo，[3]AIST)

E4 会場　午前の部（9:30～11:28）

微生物―細胞･構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

4E4a01　ESCRT はメタノール酵母 *Komagataella phaffii* のミクロペキソファジーに必要である
9:30　○石垣 颯斗[1]，白石 晃將[1]，光部 雅俊[1]，奥 公秀[2]，阪井 康能[1]　([1]京大院･農，[2]京都先端科学大バイオ環境)
4E4a02　麹菌のヌクレオファジーでは核全体が液胞を介して分解され，AoAtg11 はその効率化に関与する
9:41　○橋本 真宇[1]，山口 誉登[1]，木村 聡[2]，有岡 学[1,3]　([1]東大院農･応生工，[2]東大院農･技術基盤センター，[3]東大･微生物連携機構)
4E4a03　麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連
9:52　○井谷 綾花[1]，一ノ瀬 恵[1]，細田 柊志[1]，高谷 直樹[1]，織田 健[2]，山下 秀行[3]，酒井 香奈江[4]，田中 拓未[4]，楠本 憲一[4]，竹下 典男[1]　([1]筑波大･MiCS，[2]酒類研，[3]樋口松之助商店，[4]阪大院･工)
4E4a04　新規因子 *KpATG14* はメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* のペキソファジーに必要である
10:03　○有馬 ゆみ[1]，中村 元春[1]，中辻 拓実[1]，奥 公秀[2]，白石 晃將[1]，阪井 康能[1]　([1]京大院農，[2]京都先端科学大バイオ環境)
4E4a05　糸状菌 *Aspergillus nidulans* における PE 合成酵素の生理的機能の解析
10:14　○楊 淳児[1]，岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]東大･微生物連携機構)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4E4a06　糸状菌の胞子発芽を特徴付ける脂質成分の探索
10:33　○岩間 亮[1,2]，岡橋 伸幸[3]，松田 史生[3]，堀内 裕之[1,2]　([1]東大院･農生科･応生工，[2]東大･微生物連携，[3]阪大･院情報)

4E4a07　糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の発見および生理機能解析
10:44　○横川 大祐[1]，今井 誠[1]，立松 俊祐[1]，佐賀 裕亮[1]，Frederic Fischer[2]，Hubert D. Becker[2]，中島 春紫[1]，久城 哲夫[1]（[1]明治大院農，[2]ストラスブール大）

4E4a08　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるコアオートファジータンパク質 Atg8 と相互作用するタンパク質の機能解析
10:55　○坂根 巧，武田 陽一，菊間 隆志　（立命大院生命）

4E4a09　単核糸状菌イネいもち病菌における部分的な多核化
11:06　○北 遥生，宮本 雅史，荒添 貴之，鎌倉 高志　（東理大院創域理工）

4E4a10　ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞およびマウス筋芽細胞を用いた筋細胞成熟化誘導法の開発
11:17　○牧野 巧[1]，櫻井 英俊[2]，佐藤 隆一郎[1]，山内 祥生[1]　（[1]東大院農，[2]京大iPS細胞研究所）

E5 会場　午前の部（9:30〜12:20）

微生物―細胞-栄養，生育，増殖，培養/物質生産-微生物変換，酵素反応，機能性高分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4E5a01　ゲルマイクロドロップレットを用いた油糧微生物の超高効率な変異育種法の開発
9:30　○中村 彰宏[1]，田中 裕真[2]，鈴木 義之[1]，丸田 航大[1]，志田 洋介[1]，小笠原 渉[1]　（[1]長岡技科大･工，[2]筑波大･数理物質）

4E5a02　油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* における生育・油脂生産に関与する因子の解析
9:41　○司東 来珠[1]，丸田 航大[1]，田中 裕真[2]，中村 彰宏[1]，鈴木 義之[1]，森 一樹[3]，佐藤 里佳子[4]，田代 康介[3]，志田 洋介[1]，高久 洋暁[4]，小笠原 渉[1]　（[1]長岡技科大･工，[2]筑波大･数理物質，[3]九大･農，[4]新潟薬科大･応生命）

4E5a03　植物葉圏からの酵母の単離・同定と生物間相互作用の解析
9:52　○重田 佳奈，白石 晃將，由里本 博也，阪井 康能　（京大院農）

4E5a04　出芽酵母の SAM 輸送に関与すると予想される Ssg1 による寿命延長メカニズム
10:03　○川嵜 紗矢佳[1]，益村 晃司[2]，金井 宗良[3]，米山 香織[4]，河田 美幸[4]，関藤 孝之[4]，小川 貴史[2]，水沼 正樹[2]　（[1]広島大工，[2]広島大院統合生命，[3]酒総研，[4]愛媛大農）

4E5a05　*S*-アデノシルホモシステイン加水分解酵素が関与する寿命制御機構の解析
10:14　○益村 晃司，山下 陽彩，小川 貴史，水沼 正樹　（広島大院統合生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4E5a06　培地の鉄可用性が関わる酵母の栄養飢餓適応戦略
10:33　○松浦 彰[1]，岸 裕子[2]　（[1]千葉大院理，[2]千葉大院融合理工）

4E5a07　分裂酵母の一生を見る
10:44　○中岡 秀憲　（京大院生命）

4E5a08　出芽酵母におけるキヌレン酸によるロイシン要求量の増加
10:55　○大橋 一登　（群大生調研）

4E5a09　タケチップを含む培地で培養した *Ganoderma sinense* およびマンネンタケ（*Ganoderma lucidum*）が有する免疫チェックポイント阻害活性および抗アレルギー活性
11:06　○小堀 一[1,2]，安間 太郎[3]，戸田 雅明[3]，ダレッサンドロガバザ コリナ[3]，ガバザ エステバン[3]　（[1]岩出菌学研究所，[2]静大キノコ科学研究所，[3]三重大医）

4E5a10　栄養応答シグナル伝達因子 mTORC1 による RNA スプライシングを介した成長・寿命制御機構
11:17　○小川 貴史[1]，BLACKWELL T. Keith[2]，水沼 正樹[1]（[1]広大院統合生命，[2]ハーバード医大院ジョスリン糖尿病センター）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:28〜11:36

4E5a11　ヤギ腸内細菌叢を用いた *C*-配糖体 mangiferin からアグリコン norathyriol への微生物変換
11:36　○宇賀 悠人[1]，HASANAH Uswatun[1]，三木 香澄[1]，栢木 宏之[2]，川上 秀昭[2]，西谷 洋輔[2]，桑原 浩誠[2]，仁戸田 照彦[1]，神崎 浩[1]　（[1]岡山大院･環境生命，[2]丸善製薬･総合研究所）

4E5a12　水素添加反応及び酢酸菌を用いた各種炭糖七炭糖生産
11:47　○綿貫 花菜[1]，高松 陽太[1]，望月 進[1,2]，花木 祐輔[1,2]，吉田 裕美[2,3]，神鳥 成弘[2,3]，何森 健[1,2]，吉原 明秀[1,2]　（[1]香川大院農，[2]香川大国際希少糖，[3]香川大医）

4E5a13　*Thermus thermophilus* HB8 由来トランスアルドラーゼを用いた九炭糖生産
11:58　○三好 恵梨佳[1]，望月 進[1,2]，花木 祐輔[1,2]，神鳥 成弘[2,3]，何森 健[1,2]，吉原 明秀[1,2]　（[1]香川大院農，[2]香川大国際希少糖，[3]香川大医）

4E5a14　*Klebsiella pneumoniae* 40b 由来ポリオールデヒドロゲナーゼと *Lactobacillus rhamnosus* 由来 L-ラムノースイソメラーゼを用いた L-タロース生産
12:09　○山本 菜帆[1]，吉田 裕美[2,3]，倉原 琳[4]，望月 進[1,3]，吉原 明秀[1,3]　（[1]香川大院農，[2]香川大総合生命科学医，[3]香川大国際希少糖，[4]香川大自律機能生理学医）

E6 会場　午前の部（9:30〜12:20）

微生物―細胞-複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:22〜9:30

4E6a01　定量 PCR 解析によるヒト糞便中のデオキシコール酸生成菌の存在量の解明
9:30　○原田 恕[1]，前田 智也[1]，後藤 恭宏[2]，林 哲也[2]，吹谷 智[1]（[1]北大院農，[2]九大院医）

4E6a02　Screening of deoxycholic acid-producing bacteria from human feces
9:41　○Ni Wayan Eka Putri Gayatri KASTAWA, Tomoya MAEDA, Satoru FUKIYA　(Res. Facul. Agr., Hokkaido Univ.)

4E6a03　枯草菌を用いたセグメント細菌ゲノムの機能解析
9:52　○田中 滉起[1]，荻野 竜司[1]，小椋 義俊[2]，桑原 知巳[3]，朝井 計[1]　（[1]東農大･バイオ，[2]久留米大･医･感染医，[3]香川大･医･分子微生物）

4E6a04　定量的 16S rRNA アンプリコン解析法の検証
10:03　中村 圭佑，田代 幸寛，○大城 麦人　（九大院農）

4E6a05　Metagenomic insights for naphthalene-degrading bacteria obtained by droplet-based microfluidics
10:14　○CHONGYANG YANG[1,2], Satoko MATSUKURA[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3], Kazunori OKADA[1], Naohiro NODA[2], Hideaki NOJIRI[1,3]　([1]AgTECH, Grad. Sch. Agri. Life Sci., UTokyo, [2]BRI., AIST, [3]CRIIM, UTokyo)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:33

4E6a06　ゲル充填マイクロウェルアレイデバイスによるナフタレン分解菌群の取得と解析
10:33　○劉 禹忻[1]，楊 重陽[1]，張 詩芸[2]，水口 千穂[1,3]，佐々 文洋[2]，野尻 秀昭[1,3]　（[1]東大院･農生科･AgTECH，[2]九州大･システム情報科学研究院，[3]東大･微生物連携機構）

4E6a07　有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティの再構築
10:44　○手塚 隆博，岸田 なつみ，加藤 広海，岸田 康平，大坪 嘉行，永田 裕二　（東北大院･生命科学）

4E6a08　フロー型アピカル嫌気培養器 SMZ-II を用いた腸上皮細胞の嫌気性腸内細菌に対する応答
10:55　○石川 秀紀[1]，坂本 佳純[1]，後藤 愛那[1]，高橋 実花子[2]，米田 恭子[2]，橋本 豊之[2]，加藤 紀彦[1]，片山 高嶺[1]　([1]京大院生命，[2]島津製作所基盤研)

4E6a09　日本人に特徴的な還元的酢酸生成菌の多様性解析と共培養実験による酢酸生成への寄与
11:06　○山口 啓[1]，山田 千早[1]，加藤 創一郎[2]　([1]明治大･農，[2]産総研･生物プロセス)

4E6a10　嫌気性腸内細菌と腸管上皮細胞の共培養システムの開発
11:17　○土井 かおる[1]，加藤 紀彦[1]，後藤 愛那[1]，阪中 幹祥[1]，小酒井 智也[1]，中島 有登[1]，小西 悠月[1]，山本 英[2]，佐々木 淳[3]，神戸 大朋[1]，片山 高嶺[1]　([1]京大院生命，[2]株式会社東洋製作所，[3]東洋濾紙株式会社)

a11～a14 発表者の接続時間 11:28～11:36

4E6a11　植物葉上共生細菌 *Methylorubrum extorquens* AM1 のメタノールデヒドロゲナーゼアイソザイムに関する研究
11:36　○三井 亮司，高橋 莉史，竹内 赴登，友村 聡美，矢野 嵩典　(岡山理大生命)

4E6a12　微生物間共生とシトクロムオキシダーゼの分布
11:47　○上田 賢志，熊本 康平，向山 陸，馬場 悠史，薄井 拓海，西山 辰也　(日大生資科)

4E6a13　大腸菌による異種ギ酸トランスポーターのギ酸取り込み能の解析検討とその適応
11:58　○矢原 拓弥[1]，高坂 智之[2]　([1]山大院農，[2]山大中高微セ)

4E6a14　海洋生物の体色を構成する水溶性の色素結合タンパク質に関する研究
12:09　○山崎 良介，金子 隆之，高市 真一，川﨑 信治　(東農大院微生物)

E7 会場　午前の部(9:30～11:58)

食品―食品化学-糖質，脂質/食品化学-その他―

a01～a05 発表者の接続時間 9:22～9:30

4E7a01　ヒト嗅覚受容体応答を改善する新規分子シャペロンの発見
9:30　○金子 龍成[1]，尾城 一恵[1]，柏木 貴裕[2]，寺田 育生[2]，星野 邦秀[2]，寺田 祐子[1]，伊藤 圭祐[1]　([1]静岡県大院薬食，[2]高砂香料工業株式会社　研究開発本部)

4E7a02　ヒト嗅覚受容体応答評価システムにおける N 末端 tag の最適化
9:41　○尾城 一恵，勝山 響，金子 龍成，寺田 祐子，伊藤 圭祐　(静岡県立大学)

4E7a03　ヒト嗅覚受容体応答を指標とした畜肉の判別解析
9:52　○高田 こはる，寺田 祐子，伊藤 圭祐　(静岡県大院薬食)

4E7a04　市販プレーンヨーグルトの揮発性化合物による特徴解析
10:03　○齋藤 和子　(株式会社　明治)

4E7a05　*Lactococcus lactis* が有するセリンラセマーゼの酵素局在検討および遺伝子クローニング
10:14　○加藤 陽菜子，庄子 真樹，金内 誠　(宮城大院食産)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:33

4E7a06　液体塩こうじ副産物が有する辛味・旨味作用物質の探索
10:33　○山本 英作[1]，白井 伸生[1]，髙橋 健司[1]，野田 響子[2]，千葉 智[1]　([1]ハナマルキ(株)，[2]お茶の水女子大学)

4E7a07　味噌汁の保温にともなう香気特性の変化とそれに関わる要因成分の解明
10:44　○塩澤 天真[1]，眞鍋 太成[1]，亀山 龍[1]，山田 悠斗[2]，飯島 陽子[1]　([1]工学院大先進工，[2]神奈川工科大健康医療)

4E7a08　味噌の調理学的特性
10:55　○有住 茉莉，金内 誠　(宮城大院食産)

4E7a09　Malabaricone 類による 5-リポキシゲナーゼ活性阻害
11:06　○川上 祐生，髙原 明日香，岩岡 裕二，戸田 圭祐，津嘉山 泉，山本 登志子，伊東 秀之，高橋 吉孝　(岡山県大保福)

4E7a10　食パンの膨化に影響を及ぼすモリンガの葉含有成分
11:17　○黒須 友里愛，郡山 貴子，細谷 孝博　(東洋大院食環境)

a11～a12 発表者の接続時間 11:28～11:36

4E7a11　L-dopa の自動酸化を制御する食品由来成分の探索
11:36　○小林 諒馬，郡山 貴子，細谷 孝博　(東洋大食環境)

4E7a12　アルギン酸の M/G 比算出のための加水分解条件の検討
11:47　○稲葉 亮成[1]，関 憧平[1]，石島 大義[1]，柳岡 直樹[2]，垣田 浩孝[2]　([1]日大文理，[2]日大院総合基)

講演番号：2B1p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 B1 会場

乳酸を利用した魚醤製造法に関する研究

Study on the Production Method of a Fish Sauce using Lactic acid

○正田 直輝、辰野 竜平、古下 学、福田 翼（水産機構水大校）
○ Naoki SHOUDA, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA, Tsubasa FUKUDA (National Fisheries Univ.)

近年、低価格水産物の高付加価値化を目的とし、様々な水産物を利用した魚醤が製造されている。水産物を利用した魚醤は、耐塩性乳酸菌である *Tetragenococcus halophilus* などのヒスタミン産生菌によりヒスタミンが蓄積する事が知られている。我々は、これまでの研究成果より、*Tetragenococcus halophilus* の代替として乳酸を利用する事で魚味噌や魚醤製造が可能である事を明らかとしてきた。そこで本研究では、低利用水産物であるツノナシオキアミ（*Euphausia pacifica*）を利用した魚醤を製造し、乳酸を利用した魚醤製造法の有用性を検討した。

ツノナシオキアミは、三陸沖で漁獲された冷凍原料を利用した。ツノナシオキアミ魚醤は、ツノナシオキアミ（以下、生原料は生原料利用条件、ボイル原料はボイル原料利用条件と表記）、麹、食塩および水を用いた。また、発酵スターターは *Tetaragenococcus halophilus* および *Zygosaccharomyces rouxii* を用いた。*Tetaragenococcus halophilus* の代替として乳酸を利用する場合は、生原料とした（以下、乳酸添加条件と表記）。

生原料利用条件およびボイル原料利用条件の細菌数および乳酸菌数は、発酵 1 週間目には 10^2-10^4 CFU/g 程度であったが、発酵 2 週間目以降は 10^1 CFU/g 以下で推移していた。一方、乳酸添加条件の細菌数および乳酸菌数は、発酵期間中 10^1 CFU/g 以下で推移していた。生原料利用条件、ボイル原料利用条件および乳酸添加条件の酵母数は、いずれも発酵 2 週間目に 10^4 CFU/g 程度に到達したが、発酵 4 週間目以降は検出限界以下となった。発酵 4 週間目における生原料利用条件およびボイル原料利用条件のヒスタミン量は、それぞれ 500 ppm および 300 ppm 程度であった。一方、乳酸添加条件のヒスタミン量は、検出限界以下であった。

To establish the production technology of North pacific krill fish sauce with non-histamine production, we took on that research on a production method of fish sauce using lactic acid instead of lactic acid bacteria. The bacterial counts of the fish sauce using lactic acid were lower than the fish sauce using lactic acid bacteria during fermentation period. However, the yeast counts on the fish sauce using lactic acid and lactic acid bacteria were about the same. The amount of histamine on fish sauce using lactic acid was lower than fish sauce using lactic acid bacteria.

fish sauce, fermentation, histamine

講演番号：2B1p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 B1 会場

大豆を利用したカツオ味噌の製造条件に関する研究

Studies on the Processing Condition of Fermented Fish Paste made from Oriental bonito and Soybean

○福田 翼、矢倉 陽平、辰野 竜平、古下 学（水産機構水大校）
○Tsubasa FUKUDA, Youhei YAGURA, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA (National Fisheries Univ.)

カツオ味噌は、カツオ生肉、大豆、麹および食塩を用いた醸造なめ味噌である。近年、低利用水産物の高付加価値化を目的とし、水産物を利用した醸造なめ味噌に関する研究が行われている。水産物を利用した醸造なめ味噌は、大豆の代替として水産物を利用する事が多く、大豆利用は珍しい。そこで、カツオ味噌における大豆および麹の添加効果を検討した。

カツオ味噌製造は、大日本産業事蹟を参考にして行った。製造条件は、カツオ（以下、カツオ条件）、カツオおよび大豆（以下、カツオ＋大豆条件）、カツオおよび麹（以下、カツオ＋麹条件）、カツオ、大豆および麹（以下、カツオ＋大豆＋麹条件）とした。発酵期間は 140 日とした。

発酵期間中のカツオ条件、カツオ+大豆条件およびカツオ+麹条件の細菌数は、10^2 CFU/g 以下で推移していた。カツオ+麹条件の細菌数は、発酵 10 日目に 10^3 CFU/g 程度まで増加したが、その後は時間経過と供に減少し、発酵 60 日目以降は 10^2 CFU/g 以下で推移していた。カツオ+麹条件およびカツオ+大豆+麹条件の酵母数は、それぞれ発酵 60 日目および 100 日目に 10^4 CFU/g 程度まで増加していた。TCA 可溶性窒素量は、いずれの製造条件においても、時間経過と供に増加した。発酵 40 日目の TCA 可溶性窒素量は、カツオ+麹条件、カツオ+大豆+麹条件、カツオ条件、カツオ+大豆条件の順に高かった。発酵 40 日目の遊離アミノ酸量は、TCA 可溶性窒素量と同様、カツオ+麹条件、カツオ+大豆+麹条件、カツオ条件、カツオ+大豆条件の順に高かった。

Katsuo miso was a preserved food of oriental bonito and soybeans in Japan at Edo period. During the fermentation period, the bacterial counts under the oriental bonito, oriental bonito + soybean, and oriental bonito + *koji* conditions has changed less than 10^2 CFU/g. The bacterial counts on the oriental bonito + *koji* condition increased to about 10^3 CFU/g at the 10th day of fermentation, but then decreased over time and has changed less than 10^2 CFU/g after the 60th day of fermentation. The yeast counts of the oriental bonito + *koji* condition and the oriental bonito + soybean + koji condition increased to about 10^4 CFU/g on the 60th and 80th day of fermentation, respectively. The amount of TCA-soluble nitrogen increased over time under all production conditions. The amount of TCA-soluble nitrogen on the 40th day of fermentation was highest in the following order: oriental bonito + *koji* condition, oriental bonito + soybean + *koji* condition, bonito condition, and bonito + soybean condition.

traditional food, fermented fish pasete, food culture

講演番号：2B1p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 B1 会場

マイクロ波加熱によるガラクトースの異性化に及ぼす卵殻添加の影響

Effect of eggshell addition on isomerization of galactose by microwave heating

○二俣 真[1]、尾西 佑一朗[1]、安達 修二[2]、Khuwijitjaru Pramote[3]、渡邉 義之[4]、小林 敬[1]、谷 史人[1] ([1]京大農院、[2]京都先端大、[3]Silpakorn Univ.、[4]大阪公立大農)
○Shin Futamata[1], Yuichiro Onishi[1], Shuji Adachi[2], Pramote Khuwijitjaru[3], Yoshiyuki Watanabe[4], Takashi Kobayashi[1], Fumito Tani[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Adv. Sci., [3]Silpakorn Univ., [4]Osaka Metro. Univ.)

【背景】タガトースは希少糖の一つであり、種々の生理活性や機能が報告されているが、高効率の生産法は未確立である。ガラクトースを亜臨界水処理するとアルカリ異性化によりタガトースなどの希少糖が生成する。しかし、純水中での処理では副生成物である有機酸が多く生成するため、希少糖の収率は著しく低い。また、従来の亜臨界水処理には長時間を要していた。そこで、本研究では炭酸カルシウムを主成分とする卵殻粉末を中和剤として用い、短時間で反応を実施できるマイクロ波加熱によりタガトース収率の改善を目指した。また、中和によるカルシウムイオンの溶出についても検討した。

【方法と結果】60 mL 容の耐圧容器中にガラクトース、卵殻粉末および水を入れ、マイクロ波加熱により亜臨界水処理した。原料懸濁液を容器に入れ、密閉状態で出力 200 W または 600 W で 30–270 s 加熱した。卵殻を加えるとタガトースに加え、タロース、ソルボースも生成した。また、純水中と比べて、卵殻を加えるとタガトース収率は顕著に上昇した。200 W の処理では 600 W の場合よりもタガトース選択率が高く、75%程度で推移した。低出力での加熱では、有機酸やケトンなどの副生成物の生成が抑制され、反応中の pH はより高い値で推移した。また、200 W の処理では、得られた反応液の着色が抑制され、HMF や関連化合物の生成も抑制されたと考えられる。

【Background】Efficient production methods for tagatose, one of the rare sugars, has not yet been established. When galactose is treated in subcritical water, tagatose is produced by alkaline isomerization. However, treatment in pure water produces organic acids as by-products, resulting in the low yield of tagatose. In addition, subcritical water treatment requires longer time. In this study, we aimed to improve the tagatose productivity by microwave heating of galactose solution in the presence of eggshell as a neutralizer.

【Methods and Results】Galactose, eggshell powder and water were placed in a 60-mL vessel, and the mixture was subjected to microwave heating. The mixture was heated at 200 W or 600 W for 30–270 s. The addition of eggshell significantly increased the yields of tagatose, talose and sorbose. Heating at 200 W showed higher tagatose selectivity (75%) than at 600 W. Heating at lower microwave power suppressed the formation of by-products such as organic acids and the pH dropped during the reaction.

Rare sugar, Eggshell, Microwave heating

講演番号：2B1p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 B1 会場

フリージング条件がアイスクリームに配合したビフィズス菌の生残性に及ぼす影響
The effect of different freezing condition levels on Bifidobacterium survival in ice cream
○島田 昌幸、井上 恵介、元吉 智美（森永乳業株式会社 研究本部 食品開発研究所）
○Masayuki SHIMADA, Keisuke INOUE, Tomomi MOTOYOSHI (Food Research & Development Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】近年の健康志向の高まりを受け、プロバイオティクスに関する腸内環境改善効果が数多く報告されている。しかし、代表的なプロバイオティクスの一つであるビフィズス菌は外部環境変化に影響を受け易く、その利用は発酵乳やサプリメント等に限られている。アイスクリームは凍結保存を前提とし、当該食品に配合されたビフィズス菌は保存中の生残性が高い。一方、その製造の過程において、加熱や剪断等の様々なストレスで顕著に菌数が低下することから、食品産業上の課題とされ、その要因は明らかになっていない。そこで本研究では、ビフィズス菌を利用したアイスクリームの効率的製造工程の構築を目的にアイスクリーム製造に特徴的な工程であるフリージングに注目し、フリージング条件と菌の生残性との関係を検証した。
【方法】アイスクリームミックス 100g 当り、ビフィズス菌（*Bifidobacterium breve* MCC1274 または *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536）が約 600 億個となるように添加した。連続式フリーザーはオーバーラン、ダッシャー回転スピード、フリージング温度の 3 要素を変数とし、それぞれを変化させたときの 2 菌種のいずれかを配合したアイスクリーム中の生残性に与える影響を検証した。また、電子顕微鏡によるアイスクリーム組織解析にて氷結晶や気泡形成へ与えた影響や生残性との関係を検証した。
【結果】組織解析では有意な変化を認めなかったが、2 菌種共に高いフリージング温度で有意に高い生残性を確認し、温度が生残性に関わる主要な要素であることが示唆された。
【Objective】The increased interest in foods which improve human health has led to the need for studying probiotics, including Bifidobacterium to benefit gut. Ice cream could be one of the most suitable carrier delivering Bifidobacterium to consumers, but this microorganism appears to be unstable in freezing process because of mechanical stress. This study aims to investigate the effect of different freezing condition levels on Bifidobacterium survival in ice cream.
【Method】The two types of ice cream supplemented with either *Bifidobacterium breve* MCC1274 or *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 were tested. Each of the freezing condition levels (overrun, dasher speed and freezing temperature) was regulated, and Bifidobacterium survival in the ice creams was evaluated.
【Result】It suggests freezing temperature could influence Bifidobacterium survival in ice cream.

bifidobacterium survival, ice cream, freezing process

発表責任者：島田昌幸（m-shimada@morinagamilk.co.jp）

講演番号：2B1p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 B1 会場

モリンガ種子の麹菌発酵産物、モリンガ麹の機能性成分の分析
Analysis of functional ingredients of "*Moringa* koji," a fermented *Moringa oleifera* seeds by *Aspergillus* species.
○関口 愛里彩[1]、上野 義栄[2]、青木 秀之[3]、尾山 廣[1] ([1]摂南大学、[2]京都女子大学・家政学部、[3]池田食研)
○Arisa Sekiguchi[1], Yoshie Ueno[2], Hideyuki Aoki[3], Hiroshi Oyama[1] ([1]Setsunan University, [2]Kyoto Women’s University, [3]Ikeda Food Research Co., Ltd.)

【背景・目的】モリンガ(*Moringa oleifera*)は、熱帯・亜熱帯地域に分布する樹木であり、これらの地域では葉、莢、種子が食用として使用されている。我々は、国連世界食糧計画に採用されているモリンガに注目し、タンパク質や脂質が豊富に含まれる種子の消費拡大を目的に、*Rhizopus* 属による発酵産物(モリンガテンペ)を開発した。本研究では、食品用の種麹、*Aspergillus sojae* (AS)、*A. oryzae* (AO)、*A. kawachii* (AK)で種子を発酵し、各発酵産物(モリンガ麹)の機能性成分を分析した。
【方法・結果・考察】アミノ酸分析の結果、モリンガ麹 AS は、未発酵種子に比べて L-Glu、L-Ala、L-Thr、L-His などが増加しており、総遊離アミノ酸含有量も約 2 倍に増加した。モリンガ麹 AS とモリンガ麹 AO のアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性(IC50 値)は、未発酵種子に比べて約 1/4、モリンガ麹 AK では約 1/3 と低くなった。また、キチン結合タンパク質は、全てのモリンガ麹に残存していた。これらの結果より、モリンガ麹 AS は他の 2 種のモリンガ麹よりも遊離アミノ酸含有量が高く、ACE 阻害活性も強く、キチン結合活性も保持されており、QOL の向上、血圧降下作用、抗真菌作用などの機能性成分を豊富に含む新たな機能性発酵食品となる可能性が示唆された。

Moringa oleifera is a tree distributed in tropical and subtropical regions, such as Asian countries and the South Sea Islands, and its leaves, pods, and seeds are used as food in these areas. We have developed *Moringa* tempe, a *Rhizopus* fermentation product, with the aim of expanding the consumption of seeds rich in proteins and lipids. In this study, *Moringa* seeds were fermented with *Aspergillus sojae* (AS), *A. oryzae* (AO), and *A. kawachii* (AK), and the functional ingredients of each product were analyzed. *Moringa* koji AS has L-Glu, L-Ala, L-Thr, and L-His contents higher than unfermented seeds, and its total free amino acid content were also increased by about twice. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities (IC50 values) of *Moringa* koji AS and *Moringa* koji AO was about 1/4 that of unfermented seeds. Further, chitin-binding proteins in each product were remained. Since *Moringa* koji AS has a higher free amino acid content, stronger ACE inhibitory activity than other two *Moringa* koji, and remained chitin-binding activity, it is expected that *Moringa* koji AS has the possibility of creating a new fermented food rich in functional ingredients with QOL improvement, lowered blood pressure, and antifungal effects.

Moringa oleifera seed, *Aspergillus*, *fermentation*

講演番号：2B1p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 B1 会場

乳酸菌と食品酵素に及ぼす高圧処理の影響
Effects of high-pressure processing on the viability of lactic acid bacteria and the activity of food enzymes
○堀江 暁[1]、堀 沙織里[2]、井口 晃徳[2]、重松 亨[2]、森下 あい子[1]、加藤 優[1] ([1]キリン HD・飲料未来研、[2]新潟薬科大・応生科)
○Akira HORIE[1], Saori HORI[2], Akinori IGUCHI[2], Toru SHIGEMATSU[2], Aiko MORISHITA[1], Masaru KATO[1] ([1]Kirin Holdings Co., Ltd., [2]NUPMLS)

【背景・目的】飲料やその原材料の微生物制御手法としては一般に高温加熱殺菌が用いられるが、加熱によって変性・変質してしまう素材に対しては、十分な殺菌強度と特性の維持を両立できないことが課題となる。そこで高圧処理による微生物不活性化（殺菌）効果に着目し、このような食品素材に対する影響を評価することとした。
【方法・結果】種々の微生物の生育への影響を比較したところ、乳酸菌 *Lactobacillus lindneri* DSM 20690 は実験室酵母等と異なり、常温で 500 MPa, 10 min.の高圧処理に対する耐性を示した。この菌株を指標として温度との組合せによる効果を検討したところ、40° C 以上の加温条件下では高圧処理によって生菌数が顕著に減少することを見出した。さらに、食品用酵素剤に及ぼす影響を評価した結果、複数の酵素活性が同様の高圧・加温処理によって低下しないことを確認した。
【考察・展望】酵素剤等の食品素材に対する将来的な微生物制御技術として、比較的穏やかな加温条件下で高圧処理を行うことの有用性を見出した。今後は、微生物の圧力耐性に寄与する因子や、圧力と温度の相互作用が食品素材に与える影響のメカニズムにも興味が持たれる。

[Background and Objective] In the field of foods and beverages, thermal sterilization is commonly used as a microbial control method for beverages and their raw materials. However, for food materials easy to be denatured and/or deteriorate at high temperatures, it would be important to achieve both sufficient sterilization strength and retaining their characteristics. Therefore, we evaluated the effect of high-pressure processing (HPP) with moderately high temperatures on microbial inactivation and its impact on such food materials.
[Methods and Results] By comparing the viabilities of several microorganisms, *Lactobacillus lindneri* DSM 20690 showed a high tolerance to HPP (500 MPa, 10 min) at ambient temperature. HPP with elevated temperatures revealed that the viable cell counts of this strain significantly decreased by HPP at temperatures above 40°C. Furthermore, under the HPP conditions, certain food enzymes remained their activities.
[Perspectives] We discovered the usefulness of HPP with relatively moderate temperature as a future microbial control method, preventing denaturation of food materials such as enzymes.

High pressure processing, Food enzyme

講演番号：2B1p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 B1 会場

イソアミラーゼを用いた新規プラントベースヨーグルトの開発

Development of new plant-based yogurt using the isoamylase

○小笠原 早織、篠田 美咲、守谷 崇 (合同酒精株式会社)
○SAORI OGASAWARA, MISAKI SHINODA, TAKASHI MORIYA (GODO SHUSEI CO., LTD.)

拡大が進むプラントベースミルク市場の中で、大豆やオーツ、アーモンドに続く原料として、味にクセがなく、葉酸含量の多いひよこ豆が注目されている。しかし、でんぷんを多く含むため、加熱すると糊化してしまい、ミルクやヨーグルトの作製が困難であった。そこで、本研究では *Flavobacterium odoratum* により生産されるイソアミラーゼ製剤「GODO-FIA」を用い、ひよこ豆ミルクヨーグルトの作製方法の開発、ならびに作製したヨーグルトの各種性質の分析を行った。

ひよこ豆を一晩水に浸漬し、翌日水を入れ替えて破砕後、ろ過した。ろ液を煮沸後、43℃に保温し、乳酸菌、ビフィズス菌、イソアミラーゼ、または対照としてアミラーゼを添加して発酵させた。その結果、酵素無添加区ではダマが多く、硬いゲルとなった。アミラーゼ添加区はゲル化せず、液状であった。イソアミラーゼ添加区でのみ、ダマがなく滑らかなゲルとなった。でんぷん中の α-1,4 結合を残して α-1,6 結合を切断することで、ヨーグルト様のゲルを作製できたと推察された。 また、特にイソアミラーゼ添加区で発酵促進効果やビフィズス菌増殖効果も確認され、本酵素を利用することで、付加価値のある新規プラントベースヨーグルトを開発できる可能性を見出した。（特許出願済み）

Chickpea, which has a mild taste and contains a high amount of folic acid, is attracting attention as an ingredient for plant-based milk. However, it is difficult to make chickpea milk or yogurt because of its high starch content. In this study, we developed a method for producing chickpea yogurt using “GODO-FIA”, an isoamylase produced by *Flavobacterium odoratum*, and analyzed the yogurt.

Chickpeas were soaked overnight, and crushed in water. After filtration and boiling, the sample was fermented. As a result, the sample without enzyme was hard and had many lumps. With an amylase, the sample did not gelate. Only by using the isoamylase, we succeeded making smooth gel without lumps. This may be caused by the property of the isoamylase, to mainly hydrolyze the side chain of starch. In addition, the isoamylase promoted the fermentation and the growth of bifidobacteria. In conclusion, we found the possibility of producing new plant-based yogurt using the isoamylase.

isoamylase, plant-based food, starch

発表責任者：守谷　崇（t-moriya@oenon.jp）

講演番号：2B1p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 B1 会場

真空焼成がパン品質に与える影響解析

Analysis of the effect of vacuum baking on bread quality

○古澤 駿[1]、小野 航[2]、岡 大貴[3]、伊賀 大八[4]、井上 好文[4]、野口 智弘[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・農化、[4]日本パン技研)
○Shun FURUSAWA[1], Wataru ONO[2], Daiki OKA[3], Daihachi IGA[4], Yoshihumi INOUE[4], Tomohiro NOGUCHI[2] ([1]Dept. Agric. Chem., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]FPC, Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [4]JIB)

【目的】パンを広範に流通させるには日数を要し、鮮度の良いパンを迅速且つ効率的に提供することが難しい。このため集約的に量産した一次焼成パンを複数の地域に分散保蔵し、それぞれの地域で二次焼成を行い効率的に広範囲に提供する流通がヨーロッパを中心に行われている。この二次焼成には真空下で高温の水蒸気を用い焼成する真空焼成オーブン(VO)が用いられ、保蔵したパンを焼立て品質に戻し提供されているが、詳細な機構は不明である。そこで真空焼成がパン品質に及ぼす影響について検討した。
【方法】7.5 cm 四方のプルマン型食パンをコンベクションオーブン(CO)にて一次焼成し、ポリエチレン袋で包装後、4 ° C にて 16 日間貯蔵したものを二次焼成に供した。二次焼成は CO および VO にて行い、焼成中のパン中心温度の熱履歴を測定した。パンの評価は、1 日および 5 日貯蔵後の水分量、クラム物性・凝集性を測定した。
【結果】パン内部が均一に温められる時間は CO では 5 分、VO では庫内減圧に 1 分と加熱に 2 分であった。焼成後のパン重量は CO では 5.0%減少した一方で、VO は 3.9%増加し主にクラストにおいて水分量増加が顕著であった。さらにクラム物性は CO に比べ VO において軟化が促進し、凝集性も復元性が高かった。また VO は 5 日保蔵後も硬化が抑制され、凝集性は有意に高かった。

Providing breads over a huge area as vast as a continent requires several days. It makes difficult to distribute fresh ones efficiently. In Europe, due to this reason primary-baked breads that has been intensively produced are distributed and stored in multiple regions, then secondary-baked at each region, and distributed to a wide range of areas and countries. For secondary baking, a vacuum oven (VO), which uses hot steam under vacuum, is used to heat breads. In this study, we focused on the effect of vacuum baking on bread quality. 7.5 cm square tin breads were once baked in a convection oven (CO) and stored at 4°C for 16 days. These breads were second baked in CO and VO, and core temperature during baking was measured. The time required for heating breads inside evenly was 5 minutes in CO. But in VO, a minute for depressurization and 2 minutes for heating. The bread weight after baking decreased by 5.0% in CO, while it increased by 3.9% in VO, mainly due to a significant increase in crust moisture content. The crumb properties of VO became softer and cohesive was restorable. It remained the same after storage.

bread, vacuum baking, texture

発表責任者：古澤駿（10322031@nodai.ac.jp）

講演番号：2B1p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 B1 会場

食感設計に加熱を多目的で取り込んだフード３D プリント

Food 3D printing with versatile incorporation of heating in food texture design

○島田 勇輝、武政 誠（東京電機大院理）
○YUKI SHIMADA, MAKOTO TAKEMASA (Tokyo Denki Univ)

3D プリンターを食品製造に導入することで、食品の内部構造設計が可能になり、従来の食品加工法では困難だった食感制御が実現可能と期待されている。3D プリンターはペースト状の食品素材を細孔ノズルから吐出し積層することによって食品造形を行うため、やわらかい食品しか造形できず、制御可能な食感範囲は限定的であった。造形後の 3D プリント食品を加熱することで、破断強度を増加（つまり、かたく）することは可能だが、加熱によって変形し設計した構造が維持できず、食感制御に支障が出る課題があった。我々は、既に食品中に空隙を設計することで加熱時の変形抑制を行い、3D プリント食品の加熱に成功している。今回、加熱を、材料の空間配置と合わせて設計することで、3D プリント食品を場所ごとに硬化度合を変化させること、また前述の変形抑制だけでなく、設計通りに変形を促進させることが可能となった。つまり、加熱を、変形抑制、変形の積極利用、硬化度合の設計など多方面で活用する新世代のフード３D プリント技術確立に成功した。本研究の成果により従来の 3D プリンターでは困難であった噛み応えのある食品造形、また複数材料の有効利用や変形を考慮した構造設計による、見た目向上と食感制御の両立が可能となった。

3D printer can print non-uniform structure inside the food. Introducing 3D printer into food production is expected to enable food texture design. Food 3D printing is process in which paste type food is ejected from a fine-pore nozzle and stacking . Therefore, 3D printer can print only soft foods and controllable food texture is limited. Food products is can be hard by heating, but heating caused deformation of food and blocked food texture design.

We have already succeeded in heating 3D printed foods by designing water vapor vent in food products to suppress deformation during heating. In this study, it is able to change food products hardness part to part and promote deformation as designed by designing heating and non-uniform structure. In other words, we succeeded in establishing a new generation of food 3D printing method that utilizes heating in multiple aspects, including deformation control, active use of deformation, and designing the degree of hard. By the results of this study, it is able to print chewy food products which is difficult with conventional food 3D printer. Also, it is able to combine improved appearance of food and food texture control by structural design considering effective use of multiple food materials and deformation.

Food 3D printer, Food　texture design, Temperature induced texture design

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2B1p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 B1 会場

酵母エキス抽出残渣を用いた味噌様調味料の調製

Preparation of *miso*-like seasoning using the yeast extract residue

○吉永 亜美[1]、上野 貴生[2]、清野 俊介[3]、永井 誠也[3]、眞榮田 麻友美[3]、前橋 健二[1,3]、吉川 潤[1,3]
([1]東農大院応生、[2]アサヒグループ食品（株）食品原料、[3]東農大応生)
○Ami YOSHINAGA[1], Takao UENO[2], Shunsuke SEINO[3], Seiya NAGAI[3], Mayumi MAEDA[3], Kenji MAEHASHI[1,3], Jun YOSHIKAWA[1,3] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Food Ingredients Development Dept., Asahi Group Foods, Ltd., [3]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

酵母細胞から抽出して得られる酵母エキスは、食品産業において多様な用途が知られている。しかしながら、酵母エキス抽出後の残渣である細胞壁画分は、タンパク質を豊富に含んでいるにも関わらず、飼料以外の用途開発が進んでいない。日本の伝統的調味料の一つである味噌は、麹、大豆、塩が主な原材料であるが、タンパク質源としての大豆は食物アレルギーに関する特定原材料に準ずるものとして表示が推奨されている。そこで、大豆の代わりに酵母細胞壁を利用することで、特定原材料表示を必要としない大豆未使用の味噌様調味料の開発について検討を行った。

味噌様調味料は、酵母細胞壁または対照の蒸煮大豆に、米麹、食塩、水を原料とし、耐塩性酵母を添加して小仕込みを行った。熟成は 30℃、2 ヶ月間で行い、経時的にサンプリングして各項目の分析（明度、硬さ・粘性、還元糖、ホルモール窒素、グルタミン酸など）に用いた。最初に蒸煮大豆と同条件で調製した味噌様調味料では、うま味成分となるグルタミン酸が少なく、粘性が高いものとなったが、米麹と酵母細胞壁、水の配合比率を調節することで物性を改良できた。さらに、乾燥酵母を加えることでグルタミン酸量の増加を確認でき、各種分析においても良好な結果が得られた。以上より、課題を残したものの、未利用の酵母細胞壁画分を原料とした味噌様調味料を調製することができた。

Yeast extract is produced by extracting from a yeast cell and is utilized for a variety of purposes in the food industry. The cell wall fraction of yeast (CWF) that is the residue after its extraction contains a rich protein, and the development of applications except for a forage has been remained. *Miso* is a Japanese traditional seasoning, and soybean, the main material, are recommended to be labeled as a specified material. Therefore, production of a soy-free *miso*-like seasoning was performed using CWF, not specified label. The *miso*-like seasoning was initially prepared under the same conditions with general *miso* as a control. Aging was carried out at 30℃ for 2 months, and the sequential samples were analyzed. The *miso*-like seasoning was low glutamic acid content and high viscosity. However, the physical property was improved by adjusting the blending ratio of materials. Furthermore, an increase in glutamic acid was confirmed by adding dried yeast. From these results, we were able to prepare the alternative *miso*-like seasoning using CWF.

yeast extract, miso, cell wall

発表責任者：吉川　潤（jy207183@nodai.ac.jp）

講演番号：2B1p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 B1 会場

メイラード反応産物とビールのコクについて

Relationship between Maillard reaction products and the flavor of beer

○望月 マユラ、堀江 暁、太田 麗子、越村 裕子、加藤 優、森下 あい子（キリン HD 飲料未来研）
○Mayura MOCHIZUKI, Akira HORIE, Reiko OTA, Yuko KOSHIMURA, Masaru KATO, Aiko MORISHITA (Institute for Future Beverages, Kirin Holdings Co., Ltd.)

ビール製造には、様々な加熱工程があり、それによってメイラード反応が生じ、ビールの味や香り、色調に寄与していると言われている。メイラード反応産物（MRPs）には様々な成分があり、ビールに含まれる MRPs もいくつか報告例がある。また、遊離アミノ酸と反応したものを遊離型 MRPs、ペプチドやタンパク質中のアミノ酸残基と反応したものを結合型 MRPs として区別している。
これまでに、ビールを含めた食品中の遊離型 MRPs 量（能見ら）のみ、もしくは遊離型と結合型を測定、比較した（Michael ら）報告は存在している。一方で、ビール製造中の加熱強度によって味や香りに影響があることは経験的にわかっているものの、ビール中の MRPs 量と官能評価との関係を示す報告はなく、ビール製造との関連など詳細はわかっていなかった。
異なるタイプのビールについて、既存の手法を参考にして遊離型、結合型 MRPs を分析し、コクの強さとの関係を成分ごとに考察したので報告する。

Beer brewing involves several heating processes and that contributes to the taste, aroma, and color of beer. Maillard reaction products (MRPs) include a variety of components, and there have been several reports on the MRPs in beer. MRPs are classified according to whether they react with free amino acids (free MRPs) or with amino acid residues in peptides and proteins (bound MRPs).
Some studies have compared the amounts of free (Nomi *et al.* (2016)) and bound (Hellwig *et al.* (2016)) MRPs in foods, including beer, and have compared them. Although it is known from experience that the heating intensity during beer production affects the taste and aroma of beer, there have been no reports showing the relationship between the amount of MRPs in beer and sensory evaluation scores, and their association with beer production remains unclear.
In this study, we analyzed the free and bound MRPs in different types of beers from around the world using existing methods, conducted a sensory evaluation of the koku (richness or fullness) of the beers, and discussed the relationship between the two for each component.

Maillard Reaction Products, Koku, Beer

発表責任者：望月　マユラ（Mayura_Mochizuki@kirin.co.jp）

講演番号：2B1p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 B1 会場

プロテアーゼを含んだ食品の添加によるタウナギのタンパク質への影響
Effect of addition of food containing protease on protein in swamp eels
○廣瀬 和樹、藤堂 景史、飯村 裕子、齋藤 慎二（常磐大）
○Kazuki HIROSE, Kagefumi TODO, Yuko IIMURA, Shinji SAITO (Tokiwa Univ.)

タウナギは東アジアから東南アジアに分布する淡水魚であり、これらの地域では食用として親しまれている。タウナギにはタンパク質が多く含まれており、また脂質が少ないことから、その身は淡泊で特有の硬さが認められ、馴染みのない日本人には少し食べづらさを感じる。そこで本研究では、各種食品に含まれるプロテアーゼを利用した加工方法により、硬さの主な原因であるタンパク質を分解することで、タウナギの食べづらさを改善することを目的とした。
冷凍保存されたタウナギの切り身を解凍し、同量のパイナップル果肉、味噌、塩麹に 24 時間漬け込み、２００℃のオーブンで１０分間焼成したものを加工後の試料とした。これらの遊離アミノ酸量とタンパク質量を測定したところ、加工前と後では特に変化は認められなかった。そこで今回の研究では、SDS-PAGE によりタンパク質の分解を確認したところ、各種加工を行った試料においてはタンパク質の分解を示すバンドが認められた。そこで、各試料のコラーゲン量を測定したところ、加工した試料において減少が認められたことから、これらの加工はコラーゲンの分解に大いに作用することが明らかとなった。今後は官能評価を行うことで、これらの加工によりタウナギの食べづらさが改善されたかどうかを確認し、嗜好性を向上させる加工方法について検討していく。

The swamp eel (*Monopterus albus*) is a freshwater fish found from East Asia to Southeast Asia. Due to its high protein concentration and low fat content, the flesh of swamp eel is light in taste, but has a distinctive hardness that makes it somewhat difficult for unfamiliar Japanese to eat. Therefore, the aim of this study was to improve its texture by using processing techniques that use protease found in various foods to break down the protein that causes its hardness.

Frozen swamp eel fillets were thawed and marinated in equal amounts of pineapple pulp, miso, and salted malt for 24 hours, then baked in an oven at 200˚C for 10 minutes and freeze-dried into a powder as post-processing samples. Measurement of the free amino acid and protein content of these samples showed no particular change before and after processing. Thus, in this study, SDS-PAGE showed protein degradation in each of the processed samples. And the amount of collagen in each sample was decreased in the processed samples, indicating that these processes have a significant effect on the degradation of collagen. In the future, we will conduct sensory evaluations to determine whether these processes cause changes in sensory characteristics.

swamp eel, protease, food processing

発表責任者：廣瀬和樹（k.syoku.h13sun@gmail.com）

講演番号：2B1p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 B1 会場

マイタケ粗酵素液による鶏卵含有たんぱく質の分解

Degradation of egg protein by maitake protease

○鮫島 由香[1,4]、沖 留理子[2]、福田 史織[3]、竹本 尚未[2]、松井 徳光[3,4]([1]羽衣国際大食栄、[2]武庫女大院食栄、[3]武庫女大食栄、[4]武庫女大栄養科学研究所)
○ Yuka SAMESHIMA[1,4], Ruriko OKI[2], Shiori FUKUDA[3], Naomi TAKEMOTO[2], Tokumitsu MATSUI[3,4] ([1]Hagoromo Univ., [2]Grad. sch. of Mukogawa Univ., [3]Mukogawa Univ., [4]Res. Inst. for Nut. Sci. Mukogawa Univ.)

オボアルブミンは、鶏卵の主要たんぱく質であり、熱凝固に関与することが報告されている。一方、我々は、これまでにマイタケ粗酵素液を全卵液に添加することにより、加熱後も凝固が起こらない全卵液について報告しており、マイタケ粗酵素液添加によりオボアルブミンを分解している可能性について言及してきたが詳細は明らかとなっていない。そこで、本研究では、マイタケ粗酵素液を用いてオボアルブミンが分解されているか否かを検討することを目的として実験を行った。

カゼインを基質とし、マイタケ粗酵素液の反応温度 30℃～80℃、反応時間 5 分～22 時間におけるプロテアーゼ活性を測定した。全卵液にマイタケ粗酵素液を 1:1 の割合で添加し、50℃または 70℃で最長 22 時間酵素反応した。70℃で酵素反応した全卵液ついては、各反応時間経過後 100℃、5 分の加熱処理を行った。反応後の全部卵液を SDS‐PAGE および Western Blotting に供し、オボアルブミンを検出した。なお、オボアルブミンの標品についても同様の実験を行った。

マイタケの粗酵素液の最適温度は、60℃～80℃であり、時間経過に伴い、その活性は激減した。Western Blotting のバンドが反応前に比べ薄くなっていたことから、マイタケ粗酵素液により、全卵液のオボアルブミンおよび標品のオボアルブミンを一部分解している可能性が示唆された。

We have previously reported that by adding maitake protease (crude enzyme which extracted from maitake mushroom) to whole egg solution, does not coagulate even after heating, has been mentioned, but the details have not been made clear. In this study, we conducted an experiment to examine whether ovalbumin is degraded using maitake protease.

The protease activity of maitake protease was measured at a reaction temperature of 30～80° C and a reaction time of 5 minutes to 22 hours. Maitake protease was added to the whole egg solution at a ratio of 1:1, and enzymatic reaction was performed at 50°C or 70°C for up to 22 hours. After the reaction, whole egg solution was subjected to SDS-PAGE and Western Blotting to detect ovalbumin. Incidentally, a similar experiment was also conducted using ovalbumin.

The optimum temperature for maitake protease was 60～80°C, and its activity decreased dramatically over time. Since the Western Blotting band was fainter than before the reaction, it was suggested that the maitake crude enzyme solution may partially degrade ovalbumin in the whole egg solution.

protease, Ovalbumin, mushroom

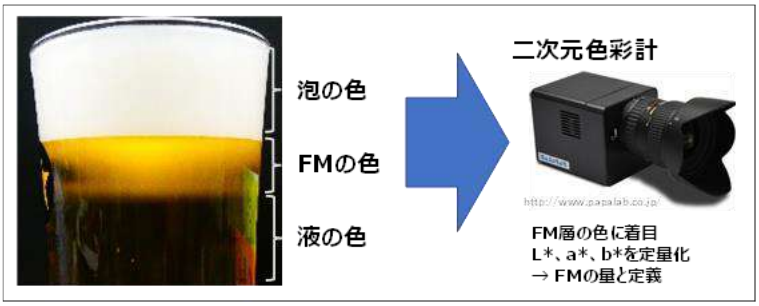
講演番号：2B2a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 B2 会場

ビール泡品質の新規評価方法の開発 1　二次元色彩計を用いたフロスティーミストの定量化
A novel method for evaluating beer foam quality (frosty mist) by using two-dimensional colorimeter

○飯牟礼 隆[1]、石鍋 菜々子[1]、浅井 梓[2]、潮井 徹[1] ([1]サッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所、[2]サッポロビール（株）商品・技術イノベーション部)
○ Takashi Iimure[1], Nanako Ishinabe[1], Azusa Asai[2], Toru Shioi[1] ([1]Value Creation Frontier Laboratories, SAPPORO BREWERIES LTD., [2]Product & Technology Innovation Department, SAPPORO BREWERIES LTD.)

日本のビールサーバーの多くにはクリーミーな泡を提供するためのユニークなタップが装備されている。このタップでビールをグラスに注ぐと、液と泡の界面に微細な泡の層（フロスティミスト（FM)）が発生する。FM の存在下では、グラスを傾けると液体と FM が混ざり合いビールの泡が再生されるため（泡の再生力)、ビール飲用シーンにおいて時間が経過してもきめ細かい泡を楽しむことができる。これまでも視覚的､定性的に FM や泡の再生力の良し悪しを観測することは可能であり、ビールの種類によってこれらに差があることが分かっていた。しかし、FM や泡の再生力を定量することは困難であった。

我々は、液、FM 層、泡層の色の違いに着目し、二次元色彩計で高精度に色を定量することで、FM の定量化に成功した。また、泡の再生力についても定量したところ、FM が多いと、泡の再生力が良くなることを定量的に確認した。今後は、ビールの種類によって FM や泡の再生力に差が生じる理由を解明し、さらに泡品質が良いビール製造技術開発につなげていきたい。



In Japan, most beer dispensers are equipped with a unique tap for serving creamy foam. When pouring beer into a glass using this tap, a layer of fine bubbles, called frosty mist (FM), is generated at the liquid–foam interface. In the presence of FM, beer foam is regenerated by mixing beer liquid and FM when the glass is tilted. This interesting phenomenon has hardly been investigated. In the present study, we developed a novel method for evaluating FM by using two-dimensional colorimetry. Our results suggested that beer with high FM amounts positively impact foam regenerative ability.

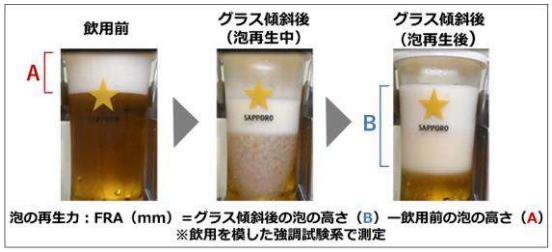
beer foam, frosty mist, two-dimensional colorimetry

発表責任者：飯牟礼　隆（takashi.iimure@sapporobeer.co.jp）

講演番号：2B2a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 B2 会場

ビール泡品質の新規評価方法の開発 2　泡の再生力の評価と再生力に差が生じる原因の追究
A novel method for evaluating beer foam quality: Evaluation of foam regenerative activity and investigation of causes of differences

○石鍋 菜々子[1]、飯牟礼 隆[1]、浅井 梓[2]、潮井 徹[1]（[1]サッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所、[2]サッポロビール（株）商品・技術イノベーション部）
○ Nanako Ishinabe[1], Takashi Iimure[1], Azusa Asai[2], Toru Shioi[1] ([1]Value Creation Frontier Laboratories, SAPPORO BREWERIES LTD., [2]Product & Technology Innovation Department, SAPPORO BREWERIES LTD.)



グラスに注いだビールでは、液と泡の界面に微細な泡の層（フロスティミスト：FM）が存在すると、グラスを傾けたときに、液体と FM が混ざり合うことで泡が再生される。泡の再生力（FRA）が高いと、ビール飲用シーンにおいて、長時間きめ細かい泡を楽しむことができる。本研究では、ビールによる FRA の差や、その差が生じる原因の詳細を調査した。

我々はまず、日本で市販されている様々なビールテイスト飲料の FRA を比較した。サンプル間で FRA に明らかな差が見られたが、泡の安定性（NIBEM 値）とは相関関係が見られなかった。次に、ビールテイスト飲料の泡部と液部を異なるサンプルで組み合わせた時、FRA がどのように変化するか確認した。組み合わせを変えることで、FRA が向上あるいは低下するサンプルが見られたが、変化しないサンプルも見られた。これより、ビールの液と泡の界面状態が、FRA に何らかの影響を与えていることが示唆された。本講演では、上記の研究結果に加えて、FRA に影響する要因について、分析化学的手法を用いて更なる検証を行ったので報告したい。

When pouring beer into a glass using the usual Japanese-style tap, a layer of fine bubbles, called frosty mist (FM), is formed at the liquid–foam interface. In the presence of FM, beer foam is regenerated by mixing the liquid beer and FM when the glass is tilted. If the foam regenerative ability (FRA) is high, fine foam can be used for a long time when drinking beer. In this study, we investigated the differences in FRA among beer types and the causes of these differences. First, we compared FRA among Japanese commercial beers. We observed obvious differences in the FRA of these beers; however, there was no correlation between FRA and NIBEM values. Next, we confirmed how the FRA changes when different samples are used to combine the foam and liquid parts of beers. FRA of some samples improved or decreased; others showed no change. These results suggest that the interfacial state between beer liquid and foam has some influence on FRA. Furthermore, we intend to report the factors that affects FRA and investigated using analytical chemistry methods in this symposium.

beer foam, foam regenerative ability

発表責任者：石鍋　菜々子（Nanako.Ishinabe@sapporobeer.co.jp）

講演番号：2B2a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 B2 会場

アミノ酸の疎水性と水和パラメータ h および関連パラメータの関係

Relationship between hydrophobicity and hydration parameters of amino acids in water

○佐藤 之紀[1,2]、佐藤 礼奈[2]([1]岩手大院連合農学、[2]弘前大農生科)
○Yukinori Sato[1,2], Rena Sato[2] ([1]The United Graduate School of Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【目的】グリシン(Gly)を基本骨格として，代表的なアミノ酸の水中での粘度 B 係数 B_a や部分モル体積 V_2 の報告はそれぞれあるが，それらの値を基に水和を議論した例は少ない。そこで，脂肪族アミノ酸の B_a と V_2 を 25℃で求め，アミノ酸側鎖の疎水性と水和の関係を追求した。
【方法】キャノンフェンスケ粘度計と精密密度計（DMA 4500, Anton Paar）を用い，Gly，L-アラニン，L-バリン，L-ロイシンの 25℃の水中での B_a と V_2 から，パラメータ h を h (mol/mol) = (400B－V_2)/18 の式を用いて求めた。さらに，アミノ酸の疎水性にはオクタノールと水への分配係数 Log D の文献値を用い，Log D とパラメータ h との関係や，Log D と h に関連するパラメータの関係を調べた。
【結果】Gly を基本骨格としたアミノ酸に結合しているメチル基鎖が長くなると，Log D が大きくなった。オクタノールを n-ブタノールに代えた場合の分配係数の文献値でもほとんど同値であった(R^2 = 0.997)。Gly と脂肪族アミノ酸のパラメータ h は，Log D の一次式に近似でき，R^2 = 0.947 で示された。また，Log D は B_a や V_2 とも高い相関関係で直線関係にあった。さらに，Gly の構造に延長された C(炭素)の数を指標にすると，h およびそれに関連するパラメータとの関係は Log D を用いる場合よりも R^2 は高くなり，C が 1 当量延長されるたびに 1 分子の水が水和していくと考えられた。
【Introduction】To reveal the mechanism of hydration for aliphatic amino acids in water, the hydration parameter h of amino acids and its related parameters at 25℃ were compared, which are the viscous B-coefficient B_a, and partial molar volume V_2.
【Methods】The hydration parameter h was measured using a capillary viscometer and a density meter. The parameter h was calculated according to the following equation: h (mol/mol) = (400B－V_2)/18. Literature data of hydrophobicity on amino acids was adapted using the partition coefficients in octanol/water.
【Results】Using literature data of Log D in n-butanol/water, Log D was the same as data in octanol/water. The relationship between Log D and the parameter h can be expressed a linear regression line with R^2 = 0.947. The related parameters, B_a and V_2, also related with Log D. On the other hand, elongation of one carbon in the side chain of an aliphatic amino acid may induce one mole of water binding in aliphatic amino acid hydration.

hydration, amino acid, viscosity

発表責任者：佐藤之紀（yukisato@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2B2a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 B2 会場

食用コオロギのにおいに寄与する成分の特定

Specification of volatile compounds contributing to flavor of cricket powder

○亀崎 悠、佐々木 直里（都産技研）
○Yu KAMEZAKI, Naori SASAKI (TIRI)

食用コオロギをはじめとする昆虫系代替たんぱく商品の世界的な供給が増加している。国内でも食糧用および飼料用コオロギの生産に関するガイドラインが策定されており、法整備が進んでいる。今後は、昆虫の味や食感、香りなど「食材」としての特徴を活かした商品が普及していくとも言われており、においに関する依頼試験や技術相談を受け賜っている当センターにも、食用昆虫を扱う企業からにおい成分の分析などの相談が増えている。しかし、食用昆虫の揮発性成分分析を行った例は報告されているが、「におい」に寄与する成分を特定した報告例は少ない。

本研究では、市販の食用コオロギ粉末を準備し、共通するにおい寄与成分を特定するため、ヒトの嗅覚を用いたにおい成分の評価と、質量分析計を用いたにおい成分の同定が同時に可能なにおい嗅ぎガスクロマトグラフ質量分析装置（ＧＣ－ＭＳ／Ｏ）による測定を行った。その結果、６種類の食用コオロギ粉末から共通する揮発性成分を２５成分同定した。その中から、においに寄与する成分を１３成分特定した。

The supply of edible insects is spreading all over the world, e.g., edible crickets. In Japan, iBPF (Insect Business R&D Platform) formulated guidelines to produce crickets for food and feed. There is still room to improve the taste, texture, and flavor of edible insects, because they are not well accepted by consumers. In addition, we are receiving an increasing number of flavor inquiries from companies working with edible insect products. However, few studies have identified the specific compounds that contribute to the flavor of edible insects.

This study investigated compounds that contribute to the flavor of edible cricket powder. Sensory evaluation and qualitative analysis were carried out at the same time. A gas chromatograph-mass spectrometer/olfactometer (GC-MS/O) was used to smell the compounds emitted from the sniffing port during GC-MS/O analysis and to identify the volatile compounds. As a result, we identified twenty-five volatile compounds which common to the six types of edible cricket powder. Thirteen of these compounds contribute to the flavor.

Edible insects, Cricket powder, Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Olfactometry

発表責任者：亀崎悠（kamezaki.yu@iri-tokyo.jp）

講演番号：2B2a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 B2 会場

難溶性食品成分の in vitro 試験に適用可能な新規溶媒の開発
Development of new solvents applicable to in vitro toxicity tests of insoluble food derived substances
○久保田 祐介[1]、黒田 浩介[2]、平田 英周[3]、田中 康浩[1]([1]サントリーホールディングス株式会社、[2]金沢大学 理工研究域生命理工学系、[3]金沢大学 がん進展制御研究所)
○Yusuke KUBOTA[1], Kosuke KURODA[2], Eisyu HIRATA[3], Yasuhiro TANAKA[1] ([1]Suntory Holdings Limited, [2]Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University, [3]Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging, Cancer Research Institute of Kanazawa University)

【背景と目的】持続可能性、経済性、及びハイスループット性などの観点から *in vitro* 試験の重要性が高まっており、多くの場合は水系に被験物質を処理するが、溶解性の観点から試験が困難な事例が認められる。水や DMSO への溶解度が非常に低いセルロースを溶解可能な溶媒として、双性イオン液体（zwitterionic liquid：ZIL）が報告されているため（Commun. Chem., 3, 163 (2020)）、新規の試験溶媒として注目し、以下の試験を実施した。
【方法】水、及び DMSO のいずれにも低い溶解性を示した食品関連物質（7 化合物）を 0.1、1、10% (w/w)の濃度で ZIL（3 種）に溶解させた。高い溶解性を示した ZIL を選定し、Ames 試験、及び HepG2（ヒト肝癌由来細胞株）を用いた肝細胞毒性試験、およびポリフェノール成分の溶解性のシミュレーション評価を HSP（Hansen Solubility Parameters）を算出することで実施した。
【結果】金沢大学・黒田研究室にて開発された ZIL が一部の食品関連物質に対して高い溶解性を示した。上記の ZIL は Ames 試験にて陰性を示し、肝細胞毒性試験において DMSO と比較し低毒性であり、エラグ酸の肝細胞毒性試験にて析出による偽陽性を改善した。また、広範なポリフェノール成分に対して高い親和性を示すことが溶解性シミュレーション評価の結果から示唆された。
【結論】選定した ZIL は低毒性であり、食品関連物質の新規試験溶媒として有用であることを明らかにした。また、エラグ酸の肝細胞毒性試験結果を改善したことから、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験のギャップを埋める手段としての有用性が示唆された。

[Background] From the point of view of sustainability, economic efficiency, and throughput, *in vitro* toxicity tests are growing in importance. However, some tests cannot be conducted due to insolubility of test substances. [Method] Food-related substances were dissolved in zwitterionic liquids (ZIL) and examined their solubility. Ames test, hepatotoxicity test, and calculation of HSP (Hansen Solubility Parameters) were conducted. [Results] One type of ZIL showed high solubility for some food-related substances, showed negative results in the Ames test, was less hepatotoxic than DMSO, improved false positives due to precipitation in the hepatotoxicity test of ellagic acid, and exhibited high affinity for a wide range of polyphenol compounds. [Conclusion] ZIL is useful as a new test solvent for food-related substances.

Zwitterionic liquid, New solvents, Solubility

発表責任者：久保田祐介（Yusuke_Kubota@suntory.co.jp）

講演番号：2B2a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 B2 会場

食品中のプロテオグリカン分離手法の開発と事例紹介

Development of a method for separation of proteoglycans in foods and case studies

○川嶋 草平、山口 信哉（青森県産業技術センター）
○SOUHEI KAWASHIMA, SHINYA YAMAGUCHI (Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

天然の高分子化合物の一種であるプロテオグリカンは多くの生理機能を有し、食品や化粧品などへの利用が進んでいる。プロテオグリカンの定量を目的とした分離手法として、これまで分子量の違いによる限外ろ過などが用いられてきた。一方で、食品や化粧品には原料や添加物由来の多糖類などが多量に含まれ、前述の手法ではプロテオグリカンの分離が困難であるといった課題があった。そこで本研究では、陰イオン交換樹脂を用いたプロテオグリカンの分離について新たに各種条件を検討した。

プロテオグリカンはコアタンパク質にグリコサミノグリカン糖鎖が結合しており、その構造中に硫酸基をもつことから強い酸性条件下でも陰イオン交換樹脂に吸着する。このため、陰イオン交換樹脂にプロテオグリカンのみが吸着する酸性条件で試料を負荷することで、ペクチンなどの硫酸基を持たない酸性多糖類と容易にプロテオグリカンを分離できることを明らかにした。

開発した分離手法を用いて、実際に様々な性状の食品に含まれるプロテオグリカンを分離した事例について紹介する。

Proteoglycans, a type of natural high molecular compound, have many physiological functions and are increasingly used in foods and cosmetics. Separation methods such as ultrafiltration have been used to quantify proteoglycans based on differences in molecular weight. On the other hand, foods and cosmetics contain large amounts of polysaccharides derived from raw materials and additives, making it difficult to separate proteoglycans using the aforementioned methods. In this study, we investigated new conditions for separation of proteoglycans using anion exchange resin.

Proteoglycans have glycosaminoglycan chains attached to the core protein, and since they have sulfate groups in their structure, they adsorb to anion exchange resin even under strongly acidic conditions. Therefore, it was found that proteoglycans can be easily separated from acidic polysaccharides without sulfate groups, such as pectin, by loading anion exchange resin with a sample under acidic conditions that only proteoglycans are adsorbed.

We will present examples of actual separations of proteoglycans in foods of various properties using our separation method.

proteoglycan, Separation method

発表責任者：川嶋草平（souhei_kawashima@aomori-itc.or.jp）

講演番号：2B2a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 B2 会場

LC-MS を用いた飲料中の高感度プリン体分析

High-sensitivity purine analysis in beverages using LC-MS

○高橋 洋武[1]、平松 幸之助[1]、橘田 規[1]、照井 善光[1]、望月 直樹[2] ([1]一般財団法人日本食品検査、[2]横浜薬科大学)

○HIROTAKE TAKAHASHI[1], KOUNOSUKE HIRAMATSU[1], TADASHI KITTA[1], YOSHIMITSU TERUI[1], NAOKI MOCHIZUKI[2] ([1]Japan Foods Inspection Corporation, [2]Yokohama University of Pharmacy)

プリン体とはプリン骨格を持つ物質の総称で、食品中では核酸や旨味成分として含まれている。食品中のプリン体分析では、酸加水分解処理によりプリン塩基 4 種（グアニン、アデニン、キサンチン及びヒポキサンチン）に変換して測定する方法が知られている[1)]。本発表では、LC-MS を用いて高感度に飲料中のプリン体を分析する検討を実施したので報告する。LC は Ultimate3000、MS は Q Exactive Focus（いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック製）を用いた。試料は、過塩素酸を用いた加水分解後に、逆相系固相カラムを用いて精製した。各種カラムを検討した結果、YMC-Triart Diol-HILIC（2.1 mm×150 mm、3 μm；ワイエムシィ製）を用いて測定した結果が最も良好であった。ビール及び低プリン体ビール系飲料に各標準品を添加して添加回収試験を実施した結果、ビールの添加回収率は 87.3 %～101.7 %、相対標準偏差は 2.5 %～9.6 %、低プリン体ビール系飲料の添加回収率は 80.2 %～91.6 %、相対標準偏差は 1.9 %～4.3 %であり、良好な結果であった。本発表では、ビール以外のアルコール飲料等での分析結果についても報告予定である。

1)金子希代子ら：痛風と尿酸・核酸, **43**, 1-9(2019).

Purine is a general term for substances with a purine ring and is contained in foods as nucleic acids and flavor components. A known method for analyzing purines in foods is to convert them into four types of purine bases (guanine, adenine, xanthine, and hypoxanthine) through acid hydrolysis [1)]. In this presentation, we will report on our study of highly sensitive analysis of purines in beverages using LC-MS. We used Ultimate3000 for LC, and Q Exactive Focus for MS (both manufactured by Thermo Fisher Scientific). After hydrolysis using perchloric acid, the sample was purified using a reversed-phase solid phase column. As a result of examining various columns, the best results were obtained using YMC-Triart Diol-HILIC (2.1 mm x 150 mm, 3 μm; manufactured by YMC). As a result of conducting spike recovery tests by adding each standard product to beer and low-purine beer-based beverages, the spike recovery rate for beer was 87.3% to 101.7%, the relative standard deviation was 2.5% to 9.6%, the spike recovery rate for low-purine beer-based beverages were 80.2% to 91.6%, and the relative standard deviations were 1.9% to 4.3%. In this presentation, we will also report on the analysis results for alcoholic beverages other than beer.

Purine, LC/MS, Diol

講演番号：2B2a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 B2 会場

食感評価を目的としたエビ圧縮時の圧力分布の調査

Effect of stress distribution on shrimp texture during compression

○梅谷 華奈、井上 竜一（（公財）東洋食品研究所)
○Kana UMETANI, Ryuichi INOUE (Toyo Institute of Food Technology)

食品の食感には、部位毎の物性の違いが影響していると考えられることから、食品の部位毎の物性に関与する成分・構造を解明することを目的として、面圧と成分の分布を調べている。今報告では、食感が特徴的なエビを用い、各種加熱処理を行った際の変化を調べた結果について報告する。

5mm 厚に輪切り（垂直方向にスライス）したボイルエビにおいて、第 1、6 節目では部位ごとの圧力差は小さかったが、第 3 節目では背側が腹側の 4.2 倍の圧力を示した。第 3 節の背側が最も高い圧力を示す部位となっていたことから、食感への寄与も大きいことが推測された。水平方向にスライスしたボイル品では、第 3 節付近の背側と腹側の圧力差は 1.5 倍と小さいことから、咀嚼する際の筋繊維の方向によって食感が異なることが示唆された。また、輪切りしたレトルトエビでは第 3 節目の背側の圧力が腹側の 1.7 倍となり、圧力差が縮小したことから、背側の方が加熱によって相対的に軟化し易いと考えられた。エビの食感に影響する成分として、コラーゲンなどの分布についても評価しており、物性との関係を調べている。

The food texture is thought to be affected by the physical properties of each food part. Therefore, we aimed to elucidate the components and structures involved in the physical properties of food by investigating stress and component distribution in shrimp. We report the changes in shrimp when subjected to heat treatments.

In a boiled shrimp that was sliced vertically (5 mm thickness), the pressure difference between the dorsal and ventral sides was small in the first and the sixth abdominal segments. However, in the third abdominal segment, the pressure on the dorsal side was 4.2 times higher than that on the ventral side. The dorsal side of the third abdominal segment had the highest pressure, indicating that this impacts the texture. In a boiled shrimp that was sliced horizontally, the pressure difference between the dorsal and ventral sides of the third abdominal segment was small (1.5 times), suggesting that the texture differs depending on the muscle fiber direction during mastication. In a retorted shrimp that was sliced vertically, the pressure on the dorsal side was 1.7 times higher than that on the ventral side of the third abdominal segment. The dorsal side is thought to be relatively easier to soften by heating compare to the other parts. We are now evaluating collagen distribution and investigating its relationship with physical properties.

texture, shrimp, stress distribution

発表責任者：梅谷　華奈（kana_umetani@shokuken.or.jp）

講演番号：2B2a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 B2 会場

ゴボウ圧縮時の圧力分布と成分の関係

The relationship between　stress distribution and components in burdock during compression

○井上 竜一、梅谷 華奈（（公財）東洋食品研究所)
○Ryuichi INOUE, Kana UMETANI (Toyo Institute of Food Technology)

食品の食感には部位毎の物性の違いが影響していると考えられることから、部位毎の物性に関与する成分・構造の解明を目的として、面圧と成分の分布を調べている。今報告では、未加熱品、100℃-5 分間加熱品、レトルト加熱品の各ゴボウにおける面圧と免疫蛍光染色で調べた各種多糖の分布の関係について報告する。両者の関係については、輪切りしたゴボウを同心円状に 5 つの部位に分け、各部位の面圧および蛍光強度から算出した相対値を用いて評価した。

未加熱品において面圧は均一であったが、加熱に伴い内皮が相対的に硬くなった。内皮付近は相対的に軟化し難いと考えられる。多糖の分布について、ホモガラクツロナンは面圧分布と同じ挙動を示し、両者に R=0.94 以上の相関が見られた。ラムノガラクツロナン I およびアラビナンは、未加熱品において内皮付近に多く存在しており、面圧分布との相関は R=0.7～0.81 と低かった。しかし、加熱処理後も内皮付近に多く残存していることから、内皮付近の加熱軟化耐性に関与していることが示唆された。

The texture of foods is assumed to be influenced by the physical properties of each of its components. Therefore, we aim to study the distribution of stress and food components. We report on the relationship between stress and polysaccharide distributions in burdock.
This relationship was evaluated via dividing burdock (round slice) into five concentric regions and calculating the relative values of pressure and intensity of immunofluorescence for each part.
In raw burdock, the stress was uniform. After heating, some parts softened; however, the endodermis relatively retained its hardness. This indicates that the endodermis is relatively difficult to soften via heating compared to other parts. In the polysaccharide distribution, homogalacturonan (HG) exhibited a similar trend to that of the stress distribution and a correlation of R = 0.94 or higher was observed between HG and stress distribution. Rhamnogalacturonan I （RG- I）and arabinan was contained in the endodermis and its surrounding, particularly in raw burdock. These polysaccharides were retained after heating in the endodermis. This result suggests that RG- I and arabinan are related to softening tolerance caused by heating in the endodermis.

Texture, Stress distribution, Pectin

発表責任者：井上 竜一（ryuuichi_inoue@shokuken.or.jp）

講演番号：2B2a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 B2 会場

清酒中のバニリンの定量と閾値調査
Quantitative analysis of vanillin in sake and its detection threshold
○孛儿只斤 蘇日娜、長船 行雄、岸本 徹、久常 有里、磯谷 敦子（独立行政法人 酒類総合研究所）
○Surina Boerzhijin, Yukio Osafune, Toru Kishimoto, Yuri Hisatsune, Atsuko Isogai (National Research Institute of Brewing)

バニリンは様々な酒類でその寄与が報告されているが、清酒においてはこれまで詳細な議論が行われていなかった。そこで、清酒中のバニリン含量の定量方法(HPLC-MS/MS)を確立し、合計 126 点清酒のバニリン含量を調査した。また、清酒中のバニリンの閾値を測定した。検量線は 5-1500μｇ/L の濃度範囲内で直線となり，R^2＝0.99 だった。バニリンをほとんど含まない清酒への 100-753μｇ/L 添加における回収率が 99.7%-101.8%，変動率が 0.67%より低く、良好な値となった。検出限界は 1.7μｇ/L，定量限界は 5.5μｇ/L だった。40 点の新酒（令和 4 酒造年度新酒鑑評会出品酒）のバニリン含量は trace-29.9μg/L であり、バニリンの清酒中の閾値である 78.9μg/L より低かった。46 点の市販熟成酒（貯蔵期間 3-53 年）のバニリン含量はバラツキが大きく（n.d-1727μｇ/L）、貯蔵期間 11 年以上では常温熟成酒の平均値が低温熟成酒より高かった。最大値は樫樽で熟成させた純米大吟醸酒（20 年貯蔵）だった。同一製造場でほぼ同様の製法で作られ、貯蔵期間の異なる清酒（5 製造場、40 点）のバニリン含量を調べたところ、経年増加し、10-15 年で閾値を超えるものが多かった。

A HPLC-MS/MS quantitative analysis method for vanillin in sake was developed and vanillin concentrations were assessed through 126 bottles of sake. Furthermore, the detection threshold of vanillin in sake was determined. The calibration curve exhibited a good linearity within the concentration range of 5-1500μg/L, with a high correlation coefficient greater than 0.99. The recovery rate of vanillin at 100-753 μg/g were in the range of 99.7%-101.8%, with RSD values less than 0.67%. The limit of determination (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 1.7 μg/L and 5.5 μg/L, respectively. 40 bottles of young sake contained vanillin in a concentration range of trace-29.9 μg/L, which were lower than its detection threshold in sake (78.9 μg/L). 46 bottles of commercial aged sake (3-56 years) contained vanillin in a wide concertation range of n.d-1727 μg/L, revealing that the average vanillin concentrations in ambient-temperature aged sake were higher than that in low-temperature aged sake after 11 years of aging. The maximum vanillin concentration was detected in an oak barrel aged sake with 20 years ambient-temperature aging. Vanillin concentration of the most bottle aged sake, which were brewed in same breweries with similar method, increased with aging length and exceed its detection threshold in 10-15 years.

Vanillin, Sake, Aging

発表責任者：ボルジギンソリナ（surina@nrib.go.jp）

講演番号：2B2a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 B2 会場

UHPLC を用いた酒類中 37 成分の D/L-アミノ酸自動分析法の改良

Improvement of an automated method for determination of 37 D/L-amino acids in liquor samples using UHPLC

○岩田 奈津紀、寺田 英敏、小林 まなみ（株式会社島津製作所）
○Natsuki IWATA, Hidetoshi TERADA, Manami KOBAYASHI (Shimadzu Corporation)

近年、食品の呈味性、保存性、香気性や疾患バイオマーカーとしての D-アミノ酸の役割が知られるようになり、アミノ酸の D/L 分離の需要が高まっている背景から、高濃度に存在する L-アミノ酸と微量の D-アミノ酸を分離し定量することが求められる。昨年の本学会にて、シンプルな構成の UHPLC システムを用いた 37 成分の D/L-アミノ酸を短時間で簡単に定量分析する方法について報告した。本研究では、自動プレカラム蛍光誘導体化反応の最適化を実施したので報告する。誘導体化における試薬濃度および反応時間を最適化したところ、従来法に比べ約 2 倍の高感度化が可能であった。最適化条件における直線性は全成分とも寄与率 r^2=0.999 以上（各 0.01～1 μmol/L）であり、各 0.1 μmol/L の標準溶液における面積の再現性（%RSD, n=6）は 1.6%以下の結果が得られた。本法を種々の酒類に適用した結果、D-アミノ酸の比率は約 4%以下と微量であったが定量可能であり、ビールやワインは種類により D-アミノ酸の含有量が約 2 倍異なることがわかった。以上より、本法は酒類中の微量 D-アミノ酸のプロファイリングに適用可能であると考える。

Recently, the role of D-amino acids in the taste, preservation, and flavor of foods and as disease biomarkers has become known, and the demand for D/L separation of amino acids is increasing. Therefore, it is necessary to separate and determine L-amino acids present at high concentrations and D-amino acids at trace amounts. A quick and simple method for the determination of 37 D/L-amino acids using a simple UHPLC system was reported last year. In this study, the optimization of an automated pre-column fluorescence derivatization reaction is reported. Optimizing the reagent concentration and reaction time for derivatization, it was possible to achieve approximately twice as high sensitivity as the conventional method. Coefficient of determination ratio (r^2) was 0.999 or greater (0.01-1 μmol/L each), and repeatability of peak area was 1.6% or lower (0.1 μmol/L each). As a result of applying this method to liquors, it was found that the overall ratio of D-amino acids to D/L-amino acids was less than approximately 4%, and that the content of D-amino acids in beer and wine was approximately twice different depending on the type. These results suggest that it can be applied to the profiling of trace D-amino acids in liquors.

D/L-amino acids, Pre-column derivatization, UHPLC

発表責任者：岩田　奈津紀（natsuki@shimadzu.co.jp）

講演番号：2B2a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 B2 会場

HPLC-SERS 法での食品成分分析の試み

Food component analysis using HPLC-SERS method

○山口 洋[1]、竹井 弘之[2] ([1]東洋大院生命、[2]東洋大生命)
○Umi Yamaguchi[1], Hiroyuki Takei[2] ([1]The Univ. of Toyo, [2]The Univ. of Toyo Life science)

本研究の目的は、表面増強ラマン分光法（SERS 法）と HPLC 法を組み合わせることでβカロテン、ビタミンなどの食品中の有益物質を現在の手法よりも迅速かつ簡便に測定を行うことである。

表面増強ラマン分光法は、微弱なラマン散乱光を貴金属ナノ構造体の光学特性を利用することにより 10000 倍程度の信号増強を可能とする手法である。これまで SERS 法で用いられている銀コロイドにおいては、凝集が増強率に影響し信号が変動する問題が発生する。そこで、我々はガラス基板上にシリカナノ粒子を単層に吸着、銀を真空蒸着することにより銀ナノ構造基板を作製している（metal film on nanosphere：MFON 法)。MFON 型 SERS 基板を HPLC 法と組み合わせるために様々な形態の基板を作製して比較した。①スライドガラス上に直径 3 mm の SERS 領域を 50 スポット形成。②櫛型アルミ基板の先端に 3 x 3 mm の SERS 領域を形成、③ガラス底 96 穴プレートの底に SERS 領域を形成した、三通りのデバイスを作製した。SERS 法のモデル分子である BPE と 1,4-benzendithiol や野菜に多く含まれるβカロテンを HPLC に注入した後に、ドレインから出てくる液体を上記のデバイスと接触させ SERS スペクトルを取得した。

The goal of our research is to combine HPLC with SERS in order to implement a rapid and facile method for evaluating valuable molecules such and beta-carotene and vitamins in food. SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) makes use of an optical phenomenon associated with noble metal nanostructures and allows enhancement of Raman scattering on the order of 10,000. Silver colloids are widely used for SERS, but the extent of colloidal aggregation, which affects the enhancement ratio, is difficult to control. Therefore, we prepare our SERS substrate by forming metal film on nanosphere, MFON; a monolayer of silica nanospheres is formed on a solid substrate and silver is vacuum-deposited. To combine SERS with HPLC, we have fabricated three different devices. (1) a glass slide with 50 SERS spots, 3 mm in diameter. (2) an aluminum comb-like structure whereby a 3 x 3 mm SERS area is formed at the end of each cantilever. (3) a 96-well plate whose glass bottom is coated with MFON. After injecting typical Raman model compounds such as BPE, 1,4-benzenedithiol, beta carotene into a HPLC equipment, the drain fluid is made to come into contact with each of the above three devices, and SERS spectra were obtained.

SERS, Food analysis

発表責任者：山口　洋（s49102200042@toyo.jp）

講演番号：2B2a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 B2 会場

イムノスティック法を用いた食物アレルゲンの簡便・高感度検出技術の開発

Immunostick colorimetric assay for simple and highly sensitive detection of food allergens

○飯嶋 益巳[1,2]、笹村 雄斗[2]、田辺 明子[1]、中高下 莉子[1]、那須 茜[1]、黒田 俊一[3]([1]東農大・応生・健康、[2]東農大院・健康、[3]阪大・産研)
○Masumi IIJIMA[1,2], Yuto SASAMURA[2], Akiko TANABE[1], Riko NAKAKOGE[1], Akane NASU[1], Shun’ichi KURODA[3] ([1]Dept. Nutr. Sci. Food Saf., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Nutr. Sci. Food Saf., Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]SANKEN, Osaka Univ.)

Hazard Analysis and Critical Control Point（HACCP）の制度化に伴い、食品の安全性・品質・機能性等の検査が改めて重要視され、食品製造工場や検査機関等では、簡便に、感度良く目的の物質を検出する技術が必要である。これまで我々は、IgG の Fc 領域を固定して Fv 領域を放射状に整列提示できる足場分子・ZZ タグ提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC）を開発し[1,2]、酵素免疫測定法（ELISA）に比べて手順が簡便で、測定時間が短いイムノスティック法を用いた食物アレルゲンの簡便・高感度検出技術の開発を目指してきた。本研究では、イムノスティック固相上の各種食物アレルゲン（オボアルブミン、オボムコイド、β-ラクトグロブリン、レクチン、トロポミオシン、グリアジン、カゼイン）を、各一次抗体と酵素標識二次抗体または二次抗体と ZZ-BNC との複合体を用いて測定したところ、ZZ-BNC は表層に二次抗体をクラスター化・整列固定化し、各種食物アレルゲン検出の発色強度を増強できることを見出した（オボアルブミン約 82 倍）[3]。さらに抗体の反応時間を従来法の 5 分の 1 に短縮することに成功し[3]、食品中の食物アレルゲンの特異的かつ簡便・高感度検出を可能にした。本方法は、新型コロナウイルスの抗原検出における高感度化効果も認められたことから、食品分野における簡易検査法だけでなく、医療分野におけるポイントオブケア検査等への応用も期待できる。

Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) systems becoming mandatory, food factories and food inspection agencies require inspection techniques to measure target substances for food safety and quality in a simple and highly sensitive manner. Herein, we have developed an immunostick colorimetric assay for simple and highly sensitive detection of various food allergens by using bio-nanocapsules harboring IgG Fc-binding Z-domain (ZZ-BNC) as a scaffold for oriented immobilization of IgG. When ZZ-BNC was used with primary and secondary antibodies to detect various food allergens on a solid phase, ZZ-BNC enhanced the chromogenic intensity of various food allergens in the immunostick colorimetric assay (~82-fold for ovalbumin) and succeeded in reducing the antibody reaction time to one-fifth that of the conventional method, enabling specific, simple, and highly sensitive detection of food allergens in food products. This method was also found to be able to detect novel coronavirus antigens with high sensitivity, and we expected that it could be applied not only to simple testing methods in the food field but also to point-of-care testing in the medical field.

1. Iijima, M. et al., Biosens. Bioelectron. 89, 810, (2017); 2. 飯嶋ら, 化学と生物, 56, 591, (2018); 3. Sasamura, Y. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 87, 765-770 (2023).

immunostick, food allergen, food safety inspection

発表責任者：飯嶋 益巳（mi206786@nodai.ac.jp）

講演番号：2B2a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 B2 会場

穀粒内のタンパク質局在と炊飯米物性との関係

Relationships between protein localization within grain and physical properties of cooked rice

○木村 映一 (農研機構・食品研)
○Eiichi KIMURA (Food Research Institute, NARO)

米の消費は年々減少しているが、外食や中食で消費される米が消費に占める割合は年々増加しており、今後も増加が予想される。外食や中食に使用される炊飯米はまとまった量での炊飯となるため、取り扱いの際に硬さや粘りが重要な物性になる。そのため本研究では穀粒内の詳細なタンパク質局在が、炊飯米の硬さや粘りとどのような関係があるかについて解析を行った。6 品種についてそれぞれ 3 反復で 2 年間栽培してデータ解析を行ったところ、炊飯米の表層の硬さについては、穀粒内のいずれの領域においても、タンパク質含量との相関はみられなかった。炊飯米の全体の硬さについては、負の相関を示すタンパク質局在が穀粒内に複数みられた。一方、炊飯米の表層の粘りについては、表層のタンパク質含量とは正の相関があり、中心部のタンパク質含量とは負の相関を示す結果が得られた。炊飯米の全体の粘りについても同様の傾向がみられた。これらの結果は、タンパク質含量の影響を受けやすい物性とそうでない物性があり、硬さや粘りに関連のあるタンパク質の局在が存在することを示唆していると考えられた。

While the consumption of rice is decreasing annually, the proportion of rice consumed in eating out and ready-made meals is on the rise. Cooked rice used for eating out and ready-made meals is cooked in large quantities, so hardness and stickiness are important physical properties when handling it. Therefore, this study aimed to analyze the detailed protein localization within rice grains and its relationships with the hardness and stickiness of cooked rice. Six rice varieties were cultivated in three replications each, and two years of data analysis were conducted. Regarding the surface hardness, no correlation with protein content was observed. However, for the overall hardness of cooked rice, multiple regions within the rice grain showed a negative correlation with protein localization. Conversely, the surface stickiness of cooked rice exhibited a positive correlation with protein content in the surface region and a negative correlation with protein content in the central region. Similar trends were observed for the overall stickiness of cooked rice. These results suggest the presence of physical properties influenced by protein content and those unaffected, indicating the existence of protein localization related to hardness and stickiness.

protein localization, cooked rice physical properties

講演番号：2B2p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 B2 会場

フリーポアラテアートの自動作製

Automated free-pour latte art

○武政 誠、河北 彩翔（東京電機大理工）
○Makoto TAKEMASA, Ayaka Kawakita (Tokyo Denki Univ.)

食のおいしさは、低分子化合物による化学的な味、高分子による食感が大きく影響するが、外観もおいしさや楽しさに影響する。コーヒーでは化学的な味及び香りが重要であるが、スチームドミルクを注ぐ手技だけで芸術的な形状を描く「フリーポアラテアート」は、食品の外観がおいしさ及び食の楽しさに大きな影響を与える代表例ともいえる。一方、特殊な形状や外観を実現するためには、膨大な訓練を積む、また下準備が必要など誰でもいつでも容易に作製する事は容易ではない。フリーポアラテアートの自動化には、手技の模倣を実現する装置の自動化も必須であるが、なによりスチームドミルクの各種物性が重要である、と我々は考えており、まずミルク作製を自動化する装置を開発した。これにより高品質のミルクを安定して作製することが実現し、比較的短時間で誰でもフリーポアラテアートの手技を一定レベルまで習得するために有用なツールとなった。また、牛乳の殺菌法方法や食用界面活性剤の添加、さらに温度履歴など各種条件により、微細気泡の安定性への影響、ラテアートに適したミルクを作製可能か、を安定評価可能となった。この自動作製ミルクを利用してエスプレッソにミルクを自動で注ぐ装置も開発し、フリーポアラテアートの自動化を実現した。

Both chemical and physical taste are mainly responsible for food deliciousness. Another important factor is the appearance of food. Chemical taste and aroma are generally important in drinks such as coffee. Free-pour Latte Art, having artistic shapes on the surface simply by pouring steamed milk, is an example of how the appearance of food has a great impact. Drawing a special shape requires long and hard training in general, making it difficult to learn. To establish automated free-pore latte art machine, a series of physical properties of steamed milk are most important. First, we developed a machine to make the milk customized for free pour latte art. This made it possible to stably produce high-quality foamed milk, and is useful to learn the free-pore latte art drawing technique. In addition, for an evaluation of various factors affecting quality of milks, whether the milk is suitable for free-pour latte art or not., such as the temperature history, ingredients, such as the chemical structure and amount of edible surfactants, are investigated. Based on the automated milk foaming machine for free-pore latte art, we combined a pouring machine of the foamed milk into espresso, realizing automation of free-pore latte art as the system.

free pour latte art, milk, coffee

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2B2p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 B2 会場

小角 X 線散乱と赤外分光による米粉の内部構造評価に関する研究

Study on the evaluation for internal structure of rice flour by SAXS and IR spectroscopy

○石川 大太郎、楊 嘉敏、七島 なつみ、山田 栞菜、藤井 智幸（東北大院農）
○Daitaro ISHIKAWA, Jiamin YANG, Natsumi SHICHISHIMA, Kanna YAMADA, Tomoyuki FUJII (Grad. School of Agric. Sci.)

本研究は、物理的変換操作を施した米粉の内部構造を小角 X 線散乱と振動分光法を用いて測定することで、米粉の内部構造評価と定量化を行うことを目的として実施した。異なる製粉処理によって調製した 6 種類の結晶性米粉試料とα化米粉が準備された。小角 X 線は、2θ＝0.06-4.00° の範囲を、Smart Lab（リガク(株)製）を用いて、0.01° 間隔で測定した（管電流は 200 mA、X 線電圧は 45 kV）。赤外スペクトルは、FT/IR6300（日本分光(株)製)を用い、4000-100 cm^{-1} の領域を 4 cm^{-1} 間隔で、ATR 法で測定した。小角 X 線散乱パターンでは、散乱ベクトルの 0.4-0.9 nm^{-1} の範囲に米粉の秩序構造に対応するバンドが観測された。本研究では、結晶性米粉のこのバンドの強度とα化米粉の比を用いて、米粉の秩序構造を評価する秩序性指標(order parameter)を提案した。秩序性指標と米粉の真密度の間には負の相関があることがわかった。さらに、グルコースの C6 の COH 振動に起因する赤外スペクトルの 990cm^{-1} の強度は、秩序性指標が増加すると低波数シフトした。以上から米粉中の秩序化とは水の結晶化に類似した構造形成であることが示唆された。さらに、このバンドは 0.11-0.7a_w 付近では波数位置に変化がなく、0.7a_w 以上では高波数側にシフトする傾向が見られた。この結果、等温下での米粉のガラス/ラバー状態を振動分光法にて評価可能であると考えられた。

The aim of this study was to investigate the internal structure of rice flour subjected to physical treatment with non-heating, milling, and water sorption on the base of the structural evaluation of rice flour using SAXS and IR spectroscopy. SAXS 0.06–4.00° of range was measured using a Smart Lab (Rigaku Co.) with 0.01° intervals of 2θ. The tube current and X-ray voltage were 200 mA and 45 kV, respectively. ATR-IR spectra within the 4000–100 cm^{-1} was measured by FT/IR6300 (Jasco. Co.) with 4 cm^{-1} intervals. Several types of rice flour samples were gradually prepared by different milling treatments. SAXS pattern of the samples occurred a band within the 0.4–0.9 nm^{-1} of the scatter vector; q owing to the ordered structure in rice flour. The order parameter was suggested by the intensity of this band and it was found the negative correlation between order parameter and trued density of rice flour. The intensity at 990 cm^{-1} of IR spectra due to the COH vibration of C6 of glucose was shifted to low wavenumber corresponding to order parameter. Thus, the formation of ordered structures in rice flour was similar to that of water crystallization. Moreover, this band showed no change in wavenumber position around 0.11-0.7 a_w, and tended to shift to higher wavenumbers above 0.7 a_w. This result revealed that the water-induced transition of glass to rubber of the starch-based food polymer can be clearly evaluated through vibrational spectroscopy.

SAXS, FTIR, Rice flour

発表責任者：石川大太郎（daitaro.ishikawa.e3@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B2p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 B2 会場

望む食感を与える食品構造設計に向けた 3D プリント食品の自動食感評価法開発

Development of automated food texture measurement system of 3D printed food toward establishing design guideline of desired food texture

○金子 瑠晟、武政 誠（東京電機大理工）
○Ryusei KANEKO, Makoto TAKEMASA (Tokyo Denki Univ.)

食品の美味しさの約 6 割は、食感に由来すると言われている。食品の内部構造により、多様な食感が創出される。フード 3D プリンタでは、材料を設計通りに空間配置できるため、多様な食感を制御することが可能である。一方、望む食感を得るために、どのような材料をどのような構造でプリントすればよいか、その設計指針は確立していない。これは食感が主として高分子間の相互作用に起因しており、各種物性予測、特に咀嚼時における大変形応答は高分子ならではの強い非線形性により事実上予測が不可能なケースも少なくない。この食品構造の設計指針確立は、フードプリンタで食感を設計する上で大きな課題である。指針がなくとも全数検査により逆引きとして、希望の食感を与える構造を検索することも原理的には可能であるが、最小構造を天然物に倣って細胞サイズとすると事実上無数の構造が存在する。代表的な構造に限定してプリント、食感評価を行い、未試験の構造の食感を機械学習を用いて予測することで、望む食感を与える構造の推定が可能になると考えられる。本研究では、目的の食感を生み出す食品の材料と構造の推定を可能にすることを目的とした。機械学習による推定を高精度に行うためには、ビッグデータが必要となる。本研究では、圧縮試験の効率化を実現するべく、3D プリント食品の自動圧縮試験法の開発に取り組んだ。これにより、食品構造推定のためのビックデータの取得が期待される。

More than 60 percent of deliciousness comes from food texture. An internal structure of foods is generally responsible for food texture, which is potentially controlled by 3D printing. Spatial placement of food materials can be designed by food 3D printer. On the other hand, general guideline of food texture design has not been established, which is probably due to the strong non-linearity of stress-strain relationship of foods especially in case of large deformation. This is the remained big challenge to apply food 3D printing to design food texture. Due to the existence of plenty of structures, it is impossible to evaluate all the structures. Only from the results of selected structures, the overall tendency could be predicted by using deep learning even for the untested structure. For more appropriate prediction, larger number of real compression data are required, so-called bigdata, the key role in deep learning. In this study, a system to print a series of food based on pre-set structure using 3D printer, and to perform compression test to evaluate food texture of the printed foods. This enables effective measurements to investigate the structure-texture relationship of the food.

food 3D printer, food texture, structure-food texture relationship

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2B2p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 B2 会場

赤外/遠赤外分光スペクトルによる糖添加ゼラチンゲルの解析

Structural analysis on the addition effect of sugar in gelatin gel by infrared spectroscopy.

○七島 なつみ、楊 嘉敏、石川 大太郎、藤井 智幸（東北大院農）
○Natsumi SHICHISHIMA, Jiamin YANG, Daitaro ISHIKAWA, Tomoyuki FUJII (Tohoku Univ.)

本研究では、赤外/遠赤外分光スペクトルからゼラチンゲル内部の水素結合状態を評価し、その物性との相関について実験的に検討した。赤外分光スペクトルから直線状水素結合に対応する 3210 cm^{-1} と歪んだ水素結合に対応した 3374 cm^{-1} のバンドの強度比; A_{3210} / A_{3374} に、赤外/遠赤外スペクトルから構造化した水に対応する 585cm^{-1} と 362 cm^{-1} のバンド強度比; A_{585} / A_{362} に着目した。糖溶液の濃度依存性を検討したところ、A_{3210} / A_{3374} と A_{585} / A_{362} との間に正の相関が認められたことから、直線状水素結合と構造化している水分子が糖濃度に依存して増加することが示された。ゼラチンゲルの場合、ゼラチン濃度が増加するとヤング率の増加とともにタンパク質のβシート含量も増加する傾向が認められたが、A_{3210} / A_{3374} と A_{585} / A_{362} はそれほど変化しなかった。故に、ゼラチンの硬化に関しては水素結合や水分子の構造化の寄与は小さく、タンパク質の二次構造が影響していることが示唆された。ゼラチンゲルは、糖の添加によってヤング率が増加し、A_{3210} / A_{3374} と A_{585} / A_{362} も増加した。一方で、βシート含量は減少した。この傾向は、ゼラチンに対する糖含量が高い場合に見られ、過剰になると認められなかった。したがって、添加した糖に由来する水素結合や水分子の構造化がゼラチンゲルの二次構造の変化を誘起し、結果として硬化する可能性が示唆された。以上の結果から、糖添加によってゼラチンゲルの内部構造を変化させることによって、マクロな物性を制御することが可能であることが示唆された。

Glucose, sucrose and maltose solution with 0-30% concentration were prepared, and gelatin gel samples containing them was produced. The intensity ratio index; A_{3210}/A_{3374} was suggested by IR spectra at 3210 and 3374 cm^{-1} due to linear and distorted hydrogen bond network, respectively. And the ratio index: A_{585} /A_{362} also developed using FIR spectra at 585 and 362 cm^{-1} of IR/FIR region corresponding to structured water in solution. The positive correlation between A_{3210}/A_{3374} and A_{585} /A_{362} in different concentration was observed. Thus, it suggested that the linear hydrogen bond network and structured water in solution increased according to concentration of sugar. Young's modulus and spectra indices obtained from gelatin gel increased with concentration of suger, respectively. Thus, it suggested that the addition of sugar affected the internal structure of the gelatin gel.

Reference：D. Ishikawa, R. Shinohara, N. Shichishima, and T. Fujii, Potential of IR Spectra in the 1000-100 cm-1 Region Combined with that in the 4000-3000 cm-1 Region to Evaluate the State of Water, Applied Spectroscopy, 77(9), 1087-1094 (2023)

gelatin gel, IR/FTIR, hydrogen network

講演番号：2B2p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 B2 会場

腸内細菌脂質代謝物 HYA の生理機能に関する臨床研究結果

Clinical studies on the physiological functions of HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid), a lipid metabolite produced by gut microbes

○若山 水歩（Noster 株式会社）
○Mizuho WAKAYAMA (Noster Inc.)

食事には様々な資質が含まれており、腸内細菌にはこれらの脂質を代謝・変換する機能があることが判ってきている。近年、これらの脂肪酸について、宿主の健康との関連性や、その生理機能について、関心が高まっている。HYA（10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid）は、乳酸菌などの腸内細菌がリノール酸を代謝することによって産生される初期代謝物で、宿主の生体恒常性維持に関与する。
我々は、植物油を乳酸菌で変換させることで純度 50%の HYA のパイロットスケールでの生産に世界で初めて成功した。更に、我々は本品を用いて、食後の血糖値上昇抑制、内臓脂肪低減、便通改善の 3 つの効果について臨床試験で確認した。

食後血糖値が高めの方を対象とした試験では、本品を食前に単回摂取した人で食後血糖値の抑制が認められた。また、BMI が高めの方を対象とした試験では、本品を 12 週間継続摂取した際に腹部内臓脂肪面積が有意に低くなることが認められた。更に、健常者を対象とした試験では、本品を 2 週間接種した人で排便回数が優位に増加し、便通が改善する効果が認められた。

HYA は腸内細菌により産生されるが、食品にも含まれている自然由来の化合物であり、今回報告したいずれの臨床研究においても有害事象は観察されなかった。これらの結果から、HYA が血糖値上昇抑制、内臓脂肪低減、便秘改善など宿主にもたらす生理活性の一部を示すものと考えられた。

HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid) emerges as an early metabolite produced by the breakdown of linoleic acid by lactic acid bacteria and other intestinal microorganisms and is crucial for maintaining the host's homeostasis.

In a world-first, we developed pilot-scale production process of HYA with 50% purity. Subsequent clinical studies with HYA-50% showed three significant effects on human health: curbed postprandial blood glucose levels; diminished abdominal visceral fat area; and ameliorated bowel movements.

These clinical outcomes demonstrate that the metabolic benefits of HYA contribute to a host's physiological well-being.

metabolite, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, intestinal microorganisms

発表責任者：若山 水歩（m.wakayama@noster.inc）

講演番号：2B2p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 B2 会場

低グリセミックインデックス食品のセカンドミール効果

Second meal effect of low glycemic index foods

○東口 夢[1]、池ノ内 佳苗[2]、小澤 真理子[2]、中村 健一郎[3]、鈴木 靖志[1,4]([1]武庫川女子大学食物栄養科学部食創造科学科、[2]株式会社シュガコン、[3]コトノーツ、[4]武庫川女子大学バイオサイエンス研究所)

○Yume HIGASHIGUCHI[1], Kanae IKENOUCHI[2], Mariko OZAWA[2], Kenichiro NAKAMURA[3], Yasushi SUZUKI[1,4] ([1]School of Food Sci. and Nutr. Mukogawa Women's Univ., [2]Syugacon Co. Ltd., [3]Kotonotes, [4]Bioscience Lab. Mukogawa Women's Univ.)

【目的】本研究では、低グリセミックインデックス（GI）をコンセプトに開発された食品（GI デリ）を朝食として摂取した後の血糖値変動プロファイル、特に昼食摂取後の血糖値変動への効果、いわゆるセカンドミール効果を評価することを目的とした。【方法】被験者は 20～60 代の男女、合計 100 名をリクルートし、FreeStyle リブレ（Abbott 社製）の装着期間中に朝食として「サトウのご飯」または「GI デリ」を摂取した場合の昼食（いずれも「サトウのご飯」）摂取後の血糖値変動を記録し、血糖値下面積(AUC)、血糖値上昇の傾き、血糖値が初期値範囲（10%以内）に戻るまでの時間など、血糖値変動パターンの特徴を示す 10 種類の指標を設定して、2 つの試験食間を比較した。【結果】AUC は 20 代と 30 代～50 代で傾向が逆転し、30 代～50 代では GI デリ群が低値を示した。さらに 30 代～50 代は、GI デリ群が最高値から空腹時に戻るまでの時間が有意に短くなり、60 分における傾きが有意に緩やかになることが見いだされた。本結果より、30 代～50 代において、GI デリを朝食として摂取することにより、昼食の血糖値上昇が緩やかになることが示された。

[Purpose] In this study, we investigated the blood glucose level fluctuation profile after consuming “GI Deli”, developed based on the concept of low glycemic index (GI) as breakfast, and in particular the effect on blood glucose level fluctuation after lunch intake; the second meal effect. [Methods] A total of 100 subjects, males and females in their 20s to 60s, were recruited. Blood glucose fluctuations were recorded after lunch consumption when "Sato Rice" or "GI Deli" was consumed as breakfast during the period of wearing FreeStyle Libre (Abbott). Ten indices, such as the area under the blood glucose level (AUC), the slope of the blood glucose rise, and the time it takes for the blood glucose level to return to the initial range (within 10%), each of which indicates some characteristics of blood glucose fluctuation pattern, and compared between the two test meals. [Results] The AUC trend was reversed between the 20s and 30-50s, with the GI Deli group showing lower values in the 30-50s. In addition, the GI Deli group in their 30s to 50s showed a significantly shorter time from the highest value to the return to fasting, and the slope at 60 min was significantly slower. These results indicate that breakfast consumption of a GI deli moderates the rise in blood glucose levels at lunch for people in their thirties to fifties.

Low glycemic index, Second meal effect, Evaluation by age group

講演番号：2B2p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 B2 会場

G タンパク質共役エストロゲン受容体の活性化を介したピセアタンノールの抗肥満効果

Anti-obesity effects of piceatannol via activation of G protein-coupled estrogen receptor

○有澤 琴子[1]、松岡 愛弓[2]、小澤 菜月[2]、市 育代[2]、藤原 葉子[2]([1]東北大院薬、[2]お茶大院ライフ)
○Kotoko ARISAWA[1], Ayumi Matsuoka[2], Natsuki Ozawa[2], Ikuyo Ichi[2], Yoko Fujiwara[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Ochanomizu Univ.)

【目的】ピセアタンノール（3, 3', 4, 5' tetrahydroxy-trans-stilbene; PIC）は天然に存在するレスベラトロールの類縁体で、抗がん、抗酸化、抗炎症作用など多くの有益な効果があると考えられている。我々は最近、閉経後肥満モデルマウスにおいて PIC が内臓脂肪蓄積を有意に抑制することを報告した。その作用機序として白色脂肪組織におけるトリアシルグリセロール分解を担うホルモン感受性リパーゼ（HSL）のリン酸化が、PIC により誘導されることを見出した。本研究では PIC による HSL 活性化の詳細なメカニズムを明らかにすることを目的とし、3T3-L1 脂肪細胞における PIC の脂肪蓄積抑制効果およびその機序の解析を行なった。
【方法】3T3-L1 脂肪細胞は分化誘導開始後 6 日目に用い、PIC は各実験において 25 μM の濃度で添加した。阻害剤は PIC と同時添加あるいは 1 時間の前処理を行なった。HSL リン酸化は PIC 添加後 30 分あるいは 60 分の時点で回収した細胞の Western blotting によって評価した。
【結果・考察】PIC の添加により 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積は減少し、HSL のリン酸化が誘導された。PKA の拮抗薬である H89 によりそのリン酸化レベルは低下し、PKA を介していることが示された。PKA 活性化の上流因子のひとつである β-アドレナリン受容体の阻害剤 propranolol を添加しても、その作用は変化しなかった。しかし、G 蛋白共役型エストロゲン受容体（GPER）の選択的拮抗薬である G15 を添加すると、PIC によって増加した HSL のリン酸化レベルは抑制された。また、GPER のアゴニストであるエストラジオールも PIC と同様に HSL リン酸化を促進し、そのリン酸化は G15 により抑制された。以上の結果より、PIC による HSL のリン酸化機構の少なくとも一部には、GPER の活性化が寄与することが明らかになった。

Piceatannol (3, 3', 4, 5' tetrahydroxy-trans-stilbene; PIC) have several beneficial effects such as antioxidant, anti-cancer, and anti-inflammatory activity. We reported that PIC significantly suppressed visceral fat accumulation in ovariectomy mouse and found that the activation of hormone-sensitive lipase (HSL) in white adipose tissue was induced by PIC treatment. In this study, we investigated in detail the effects using 3T3-L1 adipocytes to clarify the mechanism by which PIC inhibits fat accumulation. PIC decreased fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes and induced phosphorylation of HSL; its phosphorylation level was reduced by H89, an antagonist of PKA, indicating that it is mediated by PKA. The addition of propranolol, an inhibitor of the β-AR did not alter its action. In other hand, the addition of G15, a selective antagonist of the GPER, decreased HSL phosphorylation levels which was increased by PIC. These results indicate that activation of GPER contributes at least in part to the mechanism of HSL phosphorylation by PIC.

polyphenol, adipocyte, estrogen

発表責任者：有澤琴子（kotoko.arisawa.b3@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B2p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 B2 会場

豆腐の微細構造とゲル強度に及ぼすトリグリセリドの脂肪酸組成の影響
Effect of fatty acid composition of triglycerides on the microstructure and gel strength of tofu
○油屋 和[1,2]、丸岡 早紀[3]、室井 由起子[1]、杉元 康志[1]、渡邉 啓一[1] ([1]九州栄養福祉大、[2]鹿大院連農、[3]九大院農)
○ Izumi ABURAYA[1,2], Saki MARUOKA[3], Yukiko MUROI[1], Yasushi SUGIMOTO[1], Keiichi WATANABE[1] ([1]Kyushu Nutrition Welfare Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Kyushu Univ.)

大豆油の脂肪酸組成は、通常リノール酸約 50%、オレイン酸約 20%であるが、高オレイン酸系統大豆は、オレイン酸含量が 80%以上で著しく高い。

我々は、分離大豆タンパク質（SPI）に通常の大豆油（SO）または高オレイン酸大豆油（HOSO）を添加して豆乳を調製後、凝固剤として $CaSO_4$ を加え、脂質組成の異なる 2 種の豆腐を作成した。走査型電子顕微鏡で観察した結果、HOSO 豆腐は、SO 豆腐より、密度の高い均一な微細構造をしていることを見出した。さらに、豆腐のゲル強度に及ぼす脂肪酸組成の影響を調べるために、SPI に SO または 80%オレイン酸を含むオリーブオイル（OO）を添加して豆腐を作成し、破断強度試験を行った。その結果、OO 豆腐は、SO 豆腐よりゲル強度が高く、弾力があることが分った。この OO 豆腐の物性は、HOSO 豆腐がより密度の高い微細構造を有していたという結果と一致しており、トリグリセリド中の高いオレイン酸含量に起因するものと考えられる。

ここでは、上記の研究結果の発表と共に、トリグリセリド中の脂肪酸組成が豆腐の微細構造やゲル強度に影響を及ぼすメカニズムについて考察を述べる。

The fatty acid composition of soybean oil is usually about 50% linoleic acid and 20% oleic acid, but high oleic acid soybean varieties have a significantly high oleic acid content of 80% or more.

We prepared soymilk by adding regular soybean oil (SO) or high oleic soybean oil (HOSO) to soy protein isolate (SPI), then added $CaSO_4$ as a coagulant to create two types of tofu with different lipid compositions. Observation using a scanning electron microscope revealed that HOSO tofu has a denser and more uniform microstructure than SO tofu. Furthermore, to investigate the effect of fatty acid composition on the gel strength of tofu, tofu was prepared by adding SO or olive oil (OO) containing 80% oleic acid to SPI, and the gel hardness of tofu was analyzed. The results showed that OO tofu had higher gel strength and elasticity than SO tofu. This physical property of OO tofu is consistent with the result that HOSO tofu had a denser microstructure, which may be attributed to the higher oleic acid content in the triglycerides.

Here, we present the above research results and discuss the mechanism by which the fatty acid composition in triglycerides affects the microstructure and gel strength of tofu.

tofu, soy protein isolate, fatty acid composition of triglycerides

発表責任者：渡邉啓一（watakei@knwu.ac.jp）

講演番号：2B2p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 B2 会場

デキサメタゾン誘導性筋萎縮のコレステロール代謝を介した病態制御

Regulatory mechanism of dexamethasone-induced muscle atrophy via cholesterol metabolism

○市 育代[1]、久保 慧[2]、清水 誠[1] ([1]お茶大 基幹研究院、[2]お茶大 ライフサイエンス)
○Ikuyo ICHI[1], Chie KUBO[2], Makoto SHIMIZU[1] ([1]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ.)

抗炎症薬として用いられる合成グルココルチコイドのデキサメタゾン(DEX)は筋萎縮を誘導することが知られている。血中コレステロール低下薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤のスタチンも副作用として筋障害を生じる。グルココルチコイドは肝臓などにおいて脂質代謝を変化させるが、骨格筋でもコレステロール代謝が変化し、その変化が筋萎縮を誘導するかは不明である。本研究では、DEX 誘導性筋萎縮細胞においてコレステロール代謝が変化し、筋萎縮の悪化に関与するかを検証する。

10μM の DEX を添加したマウス横紋筋由来細胞株 C2C12 筋管細胞では、筋管直径の減少と筋分解マーカーである Atrogin-1 の遺伝子及びタンパク質発現が増加しており筋萎縮を確認した。この筋委縮モデル細胞では細胞内のコレステロール量が減少傾向にあり、Desmosterol 等のコレステロール中間産物及び HMG-CoA 還元酵素などのコレステロール合成関連酵素の遺伝子発現も減少していたことから、DEX 誘導性筋委縮細胞ではコレステロール合成が低下している可能性が示唆された。そこで、コレステロールの前駆物質である Desmosterol を添加したが、筋管直径や Atrogin-1 の遺伝子発現に変化は見られなかった。次に、HMG-CoA 還元酵素の産物であるメバロン酸を添加すると、筋管直径が回復した。以上の結果より、DEX 誘導性筋委縮には「Post squalene pathway」ではなく、「Nonsterol isoprenoids pathway」の産物の減少が関与している可能性がある。これらの物質はタンパク質のプレニル化やミトコンドリア機能維持に重要であることから、現在、メカニズムの解明も含めて「Nonsterol isoprenoids pathway」の産物に関して筋萎縮に対する影響を検討している。

Statins, drugs that lower blood cholesterol, produce muscle damage as a side effect. Dexamethasone (DEX), an anti-inflammatory drug, is also known to induce muscle atrophy, but it is not known whether cholesterol metabolism is altered in DEX-induced atrophic cells and whether these changes induce muscle atrophy. First, in DEX-treated C2C12 myotube cells, myotube diameter was decreased, the level of intracellular cholesterol tended to decrease, and the level of cholesterol intermediate products and the gene expression of cholesterol synthesis enzymes were also decreased. Addition of Desmosterol, a cholesterol precursor, did not alter myotube diameter, while addition of mevalonic acid, a product of HMG-CoA reductase, restored myotube diameter. These results suggest that the reduction of products of the "Nonsterol isoprenoids pathway" may be involved in Dex-induced muscle atrophy, and we are currently investigating the mechanism.

Muscle atrophy, Cholesterol, C2C12 cell

発表責任者：市　育代（ichi.ikuyo@ocha.ac.jp）

講演番号：2B2p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 B2 会場

干ばつストレス時に発生するバレイショの加工特性変化

Changes in Processing Characteristics of Potatoes under Drought Stress

○川本 健太、増冨 裕文、吉岡 睦美、根岸 順子、阿久津 圭子、鶴見 貴志、石原 克之（カルビー株式会社）
○Kenta KAWAMOTO, Hirofumi MASUTOMI, Mutsumi YOSHIOKA, Junko NEGISHI, Keiko AKUTSU, Takashi TSURUMI, Katsuyuki ISHIHARA (Calbee, Inc.)

地球規模の気候変動に伴う降雨量減少は日本の作物生産に大きな影響を与えている。バレイショ(*Solanum tuberosum L.*)も同様の影響を受けており、植物体の生長不全や塊茎収量の低下を引き起こしている。特に 2021 年度、北海道帯広地区で発生した大規模な干ばつはバレイショの生産に甚大な被害を引き起こし、加工用品種「トヨシロ」でその収量低下が顕著であった。そこで本研究では 2021 年度の干ばつを模倣した生育条件でバレイショを栽培し、得られたストレス株（DS）とコントロール株（CT）の塊茎の力学特性や遺伝子発現量を解析した。さらに、糖や遊離アミノ酸、二次代謝物の分析を行い、DS 株と CT 株で見られる代謝変動を探索した。その結果、干ばつストレスに伴い、塊茎では組織の軟化および荷重負荷時の変形歪み率の上昇が検出され、*XTH, FLA* など糖の転移に関連する遺伝子群の発現変動が確認された。これは、干ばつストレスを負荷した塊茎では加工特性や食味・食感に変化がもたらされるものと示唆された。加えて DS 株において L-アスパラギン含量が増加傾向であり、グルタミン作動性アスパラギン合成酵素 *ASN* の遺伝子発現量上昇が確認された。さらに各塊茎をフライ加工したところ、DS 株を用いたフライ品においてアクリルアミド量の増加が検出された。アクリルアミドは還元糖とアスパラギンから生成されるが、糖分析では CT 株と DS 株に差はなく、DS 株で増加するアクリルアミドはアミノ酸起因である可能性が示唆された。今後は、ストレス応答時の力学的・遺伝子学的な変化を品種間で解析することで、持続可能なバレイショ生産および加工食品の製造に繋がる知見が得られると期待される

The large-scale drought that occurred in Hokkaido in 2021 caused severe damage to the production of processing potatoes (*Solanum tuberosum L.*), and the yield loss of the cultivar "Toyoshiro," which is used for fried products such as potato chips, was especially noticeable. In this study, we cultivated potatoes under growth conditions that mimicked past drought reductions and examined the mechanical properties and molecular biological changes of the resulting tubers. Drought stress caused tissue softening and upregulated expression of genes related to sugar translocation in the tubers. This suggests that drought stress induces changes in processing characteristics, taste, and texture in tubers under drought stress. In the future, it is expected that a better understanding of changes in material properties in response to environmental stress will be developed, leading to sustainable crop production and the processed foods.

Potato, Drought Stress, Food Processing

発表責任者：川本 健太（k_kawamoto@calbee.co.jp）

講演番号：2B2p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 B2 会場

コーヒー食品のレシピ検討と官能試験による風味特徴の評価

Improvement the recipe and sensory evaluation for flavor characterization of solid coffee

○浅岡 那月、岩井 和也、垣内 美紗子、浦川 夏帆、中川 真緒、福永 泰司（UCC 上島珈琲株式会社 R&D 本部）
○Natsuki ASAOKA, Kazuya IWAI, Misako KAKIUCHI, Natsuho URAKAWA, Mao NAKAGAWA, Taiji FUKUNAGA (R&D Division, UCC Ueshima Coffee Co., Ltd)

コーヒーは一般的に焙煎豆の抽出液が飲用される。我々は過去に微粉砕コーヒー豆とコーヒーオイル、植物油脂を混錬し固形化したコーヒー食品を開発した(Kobayashi *et al.*, 2018)。この食品の最適なレシピ検討と特徴の評価を目的として官能評価および成分分析を実施したので報告する。

コーヒー食品中に微粉砕コーヒー豆は 15%～40%配合され、その風味は味覚設計において重要である。また、開発を進める中で副原料である粉糖の配合量が食品の風味に影響することが示唆された。そこで、官能評価および香気成分分析によるレシピ検討の結果、コーヒー食品に適したコーヒー豆の種類および粉糖配合量を決定した。次に、決定したレシピにおいて食品の特性を明らかにするために成分分析と官能評価を実施した。喫食量あたりで比較すると、コーヒー食品のカフェイン含量は抽出液の約 0.2 倍~0.5 倍、食物繊維は 2.7 倍～6.2 倍だった。さらに GC-MS を用いた香気成分分析により、コーヒー食品に多く含まれる香気成分を特定した。また、官能評価の結果より味わいの複雑さや豊かな香りがコーヒー食品の特徴であることが示された。

本研究により、豊かなコーヒーの香味や余韻を有する食品が開発され、コーヒーの新たな魅力を発見した。

We have successfully developed a coffee-based food product (solid coffee), incorporating finely ground coffee beans, coffee oil, and vegetable oil into a solidified form. This report outlines our comprehensive sensory evaluation and compositional analysis aimed at refining the recipe and understanding the product's characteristics.

The flavor of the finely ground coffee beans and the sugar content significantly influence the flavor profile of solid coffee. Based on meticulous sensory evaluation, we identified the optimal combination of coffee beans and sugar content. Subsequently, we conducted component analysis and sensory evaluation for a detailed characterization of solid coffee.

The results of the compositional analysis revealed that our solid coffee contains approximately 0.2–0.5 and 2.7–6.2 times more caffeine and dietary fiber, respectively compared to traditional coffee extract. The sensory evaluation affirmed that the complex taste and rich aroma of solid coffee are distinctive and indicative of the true essence of coffee.

coffee-based food, sensory evaluation, GC-MS

講演番号：2B2p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 B2 会場

ピペリン-α-シクロデキストリン包接体の溶解性および吸収性評価
Evaluation of solubility and oral absorption of piperine-α-cyclodextrin complex
長谷川 莉沙、近本 啓太、○上梶 友記子、石田 善行、中田 大介、佐藤 有一、寺尾 啓二 ((株)シクロケムバイオ)
Risa HASEGAWA, Keita CHIKAMOTO, ○ Yukiko UEKAJI, Yoshiyuki ISHIDA, Daisuke NAKATA, Yuichi SATO, Keiji TERAO (CycloChem Bio Co., Ltd.)

【目的】コショウやヒハツに含まれる辛み成分のピペリンは、血圧低下作用や冷え・むくみの改善作用が報告されており、機能性表示食品の関与成分として利用されている。更に、ピペリンはビタミンやミネラルなどの吸収を高める効果も報告されているが、ピペリン自体は水溶性が低いため、体内に吸収されにくい。シクロデキストリン（CD）は包接作用により脂溶性物質の水溶性や吸収性を高めることができ、食品や医薬品の分野で幅広く利用されている環状オリゴ糖である。本研究では、ピペリンの水溶性や経口吸収性の改善を目的としてピペリン-CD 包接体を作製し、ピペリンの水に対する溶解性および腸管吸収モデルである Caco-2 細胞を用いた膜透過性を評価した。
【方法】包接体の作製：ビーカーにピペリンと α-, β-, γ-CD を量り取り、水を加えて撹拌した後、凍結乾燥にて各種ピペリン-CD 包接体粉末を得た。溶解性試験：水にピペリン-CD 包接体を加えて 25°C, 160 rpm で 2 時間振とう後、0.2 μm PTFE フィルターを通し、ろ液中のピペリン量を HPLC にて分析した。膜透過性試験：Caco-2 細胞単層膜は常法に従って作製した。ハンクス平衡塩溶液（HBSS）から調製した人工腸液に試料を添加した溶液を Apical 側に、1% α-CD を加えた HBSS を Basal 側にそれぞれ添加し、2 時間後に Basal 側に透過したピペリン量を HPLC にて分析した。
【結果・考察】全てのピペリン-CD 包接体において、水に対するピペリンの溶解性が改善し、特に α-CD 包接体では飛躍的な溶解性の向上が認められた。また、Caco-2 細胞を用いた膜透過性試験においても、ピペリン-α-CD 包接体が最も高い膜透過性を示した。以上の結果から、ピペリンを α-CD で包接することでピペリンの水溶性や膜透過性が改善し、経口吸収性が高まることが示唆された。

Piperine, the pungent ingredient of long pepper, has functions such as antihypertensive activity, improving coldness and swelling. More interestingly, piperine has been reported to increase the absorption of vitamins and minerals. However, the oral absorption of piperine is poor due to its low water solubility. In this study, the effects of cyclodextrin (CD) to improve the water solubility and permeability through Caco-2 cell monolayer membrane of piperine were investigated. As results, the water solubilities of all piperine-CD complexes were improved, and piperine-α-CD complex showed the highest solubility. The permeability of piperine was also significantly improved with piperine-α-CD complex. These results suggest that the complexation with α-CD was improved the water solubility and permeability of piperine and increased its oral absorption.

piperine, α-cyclodextrin, oral absorption

発表責任者：上梶 友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

講演番号：2B2p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 B2 会場

微粉砕処理がセルロースをはじめとする食物繊維に与える影響について

The effect of micronization process on cellulose, a major component of dietary fiber.

○吉田 暁登[1]、小西 正朗[2]、邱 泰瑛[2] ([1]北見工大院、[2]北見工大)
○Akito YOSHIDA[1], Masaaki KONISHI[2], Tai-Ying CHIOU[2] ([1]Kitami Inst. of Tech Grad., [2]Kitami Inst. of Tech)

食物繊維は水への溶解性から、不溶性食物繊維（IDF）と水溶性食物繊維（SDF）に大別され、SDF は高分子量（SDFP）と低分子量（SDFS）に細分化される。不溶性食物繊維は分散性や水への溶解性が低いことが知られている。そこで、マッハ 2 の速度で加圧した原料をセラミックボールに衝突させて分散・粉砕をする湿式微粒化装置（Star burst mini、 SUGINO）を適用することで改善が期待できる。最初に食物繊維のモデルとして、植物の細胞壁の主成分であるセルロースを使用し、微粉砕工程が食物繊維に与える影響について調査する。微粉砕条件は、サンプルを 1%濃度で蒸留水に分散し、微粉砕処理回数を 1, 10, 25, 50 回に設定した。食物繊維測定について、酵素消化後のろ過残渣の重量（IDF）、高濃度エタノールでの沈殿物量（SDFP）、HPLC 分析（SDFS）による定量で求める。結果として、サンプルの不溶性分が 1.2-3.4%程減少し、可溶性分に大きな変動は見られない。一方、微粉砕処理回数を増やしていくと、流動性が変化し、見かけ粘度が増大したことを確認した。本講演では、上記の研究とともに、現在取り組んでいる粒度分布測定、ゼータ電位測定などの分散性の評価についても紹介したい。

Dietary fiber is broadly categorized into insoluble dietary fiber (IDF) and soluble dietary fiber (SDF) based on its solubility in water, with SDF further divided into high molecular weight (SDFP) and low molecular weight (SDFS). IDF is known for its low dispersibility and solubility in water. Therefore, improvement can be expected by applying a wet micronization device (Star burst mini, SUGINO), which disperses and pulverizes raw materials by colliding them with ceramic balls at a speed of Mach 2. Initially, cellulose, the main component of plant cell walls, was used as a model for dietary fiber, and the effect of micronization on dietary fiber was investigated. Micronization conditions involved dispersing the sample in distilled water at a concentration of 1% and setting the micronization processing cycles at 1, 10, 25, and 50. For dietary fiber measurement, the weight of the residue after enzymatic digestion (IDF), the amount of precipitate in high-concentration ethanol (SDFP), and quantification through HPLC analysis (SDFS) were determined. As a result, the insoluble fraction of the sample decreased by approximately 1.2-3.4%, revealing no obviously change in the soluble fraction. However, increasing the number of micronization cycles led to changes in flowability, confirming an increase in apparent viscosity. In this presentation, along with the mentioned research, I would like to introduce our ongoing efforts in particle size distribution measurement, zeta potential measurement, and other evaluations of dispersibility.

micronization, dietary fiber, cellulose

発表責任者：邱 泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2B2p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 B2 会場

亜臨界水を用いた和種薄荷茎に対する抽出効率の検討

Investigation of the extraction efficiency for Japanese peppermint stems using subcritical water

○吉村 祐介[1]、小西 正朗[2]、邱 泰瑛[2] ([1]北見工大院、[2]北見工大)
○Yuusuke YOSHIMURA[1], Masaaki KONISHI[2], Tai-Ying CHIOU[2] ([1]Kitami Inst. of Tech., Grad, [2]Kitami Inst. of Tech)

北見の和種薄荷(*Mentha arvensis L. var. piperascens Malinv*)は、葉から抽出される薄荷精油成分に清涼感や虫よけ、抗菌作用などの機能性を有している。本研究では、有効利用されていない和種薄荷の茎が有する有用成分の抽出に適した亜臨界水抽出条件及びサンプルの処理方法について検討した。薄荷茎は約 2 cm に切断したもの、若しくは 210 μm 以下の破砕物を用意した。サンプル重量の 20 倍の蒸留水を用いて 140－240 ºC で 5 分間抽出し、常温まで冷却した上澄みを回収した。全炭水化物の抽出量は切断した茎と茎粉砕物を用いた場合が、それぞれ 200 ºC と 160 ºC で最大値(0.25 と 0.28 g-Glc/g-sample)を示した。一方、全フェノール性物質の抽出量は切断した茎と茎粉砕物を用いた場合、それぞれが 220 ºC 及び 240 ºC で最大値(55.4 と 53.6 mg-GA/g-sample)を示した。全フェノール性物質量と全炭水化物量の最大値抽出温度及び粉砕による収量変化挙動が異なったことから、冷却によりフェノール性物質が残渣に残留していると推測した。茎粉砕物の抽出残渣にエタノールを用いてリンスしたところ、220 ºC での処理では約 57%の全フェノール性物質が抽出残渣に残留していたことを確認した。

The Japanese peppermint (*Mentha arvensis L. var. piperascens Malinv*) grown in Kitami possesses functional properties such as a refreshing sensation, insect repellency, and antimicrobial effects in its peppermint oil extracted from the leaves. This study investigated suitable subcritical water extraction conditions and sample processing methods for extracting useful components from the underutilized stems of Japanese peppermint. Stems, cut to approximately 2 cm lengths or crushed to particles below 210 μm, were used as samples. Extraction was carried out for 5 minutes at temperatures ranging from 140 to 240 ºC using distilled water at a weight ratio of 20 times the sample weight. The supernatant was then collected after cooling to room temperature. The maximum extraction of total carbohydrate content occurred at 200 ºC for cut stems and 160 ºC for crushed stems, reaching values of 0.25 and 0.28 g-Glc/g-sample, respectively. On the other hand, the maximum extraction of total phenolic content for cut stems and crushed stems occurred at 220 ºC and 240 ºC, respectively, with values of 55.4 and 53.6 mg-GA/g-sample. Due to the different yield changing behaviors in the maximum extraction temperatures for total carbohydrate and phenolic contents, as well as the pulverization process, it was suggested that the phenolic content might remain in the residue after cooling. The extraction residue of crushed stems was rinsed with ethanol, and it was confirmed that with the treatment at 220 ºC, approximately 57% of the total phenolic content remained in the extraction residue.

subcritical water, Japanese peppermint, extraction

発表責任者：邱泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2B3a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 B3 会場

mRNA 核外輸送受容体 TAP とタンパク質輸送受容体 CRM1 の二つの輸送受容体による mRNA 核外輸送の生物学的意義

Biological significance of mRNA nuclear export by two transport receptors, mRNA nuclear export receptor TAP and protein transport receptor CRM1

○鵜飼 生望[1]、竹森 久美子[1]、増田 誠司[1,2] ([1]近大院農、[2]近大アンチエイジングセンター)
○Ikumi Ukai[1], Kumiko Takemori[1], Seiji Masuda[1,2] ([1]Kindai Univ, [2]Kindai Univ. anti aging center)

【序論】成熟 mRNA の核外輸送において、バルク mRNA の輸送体である TAP と、タンパク質輸送体である CRM1 による mRNA 核外輸送における選択的 mRNA 核外輸送についてゲノムワイドな解析は現在までに行われていない。本研究は、RNA-seq を用いて、選択的 mRNA 核外輸送の生物学的意義を明らかにすることを目的としている。【方法】各 mRNA 核外輸送経路の輸送因子をノックダウン/阻害した際の mRNA 核内蓄積は、TAP siRNA と CRM1 阻害剤である LMB を培養細胞に導入・添加し、poly(A)$^+$RNA を RNA-FISH 法を用いて染色後、画像解析を行い評価した。RNA-seq における mRNA 核外輸送経路のノックダウン・阻害も同様に行い、核/細胞質でそれぞれ発現している mRNA を解析した。【結果】RNA-FISH 法によって得られた各 mRNA 核外輸送因子のノックダウン・阻害による mRNA 核内蓄積率はネガティブコントロールと比較して有意に高かった。また、RNA-seq より、CRM1 が輸送することで知られている mRNA の 4E-SE 構造・A+U rich element（ARE）の両方を持つ MYC が CRM1 阻害時、TAP ノックダウンと比較して核内で上昇していた。【考察】今回核内蓄積が確認された MYC のように、複数のアダプタータンパク質によって認識される構造や配列を持つ mRNA は、1 つのアダプタータンパク質のみと結合する mRNA と比べて、より効率的に CRM1 によって核外へ輸送される可能性が考えられた。

Introduction: Genome-wide analysis of the selective mRNA nuclear export via the exporters TAP, responsible for bulk mRNA export, and CRM1, a protein exporter, has not been conducted in the context of mature mRNA nuclear export. This study aims to elucidate the biological significance of selective mRNA nuclear export using RNA-seq. Methods: TAP siRNA and the CRM1 inhibitor LMB were introduced/added to cultured cells, and after staining poly(A)$^+$RNA using RNA-FISH, image analysis was performed for evaluation of the expression profile of mRNA in the nucleus/cytoplasm. Results: Inhibiting either mRNA nuclear exporter significantly increased nuclear mRNA accumulation. In addition, RNA-seq revealed that MYC, which has both 4E-SE structure and A+U rich element (ARE) of mRNAs known to be exported by CRM1, was elevated in the nucleus upon CRM1 inhibition. Discussion: This suggests that mRNAs recognized by multiple adaptor proteins may be more efficiently transported by CRM1, and the analysis is ongoing.

mRNA, transport, RNA-seq

発表責任者：鵜飼生望（ikumi.ukai@gmail.com）

講演番号：2B3a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 B3 会場

HSP90 阻害剤とアントラサイクリン系薬剤同時添加により mRNA の核内蓄積の解消

Simultaneous addition of HSP90 inhibitors and anthracyclines eliminated nuclear accumulation of mRNA

○堀 史人[1]、竹森 久美子[1,2]、増田 誠司[1,2]（[1]近大院農、[2]近大農食）
○Fumito Hori[1], Kumiko Takemoti[1,2], Seiji Masuda[1,2] ([1]The Univ. of Kinki, [2]The Univ. of Kinki Food Science and Nutrition）

【背景・目的】細胞は外界刺激に応答するため様々な細胞内シグナル伝達系を持つ。そのシグナルの一部は核内へ伝達され、核内での mRNA 動態も変化すると考えられている。先行研究で、mRNA 動態の変化を惹起する様々な薬剤を探索している先行研究にてシグナル伝達経路を阻害するような薬剤（362 種）をスクリーニングし、そのうち 8 種の薬剤が mRNA 動態の変化を示した。本研究は、そのうちの 1 つである HSP90 阻害剤によるシグナル伝達経路の解明を目的としている。
【結果】MCF7 細胞に HSP90 阻害剤単剤を添加した際、mRNA は核内に蓄積した。しかし、mRNA 動態の変化を惹起することを確認しているアントラサイクリン系化合物と併用添加すると、mRNA の核内蓄積が解消された。このことより、単独添加で両薬剤ともに mRNA を核内に蓄積させるシグナル伝達経路を持つが、両者を併用するとそのシグナル経路を互いに打ち消しあっている可能性が示唆された。今現在は HSP90 阻害剤およびアントラサイクリン系薬剤を単剤および併用した際に関与するシグナル伝達経路の解析する予定である。

[Background and Purpose] Cells generate various intracellular signaling pathway to response to external stimuli. Some of these signals are transmitted to the nucleus, leading to changes in mRNA processing within the nucleus. In our previous study, eight drugs detected which affected mRNA processing among 362 compounds which inhibit mRNA signal transduction pathways, in the present study we investigated the effect of HSP90 inhibitor for mRNA processing.
[Results] The mRNA accumulation in the nucleus was found by the treatment with HSP90 inhibitor or anthracycline compound individually. However, the nuclear accumulation of mRNA was disappeared by the combinative treatment of HSP90 inhibitor and an anthracycline compound. These data suggests that individual treatment with HSP90 inhibitor or anthracycline compound activate a signal transduction pathway that leads to the nuclear accumulation of mRNA. However, when used combination, they may counteract each other, potentially negating the immediate pathway activation.

mRNA, HSP90

発表責任者：堀史人（2333670018c@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B3a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 B3 会場

高速 cAMP イメージング技術による匂い応答計測

Rapid intracellular cAMP imaging for the measurement of olfactory response

○佐藤 幸治、東原 和成（東大院農）
○Koji SATO, Kazushige TOUHARA (The Univ. of Tokyo)

細胞内シグナル伝達に関わる分子動態の可視化は、生命科学で欠かせない研究手法である。また、その応用技術である人工的なバイオセンサーは、創薬・食品・医療・社会保障など、社会の多岐にわたる分野への社会実装が期待できる。動物の嗅覚器は最も優れた化学センサーであり、cAMP を介するシグナル伝達の分子機構はすでに解明されているため、嗅覚器を模したバイオセンサーの開発が試みられている。しかし cAMP を高精細に計測することは困難であり、センサー開発における大きな妨げとなっていた。本研究ではこの問題を克服し、サブ秒以下の高い時間分解能で、匂い刺激により生じる細胞内 cAMP 濃度上昇を計測する技術を報告する。本技術は、cAMP を介した様々な細胞内シグナル伝達系の解析に適用可能であるだけでなく、嗅覚受容体を介した気体状匂い刺激に対する cAMP 応答の計測にも利用でき、匂いセンサーの社会実装に必須の技術となる。

Imaging of the spatiotemporal molecular dynamics of intracellular signal transduction molecules is an essential research technique in life sciences. Additionally, biomimetic artificial sensors optimizing imaging technologies have the potential for societal implementation across drug screening, food, healthcare, and social security. Olfactory organs exhibit ultrasensitivity to odorant molecules, and the molecular mechanisms of their cAMP signaling cascade have already been elucidated. Thus, various types of biosensors utilizing reconstituted olfactory signal transduction machinery have been developed. However, real-time measurement of odorant-induced cAMP production has not yet been reported. In this study, we demonstrate a technique for measuring intracellular cAMP concentrations with sub-second levels temporal resolution. This technology not only is applicable to analyze various cellular physiological function mediated by cAMP, but also enables the measurement of cAMP responses to gaseous odor stimuli in a heterologous gene expression system. The technique is essential for the development of GPCR-based biomimetic odor sensors.

olfaction, cAMP, imaging

講演番号：2B3a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 B3 会場

昆虫味覚受容体のリガンド結合様式および活性化機構の立体構造モデル
Structural modeling of ligand-binding mode and activation mechanism of an insect gustatory receptor

○森永 敏史[1]、永田 宏次[1]、伊原 さよ子[1]、新村 芳人[1,2]、佐藤 幸治[1]、東原 和成[1] ([1]東大院農、[2]宮崎大学獣)
○Satoshi Morinaga[1], Koji Nagata[1], Sayoko Ihara[1], Yoshihito Niimura[1,2], Koji Sato[1], Kazushige Touhara[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Miyazaki)

昆虫の化学感覚受容体の多くはイオンチャネルの機能を持ち、味や匂い物質の結合で生じる細胞内へのカチオン流入によって受容体単独でシグナル伝達が生じる。しかし、受容体構造活性相関の解析は進んでおらず、その分子基盤は不明である。今回、我々は果糖受容体 BmGr9 の立体構造をモデリングし、機能領域を解析した。BmGr9 の立体構造モデルは、昆虫で広く保存された嗅覚受容体の一種である Orco の構造を基に、各サブユニットが七回膜貫通領域（TM1~7）を持つモデルとして構築した。構築したモデルから BmGr9 の機能に寄与するアミノ酸残基を推測して部位特異的変異導入を行い、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて機能解析を行った結果、TM 7 がチャネルポア、TM2~4 と TM6 がリガンド結合領域を構築することが示唆された。さらに、新規に同定した三種類の BmGr9 パーシャルアゴニストを用いて、これらの化合物に対するリガンド結合領域周辺のアミノ酸残基変異体の活性を比較して BmGr9 のリガンド結合様式を推定した。以上の結果を統合し、BmGr9 のリガンド結合からチャネルポア開口に至る構造変化の流れを提唱する。

Various insect chemoreceptors have ion channel function and cation influx caused by binding to taste and odor substances induces signal transduction through the receptor alone. However, since the structure-activity relationship of the receptors remains to be adequately elucidated, the detailed molecular mechanism has been unknown. In this study, we constructed a 3D structural model of BmGr9, a silkworm D-fructose receptor, based on the structure of Orco, a type of odorant receptor widely conserved among various insects, and analyzed its functional regions. The constructed model was a homotetramer with seven transmembrane regions (TM1~7). Site-directed mutagenesis experiments using *Xenopus* oocyte expression system, in which the amino acid residues contributing to the function of BmGr9 were deduced from the model, suggested that TM7 constructs the channel pore and TM2~4 and TM6 construct the ligand-binding site. Furthermore, using newly identified three partial agonists of BmGr9, the ligand-binding mode was estimated by comparing the activity against the agonists of the mutants of the amino acid residues around the ligand-binding site. Integrating the above results, we propose a sequential model of conformational change of BmGr9 from ligand binding to channel opening.

insect, gustatory receptor, structure

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B3a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 B3 会場

合成脂質を用いたヒト ABCA1 の活性調節機構の解析

Analysis of the Regulatory Mechanism of Human ABCA1 Activity Using Synthetic Lipids

○師岡 はるか[1]、藤原 朋哉[2]、安部 真人[2]、三澤 嘉久[3]、馬場 直道[3]、木岡 紀幸[1]、木村 泰久[1] ([1]京大農・応用生命科学、[2]愛媛大院農・生命機能学、[3]備前化成株式会社)
○Haruka MOROOKA[1], Tomoya FUJIWARA[2], Masato ABE[2], Yoshihisa MISAWA[3], Naomichi BABA[3], Noriyuki KIOKA[1], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Faculty of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Graduate School of Agriculture, Ehime Univ., [3]Bizen Kasei KK.)

ABC（ATP-binding cassette）A1 は ATP 依存的な膜輸送体であり、コレステロールを細胞から排出することで体内のコレステロール恒常性に寄与している。ABCA1 の機能は周辺脂質の影響を強く受けると推測されるが、その詳細は不明である。私たちは、負電荷をもつリン脂質が ABCA1 の機能に必要であることを明らかにした(坂田、日本脂質生化学会 2023)。しかし、負電荷脂質が ABCA1 の活性を調節する具体的なメカニズムは分かっていない。本研究では、頭部や尾部に特徴的な構造を持つ合成リン脂質を用い、脂質の構造と活性誘導の相関について検討を行った。

合成リン脂質を含む人工脂質粒子(リポソーム)に精製 ABCA1 を再構成し、ATP 加水分解活性を評価した。その結果、親水性頭部の構造が天然型の物と比べて光学異性体になっているリン脂質や、親水性頭部のアミノ酸部分の構造が異なる脂質は、ABCA1 の機能を補佐しなかった。疎水性尾部を形成する脂肪酸についての検討から、極端に短い脂肪酸などが ABCA1 の活性を補佐しないことが明らかになった。以上の結果から、ABCA1 の機能を補佐するためには親水性頭部と疎水性尾部の両方の化学構造が重要であることが示唆された。

ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1) plays a major role in cholesterol homeostasis by exporting cholesterol from cells. Our previous study showed that an anionic phospholipid is essential for the function of ABCA1 (Sakata, The Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids 2023). However, the molecular mechanism is poorly understood. We investigated the correlation between lipid structure and ABCA1 activity using chemically designed phospholipids.

Recombinant ABCA1 was reconstituted into liposomes containing synthetic phospholipids and the ATPase activity was evaluated. Phospholipids with variations in the amino acid head, including optical isomers failed to support the ABCA1 function. Additionally, phospholipids consisting of extremely short fatty acids cannot support ABCA1 activity. These results suggest that both the chemical structures of the hydrophilic head and the hydrophobic tail of anionic phospholipids are important for ABCA1 function.

ABCA1, regulation, lipid

講演番号：2B3a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 B3 会場

低酸素応答機構の制御によるヒト表皮立体培養系での分化促進効果
Regulation pf hypoxic response promotes keratinocyte differentiation in reconstituted human epidermis
遠藤 真悠子[1]、手島 裕文[1]、北谷 宏仁[1]、小林 稔[2]、辻 徳治[1]、原田 浩[2]、○人見 清隆[2]([1]名大院創薬科学、[2]京大院生命)
Mayuko Endo[1], Hirofumi Teshima[1], Koujin Kitadani[1], Minoru Kobayashi[2], Tokuji Tsuji[1], Hiroshi Harada[2], ○Kiyotaka Hitomi[2] ([1]Grad. Sch. Pharma. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Life. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】皮膚表皮では未分化な基底細胞が分化を繰り返し、角化層が形成されて外界に対して十分なバリア機能が発揮される。また、医療や化粧品等の研究分野では表皮を再現する培養系が汎用される。未分化な表皮幹細胞を立体的に培養して角化層まで分化させる培養系が確立されているが、その際は増殖した細胞を空気暴露することが分化の必須の刺激になる。その機構は不明であったが、我々はこれまで、この特異な分化刺激に低酸素誘導性因子（HIF）による転写制御が関与することを明らかにした（Teshima *et al*. FEBS J. 2023)。すなわち空気暴露を行わない状態では、細胞は低酸素状態となり HIF の転写活性が上昇し、分化が阻害されることを示した。またここで振とう操作を加えると、低酸素状態が解除され分化する可能性も示したが、その機構は不明な点が多い。今回は振とう操作の分化促進効果に加え、低酸素での培養環境を提供して解析し、その機構の知見を深めることを目的とした。
【方法・結果】未分化なヒト表皮初代培養細胞を用いて、空気暴露状態、培地に浸して培養継続した場合、振とう操作を加えた場合の３つの条件で培養した。経時的に細胞層の形態観察や分化マーカーの発現を検討しその変化の詳細を明らかにした。また RNA-seq により発現遺伝子群の違いも示した。さらに、低酸素（１％O_2）での培養環境で同様の比較を行い、振とう操作による液体培地での表皮分化亢進の効果が、低酸素状態の解除による HIF 転写促進活性の抑制に起因することを明らかにした。

Skin epidermis plays a role in barrier function against external stimulation and protection of internal water evaporation. Reconstituted human epidermal system has been available for research on medical and cosmetic sciences, using *in vitro* three-dimensional (3D) cultured keratinocytes. Upon promotion of differentiation, air-exposure of the grown cells is essential treatment. We revealed that hypoxic response is involved in the differentiation regulation. In the submerged culture (without air-exposure), the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor (HIF) is enhanced resulting in hampering the differentiation. However, we found rocking (shaking the culture dish) restored the differentiation in a culture even if the cells remained in the submerged culture. In this study, to clarify the biological background on these phenomena, we carried out RNA-seq analysis of the cells among the three culture systems: air-exposure, the submerged, and rocking. Expectedly, genes under the regulation of HIF were mainly fluctuated. Also, under the artificial lower oxygen (1% O_2) culture condition, we investigated the effect of rocking treatment and concluded that the recovery of differentiation by rocking is due to the cancellation of hypoxia.

keratinocyte, differentiation, HIF

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2B3a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 B3 会場

羊水がヒト表皮細胞における表皮形成関連因子の発現制御に与える影響
Effect of amniotic fluid on the regulation of expression of epidermal development-related factors in human keratinocytes

○辻 徳治[1]、小野川 諒[1]、村井 篤嗣[2]、辰川 英樹[1]、人見 清隆[1]([1]名大院創薬科学、[2]名大院生命農学)
○Tokuji TSUJI[1], Ryo ONOGAWA[1], Atsushi MURAI[2], Hideki TATSUKAWA[1], Kiyotaka HITOMI[1]
([1]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【背景・目的】表皮組織は体外からの異物の侵入を防ぐバリア機能を担っている。表皮がバリア機能を獲得するには、表皮形成の過程で基底層の幹細胞が角質細胞へと適切に分化し、最外の角質層において高分子量タンパク質複合体である角化細胞周辺帯 (cornified envelop; CE) が形成されることが重要となる。ヒトを含む有羊膜類では、表皮は羊水で満たされた羊膜内腔で胎生期に形成され、特にニワトリ胎仔の表皮は約 20 日という短い期間で成熟する。このことから、羊水が胎生期の表皮形成に重要な役割を果たしていることが予想されるが、その詳細は不明である。本研究では、羊水がヒト表皮細胞における表皮形成関連因子の発現促進に寄与するかを明らかにすることを目的とした。
【方法】ニワトリ受精卵から羊水を採取し、ヒト表皮角化細胞株 Ker-CT 細胞の培養培地中に添加した。一定期間の培養後、表皮分化マーカータンパク質の発現変化をイムノブロットで、表皮分化複合体遺伝子クラスターからコードされる表皮形成関連因子群の発現変化を定量的 PCR で検証した。
【結果】羊水添加によって、CE 形成に必須のタンパク質架橋化酵素であるトランスグルタミナーゼをはじめとした表皮分化マーカーの発現量が増加した。また、胎生期後期の羊水を添加することで、表皮形成関連因子群や、表皮細胞の分化制御に関わる転写因子の発現量が顕著に増加した。以上の結果から、特定胎生期の羊水由来因子が表皮細胞の分化制御に寄与している可能性が示された。

Skin epidermis plays a role in protecting organisms from harmful pathogens. For epidermis to acquire the barrier function, it is important that a proper differentiation of epidermal stem cells in the basal layer to corneocytes, and that a formation of a high-molecular weight protein complex crosslinked by transglutaminases, a cornified envelope (CE). In amniotes, including humans, the fetal epidermis is formed in the lumen of amnion filled with amniotic fluid (AF) during an embryonic stage. Among amniotes, the epidermis of chicken fetus matures during a short period of about 20 days, and thus, we hypothesized that chicken AF (cAF) promotes the expression of the epidermal development-related factors. In this study, we showed that the expression of epidermal differentiation marker proteins was increased by the addition of cAF isolated from fertilized eggs to the cultured medium of human keratinocytes, Ker-CT cells. Moreover, the addition of cAF isolated at late fetal stages markedly increased the gene expression of the epidermal development-related factors and of the transcription factors involved in the epidermal cell differentiation. These results suggested that factors of cAF at specific fetal stages may contribute to the regulation of epidermal differentiation.

keratinocyte differentiation, amniotic fluid, transglutaminase

発表責任者：辻　徳治（ttsuji@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2B3a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 B3 会場

アンドロゲンは褐色脂肪組織においてアドレナリンによる体熱産生を抑制する
Androgens suppress adrenalin-induced heat production in brown adipose tissue

○原田 直樹[1,2]、久保 慶太朗[2]、大西 照晃[1]、北風 智也[1,2]、後藤 剛[3]、乾 博[1,2,4]、山地 亮一[1,2,5] ([1]阪公大農、[2]阪府大生環、[3]京大院農、[4]大手前健栄、[5]阪公大生資センター)
○Naoki HARADA[1,2], Keitaro KUBO[2], Teruaki ONISHI[1], Tomoya KITAKAZE[1,2], Tsuyoshi GOTO[3], Hiroshi INUI[1,2,4], Ryoichi YAMAJI[1,2,5] ([1]Grad. Sch. Agr., Osaka Metrop. Univ., [2]Osaka Pref. Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Otemae Univ., [5]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Metrop. Univ.)

【背景・目的】体温には性差が存在し、男性は女性の性周期で最も体温が低い時期よりも体温が低い。我々は、これまでに去勢マウスおよびアンドロゲン受容体（AR）ノックアウト（ARKO）雄性マウスで体温上昇を見出している [Harada *et al*., *Gut Microbes*, 2016; Harada *et al*., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020]。そこで本研究では、男性ホルモン（アンドロゲン）の体温低下作用について検討を行った。
【方法・結果】去勢および ARKO 雄性マウス、β3 アドレナリン作動薬 CL316243 によって誘導される体温上昇がそれぞれのコントロールマウスよりも高かった。ARKO マウスの褐色脂肪組織を用いて解析を行った結果、CL316243 によって誘発された Uncoupling protein 1（UCP1）の発現増加および cAMP-response element-binding protein（CREB）のリン酸化レベルも ARKO マウスで高かった。培養細胞を用いた検討で、アンドロゲンによる AR の活性化は、β3-アゴニストまたはフォルスコリンによって誘導された cAMP response element（CRE）を介した転写活性化を抑制した。アンドロゲンによる CRE 抑制作用は AR アンタゴニストによって消失した。AR の活性化はフォルスコリンによる CREB リン酸化も抑制した。CRE を介した転写の抑制には AR の転写活性ではなく核局在が必要であり、AR は CREB と複合体を形成することを明らかにした。これらの結果から、アドレナリンによる褐色脂肪組織の熱産生において、AR は CREB と相互作用してアンドロゲン依存的に CREB のリン酸化を抑制することで UCP1 の発現誘導を抑制し体熱産生を抑制することが示唆された。このメカニズムは体温の性差の少なくとも一部を説明するものであると考えられる。
【Objectives】There is sex differences in body temperature, with males having lower body temperatures than females. Previously, we have found elevated body temperature in castrated and androgen receptor (AR) knockout (ARKO) male mice. In this study, we investigated the mechanisms by which male hormones (*i.e.*, androgens) suppress body temperature.
【Methods and Results】In castrated and ARKO male mice, the increase in body temperature induced by the β3-adrenergic agonist CL316243 was higher in ARKO and castrated mice than in their respective controls. increases in UCP1 expression and CREB phosphorylation by β3-agonist were also higher in ARKO mice. In cultured cell studies, AR activation suppressed CREB phosphorylation or CRE-mediated activation induced by forskolin. Nuclear localization, but not transcriptional activity, of the AR was required for the suppression. AR formed a protein complex with CREB. These results suggest that AR interacts with CREB and suppresses the phosphorylation of CREB in an androgen-dependent manner, thereby suppressing adrenalin-induced UCP1 expression and heat production in brown adipose tissue. This mechanism at least partially explains the sex differences in body temperature. [Harada *et al*., *J Biol Chem*, 2022]

androgen, brown adipose tissue, adrenalin

発表責任者：原田直樹（naoki.harada@omu.ac.jp）

講演番号：2B3a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 B3 会場

エストロゲン受容体による protein kinase A シグナル抑制作用とそのメカニズムの解明

Suppression of protein kinase A signaling by estrogen receptor

○大西 照晃[1]、久保 慶太朗[2]、原田 直樹[1,2]、北風 智也[1,2]、乾 博[1,2,3]、山地 亮一[1,2,4]([1]阪公大院・農、[2]阪府大院・生命環境、[3]大手前大・健栄、[4]阪公大・生資センター)
○Teruaki Onishi[1], Keitaro Kubo[2], Naoki Harada[1,2], Tomoya Kitakaze[1,2], Hiroshi Inui[1,2,3], Ryoichi Yamaji[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Agr., Osaka Metrop. Univ., [2]Osaka Pref. Univ., [3]Otemae Univ., [4]Ctr. R&D Bioresou., Osaka Metrop. Univ.)

【背景・目的】Protein kinase A（PKA）は制御サブユニットと触媒サブユニットとから構成され，cAMP が結合すると，触媒サブユニットが解離し活性化する。触媒サブユニットは cAMP response element-binding protein（CREB）をリン酸化し，リン酸化された CREB は cAMP response element（CRE）の転写を促進する。エストロゲン受容体（ER）は女性ホルモンである 17β-estradiol（E2）によって活性化し，転写を調節する。ER には ERα と ERβ の 2 つのサブタイプが存在し，特に ERβ はイソフラボンによっても活性化する。我々は，男性ホルモン受容体が CREB と相互作用することで PKA シグナルを抑制することを報告している。そこで本研究では ER によっても PKA シグナルが抑制されるのか，また食品成分によって模倣することができるのかを検討した。【方法・結果】HEK293FT 細胞を用いてフォルスコリンによる CRE の活性化に対する ER の影響を評価した結果，E2 依存的に ER は CRE の活性化を抑制した。さらに ERβ は *S*-equol，genistein，daidzein によっても CRE の活性化を抑制した。免疫沈降による評価の結果，ERβ と CREB との相互作用は見られなかったが，ERβ と PKA 触媒サブユニットが複合体を形成することを見出し，ERβ が PKA 触媒サブユニットと相互作用して PKA シグナルを抑制することが示された。現在，ERβ の PKA シグナル抑制作用による生理作用の探索を行っている。

【Objectives】PKA is composed of regulatory subunits and catalytic subunits. When cAMP binds to the regulatory subunits, catalytic subunits dissociate from regulatory subunits and are activated. The catalytic subunit phosphorylates CREB, and phosphorylated CREB promotes CRE-mediated transcription. ERα or ERβ is activated by the female hormone E2 and regulates transcription. In particular, ERβ is also activated by isoflavones. We have reported that androgen receptor suppresses PKA signaling by interacting with CREB. In this study, we investigated whether PKA signaling is also suppressed by E2-activated ER or isoflavone-activated ER.【Methods and Results】Effect of ER on the activation of PKA signaling by forskolin was evaluated in HEK293FT cells. ER inhibited CRE-mediated transcription in an E2-dependent mannar. In addition, *S*-equol-, genistein- or daidzein-activated ERβ suppressed activation of CRE-mediated transcription. Immunoprecipitation showed that there was no interaction between ERβ and CREB, but ERβ and PKA catalytic subunit formed a protein complex, suggesting that interaction of ERβ with PKA catalytic subunit contributes to the inhibition of CRE-mediated transcription. We are currently investigating the physiological role of this suppression.

estrogen, protein kinase A, isoflavone

発表責任者：原田直樹（naoki.harada@omu.ac.jp）

講演番号：2B3a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 B3 会場

FUS の液-液相分離に核内アクチン繊維が及ぼす影響の解析
The analysis of the contribution of nuclear F-actin to liquid-liquid phase separation of FUS
○西間木 胡桃[1]、藤井 健太郎[2]、堀籠 智洋[1]、高山 裕貴[1,3]、原田 昌彦[1,3]([1]東北大院農、[2]量子科学技術研究開発機構、[3]東北大 国際放射光イノベーション・スマート研究センター)
○Kurumi NISHIMAGI[1], Kentaro FUJII[2], Chihiro HORIGOME[1], Yuki TAKAYAMA[1,3], Masahiko HARATA[1,3] ([1]The Univ. of Tohoku, [2]QST, [3]SRIS. The Univ. of Tohoku)

【目的】細胞内の液-液相分離(LLPS)は生体分子が可逆的な集合体を形成する現象であり、核小体をはじめとする膜構造を持たない核内ドメインが LLPS によって形成されている。LLPS において重要な役割を担うのが天然変性領域(IDR)を持つタンパク質である。その一方で、核内アクチン繊維(F-アクチン)も LLPS の制御に関与する可能性が示唆されているが、その詳細については不明なままである。本研究では、IDR を持つタンパク質の一種である FUS (Fused in Sarcoma)を LLPS 可視化のマーカーとして用い、核内アクチン繊維が LLPS にどのような影響を与えているかについて、解析を行った。【方法】EGFP 付加された FUS をマウス線維芽細胞(NIH3T3)で発現させた際に蛍光顕微鏡下で観察される核内集合体について、これが LLPS による FUS の液滴形成であることを、LLPS 阻害試薬によって確認した。この実験系を用い、細胞核内でのアクチン繊維形成と FUS の形態変化の関連性の解析を行った。【結果と考察】核内でアクチン繊維が形成されている細胞と形成されていない細胞とを比較することにより、核内アクチン繊維により FUS の液滴形成が促進されることが観察された。また、共局在性解析によって核内アクチン繊維と FUS は共局在していない傾向にあることが明らかになった。さらに、薬剤処理によって人為的に核内アクチン繊維を脱重合させたところ、処理時間の経過に伴い FUS の液滴の個数が減少した。これらの結果から、核内アクチン繊維によって形成される構造的な核内環境が、LLPS による FUS の液滴形成を促進していることが示唆された。

【Purpose】It is known that cellular biomolecules are separated into membrane-less structures by liquid-liquid phase separation (LLPS). Proteins with intrinsically disordered regions (IDR) contribute to LLPS, and nuclear structural proteins affect nuclear LLPS. Although nuclear F-actin is reportedly involved in LLPS, details are largely unknown. In this study, we used the IDR-containing protein FUS (Fused in Sarcoma) as a tool to visualize LLPS and to analyze the involvement of nuclear F-actin effects.【Methods】EGFP-FUS was over-expressed in NIH3T3, and LLPS was observed. With this system, we analyzed the relationship between nuclear actin and LLPS of FUS.【Results】It was observed that LLPS of FUS was promoted in the nucleus containing nuclear F-actin, although nuclear F-actin was not colocalized with FUS. The nuclear droplets of FUS were decreased with depolymerization of nuclear F-actin. These results suggest that nuclear F-actin promotes forming LLPS of FUS by affecting the nuclear structural environment.

nuclear F-actin, liquid-liquid phase separation, fused in sarcoma

発表責任者：原田昌彦（masahiko.harata.b6@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B3a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 B3 会場

ヒト培養細胞を用いた疲労評価モデルの確立

Establish a fatigue evaluation model using cultured cells

○森 彩香[1]、野口 明日香[2]、堀籠 悟[1]、渡辺 睦行[2]([1]日本食品分析センター、[2]昭和女子大学)
○Sayaka MORI[1], Asuka NOGUCHI[2], Satoru HORIGOME[1], Nakamichi WATANABE[2] ([1]Japan Food Research Laboratories, [2]Showa Women's Univ.)

うつ病や脳血管障害などのリスクファクターのひとつとして疲労の関与が示唆されている。疲労の分子機構としては, eIF2αのリン酸化に伴う炎症性サイトカインの発現誘導，ATF-3 発現誘導, HHV-6 の再活性化などが知られている。抗疲労研究においては動物疲労モデルを用いた方法が一般的であるが、実験動物及び飼育施設の維持管理が必要であり，動物愛護の観点からも動物を使用しない方法が求められている。本研究では、培養細胞を用いた疲労評価モデルの作成を目的とし，疲労モデルマウス及び培養細胞を用いた検討を行った。

C57BL/6J マウスを 1 時間強制遊泳させ，疲労モデルマウスとし，各臓器における疲労関連因子(ATF-3，GADD34，IL-1β)の mRNA 発現変化を調べた。この結果，いずれの因子においても肝臓で最も高値であった。次に，肝臓の細胞モデルとして，肝臓を構成する肝実質細胞及び肝臓に存在するマクロファージであるクッパー細胞を入手し，7β-hydroxycholesterol で 16 時間刺激し，細胞の疲労モデルとした。刺激後，疲労関連因子の mRNA 発現を realtime-PCR にて測定した。この結果，クッパー細胞においてもこれら因子の発現量が高く、疲労細胞モデルとして有用である可能性が示唆された。

Fatigue has been suggested to be involved as a risk factor for depression and cerebrovascular disorders. The molecular mechanisms of fatigue are known to include induction of inflammatory cytokine expression associated with eIF2α phosphorylation, induction of ATF-3 expression, and reactivation of HHV-6. In this study, we aimed to establish a fatigue evaluation model using cultured cells.

C57BL/6J mice were forced to swim for 1 hour to serve as fatigue model mice, and changes in mRNA expression of fatigue-related factors (ATF-3, GADD34, IL-1ß) in each organ were investigated. As a result, the liver had the highest values for all factors. Next, we obtained hepatic parenchymal cells and Kupffer cell, these constitute a part of liver, and stimulated them with 7ß-hydroxycholesterol for 16 hours as a cell model of fatigue. The results showed that the mRNA expression of these factors were expressed at high levels in Kupffer cells, suggesting that they may be useful as a cell model of fatigue.

fatigue evaluation model, liver, Kupffer cells

講演番号：2B3a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 B3 会場

ヒト毛乳頭細胞を用いた細胞試験による海老名市産イチゴの育毛効果の検証
Verification of the hair growth-promoting effect of strawberry produced in Ebina city using human follicle dermal papilla cells

○宮内 勇樹[1,2]、謝 凉晶[1]、廣川 隆彦[3]、村上 小枝子[3]、馬 思慧[1]、矢野 敏史[1]、原 太一[1] ([1]早大人科院、[2]近代化学（株）、[3]神奈川県産技総研)
○Yuki MIYAUCHI[1,2], Liangjing XIE[1], Takahiko HIROKAWA[3], Saeko MURAKAMI[3], Sihui MA[1], Satoshi YANO[1], Taichi HARA[1] ([1]Waseda Univ., [2]Kindaikagaku Co., Ltd, [3]KISTEC)

【目的】イチゴ（*Fragaria* × *ananassa*）はビタミンやミネラルなどの栄養が豊富なフルーツであり、抗酸化作用等の様々な生理活性を示すポリフェノールも多く含まれている。これまでの研究で、イチゴは抗炎症作用など、スキンケアに関する美容効果が報告されている一方で、育毛に関する研究知見は乏しいのが現状である。本研究では、ヘアサイクルを駆動する細胞であるヒト毛乳頭細胞（HFDPC）を用いて、イチゴの抽出液の育毛効果について、代謝活性と育毛遺伝子の発現を指標に生物学的解析、及び活性成分を推定する化学的解析の２つの面から検討を行った。
【方法と結果】脱水素酵素活性を指標にして細胞の代謝活性に与える影響を調べた結果、イチゴ水抽出液は HFDPC の代謝活性を上昇させることが分かった。一方で、３つの育毛関連遺伝子（*FGF7*、*VCAN*、*TGFB2*）の発現を定量 PCR で測定した結果、すべての遺伝子の発現に影響を与えなかった。分画及び成分分析を行った結果、活性画分にはポリフェノール、多糖類、ペプチドが含まれていること、賦活化作用は加熱により低下することが分かった。メカニズムと成分に関してさらに詳細に研究を行う必要があるが、本研究によって得られた成果は、イチゴをヘアケア化粧品として応用する為の基礎的な知見を提供するものと考えられる。
【Objective】Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) is a fruit rich in nutrients, including polyphenols that have been reported to exhibit varied bioactivities. A previous study revealed that strawberries offer beauty benefits. In this study, we investigated the potential hair growth-promoting properties of strawberries by measuring dehydrogenase activity during cell activation and assessing the expression of hair growth-related genes in human follicle dermal papilla cells (HFDPC). Additionally, we performed chemical analysis to identify the bioactive compounds.
【Methods and Results】Strawberry water extract was indicated to have an activating effect on HFDPC by measuring dehydrogenase activity and the effect was reduced with heat treatment. Furthermore, the active fraction contained polyphenols, oligosaccharides and peptide. The expression levels of hair growth-related genes (*FGF7*, *VCAN*, and *TGFB2*) were examined using qPCR, but no significant differences were detected. Although further investigation into the components and mechanisms underlying this bioactivity is required, these results provide fundamental knowledge for the development of hair-care cosmetics.

strawberry, hair-growth, HFDPC

発表責任者：原太一（Harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 B3 会場

オートファジー活性に及ぼす発酵食品の探索と機能性成分の解析

Exploration of Fermented Foods and Analysis of Functional Components on Autophagy Activity

○菅谷 侑香、矢野 敏史、原 太一 (早大人科院)
○Yuuka SUGAYA, Satoshi YANO, Taichi HARA (The Univ. of Waseda)

細胞内のリサイクリングシステムであるオートファジーは、様々な疾患の予防や健康寿命の延伸、美容などに関与することが示されている。オートファジーを高度に活性化する食品を開発することができれば、細胞レベルのリノベーションによる新しい健康増進や美容法を創出できることが期待できる。本研究では、機能性成分が豊富に含む発酵食品に着目し、発酵食品のオートファジーおよび健康機能に与える影響を解析した。そこで我々は、サツマイモを原料とする発酵物が腸管上皮様細胞のオートファジーを高度に活性化することを見出した。そのオートファジー誘導機構として、オートファジーの主要な制御因子である mTORC1 キナーゼシグナルの関与を検討したところ、mTORC1 シグナル以外の機構が関与する可能性が示唆された。また、サツマイモ発酵物中の成分を分析した結果、オートファジー活性化に寄与する成分が複数含まれることが示唆された。加えて、サツマイモ発酵物には、細胞の賦活化作用を示すことも見出している。

以上の研究とともに、我々が現在取り組んでいるサツマイモ発酵物のオートファジー活性化成分や経路の探索に関する研究結果も紹介したい。

Autophagy, a recycling system in the cells, has been shown to be involved in the prevention of various diseases, lengthening of healthy life span, and beauty. If we can develop foods that activate autophagy, we can expect to create new methods of health and beauty at the cellular level. In this study, we focused on fermented foods, which are assumed to be rich in functional ingredients, and analyzed the effects of fermented foods on autophagy and health functions. We found that a fermented product made from sweet potato highly activated autophagy in intestinal epithelial-like cells. The involvement of mTORC1 kinase signaling, a major regulator of autophagy, was examined as a mechanism for inducing autophagy, suggesting that mechanisms other than mTORC1 signaling may be involved. Analysis of the components in the sweet potato fermentation product suggested that it contains several components that contribute to autophagy activation. Furthermore, we have found that fermented sweet potatoes exhibit cellular activating activity.

Along with the above studies, we will also present the results of our ongoing research on the search for autophagy-activating components and pathways in sweet potato fermented products.

Autophagy, Fermentation, Functional food

発表責任者：原太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 B3 会場

ワサビ 6-MSITC によるオートファジー制御機構の解明

Regulation Mechanism of Autophagy by Wasabi 6-MSITC

○久原 麻那、矢野 敏史、原 太一 (早大人科院)
○Mana KUHARA, Satoshi YANO, Taichi HARA (Waseda Univ.)

日本原産のワサビには、6-(methylsulfiny)hexyl isothiocyanate（6-MSITC）という特有のイソチオシアネートが豊富に含まれている。6-MSITC はがんや生活習慣病の予防をはじめとした、多様な健康効果を有することが報告されている。これまで、6-MSITC の健康効果は抗酸化応答を介した細胞ストレス保護作用に基づくと考えられてきた。しかし我々は、抗酸化応答だけでは、6-MSITC の細胞の保護作用を完全には説明できないことを見出している。本研究では、細胞から個体までの健康維持に機能するオートファジーが、6-MSITC の健康効果の一翼を担う可能性に着目した。まず、6-MSITC がオートファジーを活性化することに加え､栄養飢餓シグナルである mTORC1 を介したオートファジーとは異なるメカニズムが存在する可能性を明らかにした。オートファジーは最終的にリソソームで分解されることから、リソソームを標的として解析を進めたところ、6-MSITC のリソソーム機能の亢進が、細胞ストレス保護作用に寄与することを見出した。また、リソソームの機能亢進に中心的に働く転写因子も見出している。現在、リソソーム機能を制御する因子とそのメカニズムの解析を進めており、本講演ではその研究成果も併せて報告したい。

Wasabi originally from Japan, is rich in a unique isothiocyanate called 6-(methylsulfiny)hexyl isothiocyanate (6-MSITC), which has been reported to have a variety of health benefits, including the prevention of cancer and lifestyle-related diseases. Previous studies have reported the health effects of 6-MSITC have been thought to be based on its cellular stress protective effects by antioxidant responses. However, we find that the antioxidant response does not fully explain the cellular protective effects of 6-MSITC. In this study, we focused on the possibility that autophagy, which functions to maintain health from cell to individual, may play a role in the health effects of 6-MSITC. First, we found that 6-MSITC activates autophagy and that there may be a different mechanism from autophagy mediated by mTORC1, a nutrient starvation signal. Since autophagy is ultimately degraded by lysosomes, we targeted lysosomes in our studies and found that the enhancement of lysosomal function of 6-MSITC contributes to its cellular stress protective effects. We have also found transcription factors that play a central role in the enhancement of lysosomal function. We are currently researching the factors and mechanisms that regulate lysosome function and will also report the results of our studies in this symposium.

6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate, autophagy, lysosome

発表責任者：原太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 B3 会場

Autophagy Induction by D-amino acids: A Dive into mTOR-independent Signaling Pathways

○Kun XIE[1,2], Jinyun WANG[1], Miyu Kamimura[1], Saki shiota[1], Taichi Hara[1] ([1]Laboratory of Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University, Tokorozawa 359-1192, Japan, [2]College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China)

While L-amino acids are predominantly utilized in most biological processes, there is growing evidence of the unique roles that D-amino acids play in vital physiological activities. Autophagy is an important degradation system that maintenance of cellular health by degrading abnormal intracellular proteins and injured organelles and providing materials for renewal. In this study, we screened 19 D-amino acids and discovered that 2 of the amino acids enhanced autophagy activity in Caco2 cells expressing the GFP-LC3-RFP probe. Interestingly, the autophagy induction by those D-amino acids did not significantly affect the mTOR signaling pathway. A phospho-kinase antibody array showed that the identified 2 amino acids reduced Erk1/2 phosphorylation levels, leading to the de-phosphorylation of TFEB and its subsequent nuclear translocation. To ascertain whether the autophagy induced by those 2 D-amino acids was dependent on TFEB, we evaluated autophagy activity in TFEB-deficient HAP1 cells. The findings indicated that the autophagy-inducing capability in one of the D-amino acids was abrogated in TFEB-deficient HAP1, but another one still retained some autophagy induction ability, suggesting an alternate pathway for this D-amino acid in modulating autophagy. Further RNA-seq analysis revealed that D-amino acid induces the increasing cytochrome P450 enzymes. Upon inhibiting both the TFEB and cytochrome P450 signaling pathways, the D-amino acid could no longer activate autophagy. Our study sheds light on some of the molecular mechanisms underlying D amino acids-induced autophagy, enriching our understanding of the physiological functions of D-amino acids.

Autophagy, D-amino acids, mTOR independent

発表責任者：原太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 B3 会場

4,4'-Dimethoxychalcone (DMC): A Novel GATA2-Dependent Modulator of Autophagy Beyond mTOR Signaling

○Jinyun WANG, Kun Xie, Taichi Hara (Laboratory of Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University, Tokorozawa 359-1192, Japan)

Autophagy plays an important role in the maintenance of cellular health by degrading abnormal intracellular proteins to provide materials for renewal. Starvation induces autophagy by inhibiting the activity of mechanistic target of rapamycin (mTOR), however, it also suppresses the protein synthesis in mammalian cells. Consequently, identifying mTOR-independent autophagy induction pathways and novel molecules modulating autophagy is crucial for therapeutic research in this research field.

Through screening a botanical compounds library, we identified that 4,4'-dimethoxychalcone (DMC) can induce autophagy in various cell lines. Unlike starvation-induced autophagy, DMC did not modify mTORC1 activity. Furthermore, DMC promoted the nuclear translocation of the transcriptional factor EB (TFEB) and significantly upregulated its down-stream genes linked with lysosomal biogenesis, such as LAMP1 and SQSTM1. Notably, the autophagy-inducing capacity of DMC was partially diminished in TFEB-deficient HAP1 cells, but not completely lost, indicating DMC's autophagy induction is not solely TFEB-dependent. Further investigations revealed that DMC's autophagy-inducing pathway requires the GATA-binding factor 2 (GATA2), DMC could not induce autophagy in GATA2-deficient cells. Moreover, through compare the differential expression genes in parental cells and TFEB-deficient cells treated with DMC by RNA-seq, we found that DMC also induced the expression increasing of Nrf2-target genes independent of TFEB. Collectively, our research lays the groundwork for understanding the novel DMC-based GATA2 signaling mechanism for modulating autophagy, revealed DMC, as a GATA2-dependent autophagy activator, has the potential to be a therapeutic agent for autophagy-related strategies.

Autophagy, Chalcone, Transcriptional regulation

発表責任者：Hara Taichi（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 B3 会場

Enhanced Metabolic Efficiency with Ketone Body Supplementation in Keto-Adaptation: Insights from Animal and Cell Culture Studies

○SIHUI MA[1], YISHAN TONG[2], SATOSHI YANO[1], KATSUHIKO SUZUKI[3], TAICHI HARA[1]
([1]Faculty of Human Sciences, Waseda Univ., [2]Graduate School of Sport Sciences, Waseda Univ., [3]Faculty of Sport Sciences, Waseda Univ.)

Recent advancements in nutritional science have increasingly highlighted the ketogenic diet and ketone bodies as critical factors in enhancing metabolic efficiency and exercise performance. This study explores the metabolic implications of ketone body supplementation in ketogenic-adapted states, utilizing two experimental approaches: an animal model and cultured muscle cells. In the first experiment, ketogenic-adapted mice were supplemented with beta-hydroxybutyrate. We observed a notable increase in the expression of genes related to fat metabolism in these animals. Furthermore, this supplementation was associated with increased phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and a decrease in the phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR), indicating a shift towards enhanced fatty acid oxidation and possibly autophagy activation. Parallelly, *in vitro* experiments using cultured C2C12 muscle cells under ketogenic conditions revealed similar metabolic shifts upon beta-hydroxybutyrate supplementation. This further substantiated the role of ketone bodies in modulating key metabolic pathways. Our findings also highlight the significance of prior ketogenic adaptation for efficient utilization of ketone bodies. We observed distinct metabolic patterns in various tissues upon ketone body supplementation in a ketogenic-adapted state, suggesting a tissue-specific metabolic response. In conclusion, our study demonstrates that ketone body supplementation in a ketogenic-adapted state can significantly enhance fat metabolism and suggests potential benefits in exercise performance. The interplay between AMPK and mTOR signaling in this context provides a promising avenue for further research into the mechanisms of metabolic efficiency and autophagy regulation.

Ketone Body, Ketogenic Diet, Beta-hydroxybutyrate

発表責任者：原　太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 B3 会場

骨細胞、破骨細胞、軟骨細胞分化における骨形成型オリゴ DNA の作用

Effect of osteogenetic oligodeoxynucleotide on the differentiation into osteocytes, osteoclasts, and chondrocytes

○木村 智勇[1]、高谷 智英[1,2,3]（[1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大バイオメディカル研）
○Chihaya KIMURA[1], Tomohide TAKAYA[1,2,3] ([1]Fac Agr, Shinshu Univ, [2]Grad Sch Sci Tech, Shinshu Univ, [3]IBS, Shinshu Univ)

ロコモティブ症候群の原因疾患である骨粗鬆症と変形性膝関節疾患は、骨細胞・破骨細胞・軟骨細胞の障害によって生じる。したがって、これらの細胞の機能維持は健康長寿社会の実現にとって重要な課題である。乳酸菌ゲノム配列に由来する 18 塩基の骨形成型オリゴ DNA（iSN40）は、骨芽細胞の分化や石灰化を TLR9 非依存的に促進する。一方で、iSN40 は破骨細胞の分化を TLR9 依存的に阻害する。また、軟骨細胞分化における iSN40 の作用は不明である。本研究では、骨芽細胞と前破骨細胞の共培養による骨リモデリングモデルと、軟骨前駆細胞の分化誘導による軟骨形成モデルにおける iSN40 の効果を検討した。マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 とマウス前破骨細胞株 RAW264.7 を共培養し、RANKL を投与して破骨細胞分化を誘導した。iSN40 投与群では、破骨細胞の分化マーカーである TRAP 活性と、破骨細胞特異的遺伝子（*Ctsk*, *Dcstamp*）の発現量が有意に低下した。iSN40 は、骨芽細胞との共培養系においても RANKL 依存的な前破骨細胞の分化を顕著に阻害することがわかった。次に、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 にインスリンを投与して軟骨細胞分化を誘導した。iSN40 投与群では、アルシアンブルー陽性の酸性ムコ多糖、およびシリウスレッド陽性のコラーゲンを含む細胞外基質の形成が有意に増加し、iSN40 が軟骨分化を促進することが示唆された。

Maintenance of osteocytes, osteoclasts, and chondrocytes is critical to overcome motor dysfunction in aging societies. iSN40 is an 18-base osteogenetic oligodeoxynucleotide designed from the lactic acid bacteria genome that promotes osteogenesis in a TLR9-independent manner and inhibits osteoclastogenesis in a TLR9-dependent manner. However, the effect of iSN40 during chondrogenesis remains unclear. This study investigated the effect of iSN40 on the bone remodeling and chondrogenesis models. Murine osteoblasts MC3T3-E1 and pre-osteoclasts RAW264.7 were co-cultured and osteoclastogenesis was induced by RANKL. iSN40 significantly decreased osteoclast markers, TRAP activity and mRNA levels of *Ctsk* and *Dcstamp*. These results indicate that iSN40 inhibits the differentiation of pre-osteoclasts even in the presence of osteoblasts. Murine pre-chondrocytes ATDC5 were induced to undergo chondrogenesis by insulin. iSN40 significantly increased the formation of extracellular matrix including Alcian blue$^+$ acidic mucopolysaccharides and Sirius red$^+$ collagens. This suggests that iSN40 promotes chondrogenic differentiation.

bone remodeling, chondrocyte differentiation, osteogenetic oligodeoxynucleotide (osteoDN)

発表責任者：高谷　智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B3p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 B3 会場

筋形成型オリゴ DNA は BMP2 依存的な骨芽細胞の分化を阻害する
Myogenetic oligodeoxynucleotide inhibits BMP2-induced osteoblast differentiation

○松島 もも[1]、木村 智勇[1]、高谷 智英[1,2,3] ([1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大バイオメディカル研)
○Momo MATSUSHIMA[1], Chihaya KIMURA[1], Tomohide TAKAYA[1,2,3] ([1]Fac Agr, Shinshu Univ, [2]Grad Sch Sci Tech, Shinshu Univ, [3]IBS, Shinshu Univ)

乳酸菌ゲノム配列に由来する 18 塩基の筋形成型オリゴ DNA（iSN04）は、抗ヌクレオリンアプタマーとして働き、骨格筋・心筋・平滑筋の分化を促進する一方、脂肪の分化を阻害する。本研究では、同じく中胚葉系列である骨芽細胞の分化における iSN04 の作用を検討した。マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 にアスコルビン酸を投与して骨分化を誘導した。免疫染色の結果、iSN04 の標的であるヌクレオリンは、未分化な MC3T3-E1 では核質と核小体に局在するが、分化に伴って細胞質に移行することがわかった。次に、MC3T3-E1 に BMP2 を 48 時間投与して骨分化を誘導した。骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性は BMP2 投与群で有意に増加したが、この BMP2 依存的な ALP 活性の増加は iSN04 の投与によって有意に抑制された。同様に、定量 PCR の結果、BMP2 投与で有意に上昇する骨分化マーカー遺伝子（*Bglap2*）の発現量は、iSN04 投与で有意に抑制された。以上の結果から、ヌクレオリンは骨芽細胞の分化に関与しており、iSN04 によるヌクレオリンの阻害は骨分化を抑制することが明らかになった。BMP シグナルは骨分化を促進して筋分化を阻害することが知られる。この作用は、骨分化を阻害して筋分化を促進する iSN04 の効果と対応することから、BMP シグナル経路に iSN04 の標的であるヌクレオリンが関わっていることが考えられる。

iSN04 is an 18-base myogenetic oligodeoxynucleotide designed from the lactic acid bacteria genome that acts as an anti-nucleolin aptamer to induce skeletal, cardiac, and smooth muscle differentiation and to inhibit adipogenic differentiation. This study examined the effect of iSN04 during the differentiation of osteoblasts, one of the mesodermal cell lineages. Murine osteoblast cell line MC3T3-E1 was induced to differentiate by ascorbic acid. Immunostaining revealed that the target of iSN04, nucleolin, was localized to the nucleoplasm and nucleoli in the undifferentiated state, but translocalized to the cytoplasm during differentiation. MC3T3-E1 was then induced to differentiate by BMP2 for 48 h. An osteogenic marker, alkaline phosphatase (ALP) activity, was increased by BMP2, but this increase was significantly suppressed by iSN04. Similarly, quantitative PCR showed that BMP2 increased an osteogenic marker gene, *Bglap2*, but it was significantly inhibited by iSN04. These results indicate that nucleolin is involved in osteoblast differentiation, and its inhibition by iSN04 suppresses osteogenesis. It suggests the contribution of nucleolin to the BMP signaling pathway during osteogenic differentiation.

myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN), osteoblast, osteogenic differentiation

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B3p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 B3 会場

ヨウ化ニンニクによる細胞賦活作用の作用機序の解明

Elucidation of the mechanism of cell activation by iodized garlic

○岩崎 なつみ[1]、宮内 勇樹[1,2]、廣川 隆彦[3]、謝 凉晶[1]、矢野 敏史[1]、原 太一[1]([1]早稲田大学、[2]近代化学（株）、[3]神奈川県産技総研)
○Natsumi Iwasaki[1], Yuki Miyauchi[1,2], Takahiko Hirokawa[3], Liangjing Xie[1], Satoshi Yano[1], Taichi Hara[1] ([1]Waseda University, [2]Kindaikagaku Co., Ltd, [3]KISTEC)

【目的】ヨウ化ニンニクエキスは、ニンニクの鱗茎の熱水抽出物をヨウ素化して得られた濃縮物であり育毛剤や基礎化粧品に広く使用される。ヨウ化ニンニクエキスは美容に関する有用な効果が謳われる一方で、詳細なエビデンスは明らかにされていない。本研究では、ヨウ化ニンニクエキスの育毛と美肌に関する機能とメカニズムを明らかにすることを目的とし、ヒト毛乳頭細胞とヒト表皮角化細胞に対するヨウ化ニンニクの影響を、遺伝子発現解析と活性成分の分析の 2 つの観点から研究を行った。
【方法と結果】脱水素酵素活性を指標にして細胞の代謝活性に与える影響を調べた結果、ヨウ化ニンニクエキスはヒト乳頭細胞とヒト表皮角化細胞の代謝活性を上昇させ、細胞賦活化作用を有することが分かった。そこで、ゲノムワイドな遺伝子発現解析を実施したところ、ヨウ化ニンニクエキスは抗酸化応答経路である Nrf2 経路を活性化することが示唆され、ホルミシス効果によって細胞の賦活化に機能する可能性が推察された。現在、遺伝子破壊細胞株を用いてメカニズムの詳細を検証中である。また、活性成分の分析では、主に糖類が細胞賦活化に寄与している可能性が示唆された。本研究は、ヨウ化ニンニクエキスの美容に関する新規の機能性やそのメカニズムを明らかにするものであり、その成果は育毛や美肌製品として応用するための重要な知見となると考えられる。
【Objective】Iodized garlic extract is a concentrate obtained by iodinating a heated water extract of the bulbs of garlic. Although iodized garlic extract is considered to have beauty benefits, the details of these evidences are not clear. The purpose of this study was to elucidate the function and its mechanisms of iodized garlic extract about hair-care and skin-care using human follicle dermal papilla cells (HFDPC) and keratinocyte (HaCaT) from two approaches: analysis of gene expression level and active ingredients.
【Methods and Results】Iodized garlic extract was indicated to have a cellular activating effect on HFDPC and HaCaT at measuring dehydrogenase activity. Genome-wide RNA-seq analysis indicated that iodized garlic extract might activate cells via Nrf2 pathway: signaling in oxidative stress, suggesting that iodinated garlic extract might be cell activator and attribute to beauty by hormesis effect. Furthermore, bioactive compounds are estimated saccharides which have a potency of activating cells. This study contributes to reveal the novel functions and mechanisms of iodized garlic extract. These results lay a foundation for the development of cosmetics.

iodized garlic, HFDPC, cosmetics

発表責任者：原太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 B3 会場

オートファジーを制御するジケトピペラジンのスクリーニング

Screening of diketopiperazines that regulate autophagy

○矢野 敏史[1]、内田 頌太郎[2]、唐鎌 翔大[2]、鈴木 伸[2]、木野 邦器[2]、原 太一[1]([1]早大人科院、[2]早大理工院)
○Satoshi YANO[1], Shotaro UCHIDA[2], Shota KARAKAMA[2], Shin SUZUKI[2], Kuniki KINO[2], Taichi HARA[1] ([1]Fac. Hum. Sci., Waseda Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

オートファジーは細胞内のリサイクリングシステムであり、細胞内成分の品質管理を担うことで細胞単位から個体全体の健康維持に機能している。実際に、オートファジー活性を高めたモデル生物では、運動機能などを維持したまま寿命が延伸することが示されている。これまでに我々は、ある種の食品成分がオートファジー活性化を介して機能性を発揮することを明らかにしてきた。その研究過程で、食品成分の立体異性がオートファジー調節に影響を与えることを見出している。そこで本研究では、構成アミノ酸により多様な構造と生物活性が報告されている環状ジペプチド 2,5-diketopiperazine (DKP) のオートファジー活性に与える影響を検討した。各種 DKP はチロシジン合成酵素由来のアデニル化ドメインを利用する新規化学酵素的手法 (*Appl Microbiol Biotechnol;106(12). 2022.*) にて合成した。オートファジースクリーニングの結果、高度にオートファジーを活性化する DKP を 4 種類同定することができた。なお、これら DKP には、一般に知られる栄養飢餓シグナルとは異なるオートファジー活性化機構の存在が示唆された。さらに、構成するアミノ酸の D/L 立体異性によって、オートファジー活性に異なる効果を示すことも見出した。現在、DKP のオートファジーに関する報告はほとんどなく、本研究成果は DKP を機能性成分として活用する上で、有用な知見となると考えられる。

Autophagy is an intracellular recycling system that play a role to maintain the health of the cellular and the individual by being responsible for quality control of intracellular components. In fact, model organisms with enhanced autophagy activity have been shown to extend lifespan while maintaining motor and brain functions. Previously, we have shown that food components exert their function via autophagy activation. In the course of this study, the chirality of ingredients have found to affect autophagy regulation. In this study, we analyzed the effect of cyclic peptide 2,5-diketopiperazine (DKP), which has diverse structures based on the type and chirality of its constituent amino acids, on autophagy activity. Because DKP is a trace component in food, it was produced using an efficient synthetic method based on the adenylation domain of tyrocidine synthetase A (*Appl Microbiol Biotechnol; 106(12). 2022.*). Autophagy screening identified four highly autophagy-activating DKPs. The four DKPs also suggested the existence of an autophagy activation mechanism that differs from the commonly known nutrient starvation signal. Furthermore, we also found DKP to have opposite effects on autophagy activity, depending on the D/L chirality of the constituent amino acids. There have been few reports on autophagy in DKP, and the results of this study will be useful knowledge for utilizing DKP as a functional ingredient.

autophagy, diketopiperazine, chirality

発表責任者：原太一（harata1@waseda.jp）

講演番号：2B3p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 B3 会場

筋形成型オリゴ DNA は BMP2 による筋分化の阻害を回復する

Myogenetic oligodeoxynucleotide restores myogenic differentiation inhibited by BMP2

○石田 智香[1]、山本 万智[2]、高谷 智英[1,2,3]（[1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大バイオメディカル研）
○Chika ISHIDA[1], Machi YAMAMOTO[2], Tomohide TAKAYA[1,2,3] ([1]Fac Agr, Shinshu Univ, [2]Grad Sch Sci Tech, Shinshu Univ, [3]IBS, Shinshu Univ)

外傷や手術で生じる異所性骨化は、過剰な骨形成タンパク質（BMP）によって惹起される。骨格筋前駆細胞である筋芽細胞に BMP を投与すると、骨分化が誘導されて筋分化が阻害されることが知られており、筋組織の異所性骨化モデルに用いられる。我々が同定した、乳酸菌ゲノム配列に由来する 18 塩基の筋形成型オリゴ DNA（iSN04）は、抗ヌクレオリンアプタマーとして働き、筋分化を促進する。本研究では、iSN04 が BMP2 による筋分化の阻害を回復するかを検討した。

マウス筋芽細胞株 C2C12 に BMP2 および iSN04 を投与して 48 時間筋分化を誘導した。骨格筋の最終分化マーカーであるミオシン重鎖の免疫染色を行い、筋分化を評価した。対照群と比較し、BMP2 投与群ではミオシン重鎖陽性の筋細胞の割合が有意に減少したが、この BMP2 依存的な筋分化阻害は iSN04 の投与で回復した。iSN04 の標的であるヌクレオリンと BMP シグナル経路の関係は報告されておらず、iSN04 の作用メカニズムは現時点で不明である。骨分化の指標であるアルカリフォスファターゼの活性や、筋分化および骨分化マーカー遺伝子の発現定量により、iSN04 による BMP 依存的な筋分化阻害の回復機序を明らかにすることで、iSN04 が、異所性骨化に対する新しい核酸医薬品のシーズとなることが期待される。

Excessive bone morphogenic proteins (BMPs) induce ectopic ossification caused by trauma and surgery. It has been reported that BMPs induce osteogenic differentiation and inhibit myogenic differentiation of skeletal muscle precursor cells, myoblasts, which is used as a model of ectopic ossification. iSN04 is an 18-base myogenetic oligodeoxynucleotide designed from the lactic acid bacteria genome that acts as an anti-nucleolin aptamer to induce myoblast differentiation. This study investigated the effect of iSN04 on BMP-2 inhibited myoblast differentiation.

Murine myoblast cell line C2C12 was induced to differentiate with BMP2 and iSN04 for 48 h. Myogenic differentiation was quantified by immunostaining for myosin heavy chain (MHC), a terminal differentiation marker of skeletal muscle. Compared to the control group, BMP2 significantly decreased the ratio of MHC-positive cells, but this decrease was reversed by iSN04 treatment. Because the involvement of nucleolin in the BMP signaling pathway has not been reported, the mechanism of action of iSN04 remains to be elucidated. iSN04, which restores BMP-inhibited myogenesis, may be a drug seed for ectopic ossification.

myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN), myoblast, myogenic differentiation

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B3p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 B3 会場

筋形成型オリゴ DNA の抗子宮平滑筋肉腫作用の検討
Anti-uterine leiomyosarcoma effect of myogenetic oligodeoxynucleotide
○平林 ゆり[1]、高谷 智英[1,2,3] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大農、[3]信州大バイオメディカル研)
○Yuri HIRABAYASHI[1], Tomohide Takaya[1,2,3] ([1]Grad Sch Sci Tech, Shinshu Univ., [2]Fac Agr, Shinshu Univ., [3]IBS, Shinshu Univ.)

乳酸菌ゲノム配列に由来する 18 塩基の筋形成型オリゴ DNA（iSN04）は、抗ヌクレオリンアプタマーとして働くことで、骨格筋や平滑筋の分化を促進する。iSN04 は、骨格筋が腫瘍化した横紋筋肉腫の筋分化を誘導して増殖を阻害することから、iSN04 は平滑筋の肉腫にも抗腫瘍効果を示すことが期待される。本研究では、子宮平滑筋肉腫（ULMS）および子宮癌肉腫（UCS）に対する iSN04 の作用を検討した。ヒト患者から採取された ULMS 細胞株（SKN および RKN）と UCS 細胞株（EMTOKA）を実験に用いた。免疫染色の結果、いずれの細胞においても、iSN04 の標的であるヌクレオリンは、核質と核小体に局在することを認めた。各細胞を 10 μM または 30 μM の iSN04 を投与して培養し、細胞数を計数した結果、iSN04 は SKN の増殖を有意に抑制したが、RKN と EMTOKA の増殖には影響しなかった。平滑筋マーカー遺伝子（*ACTA2*, *CALD1*, *TAGLN*）の mRNA を定量した結果、これらの遺伝子は SKN でのみ高い発現を認めた。以上の結果から、iSN04 は、平滑筋に最も形質が近い SKN の増殖を抑制したと考えられる。今後、iSN04 の作用機序を解明することで、子宮平滑筋肉腫の創薬につながることが期待される。

iSN04 is an 18-base myogenetic oligodeoxynucleotide designed from the lactic acid bacteria genome that acts as an anti-nucleolin aptamer and induces skeletal and smooth muscle differentiation. iSN04 induces myogenic differentiation and inhibits the growth of rhabdomyosarcoma cells that are derived from skeletal muscle mutations. Therefore, iSN04 is expected to have anti-tumor activity in smooth muscle sarcoma as well. This study investigated the effect of iSN04 on uterine leiomyosarcoma (ULMS) and uterine carcinosarcoma (UCS). Patient-derived ULMS cell lines (SKN and RKN) and a UCS cell line (EMTOKA) were used in the study. Immunostaining revealed that the target of iSN04, nucleolin, was localized to the nucleoplasm and nucleoli in all cell lines. Both 10 μM and 30 μM iSN04 significantly suppressed the growth of SKN but not of RKN and EMTOKA. Quantitative PCR showed that only SKN expressed high levels of smooth muscle marker genes (*ACTA2*, *CALD1*, *TAGLN*). These results suggest that iSN04 inhibits the growth of SKN due to its smooth muscle-like properties. Elucidating the mechanism of action of iSN04 will contribute to the development of drugs for leiomyosarcoma including ULMS.

aptamer, myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN), uterine leiomyosarcoma

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B3p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 B3 会場

インドキシル硫酸は Akt/β-カテニン/c-myc および AhR/c-myc 経路の活性化を介して大腸癌細胞の増殖と EGFR の発現増加を導く
Indoxyl sulfate induces colon cancer cell proliferation and increased EGFR expression by activating the Akt/ß-catenin/c-myc and AhR/c-myc pathways.
○一坂 優[1]、矢野 彰三[3]、丹羽 利充[2]、清水 英寿[1] ([1]島大院自然、[2]修文大、[3]島大院医学)
○Yu Ichisaka[1], Shozo Yano[3], Toshimitsu Niwa[2], Hidehisa Shimizu[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Shimine Univ., [2]Shubun Univ., [3]Dept. Lab. Med., Fac. Med., Shimane Univ.)

慢性腎臓病患者は大腸癌のリスクが高いと疫学的に示されているが、この 2 つの疾患を結びつける要因は未だ不明な点が多い。双方の病態悪化には、腸内でのインドール産生菌の増加が関与していることが報告されている。インドールは肝臓でインドキシル硫酸となり、慢性腎臓病の進行促進、およびその合併症の発症・進展を導く。本研究では、インドキシル硫酸が他の合併症と同様に大腸癌の進展に関与すると仮説を立て解析を行った。インドキシル硫酸は Akt の活性化を起点に発現増加するβ-catenin／c-Myc 経路を介して、大腸癌由来 HCT-116 細胞の増殖を導いた。加えて、インドキシル硫酸の受容体として知られている AhR は、c-Myc の発現増加を介して細胞増殖を導いた。また、インドキシル硫酸によって活性化された Akt と AhR、発現増加したβ-catenin と c-Myc は、大腸癌の予後不良に関連する EGFR の発現量を増加させ、HCT-116 細胞に対する EGF 感受性を亢進させた。以上から、インドキシル硫酸は慢性腎臓病の進行と大腸癌の悪化を結びつける重要な因子であると示唆された。さらに、慢性腎臓病患者における大腸癌進行に対して、インドキシル硫酸は治療標的となり得る可能性が示された。

Although epidemiological studies have shown that patients with chronic kidney disease (CKD) are at an increased risk for colorectal cancer (CRC), the factors linking these two diseases remain unclear. The increased relative abundance of indole-producing bacteria in the gut has been implicated in the exacerbation of both the diseases. Indoxyl sulfate, which is metabolized from indole in the liver, accelerates CKD progression and leads to the onset and development of complications. The present study aimed to clarify whether indoxyl sulfate is involved in CRC aggravation as well as other CKD complications. Indoxyl sulfate led to the proliferation of HCT-116 cells derived from CRC by activating the Akt-induced β-catenin/c-Myc pathway. In addition, indoxyl sulfate-induced activation of AhR, a known receptor for indoxyl sulfate, led to HCT-116 cell proliferation via increased c-Myc expression. Furthermore, indoxyl sulfate enhanced EGF sensitivity to HCT-116 cells by increasing the expression level of EGFR, which is associated with poor prognosis in CRC. The mechanism involved indoxyl sulfate-induced activation of Akt and AhR and increased expression of β-catenin and c-Myc. Taken together, indoxyl sulfate appears to be a crucial link between CKD progression and CRC aggravation. Furthermore, indoxyl sulfate is a potential therapeutic target for CRC progression in patients with CKD.

Indoxyl sulfate, Chronic kidney disease, Colorectal cancer

発表責任者：清水英寿（hideshmz@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2B3p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 B3 会場

AMPK による SRSF9 のリン酸化が SUMO 化に与える影響の解析
Analysis of the effect of phosphorylation of SRSF9 by AMPK on SUMOylation
○中沢 茉紘[1]、松本 英里[1]、小坂 愼太郎[2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2]、鈴木 司[2] ([1]東農大院、[2]東農大)
○ Mahiro NAKAZAWA[1], Eri MATSUMOTO[1], Shintaro KOSAKA[2], Jun INOUE[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Tsukasa SUZUKI[2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】AMPK はエネルギー低下ストレス等によって活性化されるキナーゼであり、エネルギー代謝のみならず多様な機能を制御する。これまでに我々は、RNA 結合タンパク質である SRSF9 を AMPK の新規基質として同定した。さらに、AMPK が SRSF9 のリン酸化を介して RNA 結合能を低下させ、選択的スプライシングに関与することを報告した。この他に SRSF9 はタンパク質の SUMO 化促進能を持つことが報告されているが、我々は AMPK による SRSF9 のリン酸化部位を変異させたところ SUMO 化促進能が低下することを前回大会にて報告した。そこで本研究では、実際に AMPK による SRSF9 のリン酸化修飾が SUMO 化に影響を及ぼすか、SRSF9 による SUMO 化促進に RNA 結合能が関与するか、どのようなタンパク質の SUMO 化に AMPK-SRSF9 が影響を及ぼすのか解析を行った。
【方法・結果】HEK293T 細胞を用いて、SRSF9 と AMPK の過剰発現下で網羅的なタンパク質の SUMO 化を Western Blot 法にて解析した。その結果、SRSF9 によるタンパク質の SUMO 化の上昇が AMPK によって抑制される結果が得られた。さらに SRSF9 の RNA 結合部位を変異させた変異体を過剰発現させたところ、野生型で示された SUMO 化の上昇は認められなかった。さらに SUMO 化修飾を受ける代表的な因子として RanGAP1 に着目し解析を行ったところ、SRSF9 が RanGAP1 の SUMO 化を促進することの他に、この SUMO 化が AMPK によって抑制されることが示された。したがって、AMPK は SRSF9 のリン酸化を介してタンパク質の SUMO 化を制御する新たな機能が示された。

AMPK is a kinase that is activated by energy stress. Previously, we identified SRSF9, an RNA-binding protein, as a novel substrate of AMPK. In addition, SRSF9 has been reported to have the ability to promote protein SUMOylation, and we found that a phosphor-mimetic mutant of SRSF9 decreased the ability to promote SUMOylation. In this study, we analyzed whether the phosphorylation modification of SRSF9 by AMPK affects SUMOylation, whether RNA binding ability is involved in SUMOylation promotion by SRSF9, and what kind of proteins SUMOylation is affected by AMPK-SRSF9. Here, we confirmed that co-expression of SRSF9 and AMPK suppresses SUMOylation by SRSF9, which is also involved in SUMOylation of RanGAP1, a protein involved in protein transport, and that altering SUMOylation also affects the localization of RanGAP1. Thus, AMPK may have a novel function in regulating protein SUMOylation via phosphorylation of SRSF9.

AMPK, SUMOylation, RanGAP1

発表責任者：鈴木司（ts200635@nodai.ac.jp）

講演番号：2B3p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 B3 会場

がん抑制タンパク質 TSC 複合体の新規結合因子 PGRMC1 の機能解析
Functional analysis of PGRMC1, a novel binding factor for the cancer suppressor protein TSC complex
○石井 真央[1]、逸見 明央[1]、鈴木 康央介[2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2]、鈴木 司[2]([1]東農大院・応生科・農化、[2]東農大・応生科・農化)
○Mao ISHII[1], Akihiro HENMI[1], Kosuke SUZUKI[2], Jun INOUE[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Tsukasa SUZUKI[2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】PI3K/AKT/mTORC1 シグナル伝達経路の制御因子として TSC 複合体が存在する。この複合体はがん抑制タンパク質である TSC1 および TSC2、そして近年この複合体の構成因子として同定された TBC1D7 から成り、細胞増殖を制御する mTORC1 を間接的に抑制する。様々ながん細胞において mTORC1 の過剰な活性化が確認されていることから、mTORC1 の抑制メカニズムの詳細な理解が求められている。これまでに当研究室では TBC1D7 の結合因子としてヘム結合性膜タンパク質である PGRMC1 を見出し、さらに PCRMC1 が TSC 複合体とも相互作用することを報告した(日本農芸化学会 2023 年度大会)。本研究では、PGRMC1 が TSC 複合体と結合する生理的意義について解明することを目的とした。
【方法・結果】これまでに HEK293T 細胞を用い、強制発現系において PGRMC1 と TSC 複合体との結合を共免疫沈降法にて確認した。そこで内因性レベルでも同様の解析を行った結果、PGRMC1 と TSC2/TSC1/TBC1D7 がともに共免疫沈降をした。また、PGRMC1 との結合が TSC 複合体の局在性に影響を及ぼすか検討するため、免疫蛍光染色法およびショ糖密度勾配法による細胞分画を行った。その結果、PGRMC1 の過剰発現により TSC 複合体の局在がリソソーム膜上から減少することが示された。TSC 複合体はリソソーム膜上にて mTORC1 を抑制することから、PGRMC1 の過剰発現が mTORC1 の活性に影響するか解析したところ、mTORC1 の基質である S6K のリン酸化レベルの上昇が確認でき、mTORC1 の活性化が示された。これらのことから PGRMC1 は TSC 複合体と結合し、TSC 複合体の局在をリソソーム膜上から変化させ、mTORC1 に対する抑制能を阻害することが考えられた。

The TSC complex functions as a regulator in the PI3K/AKT/mTORC1 signaling pathway. Comprising TSC1 and TSC2 tumor suppressor proteins, along with TBC1D7, recently identified as part of this complex, it indirectly suppresses mTORC1, a cell growth regulator. Our recent discovery implicates PGRMC1 as a potential binding factor for TBC1D7 within the TSC complex. In this study, we aimed to determine the effect of PGRMC1 on the TSC complex. We found that PGRMC1 interacts not only with TBC1D7 but also with another TSC complex, TSC2 and TSC1. PGRMC1 also altered the lysosomal localization of the TSC complex. Furthermore, PGRMC1 increased the phosphorylation level of S6K, a substrate of mTORC1. Thus, PGRMC1 may bind to the TSC complex and inhibit its inhibitory ability against mTORC1.

mTORC1, insulin signal, PGRMC1

発表責任者：鈴木司（ts200635@nodai.ac.jp）

講演番号：2B3p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 B3 会場

AMPK が新規基質 DDB1 を介して Cullin4 ユビキチンリガーゼに及ぼす影響の解析
Analysis of the effect of AMPK on Cullin4 ubiquitin ligase via a novel substrate DDB1
○鈴木 司[1]、吉澤 千尋[2]、鈴木 理子[2]、秋山 果穂[2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化)
○Tsukasa SUZUKI[1], Chihiro YOSHIZAWA[2], Riko SUZUKI[2], Kaho AKIYAMA[2], Jun INOUE[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】AMPK は真核生物で高度に保存されたセリン・スレオニンキナーゼであり、基質のリン酸化を介してエネルギー恒常性のみならず多彩な生理作用を制御することが知られている。これまでに我々は、AMPK の新規基質を探索した結果、CUL4 ユビキチンリガーゼの構成因子である DDB1 を見出した。DDB1 は CUL4 複合体において、CUL4 と基質認識サブユニットである DCAFs とのアダプターとして機能する。DCAFs は多くの基質に対応するため複数存在するが、DDB1 と DCAFs との結合・解離がどのようなメカニズムで制御されるのかは不明である。本研究では、AMPK による DDB1 のリン酸化修飾が DDB1 と DCAFs との複合体形成、CUL4 複合体の細胞内局在性に及ぼす影響に焦点を当て解析を行った。
【方法・結果】in vitro キナーゼアッセイおよび特異的リン酸化抗体を用いた western blot 法により AMPK による DDB1 のリン酸化部位を解析した結果、DCAFs との結合に対応するドメインでリン酸化修飾を確認した。HEK293T 細胞に DDB1 のリン酸化部位の変異体を発現させ、免疫沈降法によって DCAFs との結合性を解析した結果、DDB1 のリン酸化模倣変異体と代表的な DCAFs の一つである DDB2 との結合が抑制された一方で、結合性が低下しない DCAFs も確認できた。DDB1 は CUL4 とともに細胞質・核内のどちらにも局在する。そこで免疫蛍光染色法にてリン酸化 DDB1 の細胞内局在性を解析した。その結果、リン酸化 DDB1 は細胞質にのみ局在する結果が得られた。以上のことから AMPK は DDB1 のリン酸化を介して CUL4-DDB1 の局在変化や特定の DCAFs との結合に影響を及ぼすことでユビキチン化に関与することが示唆された。

We identified DDB1, a component of the CUL4 ubiquitin ligase as an AMPK substrate. DDB1 serves as an adapter between CUL4 and the substrate recognition subunits, DCAFs. We investigated the impact of these modifications on the complex formation between DDB1 and DCAFs, as well as on the subcellular localization of the CUL4-DDB1 complex.
Our findings revealed phosphorylation modifications in the DDB1 domain responsible for DCAFs binding. DDB1 phosphorylation inhibited the binding of DDB1 to DDB2, one of the most common DCAFs. Additionally, phosphorylated DDB1 was exclusively localized in the cytoplasm. These results suggest that AMPK plays a role in ubiquitination by influencing the localization of CUL4-DDB1 and its interaction with specific DCAFs through phosphorylation of DDB1.

AMPK, DDB1, CUL4 ubiquitin ligase

発表責任者：鈴木　司（ts200635@nodai.ac.jp）

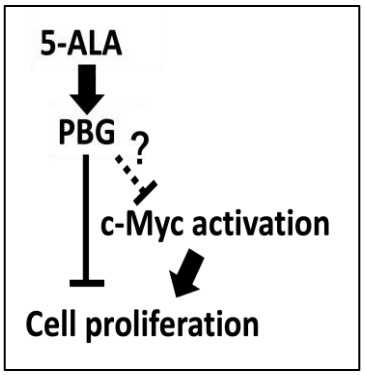
講演番号：2B3p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 B3 会場

5-アミノレブリン酸代謝産物による動物細胞増殖抑制機構の解析

Mechanistic analysis on the inhibition of mammalian cell proliferation by metabolite(s) of 5-aminolevulinic acid

○渡邉 晴也[1]、森谷 薫穂[2]、千葉櫻 拓[1,2] ([1]東農大院生命、[2]東農大生命)
○Seiya WATANABE[1], Kagaho MORIYA[2], Taku CHIBAZAKURA[1,2] ([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Agric, [2]Dept. of Biosci., Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

5-アミノレブリン酸(5-ALA)は、全生物の生体内で合成される天然アミノ酸であり、ヘムの出発基質である。ヘムは呼吸鎖複合体およびシトクロム c の主要な構成物質であり、ヘム量の増加は呼吸鎖複合体の活性と ATP 生産を上昇させる。この性質を利用して、糖尿病改善、アンチエイジング等を目的としたサプリメントとして販売されている。一方、ATP 合成量の増加は細胞のエネルギー代謝を活性化し細胞増殖を促進するとの予想に反し、当研究室では、5-ALA を動物培養細胞に投与すると細胞周期を遅延して増殖を抑制すること、増殖抑制は正常細胞よりもがん細胞においてより強いことを発見した。5-ALA 中間代謝産物であるポルフォビリノーゲン(PBG)が要因物質であると推定されているが、増殖抑制の機構は未解明である。そこで各種細胞増殖制御因子への影響を解析したところ、5-ALA 添加により、増殖促進転写因子である c-Myc の活性型リン酸化が抑制されること、またがん細胞で c-Myc の転写活性が著しく減少することを見出した。さらに、c-Myc 過剰発現下でも 5-ALA による増殖抑制が全く回復しないことから、5-ALA は c-Myc を機能的に阻害することが示唆された。



5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a naturally synthesized amino acid and a precursor of heme synthesis in mammals. Heme is a key component of the respiratory chain complexes and cytochrome *c*, and its increase enhances the activity of respiratory chain complexes and ATP synthesis. Thus, 5-ALA has been provided as a supplement for improving health problems such as diabetes and aging. Meanwhile, contrary to our assumption that an increase in ATP synthesis activates cellular energy metabolism and promotes cell proliferation, we found that administration of 5-ALA to mammalian cells results in a cell cycle delay and suppression of cell proliferation, which is more evident in cancer cells than normal cells. While porphobilinogen (PBG), an intermediate metabolite downstream of 5-ALA, has been implicated as the cause of proliferation suppression, the underlying mechanism remained unclear. We therefore analyzed the effect of 5-ALA on various regulatory factors for cell proliferation and observed that 5-ALA treatment suppresses the phosphorylation which activates the proliferation-promoting transcription factor c-Myc and causes a significant decrease in c-Myc transcriptional activity specifically in cancer cells. Furthermore, c-Myc overexpression failed to rescue the proliferation suppression in the presence of 5-ALA, suggesting that 5-ALA administration leads to a functional inhibition of c-Myc.

5-aminolevulinic acid, Cell proliferation, Porphyrin metabolism

発表責任者：渡邉 晴也（11723004@nodai.ac.jp）

講演番号：2B4a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 B4 会場

プラスミドの接合伝達の可否と，プラスミドと細菌染色体間の塩基組成類似性の関係
Correlation between conjugative transfer proficiency and similarity of the nucleotide composition between plasmids and bacteria Chromosomes

○山﨑 凜[1]、徳田 真穂[2]、敦賀 俊太[3]、前田 壮[1]、金原 和秀[1,2,3]、新谷 政己[1,2,3,4] ([1]静大・工、[2]静大院・創造、[3]静大院・総合科技、[4]静大・グリーン研)
○Rin YAMAZAKI[1], Maho TOKUDA[2], Shunta TSURUGA[3], So MAEDA[1], Kazuhide KIMBARA[1,2,3], Masaki SHINTANI[1,2,3,4] ([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Integr. Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，接合伝達によって宿主に新たな形質を与えることができ，細菌の急速な進化や多様性に寄与してきた．プラスミドとその宿主となる細菌染色体の連続塩基組成（*k*-mer 組成）や GC 含量は高い類似性を示す傾向にある[1)]．本研究では，プラスミドの接合伝達の可否と *k*-mer 組成の類似度にも正の相関があるのかを検証するため，染色体の全塩基配列が明らかとなっている細菌を用いて接合実験を実施した．PromA，IncP/P-1 群および未分類のプラスミドを保持する 14 種類の供与菌と，染色体配列既知の 125 株の受容菌を一種類ずつ用いて行った（14×125 の 1,750 通り）．このとき，GFP 遺伝子が挿入されたプラスミドが受容菌に伝達した場合にのみ蛍光を示す仕組みを利用して[2)]，プラスミドが接合伝達したかどうか，フローサイトメトリーを用いて明らかにした．1,750 の接合実験の結果，766 の組み合わせでプラスミドの接合伝達が認められ，984 の組み合わせでは接合伝達は認められなかった．また，得られた結果に対して，Mahalanobis 距離を用いて *k*-mer 組成の類似度を比較したところ，プラスミドを受け取らなかった細菌よりもプラスミドを受け取った細菌において，*k*-mer 組成は高い類似性を示した（$p < 2.2E\text{-}16$）．したがって，プラスミドと細菌染色体間の *k*-mer 組成の類似度の大きさと接合伝達の可否との間に正の相関があると示唆された．

Plasmid conjugation confers new traits to their hosts and contributes to the rapid evolution and diversity of bacteria. Similarities in nucleotide compositions and GC content between the plasmids and their host chromosomes have been observed. To investigate the relationship between the capability of conjugative transfer and the similarity in *k*-mer compositions, filter mating experiments were conducted. Fourteen donors, each carrying a distinct plasmid, and 125 recipients with previously determined chromosomal sequence were used. Conjugative transfer proficiency was assessed through GFP labeling and flow cytometry. In 1,750 filter mating experiments, plasmid transfer occurred in 766 combinations, while it did not occur in 984 combinations. Additionally, *k*-mer compositions demonstrated higher similarity in bacteria that successfully acquired the plasmid compared to those that did not ($p < 2.2E\text{-}16$). Thus, the similarity in *k*-mer compositions between the plasmid and the bacterial chromosome appears to be associated with the success of conjugative transfer.

1) Suzuki *et al.*, 2010. *J Bacteriol* ;192:6045–6055
2) Christensen *et al.*, 1998. *Appl. Environ. Microbiol* ;64:2247-2255

plasmid, transconjugants, nucleotide compositions

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B4a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 B4 会場

プラスミドが接合伝達する細菌を塩基配列の特徴から予測する
Prediction the transconjugants of plasmids from nucleotide sequences
○徳田 真穂[1]、敦賀 俊太[2]、前田 壮[3]、山﨑 凜[3]、金原 和秀[1,2,3]、新谷 政己[1,2,3,4] ([1]静大院・創造、[2]静大院・総合科技、[3]静大・工、[4]静大・グリーン研)
○Maho Tokuda[1], Shunta Tsuruga[2], So Maeda[3], Rin Yamazaki[3], Kazuhide Kimbara[1,2,3], Masaki Shintani[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. integr. Shizuoka Univ., [3]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドがどの細菌に接合伝達するのかという情報は未だ乏しい上，接合実験によって網羅的に同定することは困難である．我々は，IncP/P-1, PromA 群および未分類の 14 種類のプラスミドと，125 株の染色体配列が既知の受容菌を用いた接合実験によって，プラスミドが接合する「接合完了体」と「非接合完了体」の同定に成功した[1)]．また，プラスミドと染色体の *k*-mer 組成の類似度は，接合完了体の方が高かった[1)]．そこで本研究では，接合実験で同定した接合伝達の可否の情報と，プラスミド-染色体間の塩基組成の類似度との関係を，ランダムフォレストモデルに基づいて機械学習させることで，プラスミドが接合伝達する細菌を，プラスミドの塩基配列から予測できるかどうかを検証した．宿主域が未知であったプラスミド pYKAS102 の接合完了体の予測を行うと同時に，125 株に対して接合実験を行い，予測結果と接合実験の結果が一致するかを調べた．その結果，81%(102 / 125 株)の細菌に対する接合伝達の可否の予測が，接合実験の結果と一致した．したがって，塩基組成の類似度を利用することで，プラスミドが接合伝達する細菌を塩基配列情報から予測可能であることが示唆された．

Horizontal gene transfer by plasmid conjugation is important to understand the evolution of bacteria. However, it is still unclear which bacteria could obtain which plasmids by conjugation. In our previous study, “Transconjugants” and “Non-transconjugants” were identified by conjugation assay using 14 plasmids and 125 bacterial strains whose whole genomes were available[1)]. *k*-mer compositions between plasmids and chromosomes of “Transconjugants” were shown to be similar. In this study, we use the machine learning based on random forest model to assess if “Transconjugants” could be predicted by nucleotide compositions of plasmids and bacterial chromosomes. “Transconjugants” of pYKAS102 with unknown host ranges were predicted by machine learning and determined by conjugation assay with 125 strains. As a results, the prediction of 81% (102/125 strains) were consistent with the results of conjugation assay. Therefore, it is suggesting the nucleotide compositions could be used to predict “Transconjugants” of plasmids.

1）山﨑ら，本大会要旨集

Plasmid, nucleotide composition, conjugative transfer

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B4a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 B4 会場

プラスミド pCAR1 由来の核様体タンパク質 Pnd の DNA 結合様式の解明
DNA binding mode of Pnd, a nucleoid-associated protein encoded on the plasmid pCAR1
○江本 光毅[1]、水口 千穂[2,3]、森脇 由隆[2,3]、YANG Miaoyan[2]、鈴木 研志[2,3]、岡田 憲典[2]、野尻 秀昭[2,3] ([1]東大・農、[2]東大院・農生科、[3]東大・微生物連携機構)
○Koki EMOTO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[2,3], Yoshitaka MORIWAKI[2,3], Miaoyan YANG[2], Kenshi SUZUKI[2,3], Kazunori OKADA[2], Hideaki NOJIRI[2,3] ([1]Agric., UTokyo, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [3]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】核様体タンパク質（NAPs）の一種である NdpA ホモログは多くのグラム陰性細菌に保存されているものの、その機能や構造についての知見は非常に少ない。プラスミド pCAR1 にコードされる NdpA ホモログ Pnd は、同じく pCAR1 にコードされる他 2 種類の NAPs と協調的に機能し、pCAR1 の安定性や接合伝達能に影響を与える [Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2015, *AEM*, 81:2869-80]。先行研究では Pnd の結合配列を調べるため、*Pseudomonas putida* KT2440 株を宿主として ChIP-Seq 解析が行われたが、明確な塩基配列特異性は見出されなかった。本研究では AlphaFold による構造予測を用いて Pnd と DNA との結合様式を解明することを目的とした。【方法・結果】AlphaFold による複合体構造予測から、Pnd は二量体を形成すると考えられた。二量体の中央に生じた空洞（図 1 左）には塩基性の残基が集まっており、サイズ・電荷ともに DNA が収まる可能性が高いと考えられた（図 1 右）。そこで、モデル構造中で DNA から 5 Å 以内に存在する正電荷を持つアミノ酸残基が DNA への結合に関与すると予測し、単量体あたり 9 個の残基をアラニンに置換したタンパク質（Pnd-9Ala-C-His）を作製した。ゲルシフトアッセイの結果、Pnd-9Ala-C-His はアラニン置換前のタンパク質に比べて DNA 結合能が低下していた。以上より、Pnd は DNA の周囲に環状に結合することが強く示唆された。

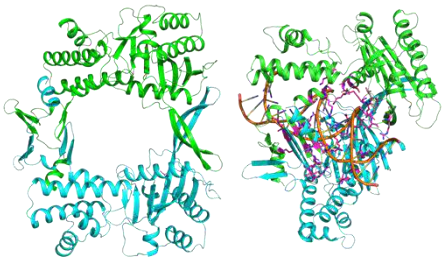


図 1. Pnd の二量体予測構造

NdpA homologs are nucleoid-associated proteins conserved among Gram-negative bacteria, although little is known about their functions and structures. Pnd, an NdpA homolog encoded on the catabolic plasmid pCAR1, affects the stability and transferability of pCAR1 [Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2015, *AEM*, 81:2869-80]. Our previous ChIP-Seq analyses indicated that Pnd has no specificity for binding to DNA in *Pseudomonas putida* KT2440. Here we revealed the DNA binding mode of Pnd using structural predictions via AlphaFold. Pnd was predicted to form a donut-like dimer, which has a hole suitable for DNA-binding (Fig. 1). We generated a Pnd derivative, in which nine basic amino acid residues around the hole were substituted with alanine (Pnd-9Ala-C-His). EMSA results showed that Pnd-9Ala-C-His has lower DNA binding ability than the native Pnd, suggesting that the DNA binding mode of Pnd shown in Fig. 1 is reasonable.

Pseudomonas, plasmid, nucleoid-associated proteins

発表責任者：野尻 秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B4a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 B4 会場

シアノバクテリアから見出された新規プラスミド複製因子と複製開始メカニズムに関する研究
Studies on novel plasmid replication factors found in cyanobacteria and their replication initiation mechanisms.
○坂田 実乃里[1]、Kaltenbrunner Alena[2]、大舘 和真[1]、前田 海成[3]、青柳 智大[1]、坂巻 裕[1]、荷村(松根) かおり[1]、大林 龍胆[4]、Wolfgang Hess[2]、渡辺 智[1]([1]東農大院・バイオ、[2]フライブルク大学、[3]東工大研究院化生研、[4]静岡大)
○ MINORI SAKATA[1], Alena Kaltenbrunner[2], KAZUMA OHDATE[1], KAISEI MAEDA[3], TOMOHIRO AOYAGI[1], YUTAKA SAKAMAKI[1], KAORI NIMURA-MATSUNE[1], RYUDO OHBAYASHI[4], Hess Wolfgang[2], SATORU WATANABE[1] ([1]Department of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Genetics and Experimental Bioinformatics Group, Faculty of Biology, Univ. of Freiburg, [3]Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, [4]Department of science, Shizuoka Univ.)

シアノバクテリアは、酸素発生型光合成を行う原核生物である。ゲノム構造が多様であり、複数のプラスミドを持つものも存在するが、その詳細な複製維持メカニズムについては未解明である。
モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 は主染色体に加えて 7 つのプラスミド(pSYSM、pSYSX、pSYSA、pSYSG、pCA2.4、pCB2.4、pCC5.2)を有している。不和合性を示さずに 7 つのプラスミドを同時に保持していることから、我々はそれぞれのプラスミドが独自の複製メカニズムを用いていると考えた。我々は、プラスミド pSYSA の複製メカニズムに着目して研究を進めた結果､プラスミド複製に関わる新規タンパク質 CyRepA1 を同定した（Kaltenbrunner et al., 2023)。CyRepA1 をコードする領域の上流には高発現 small RNA（sRNA）が見出されており、遺伝学的解析から sRNA の転写が複製開始のトリガーとなることが示唆された。さらに自律複製領域のスクリーニングから、プラスミド pSYSX において新たに 2 つの自律複製活性因子 CyRepX1、CyRepX2 を同定した。CyRepA1 と同様に CyRepX1、CyRepX2 においても上流に高発現 sRNA が確認されたことから、sRNA の転写と CyRep タンパク質が *S*. 6803 のプラスミド複製において重要な役割を担うことが示唆された。
Cyanobacteria, prokaryotes performing oxygenic photosynthesis, exhibit diverse genome structures, with some harboring multiple plasmids. However, the detailed mechanisms for the plasmid replication and maintenance in cyanobacteria are unclear. The model cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, has its main chromosome and seven plasmids (pSYSM, pSYSX, pSYSA, pSYSG, pCA2.4, pCB2.4, pCC5.2). As these plasmids coexist without incompatibilities, it suggests each employs a unique replication method. Within the pSYSA plasmid, we discovered a protein with a primase/helicase domain, named CyRepA1, identified as a factor in plasmid replication. Moreover, upstream of the region encoding CyRepA1, high-expressing small RNA was found, hinting at its role as a trigger for replication initiation. Also, using AR-Seq, two autonomous replication regions were found on the pSYSX plasmid, named CyRepX1 and CyRepX2. Transcriptome results revealed high expression of sRNA in CyRepX1 and CyRepX2, similar to CyRepA1. This indicates the importance of sRNA and CyRep proteins as replication factors in the plasmid replication of *S.* 6803.

DNA replication, transcriptional regulation, genetic engineering

講演番号：2B4a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 B4 会場

大腸菌－枯草菌間の接合伝達における *oriT* 最小領域の特定
Determination of minimal origin of transfer region for conjugation between *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*
○神崎 泰輝、猪又 俊輔、深田 悠太、片岡 正和（信州大院理工）
○Taiki KANZAKI, Shunsuke INOMATA, Yuta FUKADA, Masakazu KATAOKA (The Univ. of Shinshu)

細胞への遺伝子導入法の一つに「接合伝達」が存在する。接合伝達には様々な伝達機構が知られており、特にⅣ型分泌機構(T4SS)は広範な宿主に接合伝達能を付与するのみならず、長鎖 DNA の伝達が可能なことから、有用な遺伝子導入法の一つであると考えられている。

本研究では T4SS を保持し多様な種への遺伝子導入が可能な接合因子 RP4 を題材として用い、伝達の *cis* 因子である *oriT* 領域の伝達に必要な最小領域について調べた。*oriT* 領域には接合伝達の開始に重要な役割を果たす 3 つのタンパク質の結合領域が存在し、これらの結合領域を欠損させることで接合伝達効率が変化することが知られている。現在、*oriT* 領域の研究は大腸菌間の接合伝達を中心に進められているが、異種菌間については未だ解明されていないことが多く、早急な探究が望まれている。

そこで本研究ではグラム陽性菌のモデル生物である枯草菌を受容菌として、大腸菌－枯草菌間における接合伝達に必要な *oriT* 最小領域の特定を目的とし、実験を行った。

A phenomenon called “Conjugation” causes gene transfer and is used for artificial gene introduction. There are several conjugative transfer mechanisms and the Type Ⅳ Secretion System (T4SS) is widely used. T4SS enables us long-chain DNA transfer and inter species gene transfer.
In this study, we used the conjugative factor RP4 including T4SS. We determined the minimal region of the *oriT*, a *cis* acting factor in conjugation. The *oriT* region has binding sites for three proteins and they play important roles in initial steps. When these binding sites are partially deleted, the conjugation efficiency changes accordingly. Currently, research on the *oriT* region is mainly focused on conjugation among *Escherichia coli*. However, there are many unknown areas in the conjugation between *E. coli* and other bacterial species, and further research is desired.
Therefore, we chose *Bacillus subtilis*, a model Gram-positive bacteria, as the recipient bacterium. The aim of this study is to determine the *oriT* minimum region for *B. subtilis*.

conjugation, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*

発表責任者：神崎 泰輝（23bs110b@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B4a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 B4 会場

Pseudomonas 属細菌由来のプラスミドの複製に必要な DNA 領域の同定
Identification of the DNA regions necessary for the replication of the Pseudomonas plasmids

○磯貝 菜々子[1]、徳田 真穂[2]、水口 千穂[3]、金原 和秀[1,2]、野尻 秀昭[3]、鈴木 仁人[4]、新谷 政己[1,2,5]
([1]静大・工、[2]静大院・創造、[3]東大院・農生科、[4]感染研・薬剤耐性研究センター、[5]静大・グリーン研)
○Nanako ISOGAI[1], Maho TOKUDA[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[3], Kazuhide KIMBARA[1,2], Hideaki NOJIRI[3], Masato SUZUKI[4], Masaki SHINTANI[1,2,5] ([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [4]AMR Ctr. NIID, [5]Shizuoka Univ. RIGST)

近年，プラスミド全塩基配列の解読が急速に進み，米国の公的データバンクに登録された数は 50,000 種類を超える．プラスミドは複製開始タンパク質（RIP）の遺伝子配列に基づく分類がなされてきたが，一部の RIP は未同定のままであり，その分類体系は確立されていない．我々は，プラスミドの RIP の同定を網羅的に行うことで，その分類体系を整備することを最終目的として研究を進めている．本研究では，*Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドを対象として，その複製に必要な DNA 領域を推定後、当該領域の複製の可否を実験で検証した．まず，プラスミドの複製に必要と推定された領域を pUC ベクターにクローニングし，本ベクターが複製されない *Pseudomonas* 属細菌および *polA* 変異大腸菌内[1)]で，作製したプラスミドが複製可能であるか検証した．pUC ベクターは大腸菌の DNA ポリメラーゼ I（PolI）依存型の複製をするため，*polA* 変異をもつ大腸菌内では複製されない．その結果，新規 PromA 群に属する pKIFA124 のミニプラスミドはどちらの細菌内でも複製が認められた．一方，Rms139（IncP-2），Rms163（IncP-5），R716（IncP-12）のミニプラスミドは，*P. aeruginosa* 内で複製が認められたが，大腸菌内では認められなかった．現在は pQBR103[2)]を含む，未分類プラスミドの複製に必要な DNA 領域の同定を試みている．本研究は，公益財団法人大隅基礎科学創成財団の「プラスミド DB 構築事業」の一環として遂行している．

Although over 50,000 plasmids were reported to date, many plasmids have not been accurately classified. Our objective is to construct comprehensive plasmid database based on replicon typing. In this study, we experimentally identified the DNA regions necessary for the replication of the plasmids from *Pseudomonas*. Putative replication regions were cloned to pUC vectors and the resultant plasmids were assessed whether it could be replicated in *Pseudomonas* and *polA* mutant of *Escherichia coli*. As a result, mini replicon of pKIFA124 (PromA) was successfully identified, which could be replicated both in *P. putida* and *E. coli*. On the other hand, those of Rms139 (IncP-2), Rms169 (IncP-5), and R716 (IncP-12) could be replicated in *P. aeruginosa* but not in *E. coli*. Currently, we are attempting to identify the replication regions of unclassified plasmids from *Pseudomonas* including pQBR103[2)]. This study was supported by Ohsumi Frontier Science Foundation.

1) Cao et al., 1993, *J Bacteriol*, 175: 7247-7253, 2) Tett et al., 2007, *The ISME Journal*, 1: 331-340

Plasmid, replication, database

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B4a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 B4 会場

Pseudomonas 属細菌由来の環境浄化に寄与する染色体組み込み型接合因子(ICEs)のデータベースからの探索

Database screening of integrated and conjugative elements (ICEs) from *Pseudomonas* strains that contribute to environmental remediation

○廣瀬 遵、上原 由楓、藤波 寛人（宮崎大工）
○Jun HIROSE, Yuka UEHARA, Hiroto FUJINAMI (Univ. of Miyazaki)

【目的】染色体組み込み型接合因子(integrative and conjugative element; ICE)は、数十～200 kb 長の DNA からなる可動性遺伝因子で供与菌から受容菌に薬剤または重金属耐性、病原性、共生、代謝などの形質を付与する。本講演では、環境中での分解者である種を多く含む *Pseudomonas* 属細菌を対象にして芳香族化合物の分解、重金属に対する還元能等で環境浄化に寄与する ICE のデータベースからのスクリーニングを行い、得られた新規な ICE の比較解析を行った結果について報告する。
【結果および考察】 公的データベースに登録されている *Pseudomonas* 属細菌の全ゲノム配列から、芳香族化合物分解､水銀またはヒ素の還元に関与するカーゴ遺伝子群を包括している 33 の未知の ICE を見出した。これらの ICE についてインテグラーゼをコードする *int* 遺伝子の相同性を指標に 7 つのグループ（グループⅠ～Ⅶ）に分類することが出来た。7 つのグループのうち、1 つは芳香族炭化水素分解に関与する遺伝子群を包括していた。3 つのグループは、すべて緑膿菌の臨床株由来の ICE のみで構成されていた。それらはヒトに感染するより以前に有害物質が存在する環境に適応するために ICE を獲得した経歴があることが明白である。

Integrated conjugative elements (ICEs) are mobile genetic elements consisting of DNA with a length of several tens to 200 kb. ICEs can transfer from donor to recipient bacteria to confer phenotypes, such as drug or heavy metal resistance, pathogenicity, plant symbiosis, and metabolism. We report on the results of database screening and comparative analysis of ICEs that contribute to environmental remediation through their ability to degrade aromatic compounds and resistance to heavy metals or arsenate. The study focused on the genus *Pseudomonas*, which includes environmental species that are decomposers. Analysis of whole genome sequences of *Pseudomonas* registered in public databases identified 33 unknown ICEs containing cargo genes involved in the degradation of aromatic compounds or reduction of mercury or arsenate. These ICEs could be classified into seven groups based on the homology of the *int* gene encoding integrase. Of the seven groups, only one included the gene cluster involved in the degradation of aromatic hydrocarbons. Three groups were entirely composed of ICEs derived from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. It is obvious that the isolates have acquired the ICEs to adapt to environments where hazardous substances are present before infection of humans.

genome sequence, integrative and conjugative element, *Pseudomonas*

発表責任者：廣瀬　遵（jhirose@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2B4a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 B4 会場

IncP/P-1 群プラスミドの異なる亜群に属するプラスミドの性状の違いとその原因の解析
Exploring IncP/P-1 Plasmid Variation: Understanding Traits and Causes

新谷 政己[1,2,3,4]、○前田 壮[1]、徳田 真穂[2]、敦賀 俊太[3]、上條 遥陽[3]、金原 和秀[1,2,3] ([1]静大・工、[2]静大院・創造、[3]静大院・総合科技、[4]静大・グリーン研)
Masaki Shintani[1,2,3,4], ○ Sou Maeda[1], Maho Tokuda[2], Syunta Tsuruga[3], Haruhi Kamijo[3], Kazuhide Kimbara[1,2,3] ([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Integr. Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは接合伝達により異なる細菌間を水平伝播する．本研究では，プラスミド自体がどのように進化し，その性状を変化させてきたのかを理解することを目指している．我々は，知見が豊富な IncP/P-1 群プラスミドのうち，新たな亜群に属するプラスミドを発見し[1)]，前年度大会では，その性状の違いの一つとして，供与菌（*Pseudomonas putida*）・受容菌（*P. putida*）に用いた細菌の種類が同じであっても，プラスミドの違いによって接合伝達頻度が 10^3 以上異なることを報告した[2)]．今年度は，pMNBM077（κ 亜群），pYKAM101（λ 亜群），pYKBG036（ο 亜群）に着目し，よく知られる pBP136（β 亜群）との接合伝達頻度の違いを生む因子の特定を試みた．遺伝子の組成を比較した結果，κ，λ，ο 亜群のプラスミドは，β 亜群には存在する 1 本鎖 DNA 結合タンパク質 SSB をコードする遺伝子を含まなかった．次に，各プラスミドの複製に寄与する推定遺伝子領域のみを含むミニプラスミドを作出し，*P. putida* の形質転換を試みた．その結果，*ssb* を含まないプラスミドは，形質転換体の検出ができなかった（$< 1.29 \times 10^2$ CFU/μg）．以上の結果から，プラスミド上にコードされる SSB の有無によって，接合伝達頻度に違いが生じる可能性が考えられた．現在，*ssb* 欠損プラスミドを作製し，野生型のプラスミドとの伝達頻度の違いを比較している．

This study investigates plasmid evolution and its impact on bacterial traits through horizontal gene transfer. Within the well-studied IncP/P-1 plasmid group, we discovered a new subgroup[1)] with substantial differences in conjugative transfer frequencies, even among the same bacterial types[2)]. Focusing on pMNBM077 (kappa subgroup), pYKAM101 (lambda subgroup), and pYKBG036 (omicron subgroup), we identified a gene, absent in these subgroups but present in the beta subgroup, encoding the single-stranded DNA binding protein (SSB). Mini-plasmids containing only the estimated replication-contributing gene region were prepared and we assessed whether the resultant mini-plasmids could be replicated in *Pseudomonas putida*. Plasmids lacking *ssb* did not yield detectable transformants, suggesting that the presence or absence of *ssb* on the plasmid may influence conjugative transfer frequencies. Currently, *ssb*-deficient plasmids of beta subgroup are preparing and comparing their transfer frequencies with wild-type plasmids for further insights. 1) Hayakawa et al.,2022, *Appl Environ Microbiol*.88:e0111422，2)敦賀ら，日本農芸化学会 2023 年度大会

Plasmid, conjugative transfer, ssb

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B4a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 B4 会場

フィリピンにおける薬剤耐性菌および耐性遺伝子の伝播に寄与するプラスミドの同定
Identification of antibiotic resistant bacteria and plasmid spreading antibiotic resistance genes in Philippines

○増元 めぐみ[1]、徳田 真穂[2]、佐藤 佑香[3]、敦賀 俊太[3]、野上 勇魚[3]、金原 和秀[1,2,3]、鈴木 仁人[4]、新谷 政己[1,2,3,5] ([1]静大・工、[2]静大院・創造、[3]静大院・総合科技、[4]感染研・薬剤耐性研究センター、[5]静大・グリーン研)
○Megumi MASUMOTO[1], Maho TOKUDA[2], Yuka SATO[3], Shunta TSURUGA[3], Isana NOGAMI[3], Kazuhide KIMBARA[1,2,3], Masato SUZUKI[4], Masaki SHINTANI[1,2,3,5] ([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Integr. Shizuoka Univ., [4]AMR Ctr., NIID, [5]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，接合伝達を介して薬剤耐性遺伝子を伝播し，多剤耐性菌の出現や蔓延の主な原因とされ，特にカルバペネム系抗生物質耐性遺伝子を拡散する中心的な役割を担うと報告されている[1)]．また，抗生物質の適正使用や上下水道など，衛生管理が普及していない地域では，薬剤耐性菌の拡散が顕著である[2)]．しかし，そうした地域では，どこで，どのプラスミドが，どの細菌間で薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与するのか，その実態は全く不明である．そこで本研究では，下水施設が完備していない，フィリピンのタクロバン市における病院からの廃水処理施設や，河川やなどの環境試料を用いて，メロペネム（カルバペネム系抗生物質）耐性菌のスクリーニングを行うとともに，耐性遺伝子を伝播するプラスミドの取得を試みた．分離した耐性菌について，その耐性遺伝子の有無を multiplex PCR により検証した．その結果，分離した *Gammaproteobacteria* 綱の 7 種の細菌から *bla*$_{NDM}$ または *bla*$_{VIM}$ が検出され，環境由来の異なる細菌が臨床上問題となるカルバペネム耐性遺伝子を有することが示唆された．現在は，得られた耐性株について，プラスミド保持の有無を検証するとともに，全塩基配列の解読を試みている．

Plasmids play a crucial role in the emergence and spread of antibiotic bacteria. Especially in regions lacking proper antibiotic usage and sanitation, the spread of antibiotic resistant bacteria is notable. In this study, environmental samples from hospital wastewater treatment facilities and rivers in Tacloban City, Philippines, where there are no sewage treatment facilities, were used to screen bacteria harboring β-lactam antibiotic resistance genes. Plasmids carrying the resistance genes were also collected by exogenous plasmid capture. Identification of antibiotic resistance genes revealed the presence of *bla*$_{NDM}$ or *bla*$_{VIM}$ in seven species of *Gammaproteobacteria* by multiplex PCR. The detection of resistance genes among the various bacteria suggests that drug resistance is widespread. We are now attempting to verify whether or not the plasmids are retained in the resistant strains and to decipher the complete sequences.

1) Salvador et al., 2023. *Nat Rev Microbiol*. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00926-x.
2) Brian et al., 2021. *Life.* **11**(6): 528.

Plasmid, Antibiotic Resistance Genes, Antimicrobial resistance

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B4a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 B4 会場

接合伝達性プラスミド RP4 を用いた好アルカリ菌への遺伝子導入法の確立

Establishment of gene introduction system for alkaliphilic bacteria using conjugative plasmid RP4

○山本 純子[1]、片岡 正和[1,2] ([1]信州大院生命医工、[2]応用微生物学ルネサンスセンター)
○Junko YAMAMOTO[1], Masakazu KATAOKA[1,2] ([1]The Univ. of Shinshu, [2]RCAM)

好アルカリ菌は至適生育 pH を 9 以上に持つ極限環境微生物の一種である。好アルカリ菌は有用な代謝産物や耐アルカリ性酵素を生産することから、産業応用においても有望な生物種である。また、代謝産物の有用性だけでなく、アルカリ適応機構に対しても研究者の関心を集めている。しかし、遺伝子導入が確認されている種は限られており、代謝機構の解明の障壁になっている。したがって、本研究では好アルカリ菌を対象とした汎用性の高い遺伝子導入法の構築を目的とした。
先行研究では、大腸菌から枯草菌への遺伝子導入を探索し、*Pseudomonas* 由来の伝達性プラスミド RP4 と Type IV 分泌システム (T4SS) からなる接合伝達が利用可能であることを確認した。そこで、本研究では、RP4 システムを使用して大腸菌から好アルカリ菌への遺伝子導入を試みた。好アルカリ菌には枯草菌の近縁種である *Bacillus halodurans* C-125 と *Alkalihalobacillus clausii* を選択した。本発表では 2 種の好アルカリ菌を対象とした接合伝達による遺伝子導入を行った結果、*A. clausii* において接合伝達完了体を確認したことを報告する。
Alkaliphilic bacteria are a type of extreme environment microorganism and their optimum pH range for growth is above 9. These bacteria's ability on producing valuable metabolites and alkalitolerant enzymes making them promising organisms in industrial applications. Researchers are interested not only in the usefulness of their metabolites but also in the alkaline adaptation mechanisms. However, the number of species having gene introduction methods is limited, and the absence of gene introduction methods poses a barrier to understanding the metabolism and alkaline adaptation mechanisms. Therefore, the objective of this study is to establish a versatile gene transfer method for broad species in alkaliphilic bacteria.
In our previous studies, we sought gene introduction methods from *Escherichia coli* to *Bacillus subtilis* and found a good candidate, *i.e.* a conjugation system consisted with the conjugative plasmid RP4 derived from *Pseudomonas* and the Type IV secretion system (T4SS). In this study, we attempted this conjugation system to transfer genes from *E. coli* into alkaliphiles, such as: *Bacillus halodurans* C-125, a close relative of *B. subtilis*, and *Alkalihalobacillus clausii*. The results revealed the presence of the transconjugant in *A. clausii*.

gene introduction, conjugation, alkaliphilic bacteria

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B4a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 B4 会場

枯草菌の超高効率自然形質転換法の開発と応用

Development and application of an ultra-efficient transformation system in *Bacillus subtilis*

○赤沼 元気[1]、河村 富士夫[2,3]、相馬 亜希子[2]、鈴木 祥太[3,4]、佐藤 勉[4] ([1]学習院大理、[2]千葉大園芸、[3]立教大理、[4]法政大生命)
○Genki AKANUMA[1], Fujio KAWAMURA[2,3], Akiko SOMA[2], Shota SUZUKI[3,4], Tsutomu SATO[4] ([1]Gakushuin Univ., [2]Chiba Univ., [3]Rikkyo Univ, [4]Hosei Univ)

DNA 配列解析技術の進歩によって膨大な数の遺伝子配列情報が蓄積されてきた。これらの情報を活用するためには、相同組換え法をはじめとする様々な遺伝子改変技術の開発も重要である。枯草菌は外界から DNA を取り込んで自身のゲノムと組換えを起こす自然形質転換能を有しているため、古くからモデル微生物として扱われるとともに、遺伝子集積ツールとしての利用価値も高い。今回私たちは、枯草菌の形質転換能を極限まで高めることで、選択マーカーを使用せずに点変異や欠失変異を効率的に導入することに成功した。

枯草菌の形質転換効率を高めるため、内在性ファージ領域である SPβ と PBSX をゲノムから除去するとともに、人為的に転写誘導可能な *comK*, *comS* 遺伝子を *leuB* 遺伝子内に導入した。ComK は自然形質転換に必要な遺伝子群の転写誘導因子であり、ComS は ComK の分解を抑制する。これらの改変により、LB 培地における形質転換効率はファージ領域除去により 2 倍程度、ComK, ComS の発現誘導によって 100 倍程度増加した。この株を元に培養条件をさらに改善し、最終的に 1 塩基置換の組換えにおいて 60%もの頻度で形質転換を起こすことに成功した。既報の最高が 0.8%であることと比較すると驚異的な効率であることが分かる。また、コロニーPCR で確認が可能な 30 bp 程度の短い欠失でも 14%という高い効率で形質転換体を得ることができた。つまりこの方法では塩基置換や欠失では選択マーカーは不要であり、ゲノムに新たに遺伝子を導入する際にも有効であると言える。現在、この方法を用いてリボソームタンパク質の多重欠損株の作製などに取り組んでおり、その結果についても報告したい。

Bacillus subtilis has been well studied as a model organism because of its ability to uptake exogenous DNA followed by homologous recombination with genomic DNA via natural transformation, and it is also highly valuable as a tool for gene accumulation. In this study, we succeeded in efficiently introducing point mutations and deletion mutations without selection markers by ultimately enhancing the transformation efficiency of *Bacillus subtilis*.

To increase the transformation efficiency of *B. subtilis*, we removed the endogenous phage regions, SPβ and PBSX, from the genome, and introduced *comK* and *comS* genes into the *leuB* locus. In this ultra-transformation system, transformation frequencies up to 60% and approximately 14% were obtained with about PCR DNAs carrying the point mutation and the deletion mutation with 31 base pairs, respectively. These results indicate that any mutants with a single base change as well as short deletions are able to construct without any selection.

Bacillus subtilis, transformation, ribosome

講演番号：2B4a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 B4 会場

好熱性真正細菌 *Geobacillus* sp. Kps3 における 2 つのイントロン含有 Flagellin 遺伝子とホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子の構造と機能

Structure and function of the two-intron-containing Flagellin gene and the homing endonuclease gene in the thermophilic eubacterium *Geobacillus* sp. Kps3

○石塚 盛雄[1]、中原 悠輔[1]、石田 達矢[1]、馬野 航[1]、石橋 奈々[1]、早川 准平[1]、粟井 貴子[1]、赤沼 元気[2] ([1]中央大理工、[2]学習院大理)

○ Morio ISHIZUKA[1], Yusuke NAKAHARA[1], Tatsuya ISHIDA[1], Wataru UMANO[1], Nana ISHIBASHI[1], Jumpei HAYAKAWA[1], Takako AWAI[1], Genki AKANUMA[2] ([1]Chuo University, [2]Gakushuin University)

我々の研究室では、好熱性真正細菌が分離され、*Geobacillus* sp. Kps3 と名付けた。我々の研究室でのこれまでの研究の結果により、*Geobacillus* sp. Kps3 のフラジェリンタンパク質をコードする遺伝子（*hag*）には 2 つのイントロン配列が存在する。その 3’-直下流域にはホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子（*heg*）が存在し、その発現産物は、*hag* 遺伝子の 2 番目のイントロン配列を除いた DNA 二本鎖構造を選択的に切断するので、*hag* 遺伝子の 2 番目イントロン配列挿入に関係していると強く示唆される。*hag* 遺伝子の 2 種類のイントロンはどちらも、グループ I イントロンに特徴的な二次構造、*in vitro* での自己スプライシング、およびスプライシング中に Mg^{2+}イオンと GTP の必要性を示す。フラジェリンは真正細菌のべん毛フィラメント構造を形成する主要タンパク質で、これらの 2 つのグループ I イントロンは、選択的スプライシングによって、2 種類のアミノ酸配列が三箇所異なったフラジェリンを生成できる。通常の増殖条件下では、フラジリンは、両方のイントロンが共にスプライシングされて翻訳されたフラジェリンのみが発現するが、高濃度の NaCl 存在下で培養すると、1 番目のイントロンのみがスプライシングされた、アミノ酸配列の異なるフラジェリンも生合成される(1)。この選択的スプライシングは *in vivo* のみならず *in vitro* でも起こることが解った。。グループIイントロンの保存された構造である 5'-スプライス部分の U-G 塩基対について、他の塩基に置換した一塩基変異型基質を作成して、スプライシング実験を行うことで、２つのグループIイントロンの詳細な反応機構を解明することを目的とした実験結果を報告する。

(1) Ishizuka M., *et al.* FEBS 2019 Congress: RNA Splicing Symposium.

In our laboratory, a thermophilic eubacteria was isolated and named *Geobacillus* sp. Kps3. According to the results of previous studies in our laboratory, there are two intronic sequences in the gene encoding the flagellin protein (*hag*) of *Geobacillus* sp. Kps3. There is a homing endonuclease gene (*heg*) in the 3'-direct downstream region, and its expression product selectively cleaves the DNA double-stranded structure excluding the second intron sequence of the *hag* gene. It is strongly suggested that this is related to the insertion of the second intron sequence. Both introns of the *hag* gene exhibit secondary structure characteristic of group I introns, self-splicing *in vitro*, and the requirement for Mg^{2+} ions and GTP during splicing. Flagellin is a major protein that forms the flagellar filament structure of eubacteria, and these two group I introns can generate flagellins with three different amino acid sequences through alternative splicing. Under normal growth conditions, only translated flagellin is expressed with both introns spliced together; however, when cultured in the presence of high concentrations of NaCl, the amino acid sequence is expressed with only the first intron spliced. Different flagellins are also biosynthesized (1). It was found that this alternative splicing occurs not only *in vivo* but also *in vitro*. By creating single nucleotide mutant substrates in which the U-G base pair in the 5'-splice part, which is a conserved structure of group I introns, is replaced with other bases and performing splicing experiments, details of the two group I introns were revealed. We report the results of an experiment aimed at elucidating the reaction mechanism.

(1) Ishizuka M., *et al*. FEBS 2019 Congress: RNA Splicing Symposium.

Geobacillus sp. Kps3, Alternative splicing of mRNA, group I introns

発表責任者：石塚　盛雄（ishizuka@kc.chuo-u.ac.jp）

講演番号：2B4a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 B4 会場

複合培養における色素生産応答に関わる *sco1842* 遺伝子の機能解析

Functional analysis of *sco1842* gene involved in the pigment production response by combined-cultures

○久保木 綾梨[1]、LEI YUKUN[2]、浅水 俊平[2,3]、尾仲 宏康[1,2]([1]学習大理、[2]東大院農、[3]神戸大先端バイオ)
○Ayari KUBOKI[1], Yukun LEI[2], Shumpei Asamizu[2,3], Onaka Hiroyasu[1,2] ([1]Dept. of Life Sci., [2]The Univ. of Tokyo, [3]Kobe Univ. EGBRC)

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)はミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* との複合培養により色素性抗生物質(RED と ACT)の生産を活性化する。変異株ライブラリーに対するスクリーニングの結果、複合培養条件下で本応答はΔ*sco1842* において遅延し、*sco1842* の恒常的な発現により RED と ACT 生産を亢進することを見出した。*sco1842* は機能未知遺伝子であり、その機能解明のために WT とΔ*sco1842* の純粋培養下における RNA-seq 解析を行った。その結果、複数遺伝子の転写が顕著に上昇することが認められ、我々はそのうち *sco3623*(GntR ファミリー転写因子) に焦点を当て解析を進めた。*sco3623* の転写量がΔ*sco1842* において上昇したことから、*sco3623* は RED と ACT 生産に対し抑制的に働き、その破壊株では RED と ACT 生産が亢進すると考えられた。そこでΔ*sco3623* を作製し、固体培地上での純粋培養の表現型を親株と比較した。その結果、Δ*sco3623* は親株と比べて RED と ACT 生産が亢進した。以上の結果から、*sco3623* は、*sco1842* に関与する RED と ACT 生産の抑制因子であることが強く示唆された。現在、RED と ACT の生産変動について定量解析を進めるとともに、*sco3623* 以外の転写量変動遺伝子の機能解析を進めている。

Streptomyces coelicolor A3(2) activates the production of a red pigment upon physical contact with *Tsukamurella pulmonis*. Screening of the mutant library revealed that this response was delayed in Δ*sco1842* mutant, and expression of *sco1842* was activated during the combined-culture. To elucidate the function of *sco1842*, we performed RNA-seq analysis of WT and Δ*sco1842* in mono-culture. The results showed that several genes were remarkably upregulated in transcription, and we focused on *sco3623* (GntR family transcriptional regulator). Since the transcript level of *sco3623* increased in *Δsco1842*, we hypothesized that *sco3623* inhibits pigment production and that disruption of *sco3623* will enhance pigment production. Therefore, we generated Δ*sco3623* and compared the phenotypes with the parental strain. We found that Δ*sco3623* enhanced pigment production compared to the parental stain. These results suggest that *sco3623* is a suppressor of pigment production involved in *sco1842*. We are currently quantitatively evaluating RED and ACT, the pigment antibiotics production. Functional analysis of genes that showed significant variation in transcripts is also under investigation.

Streptomyces, combined-culture, RED

発表責任者：尾仲　宏康（hiroyasu.onaka@gakushuin.ac.jp）

講演番号：2B4a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 B4 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* において sortase により細胞壁に局在する細胞表層タンパク質 AMIS_68180 は正常な胞子嚢形成に必須である

Involvement of the sortase-mediated cell wall-localized protein AMIS_68180 in sporangium formation in *Actinoplanes missouriensis*

○譚 鋳文[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,3]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]北里大・感染制御、[3]東大・微生物イノベ連携機構）
○Zhuwen TAN[1], Takeaki Tezuka[1,2], Yasuo Ohnishi[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [3]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸伸長で増殖するが、栄養飢餓条件では内部に数百の胞子とマトリクス物質を含む胞子嚢を形成して休眠する。水を感知すると胞子嚢が開裂し、内部の胞子を放出する。我々は胞子嚢の形成と開裂の過程に注目して研究を進めている。過去に、二成分制御系の応答制御因子をコードする *asfR* 遺伝子の破壊株（Δ*asfR* 株）では、開裂条件においても胞子嚢の開裂がほとんど進行しないことが明らかになっていた。Δ*asfR* 株に対して UV 照射によりランダム変異を導入し、胞子嚢開裂により放出される胞子数が回復したサプレッサー株を選抜した結果、*AMIS_68180* に点変異が生じた株が選抜された。AMIS_68180 はそのアミノ酸配列から、sortase によりペプチドグリカン前駆体の Lipid II に連結され、細胞壁に局在する細胞表層タンパク質と予測された。*AMIS_68180* 破壊株（Δ*AMIS_68180* 株）を作製したところ、胞子嚢が水中ですぐに崩壊し、内部の胞子が水中に放出された。胞子嚢の超薄切片の電子顕微鏡観察の結果、Δ*AMIS_68180* 株の胞子嚢はマトリクス物質が大部分観察されず、一部の胞子の周りには空間が生じていた。遺伝子相補実験により、これらの形態異常の要因は *AMIS_68180* の欠損であることが確かめられた。以上より、*AMIS_68180* は正常な胞子嚢形成に不可欠であることが明らかになった。HiBiT タグを付加した AMIS_68180 (AMIS_68180-HiBiT) を Δ*AMIS_68180* 株で生産させたところ、胞子嚢および遊走子に AMIS_68180-HiBiT が検出されたことから、AMIS_68180 は胞子の細胞表層に局在すると考えられた。

Actinoplanes missouriensis forms sporangia containing hundreds of spores. Sporangia release spores when immersed in water through a process called sporangium dehiscence. Our research focused on the process of sporangium formation and dehiscence. We generated a UV-irradiated mutant library of the Δ*asfR* strain, in which sporangium dehiscence hardly progressed under dehiscence-inducing conditions, and isolated a suppressor strain, in which the number of released spores was restored. *AMIS_68180* was identified as a mutated gene in the suppressor strain. The gene product was predicted to be a cell surface protein that was linked to the peptidoglycan precursor Lipid II by sortase and localized to the cell wall. The Δ*AMIS_68180* strain formed sporangia that were prone to collapse in the water. TEM showed that the normal matrix was not filled in the mutant sporangia, with gap-like areas around the spores. These results indicated that *AMIS_68180* is essential for sporangium formation. Using the HiBiT tag detection system, AMIS_68180 was detected in the sporangia and zoospores.

actinomycete, sporangium formation, cell wall-localized protein

発表責任者：譚　鋳文（zhuwen_tan@yahoo.co.jp）

講演番号：2B4p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 B4 会場

Brevibacillus 属細菌における「忌避」の微生物間相互作用
The bacteria of the genus *Brevibacillus* show "avoidance" as microbial interaction
○河野 日向子、村上 周一郎 (明治大農)
○Hinako KONO, Shuichiro MURAKAMI (Meiji Univ.)

これまでの研究で、1.5%、および 0.3%寒天培地（swimming plate）を用いて *Brevibacillus* 属細菌の対峙培養を行うと、互いに忌避するように生育することを報告した [1)]。また一連の研究から、我々は swimming plate を用いた忌避試験において、忌避の領域には透明なものと、濁っているものの 2 種類あることを見出し、この相違は *Brevibacillus* 属細菌が相手によって効果の異なる物質（忌避・殺菌）を生産していることによると仮定した。そこで本研究では、まず「忌避」に着目して、*Brevibacillus* 属細菌が走化性を示す様子を光学顕微鏡で観察することを試みた。

まず、*Brevibacillus brevis* と *Brevibacillus formosus* を swimming plate を用いた忌避試験に供したところ、極めて透明度の高い忌避領域が形成された。次に、*B. brevis* および *B. formosus* をこの透明な忌避領域をセットした microscopic agar-drop assay に供したところ、両菌とも忌避物質を含むと思われる soft agar から遠ざかるように移動する様子が観察された。以上より、透明度の高い忌避領域には、*Brevibacillus* 属細菌に負の走化性を誘発する忌避物質が含まれていることが示唆された。今後は、他の *Brevibacillus* 属細菌でも同様の実験を行い、忌避領域が形成されるメカニズム、生態学的意義を明らかにしていきたい。

1)河野ら、日本農芸化学会関東支部 2023 年度支部大会講演要旨集、p. 49 (2023).

We have reported that *Brevibacillus* spp. grow avoiding from each other when they were cultivated on a same plate containing 1.5% or 0.3% agar. In the study, we assumed that *Brevibacillus* spp. produce repellent and bactericidal compounds against others because we found two kinds of an avoidance zone (clear and non-clear) on a swimming plate cultivating them. In this study, we focused on “avoiding effects” and observed the repellent response microscopically.

First, *Brevibacillus brevis* and *Brevibacillus formosus* were cultivated on a swimming plate and they generated a clear avoidance zone. Next, *B. brevis* and *B. formosus* were subjected to microscopic agar-drop assay setting the clear-avoidance zone, and they exhibited repellent response to the soft agar. This result suggested that the clear-avoidance zone contained repellent compounds inducing negative chemotaxis. We will carry out the assay for other *Brevibacillus* species, and make clear the mechanisms and ecological roles of this phenomenon.

Brevibacillus, microbial interaction, avoidance

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：2B4p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 B4 会場

ニワトリ由来 Lactobacillus crispatus 菌株がもつ高分子 S-layer タンパク質の特性と抗原運搬体への応用

Characterization of a high molecular S-layer Protein of *Lactobacillus crispatus* from a chicken and its application to antigen vector

○三﨑 彩、横田 健治、梶川 揚申（東農大院応生）
○Aya MISAKI, Kenji YOKOTA, Akinobu KAJIKAWA (Tokyo Univ. Agr.)

S-layer タンパク質（SLP）は細菌や古細菌の菌体最外層を覆う自己集合性のタンパク質である。一部の乳酸菌は SLP を持ち、粘膜への接着や免疫応答に関与することが報告されている。また、菌体における総タンパク質に占める割合の高さから、SLP に異種抗原を挿入した抗原運搬体への応用が検討されている。ニワトリ糞便から新たに分離された *Lactobacillus crispatus* 8 菌株が持つ SLP を SDS-PAGE により比較したところ、KJCC40 株が突出して大きい分子量の SLP（SlpH）を持つことがわかった。そこで、SlpH の構造や機能を調べ、さらに抗原運搬体への応用を試みることを本研究の目的とした。AlphaFold2 による立体構造予測から、SlpH には未知の N 末端ドメイン（HN_0）の存在が推定された。HN_0 および HN_0 欠失 SlpH（SlpΔHN_0）組換えタンパク質を用いた試験の結果、HN_0 は SlpH の自己集合機能に直接関与せず、菌体表面に露出し、免疫学的活性に関わる部位である可能性が示唆された。また、異種抗原と HN_0 の置換を試みたところ、ある程度の大きさまでの抗原タンパク質が *L. crispatus* 菌体表層に保持され得ることが確認され、応用に向けた研究展開にも期待が持たれる。

Some lactobacilli have S-layer proteins (SLPs), which are likely involved in gut adhesion and immune responses. Recently isolated *Lactobacillus crispatus* strains from chicken feces possess various SLPs. This study aimed to explore their structure, functions and potential applications, especially focusing on the high molecular SLP (SlpH) from one of the isolates. The structure of SlpH is predicted to have unknown N-terminal domain (HN_0). Testing of the purified recombinant protein indicated that the HN_0 is involved in neither adhesion nor self-assembly of SLPs. Other results suggested that HN_0 may be a site exposed on the bacterial surface and involved in immunological activity. Attempt to replace HN_0 with a heterologous antigen, it was confirmed that antigenic proteins up to a certain size can be displayed on the cell surface of *L. crispatus*.

Lactobacillus, S-layer, vaccine-delivery

講演番号：2B4p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 B4 会場

分裂酵母の温度感受性変異株を用いた胞子形成に関わる新規遺伝子の探索
Identification of novel *S. pombe* genes essential for sporulation using temperature sensitive mutants
○小林 京五、中村 太郎（大阪公立大院理）
○Keigo KOBAYASHI, Taro NAKAMURA (Osaka Metropolitan Univ.)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は栄養源が枯渇すると、接合して減数分裂・胞子形成を行う。胞子形成に関わる遺伝子は以前から数多く取得されているが、破壊すると生育ができなくなる遺伝子（必須遺伝子）はわずかであり、非必須遺伝子が大半を占めている。実際に、分裂酵母遺伝子データベースである Pombase に記載されている必須遺伝子の割合は約 17%である。これは、胞子形成過程において必須遺伝子の解析が不十分であることを示している。よって、本研究では、温度感受性変異株（以下 ts 変異株）を用いることによって胞子形成に関わる必須遺伝子の取得・解析を行うことを目的とする。

分裂酵母の野生型株にニトロソグアニジンによって変異を導入し、約 37,000 個のコロニーから、約 1,700 株の ts 変異株を取得した。これを胞子形成培地に移して、光学顕微鏡で胞子形成を観察し、胞子形成に異常を示す株を約 100 取得した。これらの株の中には胞子が形成されないものだけでなく、形成された胞子が小さい、または輪郭が不明瞭といった異常があるものなども含まれていた。現在、これらの株の原因遺伝子の特定を行なっている。

Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cells undergo sporulation when the nitrogen source is depleted. In Pombase, a fission yeast gene database, about 60 genes are involved in sporulation, among which only nine are essential for vegetative growth. Therefore, the purpose of this study is isolation and characterization of essential genes involved in sporulation by using temperature-sensitive mutants (ts mutants).

Wild-type *S. pombe* strains are mutagenized by nitrosoguanidine, and approximately 1,700 ts mutants were isolated from approximately 37,000 colonies. These ts mutant strains were transferred onto sporulation medium, and sporulation was observed under an optical microscope. Approximately 100 strains showing abnormal sporulation were isolated.

yeast, spore, cell cycle

発表責任者：中村太郎（taronaka@omu.ac.jp）

講演番号：2B4p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 B4 会場

分裂酵母の胞子細胞膜形成に関わる生育に必須な SPB タンパク質の同定

Identification of fission yeast SPB proteins essential for both growth and spore cell membrane formation

○久永 里梨、中村 太郎（大阪公立大院理）
○Satori HISANAGA, Taro NAKAMURA (Osaka Metropolitan Univ)

中心体は微小管の形成中心としてだけでなく、膜形成の起点としてもはたらくことが知られている。しかしながら、中心体からの膜形成のメカニズムについては不明な点が多い。分裂酵母胞子の細胞膜は、中心体と同様の機能を持つ SPB（スピンドル極体）を起点として形成される。現在までに胞子細胞膜形成開始に必要な SPB タンパク質はいくつか同定されてきたが、その全貌は未だ明らかになっていない。本研究は、十分に解析されていない生育に必須な SPB タンパク質に焦点を当て、SPB を起点とした胞子細胞膜形成の分子メカニズムを解明することを目的とする。

本研究では、生育に必須な SPB タンパク質のうちの 5 つ（Cdc11、Sid4、Ppc89、Pcp1、Sad1）に着目し、以下の方法で胞子形成に欠損を示す変異株のスクリーニングを行った。①PCR の複製エラーを利用して対象の遺伝子にランダムに変異を導入 ②増幅させた DNA 断片を分裂酵母に導入 ③形質転換体の胞子細胞膜形成の観察　今回は得られた結果について報告する。

Centrosomes are known to function not only as microtubule organization centers but also as the starting point of membrane formation. However, the mechanism of membrane formation from the centrosome remains unclear. The cell membrane of fission yeast spores is formed from the spindle pole body (SPB), which corresponds to the centrosome. To date, several SPB proteins required for the initiation of spore cell membrane formation have been identified, but the full picture is still unclear. This study focuses on the SPB proteins essential for growth, which have not yet been well analyzed, and aims to elucidate their molecular mechanisms through the isolation and analysis of sporulation-deficient mutants.

In this study, we focused on five SPB proteins essential for growth (Cdc11, Sid4, Ppc89, Pcp1, and Sad1) and screened mutant strains showing defects in sporulation by the following methods. ①Randomly introduction of mutations into the target genes using PCR replication errors ② Introduction of the amplified DNA fragments into fission yeast ③Observation of spore cell membrane formation of isolated mutants. We will report the results obtained.

Yeast, Sporulation, Membrane

発表責任者：中村　太郎（taronaka@omu.ac.jp）

講演番号：2B4p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 B4 会場

Role of Mar1, an HMG-box protein, in the adsorption to *n*-alkane and cell morphology in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*

○Simiao LIANG[1], Chiaki Ishimaru[1], Katsuro Matsuse[1], Ryo Iwama[1,2], Kenta Sato[3], Natsuhito Watanabe[1], Satoshi Tezaki[1], Hiroyuki Horiuchi[1,2], Ryouichi Fukuda[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Laboratory for Bioinformatics Research, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research)

Yarrowia lipolytica is a dimorphic yeast that has abilities to utilize hydrophobic compounds, such as *n*-alkanes and fatty acids, as carbon and energy sources. In order to make advanced use of *Y. lipolytica*, it is necessary to understand the metabolism of the hydrophobic substrates in this yeast. Most of the enzymes involved in the process of *n*-alkane metabolism have been clarified by the works in our lab. However, the mechanism whereby *Y. lipolytica* incorporates *n*-alkane remains to be clarified. A possible mechanism to incorporate *n*-alkane has been considered to be mediated by the adsorption of *Y. lipolytica* cells onto the droplets of *n*-alkane. In this study, we isolated and characterized mutants of *Y. lipolytica* that are defective in the adsorption to *n*-alkane of 16 carbons (*n*-hexadecane). One of the mutants was found to have a mutation in a gene, which we named *MAR1*. *MAR1* encodes a (deduced) protein containing a high mobility group (HMG) box, which has been proposed to have DNA binding function. The deletion mutant of *MAR1* showed defects in the adsorption to *n*-hexadecane and filamentous growth on the medium containing glucose, glycerol, or *n*-alkane. These results suggest that *MAR1* is involved in the regulation of *n*-alkane adsorption and cell morphology in *Y. lipolytica*.

Yarrowia lipolytica, Mar1, *n*-alkane

発表責任者：福田良一（afukuda@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B4p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 B4 会場

オーファン酵素遺伝子特定のための酵素機能予測モデルの開発

Deep learning-based enzyme function prediction for identification of orphan enzyme genes

○廣田 佳亮[1,2]、山田 拓司[1] ([1]東工大、[2]日本農芸化学会)
○Keisuke HIROTA[1,2], Takuji Yamada[1] ([1]Tokyo Tech, [2]JSBBA)

DNA 配列決定技術の発展によって、酵素を含むタンパク質の配列情報が膨大に得られるようになっている。現在では数々の大規模な酵素データベースが利用可能であるが、データベース上には配列情報を欠いた酵素が数多く存在する。このような対応する遺伝子の配列情報が未知である酵素は「オーファン酵素」と呼ばれる。オーファン酵素に関連する課題として、配列情報が未知であるため配列類似度を基盤とした機能アノテーションによって検出できないということが挙げられる。

この課題を解決するため、本研究ではアミノ酸配列に特化した言語モデルである ESM-2 を活用し、配列類似度に依存しない、遺伝子配列から酵素機能を直接予測する深層学習モデルを開発する。特に、本研究では酵素機能のラベルとして化学構造変換に基づく酵素反応分類である KEGG RClass を使用することで、EC 番号を使用する場合よりも広範な酵素反応に適用可能な深層学習モデルを開発する。

本研究では、上記の深層学習モデル用いたオーファン酵素遺伝子探索パイプラインを微生物のゲノムデータに対して適用し、酵素データベース上に多数存在するオーファン酵素について候補遺伝子の探索、予測結果の実験的検証を行う。これにより、提案手法が酵素機能予測に有用であることを示し、同時にオーファン酵素の遺伝子配列の特定を進める。

Progress in sequencing technology yields lots of protein sequence data, including enzymes. Although large enzyme databases are currently available, enzymes lacking sequence information are registered there. Those enzymes whose activity is confirmed but whose gene sequence is unknown are termed orphan enzymes. A problem associated with orphan enzymes is that they cannot be detected by functional annotation based on sequence similarity.

To overcome the issue, this study utilizes ESM-2, a language model specialized for protein sequences, to develop a deep learning model that predicts enzyme functions directly from gene sequences without sequence similarity. This study also leverages KEGG RClass, an enzymatic reaction classification based on chemical structure transformation to expand ML model application.

This study aims to establish a deep learning-based approach to explore orphan enzyme genes and show the utility of our method through experimental validation of the prediction results.

orphan enzyme, protein function prediction, deep learning

発表責任者：山田拓司（takuji@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2B4p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 B4 会場

DNA 修復関連タンパク質 DR0042 の発現・精製
Expression and purification of DNA repair-related protein DR0042
○井上 光誠[1]、坂井 雅[2]、鳴海 一成[1] ([1]東洋大、[2]農工大院)
○Kousei INOUE[1], Miyabi SAKAI[2], Issay NARUMI[1] ([1]Toyo Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* は、放射線などのストレスによる DNA 損傷に対する優れた修復機構を持っている。この機構には真核生物の相同組換えタンパク質 Rad52 のオルソログで、近縁種の *Thermus* 属細菌にも存在する DdrA と、*Deinococcus* 属細菌のみがもつ DdrAP が関わっている。この *ddrAP* 遺伝子の下流に存在する *dr0042* 遺伝子が *ddrAP* とオペロンを形成しており、極性効果により Δ*ddrAP* 株では *dr0042* 遺伝子も発現しなくなると考えられる。しかしながら、Δ*dr0042* 株は、ブレオマイシン（Bm）、紫外線（UV-C）、マイトマイシン C（MMC）に感受性を示したのに対して、Δ*ddrAP-dr0042* 株の Bm、UV-C、MMC 耐性は予想に反して野生株と同程度の耐性を示した。本研究の目的は、DR0042 タンパク質が DNA 修復にどのように関わっているのかを明らかにすることであるが、dr0042 遺伝子を大腸菌で発現させた先行研究では、Native、N または C 末端 His-tag 付きの DR0042 タンパク質がすべて不溶性画分に大量発現するという結果であった。
今回の発表では、Maltose Binding Protein-tag と DR0042 の融合タンパク質を組換え大腸菌を用いて発現・精製した結果について報告する。

Deinococcus radiodurans, known for its resistance to radiation and other stresses, employs a robust DNA repair mechanism that includes DdrA, an ortholog of the eukaryotic homologous recombination repair protein Rad52. DdrAP, unique to *Deinococcus spp.*, also plays some role in DNA repair. *dr0042* gene, located downstream of *ddrAP*, forms an operon with *ddrAP*. *dr0042* gene was thought not to be expressed in Δ*ddrAP* strains due to a polarity effect. Surprisingly, the Δ*dr0042* strain was susceptible to bleomycin (Bm), ultraviolet light (UV-C), and mitomycin C (MMC). On the other hand, the Δ*ddrAP-dr0042* strain was, contrary to expectations, as resistant as the wild -type strain. The purpose of this study was to clarify the involvement of *dr0042* in DNA repair. However, previous attempts to express the *dr0042* gene in *Escherichia coli* resulted in the detection of large amounts of Native, N- or C-terminal His-tagged DR0042 in the insoluble fraction.
In this presentation, we present the results of the expression and purification of a fusion protein of Maltose Binding Protein-tag and DR0042 using recombinant *E.coli*.

Deinococcus radiodurans, Maltose Binding Protein, DNA repair

発表責任者：井上光誠（koseiinoue.21c@gmail.com）

講演番号：2B4p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 B4 会場

Rubrobacter radiotolerans の突然変異解析
Mutation analysis of *Rubrobacter radiotolerans*
○川﨑 一輝、久保 彩、鳴海 一成（東洋大・生命）
○Ikki KAWASAKI, Aya KUBO, Issay NARUMI (Facl. Life Sci., Toyo Univ.)

Rubrobacter radiotolerans は放線菌門に属する至適生育温度が 45℃のグラム陽性桿菌で、現在確認されているバクテリアの中で最も高い放射線抵抗性を持つことが知られているが、現在までその分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究は、DNA 修復機構の健全性や強靭性を解析し、DNA 損傷ストレスによって誘発される突然変異率の上昇について調査することで、当該菌の放射線耐性機構を解明することを目標とする。本研究では、そのバックグラウンドとなる自然突然変異率を決定することを目的とした。自然突然変異率は *rpoB* 遺伝子を指標としたリファンピシン耐性株の取得によって測定した。また、DNA シーケンシングによって突然変異スペクトル解析を行い、さらに分子力学的手法を用いて当該菌の RpoB タンパク質の立体構造モデルを構築し、リファンピシンとの相互作用解析も行った。現在、ブレオマイシンによる DNA 損傷ストレスで誘発される突然変異率の増加について調査を行っており、合わせて報告する。

Rubrobacter radiotolerans, a type of Gram-positive, rod-shaped bacterium with an optimum growth temperature of 45°C that belongs to the phylum Actinomycota. It is known to have the highest radioresistance of any currently identified bacteria. Nevertheless, the molecular mechanisms underlying radioresistance remain unclear to date. The goal of this study is to elucidate the radioresistance mechanism of this bacterium by analyzing the soundness and robustness of the DNA repair mechanism and by investigating the increased mutation rate induced by DNA damage stress. The objective of this study was to determine the background spontaneous mutation rate. The spontaneous mutation rate was measured by obtaining rifampicin-resistant mutants using the *rpoB* gene as an indicator. The study also included analyzing the mutation spectrum through DNA sequencing. Additionally, a molecular dynamics method was used to predict a 3D structural model of the RpoB protein in this bacterium and perform an interaction analysis with rifampicin.

Currently, we are investigating the increased mutation rates by bleomycin-induced DNA damage stress and the findings will be presented together with this research.

Rubrobacter radiotolerans, Rifampicin resistance, *rpoB*

発表責任者：鳴海一成（narumi@toyo.jp）

講演番号：2B4p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 B4 会場

Geobacillus kaustophilus における染色体挿入型ベクターの異常複製
Unusual replication of an integration vector in *Geobacillus kaustophilus*
○服部 未澄[1]、大城 隆[2,3]、鈴木 宏和[2,3] ([1]鳥取大院・持続性、[2]鳥取大・工、[3]鳥取大・GSC)
○Misumi HATTORI[1], Takashi OHSHIRO[2,3], Hirokazu SUZUKI[2,3] ([1]Dept. Eng. Grad. Sch. Sust., Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ., [3]GSC, Tottori Univ)

Geobacillus kaustophilus MK503 は，*pyrF* 遺伝子の欠失によりウラシル要求性であるが，枯草菌由来の *pyrF*（*BSpyrF*）をもつため，常温下（50℃）ではウラシル原栄養性を示す。また本株をウラシル飢餓に晒すと，高温下でもウラシル原栄養性を示す株が発生する。それらウラシル原栄養性株の一部は，*BSpyrF* 変異により発現産物が耐熱化していた。その他は変異をもたない株（mutation-independent uracil prototroph ; MUP）であった。本会では，MUP に関する新たな知見を報告する。MUP 株をウラシル存在下で継代培養すると，一部がウラシル要求性に戻った。この結果は，MUP が発現変動による一過的な表現型変化であることを支持する。RNA シークエンスからは，*BSpyrF* の染色体挿入に使用したプラスミド領域上の遺伝子（カナマイシン耐性遺伝子など）が全体的に向上していた。このことは，定量的逆転写 PCR でも確認できた。サザンブロット解析では，MUP が当該領域をプラスミドコンカテマーとして，染色体から独立した分子としてもっていることが示唆された。定量的 PCR で MUP 内のプラスミドコピー数を解析したところ, 培養温度が高いほどコピー数が高かった。温度が高いほど BSpyrF の機能性は下がるので，より高コピーでプラスミドをもつ MUP が選択された可能性が考えられる。MUP は，高濃度のカナマイシンを含む培地でも選択できた。
G. kaustophilus MK503 lacks *pyrF* for nucleic acid synthesis but has *Bacillus subtilis pyrF* (*BSpyrF*); therefore, it is prototrophic for uracil at 50℃ but not at 60℃. MK503 generates derivatives that are prototrophic for uracil even at 60℃ under uracil starvation. Some of them carried *BSpyrF* mutants that encoded thermostable variants, whereas the others (termed MUP) had no mutation across the genome. In this presentation, we report new knowledges for MUPs. When MUPs were cultivated in the presence of uracil, some derivatives became auxotrophic for uracil. This suggested that the MUP phenotype was transient. RNA sequencing revealed that genes including *BSpyrF* on an integration vector were upregulated in an MUP. The vector region apparently existed as concatemer forms on Southern blot analysis. The copy number was higher when MUPs were isolated at higher temperatures. Because BSpyrF is less functional at higher temperatures, such conditions would cause to isolate MUPs with higher copy numbers of the vector. The vector region contained a kanamycin resistant gene. Notably, MUPs could be identified by culturing MUP in the presence of high concentrations of kanamycin.

high copy number, plasmid concatemer, replicon

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2B4p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 B4 会場

IV 型分泌装置の構成因子 TrbB は TraR による $ICE_{KKS102}Tn$*4677* の切り出し活性化に関与する

TrbB, conjugative transfer ATPase of type IV secretion system, is involved in the TraR-mediated activation of $ICE_{KKS102}Tn$*4677* excision

○松本 哲、岸田 康平、永田 裕二、大坪 嘉行（東北大院生命）
○Satoshi MATSUMOTO, Kouhei KISHIDA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

PCB 分解細菌 *Acidovorax.* sp KKS102 株の PCB 分解遺伝子群は、integrative and conjugative element(ICE)上に存在している。本 ICE の切り出しおよび接合伝達は、ICE 上にコードされる LysR ファミリー転写因子 TraR の高発現によって活性化されることが見出されている。今回、IV 型分泌装置(T4SS)構成因子をコードする *mpf* 遺伝子群破壊株では、TraR を高発現しても切り出し頻度がわずかしか増加しないことを見出した。この結果から、TraR の発現による ICE の切り出し活性化に T4SS 構成因子のいずれかが関与することが考えられた。

mpf 遺伝子群のうち、*traG*(VirD4 family ATPase をコード)、*trbB*(VirB11 family ATPase をコード)、*trbE*(VirB4 family ATPase をコード)に着目した。これらの破壊株に TraR 発現プラスミドを導入して TraR を誘導発現し、切り出し頻度を定量した結果、*traG* 破壊株では野生株よりも顕著に切り出し頻度が上昇し、*trbE* 破壊株では野生株と同程度に切り出し頻度が上昇した一方で、*trbB* 破壊株では切り出し頻度が上昇しなかった。これらの結果から、TraR 高発現による切り出しの活性化は *trbB* 依存的であることが示された。そこで、TraR と TrbB 共発現させたところ、TraR 単独発現条件と比べて顕著な切り出し頻度上昇が見られた。

次に、TrbB の ATPase 活性が切り出しに関与するか検証するため、$TrbB_{K169A}$ (Walker A motif に変異を導入)および $TrbB_{R224T}$ (Walker B motif に変異を導入)を発現するプラスミドを作製し、TraR 発現プラスミドとともに *trbB* 破壊株に導入した。これらの株について切り出し頻度を定量した結果、$TrbB_{R224T}$、TraR 共発現条件では、TrbB、TraR 共発現条件と同程度の切り出し頻度上昇を示したのに対して、$TrbB_{K169A}$、TraR 共発現条件では切り出し頻度が低下した。このことから、TrbB の Walker A motif が切り出しの活性化に寄与することが示唆された。本モチーフは ATP の結合に必須であることから、TrbB への ATP の結合が切り出しに寄与していることが考えられた。現在、TraR と TrbB の相互作用について検討している。

Acidovorax sp. KKS102 carries PCB/biphenyl-degrading genes in an integrative and conjugative element (ICE). Overexpression of *traR*, which is located on the ICE and encoding a LysR-type transcriptional regulator, activates the excision and conjugative transfer of this ICE. Interestingly, in a mutant lacking *mpf* genes, which encode T4SS components, *traR* overexpression didn't increase the excision frequency.

To identify the *mpf* gene involved in the increase in ICE excision, we focused on *traG*, *trbB*, and *trbE,* encoding VirD4, VirB11, and VirB4 family ATPase respectively. Overexpression of *traR* activated excision of ICE in *trbE* and *traG* mutants, but not in *trbB* mutant, indicating that the activation of ICE excision by *traR* is dependent on *trbB*. $TrbB_{K169A}$ (Walker A motif mutant) failed to promote ICE excision, whereas TrbB(Walker B motif mutant) showed WT-type level activity, suggesting that the Walker A motif of TrbB is important for the activation of excision.

integrative and conjugative element, conjugation, type IV secretion system

講演番号：2B4p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 B4 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の硫黄非含有合成培地における生育条件の探索
Identification of conditions required for the growth of *Thermococcus kodakarensis* in a sulfur-free synthetic medium
○松村 聡一郎、折田 和泉、福居 俊昭（東工大・生命理工）
○Soichiro MATSUMURA, Izumi ORITA, Toshiaki FUKUI (Tokyo Tech)

【背景】絶対嫌気性超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、栄養豊富培地ではアミノ酸/ペプチドを炭素源とし、元素硫黄（S^0）添加条件では硫化水素、ピルビン酸（Pyr）添加条件では水素を発生しながら生育する。一方、20 種類のアミノ酸を含む合成培地において、本菌は S^0 添加条件（AA-S^0）では生育するものの、ピルビン酸添加条件（AA-Pyr）では生育せず、その理由は不明であった。
【方法と結果】培地成分の検討の結果、*T. kodakarensis* は AA-Pyr 培地にプリンヌクレオシドの一種であるイノシンを添加した培地（AA-Pyr-Ino）で生育能を示すことを見出した。塩基部分であるヒポキサンチンを添加した培地でも同様の生育を示したことから、本菌は AA-Pyr 培地でプリン塩基を生合成できないことが示唆された。プリン塩基生合成代謝が転写レベルで抑制されている可能性を考慮して RNA-seq 解析を行ったところ、AA-S^0 培地と比較して AA-Pyr-Ino 培地で著しく転写レベルが低下した遺伝子群を同定した。この遺伝子群からプリン塩基生合成に関わる可能性がある遺伝子を選抜し、自律複製型発現ベクターにより高発現させた組換え株の生育能を検討している。

【Background】The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* grows on amino acids/peptides in nutrient-rich media with evolving H_2S and H_2 under the presence of elemental sulfur (S^0) and pyruvate (Pyr), respectively. Interestingly, in the amino acids-based synthetic (AA) medium, this archaeon is able to grow when S^0 is added to the medium (AA-S^0) whereas not in the medium containing Pyr instead of S^0 (AA-Pyr).
【Methods and Results】Optimization of the cultivation condition led to discovery of growth potential of *T. kodakarensis* in the AA-Pyr medium supplemented with inosine, a purine nucleoside (AA-Pyr-Ino). Similar level of growth was observed with hypoxanthine, the base moiety of inosine, suggesting that *T. kodakarensis* appeared to lack the ability to biosynthesize purine bases in the absence of S^0. RNA-seq analysis identified genes remarkably down-regulated in the AA-Pyr-Ino medium. Several candidate genes potentially involved in purine biosynthesis were selected among the down-regulated genes, and the effects of overexpression of the candidates on the growth is now investigating.

Thermococcus kodakarensis, Hypertheromophile, Sulfur-free amino acids-based synthetic medium

講演番号：2B4p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 B4 会場

超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* 改変株におけるヌクレオシド依存増殖の解析
Nucleoside-dependent growth of the genetically modified strain of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○西田 哲、陳 陽子、折田 和泉、福居 俊昭（東工大・生命理工）
○Tetsu NISHIDA, Yangzi CHEN, Izumi ORITA, Toshiaki FUKUI (Tokyo Tech)

【背景と目的】絶対嫌気性超好熱アーキア *Thermococccus kodakarensis* KOD1 はペプチド/アミノ酸を資化して生育するが、この際ではアミノ酸由来アミノ基の処理を維持するために元素硫黄 (S^0) またはピルビン酸 (Pyr) の培地への添加が必須だと考えられてきた。しかし、本菌の代謝改変の過程で S^0・Pyr を含まない栄養豊富培地で生育する変異株を取得した。本研究では取得変異株の生育能の解明を目的とした。
【結果】変異株の培養条件を検討したところ、培地にヌクレオシドを添加すると S^0・Pyr 非依存生育が向上することを見出した。変異株のリシーケンシング解析の結果、推定ヌクレオシドトランスポーター (TK0657)での 2 箇所のミスセンス変異とタイプ III Rubisco (TK2290)の遺伝子上流領域での変異が見出された。変異株の *tk0657* 破壊株は S^0・Pyr 非添加条件では生育能を示さず、ヌクレオシド取り込みの重要性が示された。親株に *tk0657* の変異を再現し、*tk2290* を強発現した改変株は S^0・Pyr を含まないアミノ酸合成培地でヌクレオシド依存的に生育した。本菌ではアーキアに特有なペントースビスリン酸経路が知られており、ヌクレオシドのペントース部分は Rubisco による炭酸固定反応で 2 分子の 3-ホスホグリセリン酸へと変換されて解糖系に合流する。改変株の S^0・Pyr 非添加培養上清の LC および LC-MS/MS 解析で Pyr の最終代謝産物である酢酸およびアラニンが消費ヌクレオシド量に相当する濃度で検出され、改変株ではヌクレオシド由来 Pyr を利用した生育能を獲得したと考えられた。

【Background】 The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1 prefers peptide/amino acids as carbon and energy sources, and usually requires elemental sulfur (S^0) or pyruvate (Pyr) for processing of amino acids-derived amino group. Interestingly, we recently isolated a mutant capable of growing in a nutrient-rich medium with addition of neither S^0 nor Pyr. This study focused on the growth ability of the isolated mutant.
【Methods and Results】 Whole genome re-sequencing of the mutant identified mutations in a coding region of putative nucleoside transporter (*tk0657*) and upstream region of type III Rubisco (*tk2290*). Several genetic analyses clarified that the apparent S^0・Pyr-independent growth of the mutant was supported by nucleosides. It was suggested that, in the mutant strain, pyruvate was formed from nucleosides by unique pentose bisphosphate pathway then acted as an acceptor of amino acids-derived amino group, allowing the growth in the absence of S^0・Pyr in the medium.

Thermococcus kodakarensis, Hypertheromophile, Nucleoside metabolism

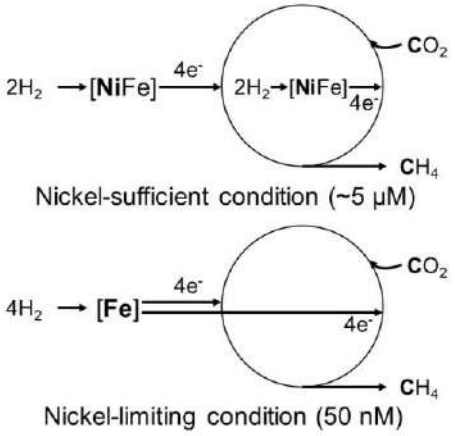
講演番号：2B4p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 B4 会場

ニッケル欠乏環境に適応したメタン生成代謝の変化

Changes in methanogenic metabolism adapted to nickel-deficient environments

○野村 駿介[1,2]、嶋 盛吾[1] ([1]マックスプランク陸生微生物学研究所、[2]旭化成ファーマ株式会社)
○Shunsuke NOMURA[1,2], Seigo SHIMA[1] ([1]Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, [2]Asahi Kasei Pharma Corporation)

メタンは再生可能燃料であると同時に、強力な温室効果ガスである。多くのメタン菌は H_2 と CO_2 からメタンを生産する。このメタン生成代謝では CO_2 をメタンに還元する電子を得るために、主に二種類の可溶性のニッケル含有ヒドロゲナーゼ（[NiFe]-ヒドロゲナーゼ）が使われている。また、メタン生産や CO_2 固定を行う酵素もニッケル酵素であるため、メタン菌を実験室で得るための培養液は比較的高濃度のニッケルイオン（約 5 μM）を含んでいる。一方、メタン菌の生息する自然環境のニッケルイオン濃度はそれよりもかなり低い。



私たちは *Methanothermobacter marburgensis* を用いた実験で、低濃度ニッケルイオン環境（50 nM）では、可溶性[NiFe]-ヒドロゲナーゼは生産されず、低ポテンシャル電子を供給するヘテロジスルフィド還元酵素複合体の組成にも変化が生じ、鉄だけを含む[Fe]-ヒドロゲナーゼがメタン生成代謝の主要なヒドロゲナーゼになることを見出した。

Methane is both a renewable fuel and a potent greenhouse gas. Most methanogenic archaea produce methane from H_2 and CO_2. Two types of soluble nickel-containing hydrogenases ([NiFe]-hydrogenases) are used to extract electrons from H_2 for the reduction of CO_2 to methane. The enzymes catalyzing the methane-forming reaction and the CO_2-fixation also contain nickel. Therefore, the culture medium used to obtain the methanogens contains relatively high concentrations of nickel (~5 μM). In contrast, the concentration of nickel in the natural environments, in which methanogens live, could be much lower.

By the experiments using *Methanothermobacter marburgensis*, we found that soluble [NiFe]-hydrogenases are not produced under low nickel concentrations (i.e. 50 nM). In addition, the composition of an enzyme complex of heterodisulfide reductase, which catalyzes the formation of low potential electrons, is changed and a hydrogenase without nickel ([Fe]-hydrogenase) functions as a main hydrogenase in the methanogenic metabolism.

Methanogenic archaea, [Fe]-hydrogenase, Nickel

発表責任者：嶋　盛吾（shima@mpi-marburg.mpg.de）

講演番号：2B4p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 B4 会場

アグマチンおよびオルニチンをプトレッシンに変換する腸内細菌の探索

Exploration of gut bacteria converting agmatine and ornithine into putrescine

○網 優太[1]、瀧原 速仁[2]、奥田 修二郎[2]、栗原 新[1] ([1]近畿大院生物理工、[2]新潟大医学)
○Yuta Ami[1], Hayato Takihara[2], Shujiro Okuda[2], Shin Kurihara[1] ([1]Kindai University, [2]Niigata University)

ヒト腸内常在細菌が mM レベルで菌体外に放出しているポリアミンは宿主に吸収され健康増進効果をもたらす（Microbiol Immunol. 51:25-35 (2007); Scientific Reports 2:233 (2012)）。しかし、オルニチンやアグマチンといったポリアミンの前駆体がヒト腸内細菌のポリアミン産生に与える影響についてはこれまでに研究されていない。

本研究では、アグマチンもしくはオルニチンを 1 mM の濃度で添加した培地を用いて、我々の保有するヒト腸内常在菌叢最優勢種一斉培養システム（Front Cell Infect Microbiol. 13:13:1056866.(2023)）で培養可能な腸内常在細菌 47 菌種および、プロバイオティクス細菌などの 24 菌種を培養し、培養上清中のポリアミン濃度を測定した。

この結果、アグマチンの添加により *Dorea longicatena* 等でプトレッシン濃度が増加し、オルニチンの添加では *Clostridium inncuum* 等のプトレッシン濃度が増加した。次に、今回培養実験を行った全菌種のゲノム配列に対して、細菌の既知のポリアミン代謝・輸送経路を調査した結果、*D. longicatena*、*C. inncuum* 等で前駆体添加によりプトレッシンが増加したにも関わらず、既知のポリアミン合成酵素のホモログが見出されなかった。このことは、ヒト腸内常在菌において全く新規なポリアミン合成酵素が存在する可能性を示唆している。

Polyamines produced by human gut bacteria are absorbed by the host, resulting in health benefits. Using a culture system that allows the simultaneous cultivation of the dominant human gut bacterial species and 24 bacterial species including probiotics in a medium supplemented with polyamine precursors such as ornithine and agmatine, the polyamine concentrations in the culture supernatant were measured. The result showed that the addition of agmatine increased putrescine levels in bacteria such as *Dorea longicatena*, while the addition of ornithine increased putrescine levels in bacteria such as *Clostridium inncuum*. Subsequent examination of the genome sequences of all bacterial species cultured in this study against known polyamine metabolism and transport pathways revealed that, despite the increase in putrescine upon addition of putrescine precursors in *D. longicatena* and *C. inncuum*, no homologs of known polyamine synthesis enzymes were found. This suggests the presence of a novel polyamine synthesizing enzyme in human commensal gut bacteria.

Polyamine, Gut bacteria, Agmatine

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2B5a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 B5 会場

久慈産琥珀から得られる spirolactone norditerpenoid の肝細胞における糖新生抑制作用

Spirolactone norditerpenoid isolated from Kuji amber suppresses glucose production in rat H4IIE hepatic cells

○吉田 潤[1]、工藤 唯[2]、伊藤 芳明[2]、木村 賢一[2]([1]岩手医大・教養教育、[2]岩手大院・総合科学)
○Jun YOSHIDA[1], Yui KUDO[2], Yoshiaki ITO[2], Ken-ichi KIMURA[2] ([1]Center Lib. Arts and Sci., Iwate Med. Univ., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ.)

【背景・目的】Spirolactone norditerpenoid(SN)は、久慈産琥珀(約 9000 万年前)の抽出物から得られる C16 の 3 環系のノルジテルペノイドで、既知物質であるが我々が初めて単離精製し、構造解析した化合物である。これまでに SN の生物活性として遺伝子破壊酵母株 YNS17(*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1*/*3*Δ)の生育回復活性、PPM1 活性化、脱顆粒抑制活性、並びにコラーゲン産生促進活性等を報告してきた[1,2)]。その中で、YNS17 株の生育回復物質は抗糖尿病活性が期待できることから、本研究では肝臓由来細胞株を用いた糖新生抑制試験にて、SN の抗糖尿病効果に関わる新たな機能性を検討した。
【方法】糖新生抑制試験は、dexamethasone/Bt_2cAMP 処理で糖新生刺激したラット肝がん由来細胞株 H4IIE に、SN を作用させて 24 時間培養し、培地交換後 4 時間で培地中に放出されたグルコースをグルコースオキシダーゼ法で定量した。また、リン酸化解析はウエスタンブロット法で行った。
【結果・考察】SN は、糖新生刺激した H4IIE 細胞のグルコース産生を IC_{50}=36.7 μM で濃度依存的に抑制した。また、SN 100 μM 処理した H4IIE 細胞において、処理後 30 分からインスリンシグナル伝達分子の Akt 及び GSK-3β のリン酸化の上昇が認められた。一方、SN と Akt 阻害剤 Akt1/2 kinase inhibitor(Akti-1/2)を H4IIE 細胞に共処理し、24 時間培養すると、完全ではないが SN の糖新生抑制作用が Akti-1/2 濃度依存的に打ち消された。以上の結果から、SN は肝細胞の糖新生を抑制し、その作用機序の一部として Akt 活性化を介している可能性が示唆された。
【Purpose】Spirolactone norditerpenoid (SN) is 16-carbon tricyclic norditerpenoid isolated from Kuji amber. We have reported the biological activities of SN, including the growth-restoring activity of the mutant yeast strain YNS17 (*zds1*Δ*erg3*Δ*pdr1*/*3*Δ) and collagen production promotion activities [1,2)]. In this study, we investigated the antidiabetic effect of SN in rat H4IIE hepatic cells as new biologic function.【Results and Discussion】SN inhibited glucose production in gluconeogenesis-stimulated H4IIE cells (IC_{50}=36.7 μM) in concentration-dependent manner. Furthermore, SN increased the Akt phosphorylation in H4IIE cells. The inhibitory activity of SN on glucose production was partially suppressed by an Akt 1/2 kinase inhibitor. These results suggest that SN suppresses gluconeogenesis in hepatocytes and that part of its mechanism may be mediated through Akt activation.

1) Shimizu E. *et al*., *Fitoterapia*, 134, 290-296 (2019)
2) Suzuki S. *et al*., *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*., 84(3), 518-525 (2020)

Kuji amber, spirolactone norditerpenoid, gluconeogenesis

発表責任者：吉田 潤（jyoshida@iwate-med.ac.jp）

講演番号：2B5a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 B5 会場

食用ほおずきに含まれる新規 withanolide 硫酸エステルの同定と生物学的役割

Identification and the biological role of a novel sulfate ester of withanolide from *Physalis peruviana*

○上杉 祥太[1]、越野 広雪[2]、箱崎 真友佳[1]、菅野 裕子[1]、菅原 英範[1]、鈴木 瑞季[3]、白石 朗子[1]、結城 彩花[1]、木村 賢一[3]、矢野 明[1] ([1]岩手生工研、[2]理研 CSRS、[3]岩手大院・総合科学)
○ Shota UESUGI[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Mayuka HAKOZAKI[1], Yuko KANNO[1], Hidenori SUGAWARA[1], Mizuki SUZUKI[3], Akiko SHIRAISHI[1], Sayaka YUKI[1], Ken-ichi KIMURA[3], Akira YANO[1] ([1]IBRC, [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ.)

【背景・目的】食用ほおずきの一種シマホオズキ（*Physalis peruviana*）の葉などには、強力な抗炎症成分 withanolide 類が含まれる。我々は、シマホオズキに既知のものとは異なる抗炎症成分が大量に存在することを見出した。本研究では、単離同定と、シマホオズキにおける役割について検討した。
【方法・結果】シマホオズキの葉を含水エタノール（エタノール濃度 0～100%の 10%刻み）で抽出し、RAW264.7 を用いた Griess assay で抗炎症活性を測定した。5 μg/mL の活性を比較した結果、30%と 100%で強い活性を示し、30%エタノール抽出物には、既知の 4β-hydroxywithanolide E（**1**）が最も多く含まれていた。一方、100%エタノール抽出物に含まれる **1** は 30%エタノール抽出物の 1/6 程度であったが、同等の活性を有しており、未知の活性物質が存在すると予想した。100%エタノール抽出物の活性への関与が示唆された成分を各種クロマトグラフィーで精製し、10.7 mg 単離した。質量分析と NMR 等で構造解析を行い、新規化合物 phyperunolide E 3-*O*-sulfate（**2**）と同定した。**2** は、DMEM 培地中でインキュベートすると次第に減少し、代わりに **1** が生じた。すなわち、**2** は培地中で硫酸基の脱離によって 2 位に二重結合が形成されて **1** に変化し、withanolide 類の生物活性に寄与する不飽和カルボニル構造が生じることで抗炎症活性を示すと考えられた。Withanolide 類には、害虫忌避活性が報告されている。シマホオズキの葉をすり潰すと **2** が **1** に変換され、この現象は加熱処理した葉では起こらなかった。したがって、**2** はシマホオズキ植物体内での安定な貯蔵形態であり、昆虫などの生物から葉が食害を受けた際に酵素的に **1** に変換され、害虫忌避物質として機能していることが推測された。

【**Purpose**】The leaves of *Physalis peruviana* contain withanolides which have potent anti-inflammatory effects. Since we identified a new abundant active component, in this study, we analysed the chemical structure and its biological role in this plant.【**Results and Discussion**】30% and 100% ethanol extracts showed equally potent inhibitory effect against Griess assay in RAW264.7 cells. On the other hand, about 6-fold amount of 4β-hydroxywithanolide E (**1**) was contained in 30% extract than 100% extract. The major component which is responsible for the activity of 100% extract (10.7 mg) was isolated and characterized as new phyperunolide E 3-*O*-sulfate (**2**). It was converted to **1** in DMEM medium and exhibits potent biological activity. Previous research have reported that withanolides have anti-feeding activity against insects. By homogenizing the leaves, **2** was converted to **1**, and it was not observed in the boiled leaves. It indicated that it is enzymatic desulfuration reaction. Thus, it was suggested that **2** is a stable storage form of **1**, an anti-insect component, in the leaves of *P. peruviana*.

Physalis peruviana, withanolide, sulfate ester

発表責任者：上杉祥太（s-uesugi@ibrc.or.jp）

講演番号：2B5a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 B5 会場

がん細胞の中心体クラスタリング阻害活性を有する kolavenic acid analog の構造活性相関

Structure-activity relationship of kolavenic acid analog having centrosome clustering inhibitory activity on cancer cells.

○古山 達貴[1]、西殿 悠人[2,3]、湯川 格史[4,5]、田中 謙[2]、木村 賢一[1]([1]岩手大院・総合科学、[2]立命館大・薬学部、[3]立命館大・総合科学技術研究機構、[4]広島大院・統合生命科学、[5]広島大・健康長寿研究拠点 (HiHA))

○Tatsuki FURUYAMA[1], Yuto NISHIDONO[2,3], Masashi YUKAWA[4,5], Ken TANAKA[2], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Fac. of Agri. Iwate Univ., [2]College of Pharm. Sci. Ritsumeikan Univ., [3]Res. Org. of Sci. and Tech. Ritsumeikan Univ., [4]Grad Sch. of Integrated Sci. for Life. Hiroshima Univ., [5]Hiroshima Research Center for Healthy Aging (HiHA) Hiroshima Univ.)

【目的】過剰な中心体を有したがん細胞は、分裂期において中心体クラスタリングを実行し、自らの細胞死を回避する。その必須因子であるモータータンパク質の HSET (KIFC1) は、大腸がん、乳がん等で高発現しており、がん細胞の有望な標的分子であると考えられている。本研究室では、HSET 過剰発現分裂酵母 TY-27 株の生育回復活性を指標に、セイタカアワダチソウからクレロダン化合物である kolavenic acid analog (KAA) 、及び 9 位の立体構造が逆である solidagonic acid (SA)などを単離精製した。そのうち KAA には、乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞において中心体クラスタリング阻害活性が認められた。そこで本研究では、新たに単離精製・同定した KAA と SA、並びにその類縁体の計 14 化合物を用い、酵母とがん細胞における構造活性相関について検討した。

【方法・結果】KAA を含む 14 種の構造類縁体を用い、TY-27 株における生育回復活性、及び MDA-MB-231 細胞に対する細胞毒性を MTT 法で評価した。TY-27 株に対する最小生育円濃度を比較すると、3 化合物を除き、KAA と同じ 9 位の絶対立体配置が *R* の化合物に低濃度（0.16～0.8 ng/spot）で生育回復活性が認められた。一方で、活性が弱い 3 化合物は全て β 配置の 3, 4-エポキシ環を有することから、それが活性の低下に関与していると示唆された。また、細胞毒性においては、明確な構造との関連性は認められなかった。現在、KAA と同程度の活性を有する成分の、がん細胞における中心体クラスタリング阻害活性を調べている。

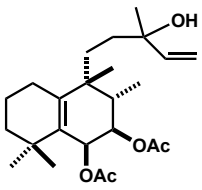
Cancer cells containing supernumerary centrosome can avoid cell death via centrosome clustering. HSET (KIFC1) is a critical protein for centrosome clustering. Kolavenic acid analog (KAA) and solidagonic acid (SA) restored the growth of fission yeast cells, TY-27, exhibiting lethal HSET overexpression. And KAA only inhibited centrosome clustering on MDA-MB-231 cells (human breast adenocarcinoma cells). The purpose of this study is to examine the structure-activity relationship in KAA and SA analogues. Using 14 kinds of KAA and SA analogues, we evaluated their growth-restoring activity against TY-27 strains and cytotoxicity against MDA-NB-231 cells. Compounds of the *R*-configuration at C-9 showed potent activity against TY-27 strain at 0.16~0.8 ng/spot except for 3 compounds. They have the 3,4-epoxy moiety of ß-configuration in the molecule, and it decreased the activity. On the other hand, there was no distinctive relationship between structure and cytotoxicity in the cells.

HSET (KIFC1), centrosome clustering, structure-activity relationship

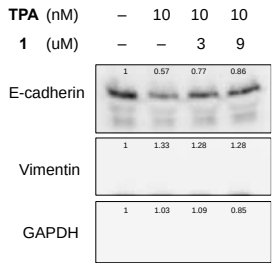
講演番号：2B5a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 B5 会場

ハマゴウに含まれるジテルペン類の単離，構造決定，ならびに生物活性評価
Isolation, structural determination, and biological evaluation of diterpenes from *Vitex rotundifolia*
○花木 祐輔、安部 凜太郎、岩瀬 二千翔、杉山 康憲、原 康雅、柳田 亮（香川大農）
○Yusuke HANAKI, Rintaro ABE, Nichika IWASE, Yasunori SUGIYAMA, Yasumasa HARA, Ryo YANAGITA (Kagawa Univ.)

シソ科ハマゴウ属の植物であるハマゴウやセイヨウニンジンボクは，炎症，疼痛ならびに婦人科疾患の諸症状を緩和することが知られており，伝統的に生薬およびハーブとして利用されている．本研究グループでは，子宮内膜がん由来 HHUA 細胞の形態を指標とする上皮間葉転換（EMT）阻害剤のスクリーニングを実施し，ハマゴウ葉のメタノール抽出物から vitetrifolin D (**1**) を活性化合物として単離した[1]．ウエスタンブロッティングによって EMT マーカータンパク質の発現に与える影響を調べたところ，**1** は間葉系マーカーである vimentin の発現には影響を与えない一方で，細胞間接着を担う E-cadherin のダウンレギュレーションを抑制することが明らかになった（右下図）[2]．さらに，本スクリーニングにおいては活性を示さなかったフラクションについても解析を進め，連続スピロ構造を有する新規ラブダン型ジテルペン **2** を単離した．HHUA 細胞を用いた細胞毒性試験の結果，**2** の細胞毒性は低いことが明らかになった（IC_{50} > 5 μM）．一方，構造類似のラブダン型ジテルペン類の一部が抗炎症作用を示すことが報告されているため，現在 **2** の炎症抑制活性の評価を進めている．



Vitetrifolin D (1)



Some species of genus *Vitex*, such as *V. rotundifolia* and *V. agnus-castus*, have traditionally been used as medicinal herb for inflammatory and gynecological diseases. We searched for inhibitors for phorbol-ester induced morphological change of HHUA endometrial cells, and isolated vitetrifolin D (**1**) from *V. rotundifolia* leaves[1]. Compound **1** suppressed the downregulation of E-cadherin, a major component of the epithelial adherens junction, but did not inhibit vimentin upregulation[2]. On the other hand, a new spirolabdane-type diterpene (**2**) was also isolated from the inactive fraction and the structure was determined by NMR and MS spectra. The cytotoxicity of **2** toward HHUA cells was weak (IC_{50} > 5 μM), and its anti-inflammatory activity is currently under investigation.

1) 花木ら，日本農芸化学会 2023 年度大会，3E01–09
2) Hanaki, Y. *et al.*, *BPB Reports* **2023**, *6*, 103–107.

Vitex, diterpene, anti-inflammation activity

発表責任者：花木　祐輔（hanaki.yusuke@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2B5a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 B5 会場

フェノキサジン環を持たない新規 Actinomycin 誘導体の合成及び生物活性評価

Synthesis and Biological Evaluation of Novel Actinomycin Analogs without the Phenoxazine Ring

○山上 健太、花木 祐輔、原 康雅、柳田 亮 (香川大農)
○Kenta YAMANOUE, Yusuke Hanaki, Yasumasa HARA, Ryo YANAGITA (Kagawa Univ.)

ピオベルジンは一部のシュードモナス属細菌が生産する蛍光性のシデロフォアであり、三価の鉄イオンをキレートすることでその利用を可能とするほか、宿主への感染や毒性において機能している可能性が示唆されている。そこで、ピオベルジンの生産を特異的に阻害する化合物の開発によって、これらの細菌の増殖及び病原性を選択的に抑制できると考えた。Actinomycin D（Act-D）は放線菌 *Streptomyces antibioticus* より単離されたペプチド系抗生物質であり、DNA に結合することによって強力な細胞毒性を示す。また、Act-D はシュードモナス属細菌によるピオベルジンの生産を阻害することが明らかとなっている [1]。しかし、Act-D は宿主に対しても強力な細胞毒性を示すため、そのまま薬剤として用いることはできない。そこで、Act-D の DNA への挿入に必要なフェノキサジン環部分をイソフタル酸または 1,3-フェニレンジ酢酸に置き換えた新規 Actinomycin 誘導体(**1**, **2**)を合成し、それらの細胞毒性及びピオベルジン生産阻害活性を評価した。その結果、**1** 及び **2** の細胞毒性とピオベルジン生産阻害活性は Act-D と比較して大きく低下していた。このことから、細胞毒性だけでなく、ピオベルジン生産阻害においてもフェノキサジン環部分が重要である可能性が示唆された。

Pyoverdines are fluorescent siderophores produced by some *Pseudomonas* species. They chelate Fe^{3+} to enable iron acquisition, and would also function in virulence on hosts. Hence, specific inhibitors of pyoverdine production can be attractive drugs to suppress growth and pathogenicity of *Pseudomonas* bacteria. Actinomycin D (Act-D) is a peptide antibiotic isolated from *Streptomyces antibioticus*, that exhibits a potent cytotoxicity by binding to DNA. Recently, Act-D was reported to inhibit the pyoverdine production by some *Pseudomonas* species,[1] but its sever cytotoxicity has hampered the use as medicines or pesticides. This led us to synthesize new actinomycin derivatives (**1**, **2**), in which the phenoxazine ring, a moiety intercalated into DNA, was replaced with isophthalic acid or 1,3-phenylenediacetic acid. As expected, **1** and **2** showed little cytotoxicity to HHUA endometrial cells (IC_{50} > 50 μM), but unfortunately their inhibitory activity against pyoverdine production of *P. fluorescens* NBRC15833 was also dramatically reduced. These results suggest that the phenoxazine ring of Act-D would be involved not only in cytotoxicity but also in inhibition of pyoverdine production.

1) Maenaka R. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2020**, *84*, 1975.

actinomycin, pyoverdine, cyclic peptide

発表責任者：花木祐輔（hanaki.yusuke@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2B5a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 B5 会場

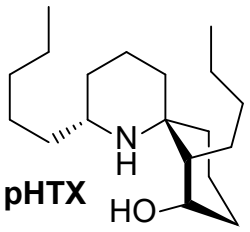
ペルヒドロヒストリオニコトキシン類のニコチン性アセチルコリン受容体に対する阻害活性の構造活性相関

Structure-activity relationship of perhydrohistrionicotoxins for inhibition of the α4ß2 nicotinc acetylcholine receptor

○森 澄海人[1]、西川 慶祐[2]、小野 陽介[2]、松村 匡浩[2]、高山 浩一[1]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1]、森本 善樹[2] ([1]近畿大農、[2]阪公大院理)
○ Sumito MORI[1], Keisuke NISHIKAWA[2], Yosuke ONO[2], Kunihiro MATSUMURA[2], Koichi TAKAYAMA[1], Makoto IHARA[1], Kazuhiko MATSUDA[1], Yoshiki MORIMOTO[2] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka Metropolitan Univ.)

ヒストリオニコトキシン（HTX）類は南米産のヤドクガエルから単離される天然物群であり、構造的特徴として 1-アザスピロ[5.5]ウンデカン（6,6-アザスピロ環）骨格が挙げられる。本天然物群はニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）を非競合的に阻害することで神経毒性を示し、そのユニークな生物活性から新規医薬品への応用が期待される一方、毒性発現における側鎖や二級ヒドロキシ基の詳細な役割は解明されていない。

そこで我々は、水銀トリフラート（$Hg(OTf)_2$）を触媒として直鎖分子から 1-アザスピロ[5.5]ウンデカン骨格を一挙に構築する環化異性化反応を鍵反応として、ペルヒドロヒストリオニコトキシン（pHTX）を合成した。この pHTX のジアステレオマーおよび誘導体（pHTX、8-*epi*-pHTX、di-6,7-*epi*-pHTX、tri-6,7,8-*epi*-pHTX、8-*oxo*-pHTX、カルバマート体）についてアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた α4β2 nAChR に対する阻害活性の構造活性相関を検討した。その結果、興味深いことに天然型と立体配置が 3 箇所異なる tri-6,7,8-*epi*-pHTX が最も高い阻害活性を示した。一方で、8-*oxo*-pHTX とカルバマート体は阻害活性が低下し、環上 C8 位のヒドロキシ基の存在が活性発現において重要であることが明らかとなった。



Histrionicotoxin (HTX) alkaloids, neurotoxins from Colombian poison dart frogs, inhibit nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). To understand the structure-activity relationship of HTX, we have synthesized perhydrohistrionicotoxins (pHTXs) and their derivatives. We have synthesized pHTX and its three stereoisomers from the known aldehyde based on a one-step construction of the 1-azaspiro[5.5]undecane framework from a linear substrate. The compounds synthesized are several diasteromers (epimers) as well as ketone and carbamate derivatives. We have evaluated the inhibition activities of pHTX and its derivatives on *Gallus gallus* α4β2-neuronal nAChRs expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Interestingly, one diastereomer with an unnatural configuration was more potent than the original pHTX, indicating the importance of the diaxial configuration of the alkyl and hydroxy groups on the cyclohexane ring. Both oxidation and block by carbamate formation of the hydroxy group led to reduced activity, demonstrating a role of the hydroxy group in the interaction with the α4β2 nAChR.

histrionicotoxin, nicotinic acetylcholine receptor, structure-activity relationship

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B5a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 B5 会場

ネオニコチノイドとの相互作用におけるショウジョウバエの Dα4 および Dβ3 サブユニットの役割
Roles of the *Drosophila melanogaster* Dα4 and Dβ3 subunits in their interactions with neonicotinoids

○高山 浩一[1]、小森 勇磨[1]、伊原 誠[1]、SATTELLE David B.[2]、松田 一彦[1]（[1]近畿大農、[2]UCL）
○Koichi TAKAYAMA[1], Yuma KOMORI[1], Makoto IHARA[1], David B. SATTELLE[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kindai Univ., [2]UCL)

ネオニコチノイド系殺虫剤は、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に対する競合的なモジュレーターであり、脊椎動物よりも昆虫の nAChR に対する選択性を示す。キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の nAChR を構成する 7 種の α サブユニットと 3 種の non-α サブユニットのうち、我々はこれまでに、Dα1、Dα2、Dα3、Dβ1、Dβ2 サブユニットによって形成される nAChR について評価を行ってきた。

本研究では Dα1、Dα2、Dα3 サブユニット遺伝子の発現抑制により生じる幼虫期および成虫期のショウジョウバエに対するネオニコチノイドの毒性の変化について検討した。*elab* ドライバーにより神経細胞特異的に当該遺伝子の発現を RNAi により抑制した結果、標的遺伝子のみならず Dβ3 サブユニットなどの標的以外のサブユニット遺伝子の発現も変動した。また、当該 RNAi によりショウジョウバエの成虫でネオニコチノイドに対する感受性が上昇する現象が観察された。同一神経細胞での Dα1、Dα2、Dα3、Dβ1、Dβ2 サブユニットとの共発現を考慮して、Dα1/Dα2/Dα3/Dβ1/Dβ2 nAChR を構成する α サブユニットのうちの 1 つを Dα4 または Dβ3 サブユニットに置換した結果、ネオニコチノイドに対する nAChR の感受性が向上したことから、RNAi によるサブユニット遺伝子の発現抑制によりショウジョウバエがネオニコチノイド過敏になる仕組みが理解された。

Neonicotinoid insecticides are competitive modulators of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and show selectivity for insect nAChRs over vertebrates. Of the seven α-subunits and three non-α-subunits that comprise the *Drosophila melanogaster* nAChR, we have previously evaluated the nAChR formed by the Dα1, Dα2, Dα3, Dβ1, and Dβ2 subunits. Our results indicate that neonicotinoids' agonist activity depends on the presence or absence of Dα1, Dα2, and Dα3 subunits. In this study, we have examined changes in neonicotinoid toxicity to *D. melanogaster* larva and adults caused by RNAi-mediated suppression of Dα1, Dα2 and Dα3 subunit gene expression. Neuron-specific RNAi of these gene expression using the *elab* driver affected the expression of not only the target genes but also non-target subunit genes, such as the Dβ3 subunit. In addition, the RNAi increased sensitivity to neonicotinoids of adult fruit flies. Replacing one of the α subunits constituting the Dα1/Dα2/Dα3/Dβ1/Dβ2 nAChRs with a Dα4 or Dβ3 subunit led to increased sensitivity of the nAChR to neonicotinoids. These results account at least in part for the RNAi-mediated hyper-neonicotinoid sensitivity of the fruit flies.

Reference: Y. Komori., K. Takayama. *et al*., *PLoS Genet*. 9, e1010522 (2023).

nicotinic acetylcholine receptor, neonicotinoid, *Drosophila melanogaster*

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B5a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 B5 会場

セイヨウミツバチのニコチン性アセチルコリン受容体の機能的発現と薬理特性に対する補助因子の効果
Effects of the cofactors on the functional expression and the pharmacology of honeybee nicotinic acetylcholine receptors
○伊原 誠、高山 浩一、伊藤 稜、森 澄海人、武林 真由花、江川 瑠夏、山本 新菜、木村 裕紀、松田 一彦（近畿大農）
○Makoto IHARA, Koichi TAKAYAMA, Ryo ITO, Sumito MORI, Mayuka TAKEBAYASHI, Runa EGAWA, Niina YAMAMOTO, Yuki KIMURA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

【目的】無脊椎生物のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）は様々な生物制御剤の分子標的として知られるが、それらの機能的異種発現法における鍵因子が明らかになったのは最近のことである。我々は、タンパク質におけるジスルフィド結合形成を担うチオレドキシン様タンパク質、TMX3 が昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体の機能的異種発現に不可欠な因子の一つであることを明らかにしてきた。本研究では、古くから nAChR の機能的発現に重要な働きを示すことが報告されてきた RIC3 に着目して、セイヨウミツバチの nAChR の機能的発現と薬理特性に対するその効果を明らかにすることを目的とした。【方法と結果】初めに、セイヨウミツバチの nAChR および補助因子である TMX3, UNC50, RIC3 をコードする cRNA を調製した。次に、それらを様々な組み合わせでアフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクションし、nAChR を発現させた。受容体の機能解析には二電極膜電位固定法を用いた。アセチルコリン処理による受容体応答を確認のうえ、ネオニコチノイドのアゴニスト活性を測定した。その結果、RIC3 の存在は nAChR 機能的発現だけでなく、場合により薬理特性に対しても影響を与える傾向があることが明らかとなった。

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are targeted by several classes of chemicals, such as pesticides, and intensive studies have been conducted. However, until recently, when we discovered TMX3 as the key molecule for functional nAChRs, functional expressions of insect nAChR have been unsuccessful. In this study, we focused on RIC3 which has been noticed as one of the most essential cofactors for the functional expression of nAChRs, and we evaluated the effects of RIC3 on the functional expression of honeybee nAChRs and the effects on the pharmacology. Functional expressions of honeybee nAChRs in *Xenopus laevis* oocytes were achieved by microinjection of cRNAs coding the nAChR subunit and cofactors (TMX3, UNC50, and RIC3) in several combinations. After confirming the functional expression of nAChRs by acetylcholine response, agonist actions of the neonicotinoid were evaluated. Results of our experiments showed that the RIC3 affects the pharmacology of nAChRs, as well as the efficiency of the functional expression of nAChRs.

nicotinic acetylcholine receptor, *Apis mellifera*, RIC3

講演番号：2B5a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 B5 会場

計算化学を用いた昆虫キチン合成阻害剤の結合部位予測

Prediction of the binding site of chitin synthesis inhibitor using computational chemistry

森 湖太郎[1]、宮下 正弘[1]、池口 満徳[2]、森 聡一朗[3]、柴田 哲男[3]、○中川 好秋[1]([1]京大院農、[2]横浜市大、[3]名工大工)

Kotarou MORI[1], Masahiro MIYASHITA[1], Mitsunori IKEGUCHI[2], Soichirou MORI[3], Norio SHIBATA[3], ○Yoshiaki NAKAGAWA[1] ([1]Kyoto University, [2]Yokohama City University, [3]Nagoya Institute of Technology)

Benzoylphenylurea(BPU)類は，約半世紀前に昆虫の脱皮阻害剤として発見され，diflubenzuron が農業用殺虫剤として最初に実用化された．その後様々な BPU 類が農業用殺虫剤として実用され，日本においても，chlorfluazuron が開発された．BPU 類は，昆虫などの節足動物においてキチンの生合成を阻害し，脱皮阻害を引き起こして昆虫を死に至らしめる．しかし，微生物や昆虫から調製した無細胞調製物においては不活性である．BPU 類は殺菌剤であるポリオキシン D のように直接キチン合成酵素(CHS)を阻害しないことから，CHS とは標的が異なるのではないかと考えられた．BPU 類の発見後，エトキサゾールやブプロフェジンなどが農薬として上市されたが，これらもキチン合成を阻害することがわかっている．最近，われわれは，セルロース合成阻害剤であるイソキサベンの構造をもとにデザインしたイソキサゾール型化合物がキチン合成を阻害することを見出した．BPU 類の作用機構は長い間不明であったが，BPU 耐性種の遺伝子解析が行われて BPU の標的は CHS であることが明確となった。しかし、依然として，BPU が CHS にどのように結合部位しているかは不明である．本研究では、ホモロジーモデリングの手法を用いて昆虫 CHS の立体構造を構築し，CHS への阻害剤のドッキングや分子動力学を行って，BPU をはじめとした様々な昆虫キチン合成阻害剤の結合部位を予測した．

Benzoylphenylureas (BPUs) were discovered as insect molt inhibitors, and some of BPUs such as diflubenzuron and chrolfluazuron are used in the agricultural market. Although BPUs inhibit chitin synthesis in insects and other arthropods, they are inactive against microorganisms and the cell-free preparation prepared from insects. Since BPUs do not inhibit chitin synthase (CHS) directly like polyoxin D, we thought that the target might be different from CHS. After discovery of BPUs, other chemicals such as etoxazole and buprofezine were launched in the agriculture market as acaricides/insecticides. Recently, we found that isoxazole-type compounds that are designed from the cellulose synthesis inhibitor (isoxaben) inhibits chitin synthesis. Although the mode of action of BPUs has not been disclosed for a half century, recently it was disclosed that the target of BPU is CHS by the genetic analysis of BPU-resistant species. The binding site of BPUs to CHS is still unknown. In this study, we construct the three-dimensional structure of insect CHS using homology modeling technique. In the further study, we performed the docking simulation and executed the molecular dynamics to predict the binding site of chitin synthesis inhibitors.

chitin, benzoylphenylurea, computer chemistry

発表責任者：中川好秋（yoshiaki.nakagawa7@gmail.com）

講演番号：2B5a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 B5 会場

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においてペンタデカン酸が誘導する脂肪毒性
Lipotoxicity induced by pentadecanoic acid in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

○星川 陽次郎[1,2]、代田 夏帆[2]、松山 晃久[1,3]、木村 聡[1]、LI Sheena[3,4]、八代田 陽子[3]、BOONE Charles[3,4]、津川 裕司[3,5,6,7]、有田 誠[6,7,8]、吉田 稔[1,3,9]、西村 慎一[1,2,9] ([1]東大院・農、[2]広島大院・統合生命、[3]理研 CSRS、[4]トロント大・ドネリーセンター、[5]東農工大院・工、[6]理研 IMS、[7]横市大院・生命医、[8]慶大院・薬、[9]東大・微生物連携機構)
○ Yojiro HOSHIKAWA[1,2], Natsuho SHIROTA[2], Akihisa MATSUYAMA[1,3], Satoshi KIMURA[1], Sheena LI[3,4], Yoko YASHIRODA[3], Charles BOONE[3,4], Hiroshi TSUGAWA[3,5,6,7], Makoto ARITA[6,7,8], Minoru YOSHIDA[1,3,9], Shinichi NISHIMURA[1,2,9] ([1]Grad. Sch. of Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. of Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [3]RIKEN CSRS, [4]Donnelly Cent., Univ. Toronto, [5]Dept. of Biotechnol. and Life Sci., Tokyo Univ. of Agr. and Technol., [6]RIKEN IMS, [7]Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [8]Grad. Sch. of Pharma. Sci., Keio Univ., [9]CRIIM, Univ. Tokyo)

脂質研究における戦略の一つとして生理活性物質を活用することが挙げられる。当研究グループは以前、炭素数 15 の直鎖飽和脂肪酸、ペンタデカン酸（C15:0）が分裂酵母の生育を阻害し、他の鎖長の脂肪酸は活性を示さないことを明らかにした。この現象を通じて炭素鎖長に依存した脂肪酸の知られざる機能、効果を明らかにできると期待し、我々は C15:0 の作用機序を解明することを目指した。一昨年の 2022 年度大会では、C15:0 が膜脂質にアシル鎖として組み込まれて様々な形態異常を誘導することを報告した。本発表では最新の結果を交えながらさらに発展させた作用モデルを紹介する。

まず、形態解析によって C15:0 が小胞体の異常構造の形成を誘導することが分かった。さらに、リピドミクス解析から C15:0 がオレイン酸に代わってリン脂質に積極的に組み込まれていることが判明した。そこで、リン脂質の生合成酵素を欠損させる、あるいはオレイン酸量や脂肪酸の不飽和化反応を制御すると C15:0 感受性が変化した。以上から、C15:0 を含む膜脂質が蓄積して飽和・不飽和のバランスが崩壊し、膜の物性変化を介して小胞体の形態異常が誘導されることが示唆された。この作用モデルは脂質組成がオルガネラの形態維持に重要であることを示唆する。また、特定の条件では C15:0 以外の飽和脂肪酸にも同様の効果が観察された。これらの結果を踏まえて、C15:0 が誘導する表現型が飽和脂肪酸の蓄積による毒性（脂肪毒性）として一般化できる可能性について議論する。

One strategy to understand lipids is to utilize bioactive compounds. We have found that pentadecanoic acid (C15:0), but not other fatty acids (FAs), inhibits the growth of the fission yeast. Our aim is to reveal the mechanism underlying this phenomenon to find novel properties of FAs.

First, cytological analyses revealed that C15:0 induces defects in the endoplasmic reticulum (ER) structure. Next, lipidomics showed that C15:0 is incorporated into membrane lipids. Furthermore, the efficacy of C15:0 was altered in phospholipid biosynthesis mutants, or by controlling oleic acid levels and FA desaturation. These results suggest that the altered lipid unsaturation level by C15:0 changed the physical properties of the membrane to deform the ER structures. This scenario emphasizes the importance of the lipid composition for maintaining organelle morphology. Moreover, it was found that FAs other than C15:0 can exert similar activities under certain conditions. We will also discuss the possibility that the unique phenomena of C15:0 are the so-called lipotoxicity that has not been reported in the fission yeast.

fatty acid, endoplasmic reticulum, fission yeast

講演番号：2B5p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 B5 会場

カプサイシンはアラキドン酸カスケードにより TRPA1 を間接的に活性化しタイトジャンクションを開口する

Capsaicin indirectly regulates TRPA1 via the arachidonic acid cascade, resulting in TJ opening

○南雲 陽子[1,2]、神田 祐輔[4]、向山 海凪[4]、臼井 健郎[1,3] ([1]筑波大生命環境系、[2]筑波大地中海・北アフリカ研究センター、[3]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター、[4]筑波大生命農学)
○Yoko NAGUMO[1,2], Yusuke KANDA[4], Minagi MUKAIYAMA[4], Takeo USUI[1,3] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]ARENA, Univ. of Tsukuba, [3]MiCS, Univ. of Tsukuba, [4]Life and Agri., Univ. of Tsukuba)

我々はカプサイシン (Cap) が上皮組織で細胞同士を密着させるタイトジャンクション (TJ) の透過性を可逆的に促進することを見出し、その活性を難吸収性薬剤の吸収促進に役立てるため、Cap の作用機構解析を行っている[1)]。これまでに Cap が TRPA1 を介して Ca^{2+} 流入と TJ 開口を引き起こすことを見出しているが[2)]、Cap が直接 TRPA1 を活性化する報告はなく、そのメカニズムは不明であった。今回 RNA-seq 解析を行い TRPA1 の上流に存在する因子の探索を行ったので報告する。

RNA-seq 解析により、Cap が cyclooxygenase 2 (COX2) 遺伝子発現を上昇させることがわかった。COX2 は phospholipase A2 (PLA2) により切り出されたアラキドン酸 (AA) をプロスタグランジン (PG) に変換する酵素であるため、PG 産生が上昇するか検討したところ、Cap 処理により PGE2 が増加した。以上により Cap 刺激により PLA2-AA-COX2 経路が活性化している可能性が示唆されたため、これらが Cap による Ca^{2+} 流入と TJ 開口に寄与しているか検討した。まず Cap による Ca^{2+} 流入は PLA2 阻害剤と COX2 阻害剤により阻害された。また AA により TJ 開口が誘導され、TRPA1 阻害剤で阻害されることを見出した。一方で Cap が誘導する TJ 開口は PLA2 阻害剤で阻害されるが COX2 阻害剤では阻害されないことがわかった。以上から Cap による TJ 開口には PLA2-AA 経路が寄与していることが示唆された。

Capsaicin induces the reversible opening of tight junctions (TJs) and enhances the delivery of molecules through a paracellular route[1)]. We have revealed that TRPA1 is involved in the capsaicin-induced Ca^{2+} influx and TJ permeability increase[2)], although there are no reports that capsaicin directly activates TRPA1. In this study, we investigated the upstream factors of TRPA1 using RNA-seq analysis, and found that the cyclooxygenase 2 (COX2) gene was upregulated by capsaicin. COX2 converts arachidonic acid (AA), a metabolite by phospholipase A2 (PLA2), to prostaglandins. Prostaglandin E2 (PGE2) production was stimulated by capsaicin, and capsaicin-induced Ca^{2+} influx was effectively inhibited by PLA2 and COX2 inhibitors. The AA-induced TJ permeability increase was inhibited by a TRPA1 antagonist, but the capsaicin-induced TJ permeability increase was inhibited by a PLA2 inhibitor, but hardly inhibited by a COX2 inhibitor. These results suggest that PLA2 activation and AA production are involved in the TJ permeability increase induced by capsaicin.

1) Shiobara *et al. PLoS ONE* **8**, e79954 (2013). 2) Kanda *et al. Sci. Rep.* **8**, 2251 (2018).

Capsaicin, Tight junction

講演番号：2B5p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 B5 会場

細胞膜透過性改善技術による天然ペプチド化合物の潜在的生理活性の探索
Exploration of the cryptic bioactivity in peptide natural products by enhancement of cell membrane permeability.
○兼田 康平、小倉 知也、鈴木 海渡、長谷部 文人、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大院生物資源）
○Kohei KANEDA, Tomoya OGURA, Kaito SUZUKI, Fumihito HASEBE, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

近年の微生物ゲノム解析によって、微生物は予想以上に多種多様な中分子ペプチドを生産する可能性が示されている。しかし、分子量 1,000 を超える中分子ペプチドの多くは細胞膜を透過しないため、従来の生理活性を指標とした創薬シード探索では十分に探索しきれていない。すなわち、中分子ペプチドの細胞膜透過性を網羅的に改善する実用的な技術を開発できれば、新しいペプチド創薬シードを獲得できるはずである。この問題を解決する方法として、我々は PIECE（polycationic bacterial isopeptides entering cells）による化合物のポリカチオン修飾を提唱している。本研究では、中分子ペプチドのモデル化合物として抗生物質である Bacitracin（BAC）（分子量 1,422）と Daptomycin（DAP）（分子量 1,620）を選択し、それぞれを PIECE によってポリカチオン修飾したところ、動物細胞に対してアポトーシスによる細胞毒性を示した（Fig.1）。現在、光アフィニティーラベル誘導体を利用した細胞内標的分子の同定を行っており、その結果についても報告する

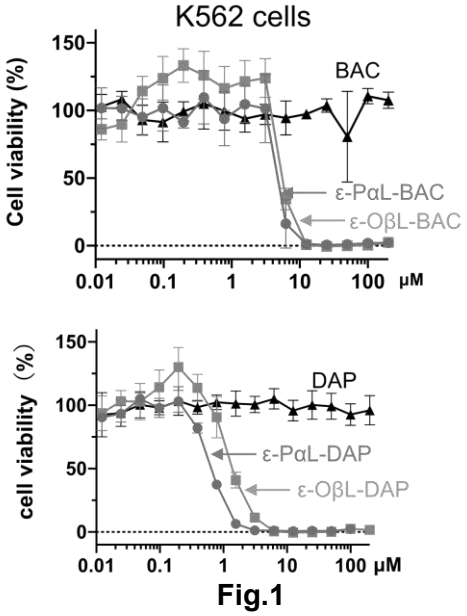


Fig.1

Recent microbial genome analyses have shown that microorganisms may produce a greater variety of peptide natural products than expected. However, many of them do not enter cells, implying that conventional screening methods have not fully explored the cryptic biological potential of peptide natural products. Therefore, a practical strategy to comprehensively improve the cell membrane permeability of peptides would allow us to obtain new peptides as drug discovery seed compounds. To address this, we offer the PIECE (polycationic bacterial isopeptides entering cells) modification of peptide natural products. In this study, we employed bacitracin (BAC) and daptomycin (DAP) as model peptides and showed that their conjugates with a PIECE indeed induced apoptotic cell death in mammalian cells (Fig.1). We will also discuss the intracellular molecular targets for them.

cell penetrating peptide, ε-poly-L-lysine, peptide natural product

発表責任者：濱野吉十（y-hamano@g.fpu.ac.jp）

講演番号：2B5p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 B5 会場

PIECE 法による微生物細胞内へのタンパク質/酵素の直接導入法の開発

Intracellular internalization of protein/enzyme in bacteria by PIECE modification

○大塚 早葉[1]、兼田 康平[1]、長谷部 文人[1]、丸山 千登勢[1]、荒川 賢治[2]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大院生物資源、[2]広島大院統合生命)
○ Saha OTSUKA[1], Kohei KANEDA[1], Fumihito HASEBE[1], Chitose MARUYAMA[1], Kenji ARAKAWA[2], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ, [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life., Hiroshima Univ.)

最近我々は､放線菌が生産するポリカチオン性イソペプチド(ε-poly-L-α-lysine と ε-oligo-L-β-lysine)が動物細胞の細胞膜を直接透過することを明らかにし、これらペプチドを PIECE と名付けた（*Commun. Biol*., 5, 1132, 2022)。さらに、タンパク質（酵素）や抗体などの分子表面に PIECE を共有結合（PIECE 修飾）させたバイオコンジュゲートも細胞質だけでなく核内まで送達し、その機能を発揮した。PIECE は、動物細胞に毒性を示さず、タンパク質分解酵素に耐性であり、細胞膜直接透過によって細胞内に移行することから、従来型の細胞膜透過性ペプチド（CPP）の欠点を克服する優れた CPP として期待される。しかし、細胞壁を有し細胞膜組成が異なる微生物に対してその有効性は未知である。そこで本研究では、PIECE 修飾法を応用して微生物細胞内へのタンパク質(酵素)の直接導入法を開発し､遺伝子導入技術に頼らない生体高分子導入法の構築を試みた。モデル実験として Cre recombinase (Cre)の PIECE コンジューゲート（PIECE-Cre）を調製し、大腸菌の細胞内に取り込まれるか検証した。Cre による LoxP 配列の相同組換えによって蛍光タンパク質（GFP）が発現するレポーター遺伝子を保持する大腸菌を構築し、その培養液に PIECE-Cre を添加した。その結果、PIECE-Cre の添加依存的にレポーター遺伝子が発現し大腸菌が蛍光を呈したことから、PIECE はグラム陰性細菌にもタンパク質を送達できることが判明した。現在、グラム陽性細菌である放線菌にも本技術が使用できるかを検証しており、その結果についても報告する。

We recently demonstrated that polycationic isopeptides (ε-poly-L-α-lysine and ε-oligo-L-β-lysine) produced by *Streptomyces* strains entered cells by direct penetration, and we designated these peptides as “polycationic isopeptides entering cells (PIECE)” (*Commun. Biol*., 5, 1132, 2022). Moreover, the covalent-bond bioconjugates of a protein/enzyme with a PIECE were also internalized into cells and localized in the nucleus. Interestingly, these bioconjugates showed their function in the cells. PIECE shows no cytotoxicities, resistance to proteolysis, and internalization by direct penetration. Therefore, PIECE would be a promising CPP to circumvent the drawbacks of traditional cell-penetrating peptides. However, its potential remains unclear in bacteria with cell walls. Therefore, in this study, we examined the cell-penetrating activity of a PIECE conjugate with Cre recombinase (Cre), and we found that the PIECE-Cre conjugate entered *E. coli* cells and functioned in the cell.

Cell-penetrating peptide, protein transfection, cell membrane

発表責任者：丸山千登勢（c-maruyama@fpu.ac.jp）

講演番号：2B5p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 B5 会場

計算機予測に基づくランカサイジンのエステル化および抗腫瘍活性評価
Evaluation of antitumor activity on esterified lankacidin derivatives based on computational prediction
○岡野 芽衣[1]、西浦 菜摘[1]、DO Kiep Min[2]、森田 洋行[2]、AYOUB Ahmed Taha[3]、荒川 賢治[1]([1]広島大院・統合生命、[2]富山大・和漢研、[3]HToO Bioscience)
○Mei OKANO[1], Natsumi NISHIURA[1], Kiep Min DO[2], Hiroyuki MORITA[2], Ahmed Taha AYOUB[3], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Toyama Univ., [3]HToO Bioscience)

【目的】*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は 17 員環ポリケチド化合物 Lankacidin(LC)を生産する。我々は以前、LC の微小管安定化作用による抗腫瘍活性を立証した。本研究では、計算機シミュレーションをもとに LC の構造改変および抗腫瘍活性試験を行い、本化合物群の高機能化を目指した。
【方法・結果】計算機シミュレーションを行ったところ、LC の抗腫瘍活性に影響を与えうる 2 つの構造特性 (①C7 位、13 位水酸基へのかさ高いエステル基導入による活性上昇、②誘導体の水溶性を高めることによる活性上昇)が予測された。まず①について、LC の C7 位、13 位の水酸基にかさ高い官能基が入ると結合ポケットが充填されて LC よりも強力な微小管脱重合安定化剤となる可能性が計算機予測で推定された。そこで、桂皮酸を用いて C7 位水酸基のモノエステル体、C13 位水酸基のモノエステル体、C7,13 位水酸基のジエステル体を取得し、抗腫瘍活性試験を行った。その結果、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞株に対して 13-*O*-cinnamoyl-LC が LC の 7 倍の活性を有し、とりわけ活性が向上することが明らかとなった。7,13-di-*O*-cinnamoyl-LC に関しては、ヒト乳がん MCF-7 細胞株、ヒト肺がん A549 細胞株に対しても有効な活性を示した。これを受け、結合ポケットにより入り込むよう桂皮酸より一つ炭素数の少ないフェニルアセチル誘導体を合成し、抗腫瘍活性試験を行った。また②については、誘導体の水溶性をより高めるため、C7, 13 位にコハク酸を導入した誘導体を合成した。本発表では、その詳細について報告する。

We have previously demonstrated the antitumor activity of lankacidin C (LC), 17-membered ring polyketide, through its microtubule-stabilizing action. In this study, we focused on two structural issues to improve the antitumor activity by computational prediction. (1) Functional development of ester derivatives; our group has revealed that the antitumor activity of ester derivatives with cinnamoyl group attached to C7 and C13 hydroxyl groups was significantly improved. Therefore, we prepared ester derivatives with phenylacetyl group, which contains one less carbon chain than cinnamoyl group, and investigated their antitumor activity. (2) Water solubility of the derivatives; Derivatives with succinic acid moiety at the C7 and C13 hydroxyl groups were prepared. The details of each will be described.

Streptomyces, Computational simulation, Antitumor activity

講演番号：2B5p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 B5 会場

4-8 結合型プロアントシアニジン立体配座に関する自由エネルギー地形の分子シミュレーション解析

Molecular simulations of conformational free-energy landscapes for proanthocyanidins including the 4-8 inter-flavan bond

○上田 稔淳[1]、河原 岳志[1,2]、真壁 秀文[1,2,3]、梅澤 公二[1,2,3]（[1]信大・農、[2]信大院・総合理工、[3]信大・バイオ研）
○Toshiaki UEDA[1], Takeshi KAWAHARA[1,2], Hidefumi MAKABE[1,2,3], Koji UMEZAWA[1,2,3] ([1]Fac. of Agric. Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shinshu Univ., [3]IBS. Shinshu Univ.)

プロアントシアニジンはフラバン-3-ol を単位として重合したポリマーである. 構成単位のフラバン-3-ol の種類や重合度によって特異的な生理活性が発現する. このことから生理活性発現に関与する特定の立体配座が示唆される．しかしながら，構成単位をつなぐフラバン間 4-8 結合まわりは回転可能であり，重合度が高くなると分子内の回転自由度が増すため，立体配座探索が困難である.

そこで，安定な立体配座を求めるため，分子シミュレーションによる自由エネルギー計算法を適用した. 計算対象の構成単位にはカテキンおよびエピカテキンの誘導体を用いた. また，重合度は 15 量体までを対象とした．構成単位の分子モデルを作成し，水中における計算を実施した.

2 および 3 量体について，フラバン間 4-8 結合の回転角を変数として分子動力学（MD）シミュレーションによるアンブレラサンプリング法を適用し，自由エネルギー地形を求めた. その結果，C4 位側がエピカテキン誘導体の場合に低エネルギー領域が多かった．つまり，エピカテキンは安定配座が多い可能性を示した．15 量体についてマルチカノニカル MD 法を適用した．カテキン 15 量体はエピカテキン 15 量体より伸長する傾向があり，互いに逆巻きのらせん状構造を形成していた.

Proanthocyanidin is a biopolymer, which is consisted of flavan-3-ol. The biological activity depends on the degree of polymerization and the type of flavan-3-ol unit. It suggests a characteristic conformation of proanthocyanidin relating to the activity. However, it is difficult to determine the conformation since the inter-flavan 4-8 bond can spontaneously rotate and the freedom of conformation increase with higher polymerization.

We have investigated the stable conformations by using molecular simulation with free energy calculation methods. The catechin and epicatechin derivatives were modeled and up to 15-mers were simulated in explicit water.

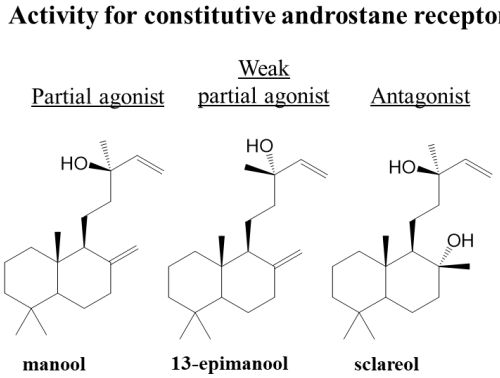
The dimer and trimer were calculated by umbrella-sampling molecular dynamics (MD) simulation as a function of torsion angle of 4-8 bond. The free energy landscape showed that the number of low energy regions for epicatechin unit was larger than that of catechin, which indicated that the epicatechin unit yielded more diverse stable conformations. 15-mers were simulated by multicanonical MD simulation. The conformations of catechin 15-mer tended to be extended. The catechin 15-mer had an opposite-handed helix to the epicatechin 15-mer.

polyphenol, catechin, molecular dynamics simulation

発表責任者：上田稔淳（20a1004c@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B5p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 B5 会場

3 つのラブダン型ジテルペノイドの核内受容体 constitutive androstane receptor に対する活性
Activity difference of three labdane diterpenoids on human constitutive androstane receptor
○関口 光広、藤浪 佑衣、高土 恵有、木本 祐、東村 泰希（石川県立大学）
○ Mitsuhiro SEKIGUCHI, Yui FUJINAMI, Keiyou TAKADO, Yuu KIMOTO, Yasuki HIGASHIMURA (Ishikawa prefectural Univ.)



核内受容体の 1 つである The constitutive androstane receptor (CAR)は薬物代謝に関連する酵素の転写を制御しているため、CAR と相互作用する食品中の天然化合物の解明は、医薬品開発にとって重要である。我々は、コモンセージに含まれる 13-epimanool が hCAR に結合することを、組み換え hCAR タンパク質を用いた示差走査蛍光測定 (DSF) により明らかにした。同様にラブダン骨格を有するジテルペノイドを調べたところ、天然由来の manool と sclareol が hCAR に結合することを明らかになった。3 つの化合物は CAR タンパク質との複合体形成時の構造安定性は大きく変わらないことに対し、ルシフェラーゼアッセイにおいて異なる作用を示し、manool は partial agonist、13-epimanool は弱い partial agonist、sclareol は antagonist 活性をそれぞれ示した。3 つの化合物の構造の違いは、13 位の立体構造と 8 位の構造であり、ラブダンジテルペノイドにおいてはこれらの構造の違いが hCAR の活性に影響を与えている可能性が示された。

The constitutive androstane receptor (CAR) regulates enzyme transcription related to drug metabolism; therefore, natural compound clarification in food that interacts with CAR is significant for drug development. We revealed that 13-epimanool, which is a compound found in the common sage, is bound to hCAR based on differential scanning fluorometry (DSF) measurements using recombinant hCAR protein. Similar labdane diterpenoids were examined, which revealed that manool and sclareol, which were both natural compounds contained in herbs, are bound to hCAR. They exhibited different effects for CAR activity in the luciferase assay despite the structural similarity. Manool was a partial agonist, 13-epimanool was a weak partial agonist, and sclareol was an antagonist. The activity of hCAR may be regulated by slight differences in the bound compound.

labdane diterpenoid, constitutive androstane receptor, differential scanning fluorometry

発表責任者：関口光広（m-seki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2B5p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 B5 会場

環状ペプチドマルホルミン類は血管内皮細胞による uPA 活性上昇を誘導する

The cyclic peptide malformins induce an increase in uPA activity by vascular endothelial cells

○小泉 幸央[1]、長井 賢一郎[2]、蓮見 惠司[3] ([1]秋田大院医、[2]北里大薬、[3]東京農工大院農)
○Yukio KOIZUMI[1], Kenichiro Nagai[2], Keiji Hasumi[3] ([1]Akita Univ., [2]Kitasato Univ., [3]TUAT)

【目的】血栓性疾患の治療薬である血栓溶解剤には組織型プラスミノーゲン活性化因子（tPA）やウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（uPA）といった酵素製剤が使用されているのに対し、低分子化合物をモダリティとした血栓溶解剤の創薬は現在開発途中である。我々は血栓溶解剤の探索過程において糸状菌が生産する分子内ジスルフィド結合を含む二環性環状ペプチドマルホルミン A1 が線溶活性を促進することをこれまでに見出してきた。今回、血管内皮細胞 HUVEC が生産するプラスミノーゲン活性化因子に対する還元マルホルミン A1（RedMA1）の影響を調べた。
【結果】RedMA1 は濃度依存的、反応時間依存的に HUVEC のプラスミノーゲン活性化因子活性を上昇させた。siRNA や中和抗体を用いた実験から、RedMA1 は HUVEC の uPA 活性を上昇させていることがわかった。RT-qPCR から RedMA1 は HUVEC の PLAU（uPA 遺伝子）の発現を上昇させることがわかった。さらに、RedMA1 は HUVEC を介した血清中のプラスミン活性も増加させた。今回の結果から、マルホルミン類は血管内皮細胞に対しても線溶活性を促進させることが示された。

【Objectives】In the process of searching for thrombolytic agents, we have previously discovered that malformin A1, a bicyclic cyclic peptide containing an intramolecular disulfide bond produced by fungus, enhance fibrinolytic activity. Here, we investigated the effect of reduced malformin A1 (RedMA1) on plasminogen activator produced by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).
【Results】RedMA1 increased plasminogen activator activity in HUVEC in a concentration-dependent and reaction time-dependent manner. siRNA-mediated knockdown and neutralizing antibody revealed that RedMA1 increases uPA activity in HUVEC. RT-qPCR revealed that RedMA1 induced the up-regulation of PLAU, uPA gene, in HUVEC. Furthermore, RedMA1 also increased HUVEC-mediated serum plasmin activity. The present results showed that malformins also enhance fibrinolytic activity on vascular endothelial cells.

plasminogen activator, fibrinolysis, malformin

講演番号：2B5p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 B5 会場

Pseudodeflectusin の構造活性相関と結合タンパク質の探索

Structure-activity relationship study on pseudodeflectusin and exploration for its binding protein(s)

○山本 由珠、鈴木 景、古山 祐貴、倉持 幸司（東理大）
○YUZU YAMAMOTO, KEI SUZUKI, YUUKI FURUYAMA, KOUJI KURAMOCH (Tokyo Univ. of Science)

Pseudodeflectusin は海藻由来真菌 *Aspergillus psedodeflectus* から単離された化合物である。我々は、pseudodeflectusin とその類縁天然物を合成し、結腸がん由来 HCT116 細胞、肺がん由来 A549 細胞、子宮頸がん由来 Hela 細胞、食道がん由来 TE-8 細胞、急性前骨髄性白血病由来 HL-60 細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、α,β-不飽和ケトンの有無が、活性発現に関与することがわかった。α,β-不飽和ケトンはマイケル付加反応によりタンパク質と共有結合することが知られている。そこで我々は共有結合性タンパク質の探索を目指し、ビオチン化 pseudodeflectusin を合成した。合成したビオチン化体は HCT116 細胞及び HL-60 細胞に対して活性を保持することが明らかとなった。

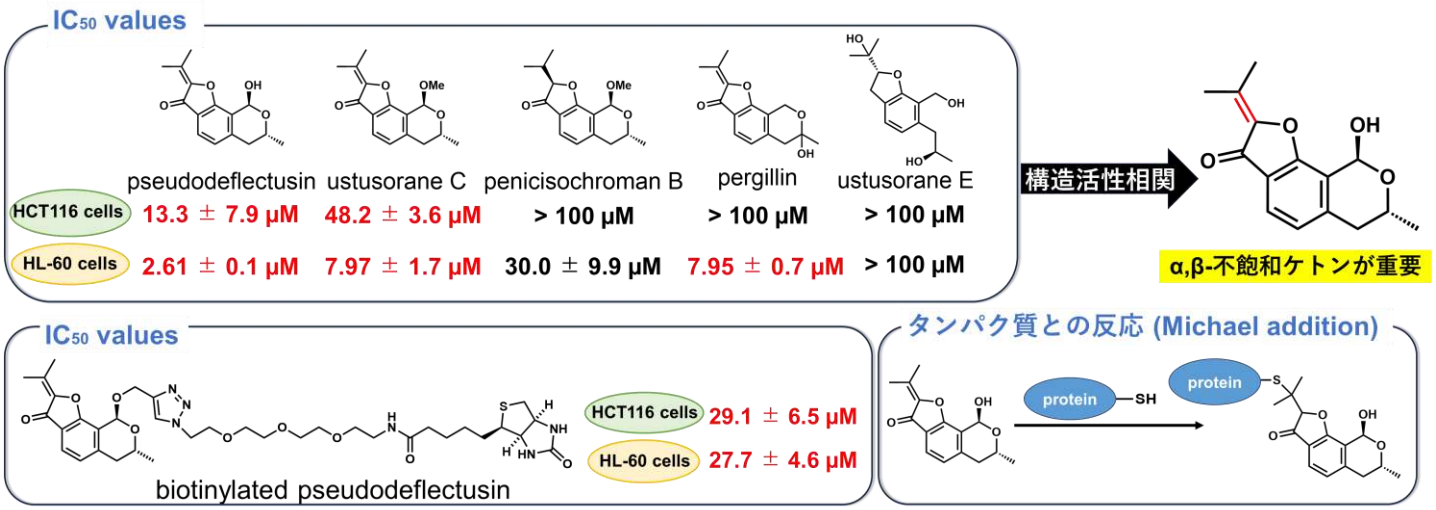


Figure. 本研究の概要

Previously, we accomplished the total syntheses of pseudodeflectusin and its related natural products. In this study, we evaluated their cytotoxicity against cancer cells. The structure-activity relationships revealed that the α,β-unsaturated ketone moiety is important for the cytotoxicity. In order to determine the target protein(s) of pseudodeflectusin, its biotinylated derivative was synthesized. The biotinylated derivative also showed cytotoxicity against cancer cells, suggesting that it can be used for identification of the binding protein(s) of pseudodeflectusin.

Pseudodeflectusin, structure-activity relationships, binding protein

講演番号：2B5p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 B5 会場

Accumulation and bioactivities of CAF 603 in filamentous fungus
○WEN ZHANG, Akinori Soga, Yuta Murai, Makoto Hashimoto (The University of Hokkaido)

CAF 603 belongs to carotene-type sesquiterpene and was initially found in a fungus, *Gliocladium virens* IFO 9166. It is reported that CAF 603 is a common natural metabolite existing in many strains including filamentous fungus and has antifungal and antibacterial effects. Besides, CAF 603 was confirmed to be a metabolic response that mediates conidiation facilitates the adaptation of *T. virens* PS1-7 to hostile environments. In addition, CAF 603 was revealed to have potent cytotoxic activities against tumor cell lines. However, there are few reports about the production of CAF 603 from microorganisms. Thus, in our study, we screened 9 kinds of filamentous fungus based on the producing amounts of CAF 603 in different kinds of culture media and confirmed bioactivities including antioxidant activity and antifungal effects.
CAF 603 is accumulated in liquid incubation from filamentous fungus at 25 ℃ for 7 days and extracted with hexane from culture liquid. Screening results showed that *T. virens* NBRC 9166 has higher production amounts than other strains in our study with the yield of 50 mg/L. However, extracts from cell body by acetone didn't contain any of that compound. In addition, among several kinds of culture media, production of CAF 603 in PDB (potato dextrose broth) liquid media is higher than vegetable juice with glucose. As for the effects of media pH on production, it was suggested that there was no big difference between pH 3, 4 and 5, a little higher than that in pH 2, which was caused by the weak growth status and metabolism level of the fungus in pH 2 environment. In the research about bioactivities of CAF 603, we found out that it has no antibacterial effects against *E. coli* however, it obviously inhibited the growth of the fungus in which that compound was produced at the concentration of 1.2 mg/mL. As for antioxidation activity, the results of DPPH and ABTS radical scavenging experiments suggested that CAF 603 is not a potential antioxidant compound without scavenging effects on radicals. We are currently setting up culture conditions aimed at increasing production of CAF 603 and elucidating the parameter which has effects on producing that compound for filamentous fungus.

CAF 603, filamentous fungus, biosynthesis

発表責任者：章 文（zhangwen.4324@gmail.com）

講演番号：2B5p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 B5 会場

エポキシド不斉開環反応を触媒する植物由来有機分子触媒の発見-1：触媒作用へのラムノガラクツロナン側鎖部分の関与

Discovery of plant-based organic molecular catalyst to catalyze asymmetric ring-opening reaction of epoxides-1: Involvement of rhamnogalacturonan side chains in the catalytic activity

○加藤 康夫[1,3]、和田 浩一[2]、日比 慎[1,3]、浅野 泰久[1]、山本 佳樹[3]、浅野 健裕[2]、竹内 祐希[2]([1]富山県大・生医工研セ、[2]協和ファーマケミカル(株)、[3]富山県大院・工)
○Yasuo KATO[1,3], Koichi WADA[2], Makoto HIBI[1,3], Yasuhisa ASANO[1], Yoshiki YAMAMOTO[3], Tatsuhiro ASANO[2], Yuki TAKEUCHI[2] ([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Eng., Toyama Pref. Univ.)

演者らはこれまで、植物の乾燥粉末がアミン付加を伴うエポキシドの不斉開環反応を触媒することを見出している[1)]。特に水溶性大豆多糖類が高い活性を示し、その触媒活性にはタンパク質性酵素ではなく多糖類が作用していると推定されるため、本触媒を植物由来有機分子触媒 (Plant-based Organic Molecular Catalyst, POMC) と名付けた。本研究では、この触媒機構の解明を目的として、触媒活性に関与する多糖部分構造の絞り込みを行なった。

市販の水溶性大豆多糖類に対しリパーゼ A「アマノ」6 処理を行うことで活性を保持したまま多糖をある程度低分子化できるという知見[1)]を元に、同酵素製剤サンプルから多糖分解酵素を精製した。多糖の分子量と触媒活性を指標にして、数段階のクロマトグラフィー操作にて部分精製した酵素の内部ペプチド配列より、同サンプルに含まれる目的酵素をラムノガラクツロナンリアーゼと推定した。大腸菌中で異種発現させた焼酎白麹菌由来の同酵素を用いて水溶性大豆多糖類を限定分解したところ、予想通り多糖類を平均分子量約 285×10^3 から 40×10^3 程度へと低分子化することができ、比活性の値も数倍向上させることができた[2)]。同酵素の基質特異性と水溶性大豆多糖類の推定構造から、本触媒作用にはペクチン性多糖中のラムノガラクツロナン主鎖に付加した側鎖部分が関与していることが強く示唆された。1) 特許 6678442 号、2) WO2023191088

We have reported a catalytic asymmetric amination of epoxides using Soluble Soy Polysaccharide (SSPS) and the catalytic activity is attributed to polysaccharide molecules but not proteins[1)], which resulted to name the catalysts as “Plant-based Organic Molecular Catalyst” (POMC). In this study, we narrowed down the polysaccharide substructure involved in the catalytic activity in order to elucidate the catalytic mechanism. Based on the finding that treatment of SSPS with Lipase A "Amano "6 can reduce its MW with retaining the activity[1)], the polysaccharide-degrading enzyme was partially purified from the enzyme sample by following the MW of polysaccharide molecule as substrate and the catalytic activity. The target enzyme was assigned to be rhamnogalacturonan-lyase from its internal peptide sequences. The enzyme from *Asperigillus kawachii* was heterologously expressed in *Escherichia coli* strain and it could degrade the polysaccharide to reduce its MW from 285×10^3 to 40×10^3 with three-fold increase the specific activity[2)]. From the substrate specificity of the enzyme and the proposed structure of SSPS, we strongly suggest that the side chains attached to the main chain of rhamnogalacturonan in pectic polysaccharides play an important role in the catalytic activity.

plant-based organic molecular catalyst, polysaccharide, rhamnogalacturonan

発表責任者：加藤康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2B5p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 B5 会場

エポキシド不斉開環反応を触媒する植物由来有機分子触媒の発見-2：触媒作用へのβ-1,4-D-ガラクタンの関与

Discovery of plant-based organic molecular catalyst to catalyze asymmetric ring-opening reaction of epoxides-2: Involvement of β-1,4-D-galactan in the catalytic activity

○和田 浩一[1]、日比 慎[2]、加藤 康夫[2]、榎 純一[2]、竹内 祐希[1]、浅野 健裕[1] ([1]協和ファーマケミカル(株)、[2]富山県大・生医工研セ)
○Koichi Wada[1], Makoto Hibi[2], Yasuo Kato[2], Junichi Enoki[2], Yuki Takeuchi[1], Tatsuhiro Asano[1] ([1]Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

演者らは前報にて、水溶性大豆多糖類を酵素処理にて低分子化することで比活性を数倍向上させることに成功しているが、植物由来有機分子触媒（POMC）の触媒本体の解明および触媒の産業的な利用のため、酵素を用いないスケールアップ可能な低分子化法が必要であった。水溶性大豆多糖類(平均分子量 285×10^3) を材料とし、アルカリ分解条件を種々検討することにより、分子量 $15\sim50\times10^3$ 程度にまで低分子化し、かつ比活性を約 2.5 倍に向上させることができた。この分解物の分子量、比活性等の性状は、酵素処理サンプルに類似していた。アルカリ分解物をさらに酸限定分解することにより、分子量 $3\sim9\times10^3$ 程度にまで低分子することができた。この酸分解物の糖組成はガラクトースが 95%以上でありかつ酸性糖は 0.5%以下と極めて少なかった。さらに、糖分解酵素処理および NMR 解析の結果から、本触媒は D-ガラクトースのみで構成され、かつその結合様式が β-1,4-結合 (β-1,4-D-ガラクタン) であることが強く示唆された[1)]。

低分子化した触媒は、大豆アレルゲン等のタンパク質が除かれており、容器付着性・ゲル化傾向も軽減していた。また、二相反応における繰返し使用（1000 時間程度）に耐え、産業上有用であることを実証できた。1) WO2023191088

We have reported that rhamnogalacturonan-lyase treatment of soluble soy polysaccharide (SSPS) could decrease its MW with increasing the specific activity. For the industrial use of the catalyst as Plant-based Organic Molecular Catalyst (POMC), here we examined to establish chemical-digestion of SSPS which can be scaled-up. We succeeded to degrade SSPS by alkaline-treatment reducing its MW from 285×10^3 to 40×10^3 with 2.5-fold increase of the specific activity. The values are comparable with those of enzymatically digested sample. Its MW was further reduced to $3\text{-}9\times10^3$ by following limited acid-treatment. Sugar composition analysis of the sample revealed that galactose was the main componemt (>95%) with quite little acidic sugar (0.5% or less). Glycoside hydrorase-treatment and NMR analysis of the sample also suggests that the catalyst consisted of only D-galactose with β-1,4-lincage (β-1,4-D-galactan).

The sample was free from soy-allergen and lost its tendency to adhere to reaction containers and gelling properties. Repeated use of the catalyst for nearly 1000 h was succeeded by using two-phase reaction system to result an industrial use of the catalyst.

plant-based organic molecular catalyst, polysaccharide, galactan

発表責任者：和田浩一（koichi.wada@kyowa-kirin.co.jp）

講演番号：2B5p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 B5 会場

エポキシド不斉開環反応を触媒する植物由来有機分子触媒の発見-3：β-1,4-D-ガラクタン重合度と触媒活性の関係

Discovery of plant-based organic molecular catalyst to catalyze asymmetric ring-opening reaction of epoxides-3: Relationship between polymerization degree and catalytic activity of β-1,4-D-galactan

○日比 慎[1]、和田 浩一[2]、加藤 康夫[1]、榎 純一[1]、大坂 一生[1]、浅野 健裕[2]、竹内 祐希[2]（[1]富山県大・生医工研セ、[2]協和ファーマケミカル（株））

○Makoto HIBI[1], Koichi WADA[2], Yasuo KATO[1], Junichi ENOKI[1], Issey OSAKA[1], Tatsuhiro ASANO[2], Yuki TAKEUCHI[2] ([1]Biotechnol. Res. Cent. Toyama Pref. Univ., [2]Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd.)

演者らは水溶性大豆多糖類の有機分子触媒活性に関与する多糖部分構造の絞り込みを行ない、活性の本体が β-1,4-D-ガラクタンであることを突き止めている。本研究では、ガラクタンの重合度（DP）と触媒活性の関連性を調査することを目的として、水溶性大豆多糖類由来の β-1,4-D-ガラクタンを単一分子までに精製し、詳細な解析を実施した。

アルカリおよび酸処理により低分子化した水溶性大豆多糖類より、ゲル濾過クロマトグラフィーにて、様々な DP の β-1,4-D-ガラクタンを含有する活性画分を分画した。次いでこれらを逆相分取クロマトグラフィーに供することで、活性画分中に含まれる多糖類の分取精製を行った。MALDI-TOF-MS を用いた質量分析により、得られた各フラクションにはほぼ単一 DP の β-1,4-D-ガラクタンが含まれることが確認できた。DP21 以下の β-1,4-D-ガラクタンの触媒活性を評価したところ、DP がある値より低い分子種では比活性やエナンチオ選択性が低下することを見出した。さらに化学合成した DP20 の β-1,4-D-ガラクタンが、水溶性大豆多糖類由来の β-1,4-D-ガラクタンと同等の触媒活性を持つことを明らかにした。以上の通り、本研究は多糖類の一種である β-1,4-D-ガラクタンが有機分子触媒活性を保持することを示した初めての研究である[1)]。1) WO2023191088

We have reported that we narrowed down the polysaccharide moiety of soluble soy polysaccharide (SSPS) involved in the catalytic activity for an asymmetric amination of epoxides and found that the main component for the activity is β-1,4-D-galactan. In this study, we further purified β-1,4-D-galactan derived from SSPS into a single molecule to investigate the relationship between the degree of polymerization (DP) of galactan and the catalytic activity. Active fractions containing β-1,4-D-galactan from different DPs were separated from alkaline- and acid-treated SSPS by gel filtration chromatography. They were next subjected to preparative reverse phase chromatography to further purify each polysaccharide molecule. Mass spectrometry using MALDI-TOF-MS confirmed that they were composed of β-1,4-D-galactans with almost single DP. When we evaluated the catalytic activity of β-1,4-D-galactan with a DP of 21 or less, we found that the specific activity and enantioselectivity decreased for the molecular species with a DP below a certain value. Moreover, chemically synthesized β-1,4-D-galactan with DP20 had the same catalytic activity as the SSPS-derived β-1,4-D-galactan. This is the first report to demonstrate that β-1,4-D-galactan, a polysaccharide, with DP of around 20 has the catalytic activity as Organic Molecular Catalyst[1)].

plant-based organic molecular catalyst, polysaccharide, β-1,4-D-galactan

発表責任者：日比　慎（hibi@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2B5p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 B5 会場

アジサイの青色に関わるアントシアニン錯体の極低温気相分光

Cold gas-phase spectroscopy of anthocyanin complexes involved in blue *Hydrangea*

○濵田 昇賢、村松 悟、井口 佳哉（広島大院先進）
○Shoken HAMADA, Satoru MURAMATSU, Yoshiya INOKUCHI (The Univ. of Hiroshima)

【目的】青色アジサイの発色に関わる錯体について、デルフィニジン-3-グルコシド(D3G)と 5-O-カフェオイルキナ酸(5CQ)がアルミニウムイオンに配位した推定構造が報告されている(Fig. 1) [1]。しかし、推定構造中の H_2O 分子が実際に配位しているのか、あるいは配位子の電子・電荷状態、幾何構造などについて実験的に明らかにした研究はない。本研究では、溶液の吸収分光や質量分析、極低温気相光解離分光法、量子化学計算を用い、この錯体における電荷状態や配位部分の構造と青色発色との関係を明らかにすることを目的として研究を行なった。

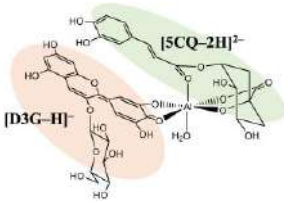


Fig. 1. Proposed structure of *Hydrangea* blue complexes.

【方法】実験には、我々の研究室で開発した極低温気相分光のための真空装置[2]を用いた。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用いて、試料溶液中のイオンを真空装置内に導入し、極低温四重極イオントラップ(QIT)に捕捉し、飛行時間型質量スペクトルを得た。また、QIT で捕捉したイオンに可視光レーザを照射し、光解離により増減するイオンの強度をレーザ波数の関数としてプロットすることで可視光解離(Vis-PD)スペクトルを得た。

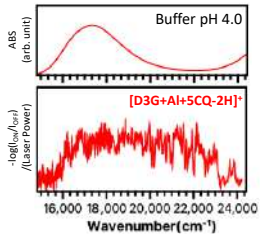


Fig. 2. Absorption spectra (Top) and Vis-PD spectra (Bottom).

【結果】質量スペクトルには D3G のプロトン付加体$[D3G{\cdot}H]^+$と錯イオン$[D3G{\cdot}5CQ{\cdot}Al–2H]^+$が観測された。これらのイオンの Vis-PD スペクトルを測定したところ、錯イオン中の D3G が中性状態である可能性が示唆された。また、気相錯イオンの光解離分光の吸収領域は、溶液の吸収分光の吸収領域より長波数側に吸収をもち(Fig. 2)、中性 D3G 部位の構造異性体に起因するものと考えた。これらの考察に対し、量子化学計算からの検討を進めている。

Blue color of *Hydrangea* originates from an aluminum complex coordinated by two ligands: delphinidin-3-glucoside (D3G) and 5-*O*-caffeoylquinic acid (5CQ). In this research, we clarify the relationship between the blue coloration and the coordination structure as well as charge states of the ligands. We measured visible photodissociation (Vis-PD) spectra of $[D3G{\bullet}H]^+$ (**1**) and $[D3G{\bullet}5CQ{\bullet}Al–2H]^+$ (**2**) isolated under cold (~10 K) gas-phase conditions. These results suggest that D3G coordinating to the Al^{3+} ion in the complex is in a neutral charge state. Absorption of Vis-PD spectrum of **2** in gas phase appeared at higher wavenumber than that of the solution spectrum, which may derive from structural isomers of the neutral D3G moiety. Quantum chemical calculations to verify this hypothesis are undergoing. [1] T. Ito; K. Yoshida *Molecules* **23**,1424 (2018). [2] Y. Inokuchi; *et al. J. Phys. Chem. A* **119**, 8512 (2015).

Blue Hydrangea, Anthocyanin, Cold gas-phase spectroscopy

発表責任者：井口佳哉（y-inokuchi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C1p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C1 会場

生物の石灰化におけるプロトン輸送メカニズムの解明

Analysis of H^+ transportation in biomineralization organisms

○長尾 颯己[1]、竹内 猛[2]、加藤 由悟[3]、鈴木 道生[3] ([1]東大農、[2]沖縄科学技術大学院大学、[3]東大院農)
○Satsuki NAGAO[1], Takeshi TAKEUCHI[2], Yugo KATO[3], Michio SUZUKI[3] ([1]Faculty of agriculture, The Univ. of Tokyo, [2]OIST, [3]The Univ. of Tokyo)

石灰化生物が炭酸カルシウムを合成する際には、カルシウムイオンと重炭酸イオンが用いられ、反応の副産物としてプロトンが生じる。生物による石灰化の場ではpH上昇していることが知られており、生体内ではプロトンが取り除かれていると推察されるが、その機構は明らかにされていない。本研究では、プロトン動態の可能性として、プロトンポンプによる生体外への排出、および塩基性物質への吸着の２つを候補に考えて研究を進めている。

まず、軟体動物におけるプロトンポンプおよび微生物の石灰化に寄与すると知られているウレアーゼの遺伝子発現解析を行ったところ、脊椎動物や節足動物には見られなかったウレアーゼが、二枚貝や巻貝において確認された。貝殻形成組織における発現量から、プロトン受容における評価を進めている。また、石灰化の有無による生体組織や排泄物中の元素分析により石灰化時のプロトンの行方を探索したところ、石灰化により窒素および硫黄の比率が増加しており、これらの元素にプロトンが吸着している可能性が示唆された。さらに、石灰化組織の質量分析により、プロトンが吸着している塩基性高分子の探索を行っている。

Biomineralization organisms synthesize calcium carbonate using calcium and bicarbonate ions, generating protons as byproducts. As increase of pH was detected during the reaction of biomineralization, proton may be removed *in vivo*. However, the mechanism remains unclear. This study explored two possibilities: proton expulsion via proton pumps and adsorption onto basic substance.

Initially, a genetic expression analysis of proton pumps and urease, those are contributed to calcification in mollusks and microorganisms, showed that the urease gene, that is not encoded in the genome of vertebrates or arthropods, existed in bivalves and gastropods. Based on expression levels in shell-forming tissues, we are further evaluating its involvement in proton reception. Additionally, elemental analysis of biological tissues and excretions indicated that an increase in the ratio of nitrogen and sulfur in biological tissues during calcification. These results suggested the potential adsorption of protons by these elements. Furthermore, mass spectrometry of calcifying tissues is being conducted to identify basic polymers capable of adsorbing protons.

Biomineralization, Proton transportation, Calcium carbonate

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C1p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C1 会場

円石に含まれる Ca 結合能を持つタンパク質の探索
Search for proteins with Ca-binding ability in coccolithophores
○木村 龍太郎[1]、浪川 勇人[1]、根岸 瑠美[2]、長坂 征治[3]、胡桃坂 仁志[2]、加藤 由悟[1]、鈴木 道生[1]
([1]東大院農、[2]東大定量研、[3]東洋大生命科学)
○ Ryutaro KIMURA[1], Yuto NAMIKAWA[1], Rumi NEGISHI[2], Seiji NAGASAKA[3], Hitoshi KURUMIZAKA[2], Yugo KATO[1], Michio SUZUKI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]IQB, The Univ. of Tokyo, [3]Toyo University)

円石藻は、海に生息する単細胞の植物プランクトンの一種である。円石藻は主成分が炭酸カルシウム($CaCO_3$) の「円石」という物質によって周囲を覆われている。円石藻の炭酸カルシウムを形成する機構を利用することで、大気中の二酸化炭素を減らすことができると考えられる。本研究は CaCO3 合成に関与する因子を同定し、地球温暖化の抑制に貢献することを目的としている。まず、円石を海水中に加え、pH 調整をすることで CaCO3 結晶形成実験を行った。実験後の円石に CaCO3 結晶が形成されている様子が観察された。このことから、円石の特定の部位に CaCO3 結晶を沈着させる活性があることが示唆された。これまで円石のベースプレートの縁には窒素を含む有機分子が検出されることが示されてきたため、円石由来のタンパク質が炭酸カルシウムの沈着を制御している可能性が考えられた。そこで、円石から抽出したタンパク質を CaCO3 と混合し、Ca 結合に関するタンパク質のみを吸着させた。吸着実験後の上清と吸着実験前のタンパク質溶液を SDS-PAGE に供し、バンドパターンで比較した。吸着実験により消失したバンドを分離し、LC-MS/MS（液体クロマトグラフィー/質量分析）で解析した結果、Ca 結合能のあるタンパク質を同定した。
Coccolithophores are a unicellular phytoplankton living in the ocean. Coccolithophores are surrounded by a substance called "coccoliths," that is mainly composed of calcium carbonate ($CaCO_3$). This study aims to identify factors involved in $CaCO_3$ synthesis and to contribute to the mitigation of global warming. Firstly, adding coccolith to seawater and adjusting the pH. Additional $CaCO_3$ crystals were observed on the coccolith. This suggested that there was $CaCO_3$ crystal formation activity in a specific area of the coccolith. Since it has been shown that organic molecules including nitrogen were detected at the rim of the baseplate, it was considered that coccolith proteins controlled the deposition of calcium carbonate. Therefore, coccolith proteins were mixed with $CaCO_3$, and only proteins related to Ca binding were identified. LC-MS/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) could reveal the sequence of this protein that are related to Ca-binding activity.

biomineralization, coccolith, CaCO3

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C1p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C1 会場

CO_2 固定技術の開発に貢献するバイオミネラル粉末の機能解析

Application of biomineral powders to the CO_2 sequestration process

○浪川 勇人、鈴木 道生（東大院農）
○Yuto NAMIKAWA, Michio SUZUKI (The Univ. of Tokyo)

地球温暖化が進行している現在、大気中の CO_2 濃度を減らすことは人類にとって喫緊の課題であり、炭素固定法の研究・開発が広く行われている。CO_2 を $CaCO_3$ として固定する方法は、外部からエネルギーを加える必要がなく、反応過程で生体に有害な物質が出ないという点で優れた方法である。しかし、反応速度が遅く、$CaCO_3$ が容器の壁面で無秩序に析出するために回収が困難になるという問題点がある。一方、$CaCO_3$ の殻を持つ貝類は有機物を用いて $CaCO_3$ 形成を緻密に制御している。本研究では、様々な種類の貝殻粉末を添加剤として用いることで、CO_2 から $CaCO_3$ を合成する反応を促進することができるかどうかを調べた。実験ではアコヤガイ（*Pinctada fucata*）、クロアワビ（*Haliotis discus*）、マガキ（*Crassostrea gigas*）、ホタテ（*Mizuhopecten yessoensis*）、サザエ（*Turbo sazae*）、オオアサリ（*Saxidomus purpurata*）の 6 種類の貝殻粉末を用いた。その結果、どの貝殻粉末を添加剤としても $CaCO_3$ 形成が加速された。さらに、合成した $CaCO_3$ はすべて貝殻粉末を種結晶として成長したため、$CaCO_3$ の回収率も向上した。次に、貝殻に含まれる有機物が $CaCO_3$ 形成に与える影響を調べるために、NaClO 処理で有機物を分解した貝殻粉末を用いて同様の実験を行った。その結果、貝殻に真珠層を含むアコヤガイ、クロアワビ、サザエは反応速度と回収率に変化はなかったものの、マガキ、ホタテ、オオアサリについては反応速度と回収率が有意に減少したため、貝殻の有機物が $CaCO_3$ 形成の基盤からの成長促進に寄与していることが判明した。貝殻は食産業や真珠養殖における産業廃棄物で、有効な利用法が模索されている。本研究の成果は安価な貝殻粉末を炭素固定反応における触媒として利用した事例であり、経済的かつ機能的に優れた炭素固定技術への開発に繋がる可能性が高い。

Considering the global warming, it is an urgent challenge to reduce the atmospheric CO_2. $CaCO_3$ formation is a promising approach for CO_2 sequestration because $CaCO_3$ formation requires no external energy and generates no harmful byproducts. However, the reaction rate is slow and random $CaCO_3$ precipitation on the wall causes a difficulty in $CaCO_3$ recovery. In this study, we used 6 different types of shell powders as an additive for $CaCO_3$ formation. We found that the addition of shell powders accelerated $CaCO_3$ formation, and that $CaCO_3$ recovery was improved because shell powders acted as seed crystal, inhibiting random $CaCO_3$ precipitation. We also revealed that NaClO-treatment significantly decreased the reaction rate of $CaCO_3$ formation and $CaCO_3$ recovery as for shell powders without the nacre microstructure. It is concluded that organic matters in shell powders promote $CaCO_3$ formation. Shells are industrial wastes in the food production and pearl-aquaculture. The findings in this study will contribute to the development of an economically and functionally superior carbon sequestration technology.

CO_2 sequestration, biomineral, $CaCO_3$

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C1p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C1 会場

生物活性向上を指向したアルギニンオリゴマー結合型ゼルンボン誘導体の合成

Synthesis of arginine oligomer-conjugated zerumbone derivatives aimed at enhancing biological activity

○石原 怜奈、柏﨑 玄伍、井坂 くるみ、北山 隆（近畿大院農）
○Reina ISHIHARA, Gengo KASHIWAZAKI, Kurumi ISAKA, Takashi KITAYAMA (Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kindai Univ.)

11 員環セスキテルペンであるゼルンボンは、再生可能資源であるハナショウガの根茎部に豊富に存在し，その構造内に複数の高反応点部位をもつ天然物である。これにより，広範囲のケミカルスペースで新規骨格への変換が可能となる。さらにゼルンボンは医薬学的にも有用であり，がん細胞増殖阻害や抗 EB ウイルス作用などのさまざまな生物活性を示す。
これまでに、ゼルンボンを出発物質とする 2～3 の化学反応により、複数の複雑な天然物様構造体および多数の新規物質の構築に成功した。その中でいくつかの化合物は新たな生物活性を示し、これらの生物活性は構築された新しい構造に起因している。一方で、ゼルンボン自体が多様な生物活性を示すことが多くの研究者によって報告されている。Jurkat 細胞の増殖阻害効果をゼルンボンとその還元体で比較した結果、ゼルンボン内のすべての共役系の存在が阻害活性に極めて重要であることが分かった（IC_{50}：約 5.0μM）。ゼルンボンは疎水性が高いため、細胞透過性ペプチドとして作用するアルギニンオリゴマーとの結合により、ゼルンボンの細胞内送達が強化され、生物学的活性が向上する可能性がある。そこで本研究では、アルギニンオリゴマー結合型ゼルンボン誘導体の合成を検討した。

Zerumbone, an 11-membered ring sesquiterpene that is abundantly present in the rhizome of *Zingiber zerumbet* Smith, a renewable resource, is a natural product with multiple highly reactive sites within its structure. This allows for the converted to novel skeletons within a wide range of chemical space. Zerumbone is pharmaceutically useful and exhibits various biological activities, such as antiproliferative effects on cancer cells and anti-EB virus activity. We have achieved the successful synthesis of several complex natural product-like structures and many novel substances through a concise series of chemical reactions utilizing zerumbone as a pivotal starting material. Among them, certain compounds exhibited novel biological activities, and these activities were attributed to the newly constructed structures. On the other hand, numerous researchers have reported that zerumbone itself demonstrates diverse biological activities.
Upon scrutinizing the antiproliferative effects on Jurkat cells in comparison to zerumbone and its reductive form, we confirmed that the presence of all conjugated systems within zerumbone is pivotal for its inhibitory activity (IC_{50}: approximately 5.0 μM). Due to the high hydrophobicity of zerumbone, its conjugation with arginine oligomers, which act as cell-penetrating peptides, has the potential to enhance the intracellular delivery of zerumbone, thus possibly improving its biological activity. Consequently, we investigated the synthesis of arginine oligomer-conjugated zerumbone derivatives in this study.

Zingiber zerumbet Smith, zerumbone, biological activity

講演番号：2C1p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C1 会場

オウレン根圏土壌由来新規ベルベリン資化性菌の単離

Isolation of a novel berberine-utilizing bacteria from a rhizosphere soil of *Coptis Japonica*

○小池 音寧、武田 尚、若菜 大悟、堀内 正子、細江 智夫（星薬大）
○Otone KOIKE, Hisashi Takeda, Daigo Wakana, Masako Horiuchi, Tomoo Hosoe (Hoshi Univ.)

我々は、微生物による新しい分解経路や新規分解関連酵素の獲得を目的として、アルカロイド分解菌を単離している。先行研究として *Coptis japonica* や *Phellodendoron amurense* が産生するアルカロイドで、古くから止瀉薬として利用されているベルベリン（BBR）に注目し、その分解菌 *Sphingobium* sp. BD3100 株および *Rhodococcus* sp. BD7100 を単離し、BBR の初期分解に関与する遺伝子を特定している。しかし、その分解経路の全貌や多様性はまだ不明である。本研究では BBR 分解経路を明らかにする方法の 1 つとして、新たな BBR 分解菌の探索を行った。その結果、星薬科大学薬草園内の *C. Japonica Makino* の根圏土壌から BBR 分解菌 HO1 株および HO2 株を単離した。二つの BBR 分解菌は 16S rRNA の塩基配列より、HO1 株は *Caulobacter endophyticu*、HO2 株は *Cupriavidus basilensis* と高い同一性を得られた。従って、これらは同種である可能性が高いと考えられ、我々がこれまで単離した BBR 分解菌とは異なる新たな BBR 分解菌であると考えられた。現在、両菌株の性状を調べており、HO1 株の休止菌体はリン酸緩衝液中の 20mM BBR 溶液 250 μl を 20 時間以内に完全に分解すること、また、HPLC 分析の結果から、HO1 株は BBR 分解の代謝物として脱メチレンベルベリン（D-BBR）を生産することを明らかにしている。本大会では、これらの内容の詳細について報告する。

We have been focusing on bioactive alkaloids and isolating degrading bacteria in order to obtain new microbial degradation pathways and new degradation-related enzymes. For example, we have isolated *Sphingobium* sp. strain BD3100 and *Rhodococcus* sp. BD7100 as berberine (BBR) degrading bacteria and identified genes involved in their degradation. However, the full extent and diversity of its degradation pathways is not clear. Therefore, in this study, we attempted to search for new degrading bacteria in order to clarify a new degradation pathway of BBR, one of the alkaloids. BBR has long been used as a medicine, produced by plants such as *Coptis japonica* and *Phellodendoron amurense*, and is said to have antibacterial and antidiarrheal effects. We isolated BBR-degrading bacteria, strains HO1 and HO2, from rhizosphere soil of *C. Japonica Makino* cultivated at the Hoshi University Herbarium. The dormant bacteria of each of the HO1 and HO2 strains were completely degraded within 20 hours in 250 µl of 20 mM BBR solution in phosphate buffer. The HO1 strain was also found to produce D-BBR, a metabolite of BBR degradation. The 16S rRNA sequences of the two BBR-degrading bacteria isolated were highly identical to those of Caulobacter endophyticu for strain HO1 and Cupriavidus basilensis for strain HO2, suggesting that they are likely to be the same species. In this study, we isolated a new BBR-degrading bacterium that is different from the BBR-degrading bacteria we have previously isolated.

berberine, bacteria, rhizosphere

講演番号：2C1p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C1 会場

カンプトテシン資化性菌の単離と特性

Isolation and characterization of camptothecin-utilizing bacteria

○武田 尚、鈴木 ひとみ、雉子波 樹、若菜 大悟、堀内 正子、須藤 浩、細江 智夫 (星薬大)
○Hisashi TAKEDA, Hitomi Suzuki, Tatsuki Kijinami, Daigo Wakana, Masako Horiuchi, Hiroshi Sudoh, Tomoo Hosoe (Hoshi Univ.)

天然由来のアルカロイドのひとつであるカンプトテシン (CPT) は、*Camptotheca acuminata*, *Nothapodytes nimmonianus* などの植物が産生する抗がん剤の起源薬として知られている。CPT はトポイソメラーゼ阻害剤としての機能を持ち、根から放出することで防御物質の役割を担っていると考えられている。本研究では CPT 産生植物と CPT を利用するバクテリアの存在を明らかにするために、星薬科大学薬用植物園内から CPT を唯一の炭素源として生育可能なバクテリアを *C. acuminata* の根圏土壌から KJ09 株、*N. nimmonianus* の根圏土壌から NN19 株を単離した。両菌株は 16S rRNA の塩基配列から Sphigobium 属細菌に属したが、塩基配列の同一性の高い同種は見出せなかった。ゲノム配列のシーケンスの結果、KJ09 株は NN19 株とほぼ同一の菌であること明らかとなった。また、Average nucleotide identity (ANI)による全ゲノム比較においても同一性の高い同種は見出せなかった。KJ09 株と NN19 株の休止菌体は、リン酸バッファー中の 50 μg の CPT を 4 時間以内に完全に分解した。現在は、CPT 分解に関与する遺伝子を特定するために CPT 分解能欠損変異株の作製を行っている。

One of the alkaloids, camptothecin (CPT), is an anticancer drug of origin produced by plants such as *Camptotheca acuminata* and *Nothapodytes nimmonianus*. CPT functions as a topoisomerase inhibitor and is released from the roots. To elucidate the existence of CPT-producing plants and bacteria that utilize CPT, we isolated strain KJ09 from the rhizosphere soil of *C. acuminata* and strain NN19 from the rhizosphere soil of *N. nimmonianus* that can grow on CPT as the sole carbon source. NN19 strains were isolated from the rhizosphere soils of *C. acuminata* and *N. nimmonianus*, respectively. Both strains belonged to the genus Sphigobium based on 16S rRNA sequences, but no homologous strains with high sequence identity were found. Results of the genome sequence indicated that strain KJ09 was almost identical to strain NN19. In addition, ANI found no highly similar homologs in the whole genome comparison. KJ09 and NN19 completely degraded 50 μg of CPT in phosphate buffer within 4 hours.

camptothecin, bacteria, rhizosphere

講演番号：2C1p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C1 会場

ジブロモゼルンボン誘導体の反応性を利用した多環式化合物の構築

Synthesis of complex and structurally diverse scaffolds using reactivity of dibromozerumbone derivative

○池上 剣生[1]、柏﨑 玄伍[1]、西澤 拓未[1]、吉川 知美[1]、河合 靖[2]、土田 敦子[3]、北山 隆[1]([1]近畿大院農、[2]長浜バイオ、[3]埼玉医大)
○Tsurugi IKENOUE[1], Gengo KASHIWAZAKI[1], Takumi NISHIZAWA[1], Tomomi YOSHIKAWA[1], Yasushi KAWAI[2], Noriko TSUCHIDA[3], Takashi KITAYAMA[1] ([1]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kindai Univ., [2]Nagahama Inst., [3]Saitama Med. Univ.)

ハナショウガ（*Zingiber zerumbet* Smith）は再生可能資源であり，根茎部に豊富に存在する 11 員環セスキテルペンであるゼルンボンは，「多様な反応性を有する天然物を利用した多様性指向型合成（NMRDOS）[1-3]」における重要な出発物質の成功例の一つである。これまでに、ゼルンボンを出発物質とする化学反応を 2～3 ステップ行うことで、複数の複雑な天然物様構造体構築に成功し、その成果が創薬科学に応用できることを明らかとした。ゼルンボンから簡便に合成される 2,3-ジブロモゼルンボンは，さまざまな求核剤によって引き起こされる渡環反応を経て，三員環または四員環の新しい多環化合物を生成する [1]。興味深いことに，その中にはがん細胞株に対して高い増殖阻害活性を示すものもある。これらの成果を受けて，我々はゼルンボン誘導体（1）を合成するために，C2 および C3 での臭素化，C6 と C7 の間でのエポキシ化，C10 および C11 での水素化を試みた。このエポキシ基は，C2 および C3 の臭素化中に C7 での臭素化を防ぐことを意図して導入した。2,3-ジブロモ-6,7-エポキシゼルンボンにおける渡環反応は以前に報告されているが [4]，本研究では，C11 のプロトンの引き抜きによる渡環反応を様々な塩基を用いて明らかにした。本研究の計算は分子岡崎国立共同研究機構共通施設計算科学研究センター（23-IMS-C153）を利用した。

Zerumbone, an 11-membered sesquiterpene abundantly present in the rhizomes of *Zingiber zerumbet* Smith, a renewable resource, serves as a significant example among the essential starting materials in "natural material-related diversity-oriented synthesis (NMRDOS).[1-3]" We have accomplished the construction of various complex natural product-like structures through a concise series of two to three chemical reactions employing zerumbone as the starting material, demonstrating the applicability of these outcomes to drug discovery science. 2,3-dibromozerumbone, easily derived from zerumbone, generates novel polycyclic compounds containing three- or four-membered ring substructures through transannulation activated by various nucleophiles.[1] It is noteworthy that some of these compounds exhibit high antiproliferative activity against a cancer cell line. Motivated by these findings, our attempts to synthesize a zerumbone derivative (1) involved bromination at C2 and C3, epoxidation between C6 and C7, and hydrogenation at C10 and C11. The introduction of the epoxy group aimed to prevent bromination at C7 during the bromination of C2 and C3. While the transannulation of 2,3-dibromo-6,7-epoxyzerumbone has been previously reported,[4] this study demonstrates the transannulation originating from the abstraction of the proton at C11 using various bases.

1. Utaka, Y. *et al*. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 8371–8386.
2. Kitayama, T., Utaka, Y. *In Future Directions in Biocatalysis*, 2nd ed.; Matsuda, T., Ed.; Elsevier Bioscience: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp 297–312.
3. Kitayama, T. *et al*. *Tetrahedron* **2006**, 62, 10859–10864.
4. Kitayama, T. *et al*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2193–2199.

Zingiber zerumbet Smith, zerumbone, transannular reaction

講演番号：2C1p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C1 会場

新規機能性物質創製に向けて：光学活性をもつキラルゼルンボン誘導体の創製

En route to novel functional drug discovery: Creating chiral zerumbone derivatives with optical activity

○鈴木 基元[1]、柏﨑 玄伍[1]、本村 亘[1]、河合 靖[2]、北山 隆[1]（[1]近畿大院農、[2]長浜バイオ）
○Motoharu SUZUKI[1], Gengo KASHIWAZAKI[1], Ko MOTOMURA[1], Yasushi KAWAI[2], Takashi KITAYAMA[1] ([1]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kindai Univ., [2]Nagahama Inst.)

再生可能な資源であるハナショウガ（*Zingiber zerumbet* Smith）の根茎部に豊富に存在する 11 員環セスキテルペンであるゼルンボンはその構造内に複数の高反応点部位を有し、広範囲のケミカルスペース内で新規骨格への変換を可能にする天然物である。
ゼルンボンは，多様な反応性を有する天然物を利用した多様性指向型合成（NMRDOS）における重要な出発物質の成功例の一つである。これまでに、ゼルンボンを出発物質とする 2～3 の化学反応によって複数の複雑な天然物様構造体と、35 個の新規物質構築に成功し、その成果が創薬科学に応用できることを明らかとした。
我々が発見した多くの反応がジアステレオ選択的に進行し、興味深いことに，その中にはがん細胞株に対して高い増殖阻害活性を示すものもある。これらの成果を受けて，私たちは創薬研究に本格的に展開するために、光学活性ゼルンボン誘導体の構築を目指した。そこで特に反応活性の高い 2,3-ジブロモゼルンボンに着目し、この化合物の光学活性体を合成することを試みた。
様々な手法を用いて光学活性 2,3-ジブロモゼルンボンの合成を検討した結果、これを還元した 2,3-ジブロモゼルンボールを用いて誘導体化することで光学活性体が得られた。最終的にこれを酸化することで目的物が得られる。

Zerumbone, an 11-membered ring sesquiterpene that is abundantly present in the rhizome of *Zingiber zerumbet* Smith, a renewable resource, is a natural product with multiple highly reactive sites within its structure that allow for the converted to novel skeletons within a wide range of chemical space.
We have accomplished the construction of various complex natural product-like structures through a concise series of two to three chemical reactions employing zerumbone as the starting material. Moreover, we have succeeded in creating multiple complex natural product-like structures and 35 novel substances by employing zerumbone as a starting material through a few chemical reactions. These endeavors have revealed the potential application of our results in drug discovery science.
Many of the reactions we have discovered proceed in a diastereoselective, and interestingly, some of them exhibit high antiproliferative activity against a cancer cell line. Based on these results, we aimed to construct optically active zerumbone derivatives for authentic development in drug discovery research. Therefore, we focused on 2,3-dibromozerumbone, which has particularly high reaction activity, and attempted to synthesize an optically active form of this compound.
We have discovered numerous reactions that proceed diastereoselectively. Interestingly, some of these reactions exhibit a notable high antiproliferative activity against a cancer cell line. Drawing inspiration from these results, our aim was to create optically active zerumbone derivatives for their authentic development in drug discovery research. Therefore, we focused on 2,3-dibromozerumbone, known for its particularly high reactivity, as we endeavored to synthesize the optically active compound.
As a result of investigating the synthesis of optically active 2,3-dibromozerumbone using various methods, an optically active form was obtained by derivatizing it using reduced 2,3-dibromozerumbol. Finally, the desired product is obtained by oxidizing this compound.

Zingiber zerumbet Smith, zerumbone, optically active substance

講演番号：2C1p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C1 会場

植物化学物質であるゼルンボンから誘導体化された高反応性アレン型ゼルンボンの Brønsted 酸誘導による渡環反応

Brønsted acid-induced transannulation of allene-zerumbone, derived from the highly reactive phytochemical zerumbone

○中村 蒼[1]、柏崎 玄伍[1,2]、渡辺 凌[2]、北村 優斗[2]、西川 慎太郎[1]、吉村 寛太[2]、河合 靖[3]、土田 敦子[4]、北山 隆[1,2] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農、[3]長浜バイオ、[4]埼玉医大)

○Aoi NAKAMURA[1], Gengo KASHIWAZAKI[1,2], Ryo WATANABE[2], Yuto KITAMURA[2], Shintaro NISHIKAWA[1], Kanta YOSHIMURA[2], Yasushi KAWAI[3], Noriko TSUCHIDA[4], Takashi KITAYAMA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agric., Kindai Univ., [2]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kindai Univ., [3]Nagahama Inst., [4]Saitama Med. Univ.)

再生可能な資源であるハナショウガ（*Zingiber zerumbet* Smith）の根茎部に豊富に存在する 11 員環セスキテルペンであるゼルンボンはその構造内に複数の高反応点部位を有し，広範囲のケミカルスペース内で新規骨格への変換を可能にする天然物である。ゼルンボンを出発物質に使用し，Doering-LaFlamme allene 反応を経て 4 段階で合成される 12 員環のアレン型ゼルンボンは [1]，ゼルンボンの渡環反応によって生成される骨格とは異なる環状構造を形成することが容易に予測できる。また，ゼルンボンの 6 位にある孤立二重結合が高反応性をもつアレン基に置換されているため，アレン型ゼルンボンはこれまでにアクセスできない構造への誘導体化が期待される。これまでに，我々および他の研究グループは，ゼルンボンを穏やかな酸性条件下で処理することで，複雑な反応経路を経て多様な環状構造を持つ化合物へ変換されることを明らかにしてきた。

そこで本研究では，アレン型ゼルンボンも同様に酸性条件下で処理した結果，ユニークな複数の新規環状化合物を単離・同定し，計算化学を用いて反応機構について解析した。本研究の計算は分子岡崎国立共同研究機構共通施設計算科学研究センター（23-IMS-C153）を利用した。

Zerumbone, an 11-membered ring sesquiterpene that is abundantly present in the rhizome of *Zingiber zerumbet* Smith, a renewable resource, is a natural product with multiple highly reactive sites within its structure that allow for the converted to novel skeletons within a wide range of chemical space. The 12-membered allene-zerumbone, synthesized in four steps through the Doering-LaFlamme allene reaction using zerumbone as a starting material,[1] can be converted to a cyclic structure different from the skeleton produced by the transannular reaction of zerumbone, making it easily predictable. In addition, since the isolated double bond at the 6-position of zerumbone is substituted with a highly reactive allene group, it is anticipated that allene-zerumbone can be modified into structures that have not been attainable until now.

Both our research group and other research entities have demonstrated that treating zerumbone under mild acidic conditions results in its transformation into compounds with diverse cyclic structures through intricate reaction pathways.

Therefore, in this study, when treating allene-zerumbone similarly under acidic conditions, several unique novel cyclic compounds were isolated and identified, and the reaction mechanism was analyzed using computational chemistry.

1. Remarkable synthesis and structure of allene type zerumbone. Kitayama T. *et al. Tetrahedron,* **2006**, *62*, 10859–10864.

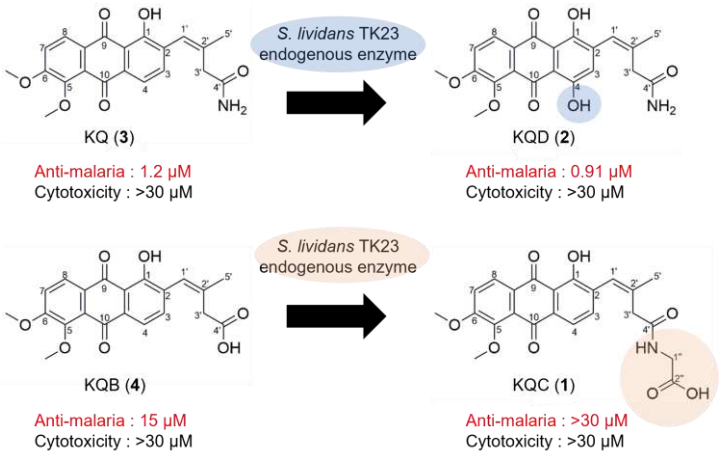
Zingiber zerumbet Smith, zerumbone, allene

講演番号：2C2a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 C2 会場

異種発現 *Streptomyces lividans* TK23 を利用した新規アンスラキノン化合物の取得

Acquisition of novel anthraquinone compounds using heterologous expression *Streptomyces lividans* TK23

○坂井 克行、二村 友史、野川 俊彦、越野 広雪、長田 裕之、高橋 俊二 (理研 CSRS)
○Katsuyuki SAKAI, Yushi Futamura, Toshihiko Nogawa, Hiroyuki Koshino, Hiroyuki Osada, shunji Takahashi (RIKEN CSRS)



放線菌 *Streptomyces* sp. SN-593 より取得されたアンスラキノン化合物 kinanthraquinone (KQ, **3**) の生合成機構の解明および生物活性評価を目的として、*Streptomyces lividans* TK23 に非典型 OmpR レスポンスレギュレーター (*kiqA*) および **3** 生合成遺伝子クラスターを発現した形質転換株を構築し[1]、新規アンスラキノン化合物の取得を試みた。得られた形質転換株を培養したところ、既知化合物の **3** および KQB (**4**) に加え、新規化合物の KQC (**1**) および KQD (**2**) を取得した。投与実験により、*S. lividans* TK23 では **3** から **2**、**4** から **1** への変換が確認されたことから、新規化合物の生合成は *S. lividans* TK23 の内在性酵素により触媒されることが判明した。生物活性を調べた結果、*Plasmodium falciparum* に対して化合物 **2**–**4** は IC_{50} 値が 0.91–15 μM で生育を阻害することが明らかになった。*P. falciparum* に対する生物活性には、カルボキサミド基が重要であることが示唆された。

Anthraquinone compound, kinanthraquinone (KQ, **3**), was isolated from *Streptomyces* sp. SN-593. The compound contains a carboxamide group in the molecule and is rare side chain in natural products obtained from microorganisms. We were interested in the biological activity and biosynthetic pathway of **3** and identified the **3** gene cluster[1]. The aim of this study was to elucidate the biosynthetic mechanism of **3** and to obtain novel anthraquinone compounds using a heterologous expression system. We isolated two new compounds, KQC (**1**) and KQD (**2**), along with two known compounds, **3** and KQB (**4**), by the heterologous expression of *kiq* biosynthetic gene cluster and its pathway-specific regulator (*kiqA*) in *Streptomyces lividans* TK23. To examine a biosynthetic pathway of compounds **1** and **2**, feeding experiments were conducted using *S. lividans* TK23 to supply the compounds **3** and **4**. These experiments indicated that **3** and **4** were converted to **2** and **1**, respectively, by the endogenous enzymes of *S. lividans* TK23. Compounds **2**–**4** were had anti-malarial activities at IC_{50} values of 0.91–15 μM. [Reference 1: R. Takao, *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* 85:714–721 (2021).]

Actinomycetes, Anthraquinone, Anti-malarial activity

発表責任者：坂井　克行（katsuyuki.sakai@riken.jp）

講演番号：2C2a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 C2 会場

Expression of Syo_1.56 SARP Regulator Unveils Potent Elasnin Derivatives with Antibacterial Activity

○Islam Adel Abdelhakim Amin[1,2], Yushi Futamura[3], Yukihiro Asami[4], Hideaki Hanaki[4], Naoko Kito[1], Sachiko Masuda[5], Arisa Shibata[5], Ken Shirasu[5], Hiroyuki Osada[3], Jun Ishikawa[6], Shunji Takahashi[1,7] ([1]Natural Product Biosynthesis Research Unit, RIKEN CSRS, Wako, Saitama, Japan, [2]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Assiut University, Assiut, Egypt, [3]Chemical Resource Development Research Unit and Drug Discovery Chemical Bank Unit, RIKEN CSRS, Wako, Saitama, Japan., [4]Ōmura Satoshi Memorial Institute, Kitasato University, Tokyo, Japan., [5]Plant Immunity Research Group, RIKEN CSRS, Yokohama, Japan, [6]National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan., [7]Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, Saitama, Japan)

[**Introduction**] Actinomycetes are prolific producers of natural products, particularly antibiotics. However, a significant proportion of its biosynthetic gene clusters (BGCs) remain silent under typical laboratory conditions. Activating these silent BGCs represents a promising strategy to discover novel antibiotics with unique structures that could play a vital role in combating the rapidly evolving antimicrobial drug resistance. *Streptomyces* Antibiotic Regulatory Proteins (SARPs) have extensively been found in actinomycetes, where they typically act as cluster-specific activators. Expression of these regulators has the potential to activate silent gene clusters, particularly those where SARPs are located, thereby facilitating the discovery of novel antibiotics.

[**Methods**] In this study, the *syo_1.56* gene encoding for a SARP family regulator was identified in *Streptomyces* sp. RK18-A0406 by TBLASTN search using Fur22 from *Streptomyces* sp. SN-593 as a query sequence. This gene is located 1.7 kb upstream of a previously uncharacterized typeII polyketide synthase gene cluster. The *syo_1.56* gene was amplified by PCR, cloned into an integrative pKU460 vector harboring *sav2794* promoter, and transformed into the parent strain. The resulting transformant and wild-type strains were cultured, and a comparative LC-MS analysis of the extracts was performed for the detection of induced metabolites. Scale-up culture of the transformant strain was prepared and the induced metabolites were isolated, identified, and their biological activities were evaluated.

[**Results**] Expression of a previously uncharacterized SARP protein, Syo_1.56, in *Streptomyces* sp. RK18-A0406 significantly enhanced the production of known antimycins and twelve elasnins (**1–12**), ten of which were novel. Unexpectedly, Syo_1.56 seems to function as a pleiotropic rather than cluster-specific SARP regulator, with the capability of co-regulating two distinct biosynthetic pathways, simultaneously. All the isolated elasnins exhibited potent antibacterial activity against wild-type and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with IC_{50} ranges from 1.3 - 50 μM, some of which (elasnin A_1, B_2, and C_1, and proelasnin A_1, and C_1) demonstrated moderate to strong antimalarial activities against *Plasmodium falciparum* 3D7. Moreover, three elasnins (A_1, B_3, and C_1) showed *in vitro* inhibition of the metallo-β-lactamase responsible for the development of highly antibiotic-resistant bacterial strains.

SARP regulators, Elasnin, Antibacterial activity

発表責任者：Shunji Takahashi（shunjitaka@riken.jp）

講演番号：2C2a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 C2 会場

CTX3C 同族体、51-hydroxyCTX3C のプロダクトイオンの帰属ならびに 51-OH 同族体のシグナル識別

Structural assignment of Structural assignment of the product ion generated from a natural ciguatoxin-3C congener, 51-hydroxycigatoxin-3C, and discovery of distinguishable signals in congeners bearing the 51-hydroxy group.

○鵜飼 亮伍[1]、内田 秀明[2]、菅谷 紘一[3]、小野瀬 淳一[3]、大城 直雅[4]、阿部 直樹[3]、安元 健[5]([1]東農大院・健康、[2]アジレント・テクノロジー、[3]東農大・健康、[4]国立医薬品食品衛生研究所、[5]食品分析セ)

○Ryogo UKAI[1], Hideaki UCHIDA[2], Kouichi SUGAYA[3], Jun-ichi ONOSE[3], Naomasa OSHIRO[4], Naoki ABE[3], Takeshi YASUMOTO[5] ([1]Grad. Sch. of Tokyo Univ. of Agr., [2]Agilent Technologies, [3]Tokyo Univ. of Agr., [4]National Institute of Health Sciences, [5]JFRL)

シガトキシン類はシガテラ中毒の原因物質の 1 つであり、特徴的なはしご状の環状ポリエーテル構造を有する化合物である。食品衛生上、重要な化合物であるが、毒性評価に重要な類縁体の化学構造に関する知見は十分とは言えない。そこで、微量のサンプルにより検出・解析が可能な LC-APCI-QTOFMS により、0.1 μg の CTX3C を用いて、$[M+H]^+$をプリカーサーイオンに選択した MS/MS スペトルを解析することで、開裂パターン並びにプロダクトイオンの構造の帰属を報告した。

本研究では CTX3C 類縁体である天然由来の 51-hydroxyCTX3C をサンプルとした LC-APCI-QTOFMS スペクトルの最適条件を検討し、取得したスペクトルについて CTX3C の MS/MS スペクトルとの比較から CTX3C 骨格の 51 位の水酸基が開裂パターンに及ぼす影響を検討した。結果として、2 つの新たな開裂パターンが生じることを確認、それにより生じるプロダクトイオンの構造を帰属した。さらに、スピロケタール酸素間に電荷が固定された charge site B 由来のプロダクトイオンにおいても、C51 水酸基置換体に特徴的な知見を得た。

Ciguatoxins (CTXs) are significant compounds, which are main causative toxins of ciguatera fish poisoning (CFP) for food hygiene and have characteristic polycyclic ether structure. Since the amount of CTXs contained in poisoned fish body is very small, it is difficult to secure the necessary amount for structural analysis with NMR. In previous research, we assigned structures of product ions and fragmentation patterns from the obtained MS/MS spectrum of optimized $[M+H]^+$ ion of CTX3C (0.1 μg) through liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization (LC-APCI-QTOFMS).

In this study, using of LC-APCI-QTOFMS enabled us to obtain the $[M+H]^+$ ion of naturally occurring 51-hydroxyCTX3C. MS/MS spectrum of the congener, compared with that of CTX3C, assigned the fragmentation patterns and the structures of product ions of it, which was influenced on the 51-hydroxy substituent. As a result, two new fragmentation pathways A and B were assigned. Furthermore, characteristic product ions induced from charge site B were confirmed.

51-hydroxyciguatoxin-3C, LC/Q-TOFMS, Structural skeleton of CTX3C

発表責任者：阿部直樹（abe@nodai.ac.jp）

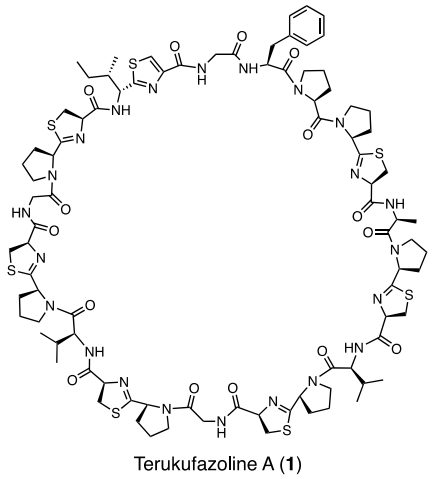
講演番号：2C2a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 C2 会場

粟国島産未記載種海洋シアノバクテリア由来 Terukufazoline 類の単離，構造決定，生物活性および全合成

Isolation, Structure Determination, Biological Activity and Total Synthesis on Terukufazolines from an Undescribed Marine Cyanobacterium

○田口 黎武[1]、海老原 玲[1]、恒松 雄太[3]、Ghulam Jeelani[4]、野崎 智義[4]、末永 聖武[1]、岩崎 有紘[2] ([1]慶大理工、[2]中央大理工、[3]名大院生命農、[4]東大医)
○Raimu TAGUCHI[1], Akira EBIHARA[1], Yuta TSUNEMATSU[3], Ghulam JEELANI[4], Tomoyoshi NOZAKI[4], Kiyotake SUENAGA[1], Arihiro IWASAKI[2] ([1]Keio Univ., [2]Chuo Univ., [3]Nagoya Univ., [4]The Univ. of Tokyo)

海洋シアノバクテリアは、多様な二次代謝産物の生合成遺伝子をもち、天然物の探索源として有用である。我々は、沖縄県粟国島にて採集した未記載種海洋シアノバクテリアから環状ペプチド terukufazoline A (**1**) を単離した。**1** は 22 残基のアミノ酸からなり、6 個のチアゾリン環を有する、前例のない特異な構造であった。


Terukufazoline A (**1**)

従来の有機化学的手法による **1** の構造解析、特にアミノ酸配列決定が困難であった。そこで、構成アミノ酸から **1** がシアノバクチンに分類されると推定し、その生合成機構に着目した。凍結保存シアノバクテリアのメタゲノム解析を行った結果、terukufazoline 類の生合成遺伝子クラスターを発見し、NMR スペクトルおよびタンデム質量分析の結果と合わせて、平面構造を決定した。また、絶対立体配置決定では、エピ化しやすい不斉点の取扱が課題となったため、種々の反応を組み合わせてアミノ酸残基の立体配置を決定した。以上により構造を明らかにした **1** は、トリパノソーマ原虫に対して選択的な毒性を示した。さらに **1** の全合成を達成し、決定した構造が正しいことを確認した。

Marine cyanobacteria possess various biosynthetic genes encoding a variety of secondary metabolites, making them a valuable source for natural product discovery. In this study, we isolated novel cyclic peptide Terukufazoline A (**1**) from undescribed marine cyanobacterium collected on an isolated island, Aguni Island, Okinawa Prefecture, Japan.

Since the planar structure of **1** was too complicated to determine by conventional chemical methods, we focused on its biosynthetic gene information. Therefore, the metagenomic analysis of environmental samples was conducted, and a terukufazolines biosynthetic gene cluster was found. Thus, the planar structure of **1** was successfully determined by combining the biosynthetic gene information, NMR data, and MS/MS analysis. The absolute configuration of **1** was determined using several degradation reactions to settle the epimerization.

1 was found to exhibit moderate antitrypanosomal activity without cytotoxicity. Furthermore, the total synthesis of terukufazoline A was achieved, and the structure was confirmed entirely.

structure determination, marine cyanobacterium, total synthesis

発表責任者：田口黎武（lime39@keio.jp）

講演番号：2C2a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 C2 会場

赤潮由来渦鞭毛藻 *Karenia selliformis* の増殖を亢進するバクテリア成分の同定
Identification of growth accelerator of red tide forming *Karenia selliformis* from *Sulfitobacter bacterium*

○恒松 雄太[1]、尾崎 俊希[1]、前田 直哉[1]、鈴木 重勝[2]、藤田 雅紀[3]、北 将樹[1]、河地 正伸[2]([1]名大院生命農、[2]国立環境研究所、[3]北大院水産)
○Yuta TSUNEMATSU[1], Toshiki Ozaki[1], Naoya Maeda[1], Shigekatsu Suzuki[2], Masaki Fujita[3], Masaki Kita[1], Masanobu Kawachi[2] ([1]Nagoya Univ., [2]NIES, [3]Hokkaido Univ.)

【目的】2021 年 9 月、北海道南部海域で大規模な赤潮が発生し、ウニやサケを中心として甚大な漁業被害をもたらした。この赤潮の主な構成種は渦鞭毛藻 *Karenia selliformis* であり、本種による赤潮は日本近海で初めて報告された[1)]。先行研究では、本赤潮発生海域で単離されたバクテリア *Sulfitobacter* の抽出物が、*K. selliformis* の増殖を亢進することが示唆された[2)]。そこで本研究では、*K. selliformis* の増殖を亢進する *Sulfitobacter* 由来化学成分の同定を目指した。
【方法・結果】まず *Sulfitobacter* を培養し、遠心分離によって培地成分と菌体成分に分離した。培地成分には合成吸着剤 Diaion HP-20 を添加し、有機化合物の抽出を行った。菌体成分は、エタノール中での超音波破砕によって抽出を行った。続いてこれらの *Sulfitobacter* 抽出物を *K. selliformis* の培養液に添加して培養し、増殖亢進作用の評価を行った。その結果、*Sulfitobacter* 菌体のエタノール抽出物が *K. selliformis* の増殖を亢進することが確認された。現在 HPLC により *Sulfitobacter* 抽出物を精製し、活性化合物の分離を行っている。

【Purpose】In September 2021, a red tide occurred in the southern sea area of Hokkaido, causing fishery damage to sea urchins and salmon. The main species of this red tide was the dinoflagellate *Karenia selliformis*, and this was the first red tide caused by this species in Japan[1)]. A previous study suggested that an extract of *Sulfitobacter* isolated from the red tide area enhanced the growth of *K. selliformis*[2)]. In this study, we aimed to identify the chemical components from *Sulfitobacter* that enhance the proliferation of *K. selliformis*.
【Methods and Results】 *Sulfitobacter* was first cultured and separated into medium and bacteria component by centrifugation. The organic compounds were extracted from the medium component with a synthetic adsorbent, Diaion HP-20. The bacteria component was extracted by ultrasonic disruption in ethanol. These *Sulfitobacter* extracts were then added to *K. selliformis* culture medium and incubated to evaluate their growth enhancing effects. As a result, it was confirmed that the ethanol extract of *Sulfitobacter* increased the growth of *K. selliformis*. We are currently purifying the *Sulfitobacter* extract by HPLC and isolating the active compounds.

1) lwataki, M. et al *Harmful Algae* 2020, *114* 102204.
2) Suzuki, S. *et al*. 日本藻類学会第 47 回大会 2023, B12.

Dinoflagellate, red tide, growth factor

発表責任者：恒松雄太（tsune@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2C2a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 C2 会場

フェアリー化合物のキノコホルモン候補として化学的研究
Chemical studies on fairy chemicals as mushroom hormone candidates

○呉 静[1,2]、吉川 蒼人[1]、崔 宰熏[2,3]、平井 浩文[2,3]、河岸 洋和[1,2]（[1]静大農、[2]静大キノコ科学研究所、[3]静大共創）
○JING WU[1,2], AOTO YOSHIKAWA[1], JAE-HOON CHOI[2,3], HIROFUMI HIRAI[2,3], HIROKAZU KAWAGISHI[1,2] ([1]Fac. of Agri., [2]Res. Inst. Mushroom Sci., Shizuoka Univ., [3]Japan Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】多くの生物種は，特有のホルモンを有している。しかし，高等菌類であるキノコにおけるホルモンは全く明らかにされていない。キノコを発生させる菌類は，胞子から菌糸，菌糸から子実体，子実体から胞子という生活環を持っている。我々はキノコ生活環制御ホルモン，特に子実体発生（発茸）ホルモンの発見を目的とした。当研究室ではフェアリーリングを引き起こすキノコであるコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から植物生長制御物質，2-azahypoxanthine（AHX）と imidazole-4-carboxamide（ICA）を発見した。その後, 植物体内での AHX の代謝産物 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）を得た（図 1, AHX, ICA, AOH をフェアリー化合物, fairy chemicals, FCs と表記）[1]。そして，FCs が普遍的に植物に内生していることを証明し，生合成経路も明らかにした。これらのことは FCs が新しい植物ホルモンであることを示唆した。FCs はそもそもキノコから発見され，キノコの中でもホルモンとして重要な役割を担っていると考えている。本研究では, FCs はキノコホルモン候補として, キノコに対する菌糸体成長および子実体形成への効果，さらに FCs と特異的な結合タンパク質の探索を目的とした。

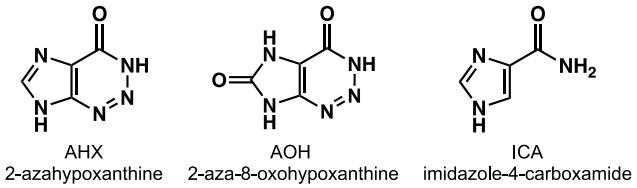


図1. Fairy chemicals

【結果】FCs はマツタケやトリュフなどの菌糸成長を促進し，シイタケ，エノキタケ，ヤマブシタケおよびブナシメジの子実体形成を誘導した。これらのアッセイを繰り返し，再現性，至適濃度などを検討した。FCs 結合物質の探索では，スペーサーを導入した FCs を固定化したアフィニティーカラムを作成した。現在，FCs の効果が一番高いエノキタケ（子実体を発生した直後）のタンパク質抽出液から FCs 結合タンパク質の精製を試みている。

The fruiting body of basidiomycetes and ascomycetes is known as“mushroom”. It produces spores, and the spores germinate and create mycelium. The mycelium eventually produces a primordium, which grows into a new whole mushroom, and the life cycle continues. Each stages of the cycle may be controlled by specific compounds such as hormones. However, nobody knows whether mushrooms produce their own hormones or not. The current study has focused on searching for fruiting body-inducing compound(s) (candidates for fruiting body-inducing hormone) in mushrooms on the basis of the following hypothesis.The natural phenomenon “fairy rings” are zones of stimulated grass growth owing to the interaction between a fungus and a plant. We discovered “fairy chemicals” (FCs) from the culture broth of *Lepista sordida*. We hypothesized that FCs are a new family of plant hormones. Since FCs were originally isolated from mushroom, we speculate that they also play an important role like hormone in mushroom. As a result, we found FCs regulated mycelium growth and induced fruiting bodies of a few mushrooms. We are trying to isolate the specific binding proteins of FCs from *Flammulina velutipes*.

1) Kawagishi, H., Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95(1), 29–38 (2019).

fruiting body-inducing compound, fairy chemicals, mushroom

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C2a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 C2 会場

フェアリーリング形成菌とノシバとの化学的相互作用
Chemical interaction between zoysiagrass (*Zoysia japonica*) and fairy ring-forming
○スヌワル アルビン[1]、崔 宰熏[1,2,3,4,5]、平井 浩文[1,2,3,4,5]、河岸 洋和[3,5] ([1]静大院・創造、[2]静大・共創、[3]静大・農、[4]静大・グリーン研、[5]静大・キノコ科研)
○Arbin SUNUWAR[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4,5], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4,5], Hirokazu KAWAGISHI[3,5] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [3]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. Mushroom Sci. Tech., Shizuoka Univ.))

コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）は、芝生がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生するフェアリーリングという現象を起こす菌として知られている。過去に当研究室では菌糸体培養濾液から、様々な植物体に対して成長調節活性を示す 2-azahypoxanthine（AHX）および imidazole-4-carboxamide（ICA）を発見した。また、イネからは AHX の植物における代謝産物として 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）を見出した[1]。これら 3 つの化合物をフェアリーリング形成の原因物質とし、フェアリー化合物（fairy chemicals，FCs）と称している。一方、フェアリーリング上でキノコが発生する際には、芝生からの化学シグナルによる影響が考えられるが、その分子機構は全く不明である。そこで、本研究ではノシバとフェアリーリング現象を引き起こすコムラサキシメジとの共存培養を行うことでフェアリーリング現象の本質的な解明を試みた。二つの方法（寒天あるいは土壌を用いた培養）を用いた。寒天培地でのノシバとコムラサキシメジの共存培養では、表現型と重量測定の結果から、ノシバとコムラサキシメジが互いに相手の成長を促進することが判明した。また、共存培養したノシバから FCs が検出された. 特に AOH が多量に蓄積していたことから、この共存培養ではノシバ地上部の成長促進に AOH が関与していると考えられる。現在、土壌での共存培養のノシバ地上部と土壌の抽出物の FCs の定量と 2 次代謝産物の探索を行っている。

Lepista sordida is a well-known fungus that causes a phenomenon known as “fairy rings”, wherein mushrooms develop after turfgrass has either thrived or died in a ring-like pattern. On the other hand, the development of mushrooms on fairy rings may be influenced by chemical signals from the turfgrass, but the molecular mechanism is completely unknown. Therefore, we attempted to elucidate the essence of the fairy ring phenomenon by co-cultivating zoysiagrass with *L. sordida*. Two methods were used: co-cultivation on agar medium and soil medium. In the co-culture of zoysiagrass and *L. sordida* on agar medium, phenotypic observations and weighing results showed that zoysiagrass and *L. sordida* mutually promoted growth. In addition, in co-cultured zoysiagrass AOH accumulated in large amounts, suggesting that AOH may be involved in the shoot growth promotion by co-cultivation. Analysis of metabolites of the plant and the soil from soil co-cultivation is currently underway.

1) Kawagishi, H., Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95(1), 29–38 (2019).

fairy ring, *Lepista sordida*, co-cultivation

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C2a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 C2 会場

サナギタケ（*Cordyceps militaris*）由来の新規フェアリー化合物誘導体の探索

Search for novel derivatives of fairy chemicals from *Cordyceps militaris*

○森井 風詩[1]、崔 宰熏[1,2,3,4]、鈴木 智大[3,5]、道羅 英夫[3,4]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,3]（[1]静大農、[2]静大共創、[3]静大キノコ科研、[4]静大グリーン研、[5]宇大バイオ）

○ Futa MORII[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4], Tomohoro SUZUKI[3,5], Hideo DOHRA[3,4], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,3] ([1]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Mushroom Schi. Tech., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [5]C-Bio, Utsunomiya Univ.)

フェアリー化合物（FCs）は 2-azahypoxanthine（AHX）、2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）、imidazole-4-carboxamide（ICA)の総称で、プリン代謝経路上で生合成される生理活性物質であり、多くの生物の体内で合成され様々な誘導体に変換されることが明らかになっている。一方、昆虫病原性の子嚢菌であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*）が産生するコルジセピン（3'-deoxyadenosine）は同じくプリン代謝経路上で生合成される生物活性物質である。本研究ではコルジセピンのアグリコンである adenine と FCs との構造の類似性に着目し、コルジセピン様の新たな FCs 誘導体の探索を行った。

コルジセピン高産生株として選抜した NBRC103755 株を yeast extract と FCs を加えた PDB 培地上で培養し UPLC 分析を行ったところ、AHX を処理した株で AHX が AOH に変化し、AOH が更に新たな代謝産物に変化していることが判明した。そこで、AOH 代謝産物が多く確認された条件でサナギタケの大量培養を行い、AOH 代謝産物の構造決定を目指した。分画を進めるにつれて AOH が複数の代謝産物へと変化している可能性が示唆され、現在、複数の代謝産物の単離を試みている。

Fairy chemicals (FCs) are the collective term for 2-azahypoxanthine (AHX), 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), and imidazole-4-carboxamide (ICA), which are bioactive compounds and known to be biosynthesized in the purine metabolic pathway in many organisms, and converted to various derivatives. On the other hand, cordycepin (3'-deoxyadenosine), produced by the fungus *Cordyceps militaris,* is a bioactive compound that is also biosynthesized in the pathway. In this study, we focused on the structural similarity between FCs and adenine, an aglycon of cordycepin, and searched for new cordycepin-like FCs derivatives.

C. militaris NBRC103755, a high cordycepin-producing strain, was cultured on PDB medium supplemented with FCs and UPLC analysis indicated that AHX was converted to AOH in the AHX-treated strain and AOH was further converted to a new metabolite. Therefore, we conducted a large-scale culture of AOH-treated *C. militaris* to determine the structure of the AOH metabolite. Further fractionation and analysis of the culture medium suggests that AOH may be converted into multiple metabolites, and we currently attempting to isolate the metabolites.

fairy chemicals, cordycepin, *Cordyceps militaris*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C2a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 C2 会場

きのこ由来シロキクラゲ菌糸体誘導物質の探索

Search for mushroom-derived mycelial inducers of *Tremellales fuciformis*

○小林 太洋、ナンタワン カオニウォン、會見 忠則、一柳 剛（鳥取大農）
○Taiyo KOBAYASHI, Kaeoniwong Nanthawan, Tadanori AIMI, Tsuyoshi ICHIYANAGI (Tottori Univ.)

日本や中国で食用きのことして扱われているシロキクラゲ目(*Tremellales*)は担子菌門に属しており、なかでも酵母ときのこの二面性をもつ珍しい種であることが知られている。*Tremellales* 目は胞子から酵母が発育し、外部刺激により酵母型から菌糸型へ形態を変化させることで子実体を形成している。また、*Tremellales* 目は木材腐朽菌であるヒポキシロン属(*Hypoxylon*)に寄生する菌寄生菌であり、*Hypoxylon* 属の共存が菌糸型への形態変化に起因することが知られている。本研究ではきのこ抽出物ライブラリーより、*H. truncatum* TUFC65001 株と *H. howeanum* TUFC31602 株を選抜し、培養濾液抽出物より *Tremellales* 菌糸体誘導物質を単離、同定することとした。

H. truncatum と *H. howeanum* を液体培養したのち菌糸体を濾別し、得られた培養濾液を EtOAc で分配抽出して得られた有機層を減圧濃縮した。得られた EtOAc 抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび分取 TLC で分離、精製を行い、化合物を単離した。*H. truncatum* 抽出物の ^{1}H および ^{13}C NMR データと MS スペクトルの構造解析の結果、5-methylmellein および 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol を単離した。また、*H. truncatum* 抽出物より分子式 $C_{16}H_{28}O_4$ の化合物を単離することに成功した。これらの化合物をそれぞれ *Tremellales fuciformis* に供し菌糸体誘導活性試験を行った結果を報告する。

Tremellales fuciformis is an edible mushroom in Japan and China that belongs to the Basidiomycota. *Tremellales* is known for its unusual dual nature as a yeast and a mushroom; the yeast develops from the spores and forms the fruiting body by changing its morphology from a yeast form to a mycelium form upon external stimuli. *Tremellales* is also known to be a mycorrhizal parasite of the wood-rotting fungus *Hypoxylon sp*., and the coexistence of *Hypoxylon sp* is responsible for the morphological change to the mycelial form. In this study, we selected two strains of *H. truncatum* (TUFC65001) and *H. howeanum* (TUFC31602) and isolated and identified the *Tremellales* mycelial inducers from filtrate extracts of the cultures.

After cultivation of the above strains, the mycelia were filtered off, the resulting culture filtrate was extracted with EtOAc, and the organic layer was concentrated. The EtOAc extract was purified by silica gel column chromatography and preparative TLC to give the compounds. The NMR and MS data analysis of compounds from the *H. truncatum* revealed 5-methylmellein and 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol. In addition, a compound ($C_{16}H_{28}O_4$) was successfully isolated from *H. truncatum*. These compounds were tested on *Tremellales fuciformis* to investigate their mycelial induction activity.

Tremellales fuciformis, *H.howeanum*, *H.truncatum*

発表責任者：一柳剛（yanagi@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C2a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 C2 会場

キクラゲ抗白癬菌物質の探索

Isolation and structure determination of anti-tricophyton compunds

○一柳 剛[1]、宋 晟遥[2]、山本 悠輝[2]、平田 智基[3]、會見 忠則[1]([1]鳥取大農、[2]鳥取大院持続性社会創成、[3]鳥取大連農)
○Tsuyoshi Ichiyanagi[1], Shengyao Song[2], Yuuki Yamamoto[2], Tomoki Hirata[3], Tadanori Aimi[1] ([1]Tottori Univ., [2]Grad. Sch. of Tottori Univ., [3]United Grad Sch. of Tottori Uinv.)

白癬は皮膚糸状菌である *Trichophyton rubrum* や *T. mentagrophytes* 等の感染によって生じる皮膚表在性感染症である。白癬に対する治療はエルゴステロール生合成阻害薬が使用されているが、耐性菌の出現が確認されてきており、新しい薬剤開発に向けたリード物質探索が行われている。

本研究では、鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター(FMRC)が保有するきのこ菌株の培養液より作成した抽出物ライブラリーから *T. mentagrophytes* (NBRC16646)に対する生育阻害活性を指標に抽出物を選抜した。その結果 *Aporpium strigosum* (TUFC100651)、および *Auricularia heimuer* (TUFC100803)の菌体培養濾液の酢酸エチル抽出物を選抜することができた。この2種の酢酸エチル抽出物より生育阻害活性物質の単離精製を行った。

その結果、*A. strigosum* より 3 種類の化合物を単離し、質量分析、NMR、および比旋光度データから 3-hydroxy-(4-methoxyphenyl)propan-1-one 、 (*R*)-2-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-one 、 および Speciosine B であると同定した。また *A. heimuer* の菌体培養液の酢酸エチル抽出物から2回のシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製を経て生育阻害活性物質を得た。精密質量分析および 2D NMR スペクトルの解析により、平面構造が 2-(prop-1-en-2-yl)6-oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol であると決定した。

Tinea is a superficial infection of the skin caused by the dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes*. Ergosterol biosynthesis inhibitors have been used to treat ringworm, but the emergence of drug-resistant strains has become a problem.

In this study, we screened the extracts library prepared from the culture media of mushroom strains based on their growth inhibitory activity against *T. mentagrophytes* (NBRC16646). Moreover, the growth inhibitory substances, 3-hydroxy-(4-methoxyphenyl)propan-1-one, 2-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)propan-1-one, and 2-(prop-1-en-2-yl)6-oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol were isolated and purified from ethyl acetate extracts of *Aporpium strigosum* (TUFC100651) and *Auricularia heimuer* (TUFC100803) culture filtrates.

anti-tricophyton, isolation

発表責任者：一柳　剛（yanagi@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C2a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 C2 会場

Isolation, structure elucidation, and biological activities of sesquiterpenes and phthalides from two edible mushrooms Pleurotus species

○Jewel De Padua[1], Emi Fukushima Sakuno[2], Kotomi Ueno[3], Thomas Edison dela Cruz[4], Atsushi Ishihara[3] ([1]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Tottori, Japan, [2]The Tottori Mycological Institute, The Japan Kinoko Research Center Foundation, Tottori, Japan, [3]Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori, Japan, [4]Department of Biological Sciences, College of Science, University of Santo Tomas, Espa = a Blvd., Manila, Philippines)

Antimicrobial compounds were purified from culture filtrates from two edible *Pleurotus* species. Using a bioassay-guided fractionation of the culture filtrate extracts, three compounds (**1-3**) were obtained from *Pleurotus ostreatus*, and another compound (**4**) was obtained from *Pleurotus pulmonarius*. Spectroscopic analyses revealed that **1-3** was identified as 5,7-dimethoxyphthalide, 4,6-dimethoxyphthalide, and cheimonophyllon E, respectively, while **4** were identified as pleuroton A. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of these compounds were determined against six pathogenic bacterial species, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter cloacae*. Compounds **2** and **4** were inhibitory against all tested bacteria, while **1** and **4** were inhibitory against three and two species, respectively. In addition, **1-4** inhibited tyrosinase, with IC_{50} values of 0.10-0.30 mg/mL and α-glucosidase with IC_{50} values of 0.12-0.54 mg/mL. However, their antioxidant capacities were marginal.

Pleurotus, antimicrobial, tyrosinase inhibitor

発表責任者：Atsushi Ishihara（aishihara@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C2a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 C2 会場

Identification of two phthalide derivatives and an oxindole compound isolated from the edible mushroom Pleurotus ostreatus and their inhibitory activities against plant pathogenic microorganisms

○Enrico Cabutaje[1], Kotomi Ueno[2], Kumiko Osaki-Oka[2], Kazutaka Kido[2], Thomas Edison dela Cruz[3], Atsushi Ishihara[2] ([1]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Tottori, 680-8553, Japan, [2]Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama-cho Minami, Tottori 680-8553, Japan, [3]Department of Biological Sciences, College of Science, University of Santo Tomas, España Blvd. 1015 Manila, Philippines)

Plant diseases caused by pathogenic microorganisms are considerably one of the biggest challenges in the agricultural sectors, leading to substantial economic losses. Farmers and agricultural producers rely on commercially available pesticides to eliminate these plant pathogenic microorganisms. However, the excessive use of chemical pesticides in agricultural fields harms human health, the environment, and other beneficial microorganisms in the soil and plants. To address this challenge, it is essential to develop bio-ecofriendly solutions that effectively address the burden caused by pathogenic microorganisms while minimizing harm to beneficial organisms and the environment. Mushrooms represent one of the untapped natural resources with immense potential and have been proven as reservoirs of diverse bioactive metabolites.

The culture filtrate of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* was subjected to bioassay-guided isolation, and two phthalide derivatives, 4,6-dimethoxyphthalide (**1**) and 5,7-dimethoxyphthalide (**2**), were identified, along with an oxindole compound,3-hydroxy-3-methyloxindole (**3**). The inhibitory activities of the three compounds were evaluated against four fungal and five bacterial pathogens. Remarkably,**1** and **2** exhibited the lowest IC_{50} values against the conidial germination and germ tube elongation of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. However, their effectiveness against bacterial pathogens was relatively low. Structurally related phthalide compounds with methoxy substitutions at the benzene ring were also evaluated and have shown selectivity in inhibiting plant pathogenic microorganisms. Moreover, this is the first isolation of the scalemic mixture of (*S*) and (*R*)-enantiomers of 3-hydroxy-3-methyloxindole from macrofungi and second from a biological source. The two enantiomers showed different activities against plant fungal pathogens and bacterial plant pathogens. The inhibitory activities of the isolated compounds may indicate their potential as alternatives to synthetic chemicals for agricultural applications.

edible mushroom, oxindole, phthalide

発表責任者：Atsushi Ishihara（aishihara@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C2a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 C2 会場

コガネタケ培養物からの揮発性抗菌物質の単離
Identification of volatile antifungal compounds form *Phaeolepiota aurea*
○田中 智也[1]、下田 絵美子[2]、宮崎 つぐみ[3]、徳本 健人[3]、田澤 寿明[3]、大崎 久美子[2]、石原 亨[2]
([1]鳥大院持社創生、[2]鳥大農、[3]エステー株式会社)
○Tomoya TANAKA[1], Emiko SHIMODA[2], Tsugumi MIYAZAKI[3], Kento TOKUMOTO[3], Toshiaki TAZAWA[3], Kumiko OSAKI[2], Atsushi ISHIHARA[2] ([1]Graduate School of Sustainability Science, Tottori University, [2]Faculty of Agriculture, Tottori University, [3]S. T. Corporation)

菌類は、さまざまな抗菌性物質を生産している。そのなかでも揮発性抗菌物質は、狭い空間内に行き渡りやすく、通気により取り除くことも容易なため注目されている。菌類に含まれるきのこは、栽培や培養に時間がかかることなどから生物活性物質の探索が十分に行われていない、未開拓の生物資源である。そこで、きのこ類から揮発性抗菌物質の探索をおこなった。

複数のきのこ菌株を液体培養し、培養ろ液抽出物を得た。これをシャーレ内で揮発させ、*Penicillium citrinum* に対する抗菌活性を調べた。その結果、コガネタケ（*Phaeolepiota aurea*）培養ろ液抽出物が強い活性を示すことがわかった。そこで、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC によって活性物質を精製したところ、抗菌活性を示す化合物 **1** および **2** が得られた。マススペクトルの解析から、それぞれの分子量を 234 および 259 と決定した。さらに、NMR スペクトルに基づき、これらの化合物をα-ボルボネン骨格を有する新規のセスキテルペノイドと推定した。いずれの化合物もアルデヒド基を有し、**2** はシアノヒドリン構造を持つ化合物であった。化合物 **1** は *Aspergillus niger* や *Cladosporium sphaerospermum*、*Alternaria brassicicola* などにも抗菌活性を示したが、細菌に対する抗菌活性は認められなかった。

Fungi produce a variety of antimicrobial substances. Among them, volatile antimicrobial substances have attracted attention because they are easily distributed in narrow spaces and can be rapidly removed by ventilation. Among the fungi kingdom, mushrooms are an underexplored biological resource, as the search for biologically active substances has not been sufficiently conducted due to difficulty of culturing and long culturing period. Therefore, we explored volatile antimicrobial substances in mushrooms.

The extracts of the culture filtrates were obtained from various mushroom species. The extracts were volatilized in petri dishes and examined for antimicrobial activity against *Penicillium citrinum*. The extract of the golden bootleg (*Phaeolepiota aurea*) showed strong inhibitory activity on conidial germination. The active compounds were purified by silica gel column chromatography and HPLC, yielding **1** and **2**. Mass spectra indicated their molecular weights were 234 and 259, respectively. On the basis of NMR analyses, these compounds were determined to be new sesquiterpenoids with α-bourbornene skeleton. Both compounds had an aldehyde group, and **2** contained a cyanohydrin structure. Compound **1** showed antifungal activity against *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, and *Alternaria brassicicola*, but no activity against bacteria species tested.

antimicrobial substances, mushrooms

発表責任者：石原亨（aishihara@tottori-u.ac.jp）

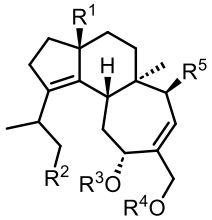
講演番号：2C2a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 C2 会場

コウタケ属キノコ ケロウジ由来新規抗炎症活性ジテルペノイド sarcodonin 類の単離・構造決定、構造活性相関研究

Isolation, Structure Determination, and Structure-Activity Relationship studies of Anti-inflammatory Diterpenoid Sarcodonins from the Mushroom *Sarcodon scabrosus*

○河村 篤[1]、飯田 優希[2]、北 将樹[3]、真壁 秀文[1,2] ([1]信大バイオメディカル研、[2]信大院総合理工・農、[3]名大院生命農)
○ Atsushi KAWAMURA[1], Yuki IIDA[2], Masaki KITA[3], Hidefumi MAKABE[1,2] ([1]IBS, ICCER, Shinshu University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, [3]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

信州大学農学部ではこれまでに、コウタケ属キノコ (*Sarcodon scabrosus*) の抽出物からシアタン骨格を有するジテルペノイドである sarcodonin 類を 40 種類以上報告してきた。これらの多くが抗炎症活性を示すことから、本研究では更なる新規 sarcodonin 類の探索、および抗炎症活性 (LPS で刺激したマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞の NO 生産抑制効果）における構造活性相関研究に着手した。



Sarcodonin 1 (**1**) : R^1 = CH_2OH, R^2 = H, R^3 = Bz, R^4 = Bz, R^5 = OH (EC_{50} 13.4 μM)
Sarcodonin 2 (**2**) : R^1 = Me, R^2 = OH, R^3 = Bz, R^4 = H, R^5 = carbonyl (EC_{50} > 200 μM)
Sarcodonin 3 (**3**) : R^1 = Me, R^2 = OH, R^3 = Bz, R^4 = H, R^5 = OH (EC_{50} 68.1 μM)

ケロウジ乾燥子実体の MeOH 抽出物から NMR スペクトルを指標とした分離精製を行い、3 つの新規化合物 sarcodonin 1, 2, 3 (**1**, **2**, **3**)、および 6 つの既知 sarcodonin 類を単離した。各種機器分析および化合物の誘導体化により、**1**, **2**, **3** の立体構造を決定した。化合物 **1**, **2**, **3** の抗炎症活性を評価した結果、**1** と **3** はそれぞれ IC_{50} 13.4 μM、および IC_{50} 68.1 μM の活性を示した。本発表では、**1**, **2**, **3** の構造、3 つの新規化合物を含む単離した 9 つの sarcodonin 類の生物活性、および構造活性相関について報告する。

Mushrooms produce various secondary metabolites that have unique chemical structures and bioactivities. A large number of sarcodonins with cyathane skeleton have been isolated from the mushroom *Sarcodon scabrosus* at Faculty of Agriculture, Shinshu University. Additionally, it has been reported that the majority of sarcodonins exhibited anti-inflammatory activity. From the above background, we carried out isolation, anti-inflammatory assay (the nitric oxide production inhibitory assay with lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage RAW264.7 cells), and structure-activity relationship studies of sarcodonins.

Based on NMR spectra, three new compounds sarcodonin 1, 2, and 3 (**1**, **2**, and **3**) and six known sarcodonins were isolated from the methanolic extract of *S. scabrosus*. The structures were determined by various instrumental analysis and chemical derivatizations. Compound **1** and **3** exhibited anti-inflammatory activities with IC_{50} values of 13.4 μM and 68.1 μM, respectively. Purification, structure analysis, bioactivities, and structure-activity relationship studies of nine sarcodonins including three new ones will be presented.

Sarcodonin, Isolation and structure determination, Anti-inflammatory

発表責任者：河村　篤（a_kawamura@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C2p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 C2 会場

インディカ種イネが生産するストリゴラクトン
Characterization of strigolactones produced by Indica-type rice plants

○井上 美智、王 梓鳳、野村 崇人、謝 肖男（宇大バイオ）
○Misato INOUE, Azusa WANG, Takahito NOMURA, Xiaonan XIE (The Univ. of Utsunomiya)

ストリゴラクトン（SL）は植物特化の二次代謝産物である。植物体内では枝分かれを制御し、土壌中ではアーバスキュラ菌根の分岐誘導活性を促したり、根寄生植物の種子発芽を促進したり、共生と寄生のシグナルとして機能する。そのため SL についての理解を深め、人為的操作が可能となれば、着果数の調整や植物の生育促進、根寄生雑草防除法の確立など農業の利益に貢献できる。今日までイネが生産する SL については多くの研究がされているが、それはジャポニカ種イネについてであり、世界の米の生産量の 8 割を占めるインディカ種イネに関するものは少ない。そこで本研究では、インディカ種イネが生産する SL を同定することを目指し実験を行った。インディカ種イネである Kasalath を水耕栽培し、活性炭に吸着させた根浸出物をアセトンで溶出後アセトンを留去させた水性残渣を酢酸エチルで抽出し、減圧濃縮したものを LC-MS/MS により分析した。加えてそれらを精製し、キラルカラムに変更した上でプロダクトイオンスキャンによる開裂パターンの解析も行った。過去のイネ科から生産される SL のデータと比較したところ、オオムギから単離・構造決定された *epi*-heliolactone、および *epi*-heliolactone のの二重結合がエポキシ化された構造であることが示唆された。

Strigolactones (SLs) are plant specific secondary metabolites which regulate plant growth and development. So far, SLs produced by Indica type rice plants which account for 80% of rice production all over the world have not yet been characterized. In this study, we tried to characterize SLs produced by an Indica type rice Kasalath. The crude extract of the root exudate collected from the roots of Kasalath was purified and the cleavage pattern was analyzed by product ion scanning using LC-MS/MS using a chiral column. Three novel SLs were found from Kasalath root exudate. Characterization of SLs produced by some other Indica type and Indica-Japonica hybrid rice plants will be reported.

strigolactone, indica type rice

講演番号：2C2p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C2 会場

ササゲの生産するストリゴラクトンの単離と構造解析

Isolation and identification of novel strigolactone produced by cowpea

○阿部 怜生[1]、本間 大翔[1]、若林 孝俊[1,2]、滝川 浩郷[2]、水谷 正治[1]、杉本 幸裕[1] ([1]神戸大院農、[2]東大院農生科)
○Reo ABE[1], Masato HOMMA[1], Takatoshi WAKABAYASHI[1,2], Hirosato TAKIKAWA[2], Masaharu MIZUTANI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1] ([1]The Univ. of Kobe, [2]The Univ. of Tokyo)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone、 SL）は、根寄生植物の種子発芽刺激、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導、植物の形態制御の機能を持つ植物ホルモンとして注目を集めている。我々はトマト（*Solanum lycopersicum*）において CYP722C が carlactonoic acid（CLA）を 18-oxo-CLA に変換し、Stereoselective BC-Ring-forming Factor（SRF）が 18-oxo-CLA を立体選択的に orobanchol へ導くことを報告した。トマトと同じく orobanchol を生産するササゲ（*Vigna unguiculata*）には、*SlSRF* ホモログ遺伝子が 2 つ存在する。これらの組換えタンパク質のうち VuSRF1 は 18-oxo-CLA を orobanchol に変換するのに対し、VuSRF2 は orobanchol とは異なる新規成分へと変換した。本研究は、この新規成分を単離し構造を解明することを目的とした。
【方法および結果】目的とする成分はササゲ水耕液中にも検出されたので、SL 生産が高まる低リン酸条件で大量にササゲを水耕栽培し根分泌物を XAD4 に吸着した。目的成分をアセトンにより XAD4 から回収し、固相抽出カラム Oasis MAX により酸性画分に溶出した。さらに逆相およびキラルカラムを用いた HPLC によって単一成分にまで精製した。本成分の分子量は orobanchol と同じであるが TMS ジアゾメタンによって容易にメチル化を受けることから、分子内に遊離のカルボン酸を有していると考えられる。現在、詳細な NMR 解析により構造の解明を進めている。本発表では推定構造を示すとともに発芽刺激活性についても報告する予定である。

Strigolactones are important apocarotenoids involved in plant–rhizosphere interactions and plant architecture. In tomato (*Solanum lycopersicum*), CYP722C converts carlactonoic acid (CLA) to 18-oxo-CLA, while Stereoselective BC-Ring-forming Factor (SRF) converts 18-oxo-CLA to orobanchol. Cowpea (*Vigna unguiculata*), another orobanchol-producing plant, has two homologs of SlSRF, VuSRF1 and VuSRF2 which convert 18-oxo-CLA to orobanchol and a novel substance, respectively. This study aims to isolate and determine the structure of the novel substance.

We extracted the substance from cowpea root exudates and purified it using chromatography. The substance has the same molecular weight as orobanchol. Currently, we are analyzing its structure using NMR. We will report the proposed structure of the novel substance and its ability to stimulate seed germination towards root parasitic weeds.

strigolactone, cowpea, isolation

発表責任者：阿部怜生（232a402a@stu.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2C2p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C2 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株を用いた久慈産琥珀由来の生物活性物質の探索
Isolation of bioactive compounds that restore the growth of yeast ubiquitin ligase *rsp5*^{A401E} strain exposed to high temperature stress from Kuji amber.
○丹場 晴也[1]、越野 広雪[2]、野川 俊彦[2]、今井 央由[2]、高木 博史[3]、木村 賢一[1] ([1]岩手大院・総合科学、[2]理研 CSRS、[3]奈良先端大・バイオ)
○Seiya TANBA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Toshihiko NOGAWA[2], Eiyu IMAI[2], Hiroshi TAKAGI[3], Ken-ichi KIMRA[1] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Div. of Biol Sci. NAIST.)

岩手県久慈市周辺の大量に埋没している久慈産琥珀のメタノール抽出物（MEKA）は、新規物質の宝庫であり特徴的なケミカルスペースを示す。これまで酵母の Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子破壊株(YNS17 株)の生育回復活性を指標に活性物質の単離を行ってきたが、本研究では高温ストレス(37℃)下で酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 変異酵母(*rsp5*^{A401E} 株)の生育を回復させる活性を指標としたスクリーニング系を用い、さらなる活性物質の単離を目指した。

まず､久慈産琥珀粉末 1007.1 g から得られた MEKA 51.0 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、17 画分に分けた。既に、Fr.10 (ヘキサン : 酢酸エチル＝2:1)より 2 種の新規活性物質 15-nor-5, 7, 9-drimatrien-3-ol および 5-hydroxy-15,19,20-trinor-4,5-*seco*-5,7,9-labdatrien-4-one を単離、構造決定し報告している。今回は Fr.11(ヘキサン : 酢酸エチル＝1:1)より得られた活性物質を報告する。Fr.11 を中圧液体クロマトグラフィーに供し 11 画分に分けた。その内、*rsp5*^{A401E} 株に対し強い生育回復活性を示した Fr.11-7 および Fr.11-8 を逆相 HPLC 分取（80% MeOH+ 0.1% AcOH および 60% ACN+ 0.1% AcOH）に供し、化合物 7-A (2.1 mg)、7-B (3.8 mg)、8-A (3.4 mg)、8-B(2.3 mg)、8-C-1 (1.3 mg)、並びに 8-C-2 (0.9 mg) の 6 種の化合物を単離精製した。これらは *rsp5*^{A401E} 株および YNS17 株の両株に対し濃度依存的な生育回復活性を示した。現在、各種機器分析による構造解析を進めている。

The methanol extract of Kuji amber (MEKA) is a treasure natural product for novel bioactive compounds and has a characteristic chemical space. We had isolated novel bioactive compounds using a screening system based on the growth-restoring of the yeast of four genes disruption strain involved in yeast Ca^{2+} signaling (YNS17). In this study, we aimed to isolate other bioactive compounds by using another screening system based on the growth-restoring of the yeast ubiquitin ligase Rsp5 mutant yeast strain (*rsp5*^{A401E}) exposed to high temperature stress (37°C). As a result, 6 compounds were isolated from MEKA using silica gel column chromatography (hexane: ethyl acetate = 20:1 to 1:3), medium pressure column chromatography (100% MeOH) and HPLC (ODS, 80% MeOH+ 0.1% AcOH and 60% ACN+ 0.1% AcOH). They showed growth-restoring activity against *rsp5*^{A401E} and YNS17 strains. Structural elucidation using various instrumental analyses is in progress.

Kuji amber, *Saccharomyces cerevisiae rsp5* ^{A401E} strain, bioactive compounds

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2C2p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C2 会場

スペイン産琥珀と久慈産琥珀の生物活性物質の構造と活性の比較研究
Comparative study of the structure and biological activity of Spanish and Kuji amber constituents
○笹本 啓将[1]、鈴木 瑞季[1]、越野 広雪[2]、CESER Menor-Salvan[3]、木村 賢一[1]([1]岩手大院・総合科学、[2]理研 CSRS、[3]Alcala 大学)
○Keisuke SASAMOTO[1], Muzuki SUZUKI[1], HIROYUKI KOSHINO[2], Menor-Salvan CESER[3], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Univ. of Alcala)

久慈産琥珀（生成年代：約 9000 万年前、起源樹：ナンヨウスギ科、北緯 40.2°）のメタノール抽出物（MEKA）から、通常の植物が産生するジテルペノイドから炭素が 1~4 個欠如した上に、環化・芳香環化、酸化・還元された新規物質をこれまで 15 種類単離精製した。しかし、調べた限りの他国産琥珀中には既知物質が多いことから、そのユニークなケミカルスペースの成り立ちを解明するため、外観も含めて極めて類似の性質を有するスペイン産琥珀（生成年代：約 9900 万年前~1 億 2500 万年前、起源樹：ナンヨウスギ科、北緯 42.8°）と、生物活性物質の比較を行うこととした。スペイン産琥珀メタノール抽出物（MESA）の Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子破壊酵母 YNS17 株に対する生育回復活性は、MEKA と同程度であった。しかし、HPLC 分析では、MEKA の主要な活性成分である kujigamberol は含まれておらず、その近くに MEKA には無いピークが認められた。一方で、MEKA と MESA の両方から、kujigamberol からヒドロキシメチル基が欠如した amberene が検出された。MESA の主要なピークを単離精製し、構造を決定したところ 1,2,5-trimethylnaphthalene と同定され、これは久慈産琥珀超臨界メタノール分解抽出（350℃、30 min）して得られた成分であることから、スペイン産琥珀が久慈産琥珀よりもさらに激しい続成作用を受けていたことが示唆された。現在、MESA から kujigamberol とは異なる新たな生物活性物質を単離精製中である。

We have isolated 15 novel compounds from methanol extract of Kuji amber (MEKA). However, only known compounds were found from other ambers around the world. To elucidate the origin of MEKA's unique chemical space, we compared the bioactive compounds in Kuji amber and Spanish amber, which have much in common with Kuji amber. MEKA and Methanol extract of Spanish amber (MESA) showed similar growth-restoration activity against the mutant yeast. However, HPLC analysis showed that kujigamberol was not detected in MESA, instead, a large peak not presented in MEKA was observed. On the other hand, both MEKA and MESA included amberene lacking hydroxymethyl groups of kujigamberol. The main peak of MESA was isolated and identified to be 1,2,5-trimethylnaphthalene, which was obtained by supercritical methanol extraction of Kuji amber (350°C, 30 min). This suggests that the Spanish amber underwent more intense diagenesis than the Kuji amber.

Kuji amber, Spanish amber, 1,2,5-trimethylnaphthalene

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2C2p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C2 会場

珪化木の遺伝子破壊酵母に対する生物活性と活性物質の同定
Biological activity of silicified woods against the mutant yeast and identification of their active compounds
○田端 菜々海、木村 賢一（岩手大院・総合科学）
○Nanami TABATA, Ken-ichi KIMURA (Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ.)

久慈産琥珀（生成年代：約 9000 万年前、起源樹：ナンヨウスギ科）のメタノール抽出物（MEKA）から、ジテルペノイドから炭素が 1~4 個欠如した上に、環化・芳香環化、酸化・還元された新規物質を 15 種得た一方で、調べた限りの他国産琥珀中には既知物質がほとんどであった。この結果は、久慈市周辺の 9000 万年間の地球環境の特徴（続成作用）によるものであると考えている。そこで、今回は琥珀とは異なる環境で生成した珪化木のメタノール抽出物の活性を調べ、活性物質を同定することで、続成作用が含有化合物に与える影響を推定することを目的とした。

珪化木は、三畳紀（約 2 億 5000 万年前～約 2 億 100 万年前）のマダガスカル産とアリゾナ産を購入し、微粒子にしてからメタノール抽出した。その結果、500g のマダガスカル産珪化木からは 202.6 mg（収率 0.04%）、アリゾナ産珪化木 200g からは 41.0 mg (収率 0.02 %)の抽出物が得られた。生物活性は、Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子破壊酵母 YNS17 株に対する生育回復活性を用いた。また、構造の同定には GCMS を用いた。琥珀の場合は、生成年代の長さに比例してポリマー化が進むので、メタノール抽出効率が悪くなるが、珪化木はいずれも琥珀よりは抽出効率が 50 倍以上低かった。また、YNS17 株に対して珪化木は、久慈産琥珀とは異なり生育阻止の活性を示し、その活性も 4 倍低かった。現在、活性物質を GCMS で分析している。

Fifteen kinds of novel norditerpenoids having biological activities against YNS17 strain are isolated only from the methanol extract of Kuji amber (MEKA). We think that the reason for this is related to the global environment around Kuji City during 90 million years (diagenesis). This study aimed to identify the biological activity and active compounds from silicified woods produced in a different age and environment from amber for estimating the effect of diagenesis on compounds in fossils. The methanol extracts from Madagascar and Arizona silicified woods in the Triassic period were obtained 202.6 mg (yield: 0.04%) and 41.0 mg (yield: 0.02%), respectively. The extraction efficiency of them showed more than 50 times lower than that of amber. Unlike Kuji amber, silicified wood showed growth inhibition activity against YNS17 strain, which was also four times lower. Biologically active compounds are being analyzed by GCMS.

silicified wood, mutant yeast, GCMS

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2C2p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C2 会場

動物性餌としてコオロギに認識される化合物の精製
Purification of factors recognized as carnivorous diets by crickets

○清家 瞳、永田 晋治（東大院新領域）
○Hitomi Seike, Shinji Nagata (The Univ. of Tokyo)

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* は、雑食性昆虫であり、体内の足りない栄養分を補償するように動物性餌あるいは植物性餌を選択的に摂食する。発表者の研究室で飼育しているコオロギは、動物性餌および植物性餌としてそれぞれキャットフード(CF)、ラビットフードを共に与えることで健全に生育する。しかしながら、動物性餌あるいは植物性餌を選択する際、コオロギが何を指標としているかは明らかにされていない。そこで、本研究ではフタホシコオロギにおいて動物性餌を選択的に摂食するメカニズムを明らかにすることを最終目的とし、まずはコオロギが動物性餌として認識している化合物を CF から精製単離することにした。昨年度の本大会では、フタホシコオロギの孵化幼虫を用いた、動物性餌を有意に選択する行動を指標とした生物検定系により、CF のメタノール抽出物および抽出残渣の両方に、顕著な生理活性が認めらたことを報告した。そこで、より強い生理活性を示す CF のメタノール抽出物から、活性を持つ化合物の単離精製を試みた。ODS カラムに CF のメタノール抽出物を供し、10%、50%、100%メタノール水溶液で溶出したところ、どの画分にも活性が認められなかった。一方、CF のメタノール抽出物を *n*-ヘキサン–酢酸エチル系のシリカゲルカラムに供し分画した結果、*n*-ヘキサン:酢酸エチル 1:1 の溶出画分に強い活性が認められた。以上のことから、フタホシコオロギが動物性餌を選択する際に指標としている化合物は、比較的疎水性の高い化合物であることが示唆された。

The two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*, an omnivorous insect, exhibits alternate feeding in dietary selection between carnivorous and herbivorous diets to meet its required nutrients. In our laboratory, cat food (CF) and rabbit food are used to feed experimental crickets as carnivorous and herbivorous diets, respectively. However, it has not yet been clarified what are the factors to be recognized as carnivorous diets in CF by crickets. In this study, we aim to purify these carnivorous factors from CF. According to a bioassay using 1st nymphs, the crude extract by methanol from CF exhibited significant recognition activities. That crude extract from CF was further purified using a normal-phase liquid chromatography by *n*-hexane and ethyl acetate. The factors recognized as a carnivorous diet by crickets were efficiently eluted by *n*-hexane: ethyl acetate (1:1) from the adsorbed crude methanol extract on the column. These results indicate that the carnivorous factors in CF were hydrophobic.

cricket, omnivorous, carnivorous factors

講演番号：2C2p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C2 会場

ハネカクシから初めて同定された (7*R*)-actinidine の生合成経路と生理活性

Biosynthetic pathway and its biological activity of (7*R*)-actinidine in rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae)

○高谷 佑生[1]、大畑 勇統[2]、丸山 宗利[3]、森 直樹[2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]九大博)
○Yu TAKATANI[1], Yuto OHATA[2], Munetoshi MARUYAMA[3], Naoki MORI[2] ([1]Fac. Agri., Kyoto Univ, [2]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ, [3]Kyushu Univ. Museum)

「ハネカクシ」とはコウチュウ目ハネカクシ科に属する昆虫で、動物界最大級の多様性を誇る。また、多様な二次代謝物質を産生することでも知られ、これまで様々な化合物が単離・同定されてきた。しかし、日本産 海浜性ハネカクシであるオオアバタウミベハネカクシ *Cafius vestitus* の分泌物質に関しては知見が乏しい。そこで、本種の主要分泌物質の同定を目指し研究を行った。

300 頭のハネカクシを酢酸エチル 50 mL に一晩浸し、分泌物を抽出した。濾過・濃縮乾固の後、粗抽出物 67.2 mg を得た。ヘキサン・酢酸エチルを展開溶媒とし、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行った。酢酸エチル 30 % 画分から黄色油状物質 5.2 mg を得た。これを NMR と GCMS 分析に供した。また、キラルカラムを用い、化合物の絶対立体配置を決定した。

NMR のスペクトルデータ、MS のフラグメントパターンおよびキラルカラムでの保持時間から、分泌物質の主要成分として (7*R*)-actinidine を同定した。天然物からの *R* 体報告は本報が初である。

安定同位体である glucose-1-^{13}C と mevalonic acid-2-^{13}C を用いたトレーサー実験を行い、actinidine の生合成経路と経時変化を調べた。また、細菌・真菌に対する抗菌試験を行った。

Rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae), one of the largest beetle families, comprise more than 63,600 species. Many rove beetles possess abdominal defensive glands for chemical defense. In this study, actinidine was isolated and identified from rove beetles, *Cafius vestitus* (Coleoptera: Staphylinidae). Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and nuclear magnetic resonance analyses confirmed actinidine produced these rove beetle species. Additionally, using a chiral GC/MS analysis revealed that the compound is (+)-(7*R*)-actinidine, marking its first discovery in natural products. Glucose-1-^{13}C and mevalolactone-2-^{13}C were fed to *C. vestitus* to elucidate the actinidine biosynthesis pathway. In addition, the bioactivity against bacteria and fungi was examined.

Chemical ecology, Rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae), (+)-(7*R*)-Actinidine

発表責任者：森 直樹（mori.naoki.8a@kyoto-u.ac.jp）

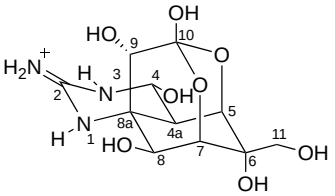
講演番号：2C2p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C2 会場

オキナワフグ(*Chelonodon patoca*)由来の新規テトロドトキシン類縁体の単離、構造決定(2)

Isolation and structural elucidation of a new tetrodotoxin analogue from the pufferfish *Chelonodon patoca* (2)

○青沼 栞里[1]、工藤 雄大[2,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]東北大学際研)
○Shiori AONUMA[1], Yuta KUDO[2,1], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[1]
([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】テトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX, **1**)は強力な神経毒で食中毒原因物質である。海洋生物ではフグ、カニ、ヒラムシなど、陸上生物ではイモリなどの両生類に分布しているが、その生合成経路は未解明である。当研究室では、フグやイモリ[1)]から TTX 関連化合物を探索、構造決定することで TTX 生合成経路を推定し、海洋では TTX は二環性スピロ-グアニジノ化合物から段階的な酸化により生合成されると提唱した[2)]。また、9-*epi*TTX など 9-*epi* 型の TTX 関連化合物を同定し、TTX 生合成のシャント経路が示唆された[3)]。本研究では昨年度[4)]に引き続き新規 TTX 類縁体を探索し、単離、構造決定を行った。



TTX (**1**)

【方法】HR-LC-MS を用いて、オキナワフグ(*Chelonodon patoca*)皮膚の希酢酸抽出物から新規 TTX 類縁体を探索した。候補化合物を活性炭、イオン交換樹脂、HILIC、RP-LC により、約 13 μg 単離し、各種 NMR スペクトル(^{1}H, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY 1D)を測定して構造を解析した。

【結果】本化合物は HR-MS データで決定した分子式から新規 TTX 類縁体であることが推定された。^{1}H NMR、2D NMR スペクトルでシグナルを帰属し、化学シフトや NOE を既報の TTX 類縁体と比較した結果、本化合物は 5,6,11-trideoxyTTX の 1 種であると考えられた。また、安定性試験により既知の 5,6,11-trideoxyTTX およびその 4-*epi* 体と平衡関係にあることが判明した。これまで推定した TTX 生合成経路から考察すると、本化合物は TTX 生合成におけるシャント化合物であると予想された。

Tetrodotoxin (TTX) is a potent neurotoxin. We have identified several TTX analogues from pufferfish to predict a biosynthetic pathway of TTX in marine environments. Based on their chemical structures, TTX is assumed to be biosynthesized from the bicyclic spiro-guanidino compounds via a multi-step oxidation process. Recently, we reported 9-*epi* type TTX analogues and proposed a shunt pathway of TTX biosynthesis. In this study, our search for novel TTX analogues using HR-ESI-HILIC-LC-MS resulted in identifying another new TTX analogue from the pufferfish *Chelonodon patoca*. This compound was predicted to be an additional shunt product in TTX biosynthesis.

【References】1) Kudo Y., Yotsu-Yamashita, M. *et al*., *Org. Lett.*, **2021**, *23*, 3513–3517. 2) Ueyama N., Yotsu-Yamashita M. *et al*., *Chem. Eur. J*., **2018**, *24*, 7250-7257. 3) Yaegashi Y., Yotsu-Yamashita M. *et al*., *J. Nat. Prod.* **2022**, *85*, 2199–2206. 4) 青沼、山下ら、2023 年度日本農芸化学会大会要旨集

tetrodotoxin, structural elucidation, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

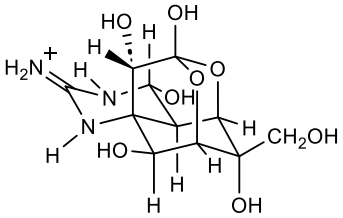
講演番号：2C2p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C2 会場

日本産二枚貝のテトロドトキシンの定量と類縁体の同定

Quantitation of tetrodotoxin and identification of its analogues in two species of bivalves collected in Japan

○松井 蘭丸[1]、八巻 慶汰[1]、工藤 雄大[2,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大学際研)
○Ranmaru MATSUI[1], Keita YAMAKI[1], Yuta KUDO[2,1], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】テトロドトキシン（tetrodotoxin, TTX）は，フグ毒として知られる神経毒であるがカニ、巻貝、タコ、ヒラムシなど広く海洋生物および陸上のイモリ、カエルなど両生類に分布する。近年、ヨーロッパ、ニュージーランド、中国および日本で、食用として重要な二枚貝からも低濃度の TTX が検出されており[1-5]、注目を集めている。二枚貝中の TTX 類縁体の報告もあるが、HR-LCMS などで明確に同定した例はまだない。TTX 類縁体の同定は、二枚貝の TTX の起源探索に情報を与えると期待される。本研究では日本の二種の二枚貝の TTX の濃度を定量するとともに、TTX 類縁体の同定を詳細に検討した。



tetrodotoxin (TTX)

【方法・結果】北および東日本の 3 カ所で 2023 年 8 月に採集された養殖ホタテガイ及び同年 1 月および 9 月に採集されたアカザラガイの中腸腺を、1% 酢酸で加熱抽出し、ヘキサン分配後、二種の担体で順次精製し、LC-蛍光分析および LC-MS/MS, HR-LCMS に供して、TTX の定量および類縁体の探索を行った。その結果、どの個体からもほぼ食用に問題ないレベルの TTX が検出されたが、ホタテガイよりアカザラガイの TTX 濃度が高く、さらにアカザラガイでは 1 月よりも 9 月に高かった。TTX 類縁体としては、両方の二枚貝から 5,6,11-trideoxyTTX 関連化合物を同定し、アカザラガイからはさらに monodeoxyTTX を同定した。なお、これらの二枚貝の麻痺性貝毒は規制値以下であった。

Tetrodotoxin (TTX) is a potent neurotoxin distributed in wide-range of marine animals. Recently, low concentration of TTX was detected in bivalve mollusks in Europe, New Zealand, China and Japan[1-5]. In this study, we quantified TTX and clearly identified TTX analogues in the hepatopancreas of the Japanese scallops and Akazara scallops collected in northern and eastern Japan using LC-fluorescent detection and LCMS. As a result, almost all TTX levels were low enough to be safe to eat. 5,6,11-trideoxyTTX related compounds were identified in both tested bivalves. In addition, a monodeoxyTTX was identified in Akazara scallop using HR-LCMS.

[References] 1) S. Numano, M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, *Mar. Drugs,* **2019**, *17*, 653. 2) M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, *Mar. Drugs,* **2013**, *11*, 2799–2813. 3) M. Qian, X. Su, *et al.*, *Food Chem.,* **2024**, *434*, 137493. 4) P. Anntonelli, A. Peruzzo, *et al.*, *Chemosphere,* **2023**, *339*, 139682. 5) S. Yasukawa, S. Itoi, *et al.*, *Mar. Biotechnol.,* **2023**, *25*, 666–676.

tetrodotoxin, bivalves, LCMS

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2C2p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C2 会場

致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の新規類縁体の推定構造

The possible structure of a new analogue of polycavernoside, the causative toxin of the lethal seaweed poisoning

○青木 玲翔[1]、岩崎 浩太郎[2]、佐々木 理[2]、川島 悠岐[2]、工藤 雄大[3,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、佐々木 誠[2]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院生命科学、[3]東北大学際研)
○Reika AOKI[1], Kotaro IWASAKI[2], Satori SASAKI[2], Yuki KAWASHIMA[2], Yuta KUDO[3,1], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Makoto SASAKI[2], Mari YOTSU-YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ. Agri, [2]Tohoku Univ. Life Science, [3]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】ポリカバノシド A, B（PA, PB）は、グアムで発生した紅藻カタオゴノリ *Gracilaria edulis* による致死性食中毒の原因物質であり [1)]、数種の類縁体が存在する(右図)。藍藻からも類縁体が報告されているが [2)]、自然界での分布、毒性発現機構、構造活性相関についてさらに解明する必要がある。本研究では、ポリカバノシド類の未知類縁体の単離、構造決定を行うことを目的とした。

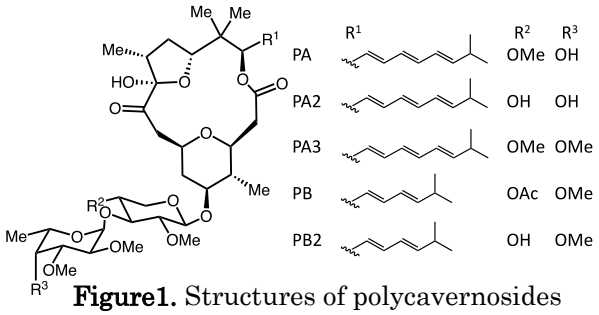


Figure1. Structures of polycavernosides

【方法・結果】2002 年フィリピン産 *G. edulis* より [3)]、ポリカバノシド類を抽出し、LC-MS/MS で未知類縁体を探索し、分子式、MS/MS フラグメント、UV 吸収が PB と一致する類縁体(PB')の存在が示された。PB'を溶媒分配、順相、逆相レジンでの分画、および逆相 LC で単離を試みたが、極微量しか得られず NMR は測定したが、詳細な構造決定は困難であった。しかし、PB'は PB の側鎖の一部のみ変化した構造を有すると推定された。そこで、佐々木らの PB の全合成 [4)]における合成中間体を用いて、推定した PB'を合成した。その結果、合成した推定 PB'と天然 PB'の LC/MS での保持時間が一致し、PB'は推定した構造をもつと考えられた。

Polycavernosides were identified as the causative toxins of the fatal food poisoning caused by ingestion of the red alga *Gracilaria edulis*.[1)] Cyanobacterial origin of polycavernosides has been suggested. [2)] In this study, we detected a new analogue of polycavernoside B (PB') from *G. edulis* collected in the Philippines [3)] using LC-MS/MS. However, elucidation of the structure using NMR was difficult due to the trace amount of the isolated PB'. Therefore, we attempted to synthesize the predicted structure of PB' from the synthetic intermediate of PB reported by Sasaki *et al.* [4)] As a result, the retention times of the synthetic and natural PB' were identical on LC/MS chromatograms, supporting the predicted structure of PB'.

【参考文献】1) Yotsu-Yamashita, M., Yasumoto, T. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1147−1148. 2) Navarro, G., Gerwick, W. H. *et al*., *Environ. Sci. Technol. Lett*. **2015**, *2*, 166−170. 3) Yotsu-Yamashita, M., Yasumoto, T. *et al*., *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1265−1271. 4) Iwasaki, K., Sasaki, M. *et al*., *J. Org. Chem*. **2017**, *82*, 13204−13219.

polycavernoside, structural elucidation, red alga

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2C2p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 C2 会場

ショウガから単離した新規含窒素ラブダン型ジテルペン類の構造解析

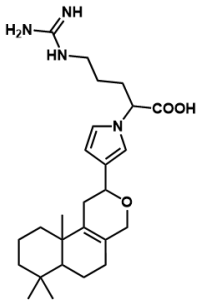
Structure Determination of New Nitrogenous labdane-type diterpenes from *Zingiber officinale*

○武永 朋巳[1]、大坪 弘樹[1]、藤本 崇[2]、筒井 歩[3]、藤田 智之[3] ([1]信州大院総合理工、[2]明星大理工、[3]信州大農)
○Tomomi Takenaga[1], Hiroki Otsubo[1], Takashi Fujimoto[2], Ayumi Tsutsui[3], Tomoyuki Fujita[3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, [2]The Univ. of Meisei, [3]The Univ. of Shinshu)

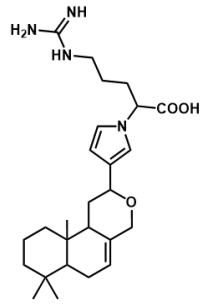
［目的］中生姜に分類される千葉県産三州生姜のメタボローム解析において、特徴的な成分として分子式 $C_{26}H_{40}N_4O_3$、$C_{26}H_{44}ON_4O_3$ および $C_{24}H_{36}N_2O_5$ を有する化合物の存在が示唆された。いずれも新規化合物と予想される分子式であり、これらの成分が三州生姜の保温効果に寄与しているのではないかと考え、成分検索を行った。これまでに複数の生姜品種にこれらの成分が含まれていることを確認し、高知県産三州生姜と同大生姜から化合物 **1** と **2** を単離し、構造決定した[1)]。本研究では関連化合物の単離を試みたので報告する。

［方法］高知県産大生姜をエタノールに浸漬し、エタノール抽出液を得た。抽出液を濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、水飽和ブタノールで順次液−液分配抽出し、各抽出物を得た。LC/MS 分析における m/z 457, 475, 431 の各分子イオンピークを指標として酢酸エチル抽出物を分画し、化合物 **3**−**5** を得た。

［結果］HR-ESITOF-MS 及び各種 NMR 分析によって化合物 **3** は化合物 **2** と同じ分子式を有し、12 位の置換基の立体化学が異なる化合物 **2** のジアステレオマーであると決定した。また、化合物 **4** は化合物 **1** よりも酸素原子が 1 個多く、化合物 **1** の 13 位に水酸基が付加した構造であると推定した。化合物 **5** は、化合物 **1** のアルギニン側鎖の代わりにアスパラギン側鎖が結合した構造であると決定した。いずれも新規化合物であり、ラブダン型ジテルペンとアミノ酸の糖化様反応生成物であると推察した。



化合物**1**



化合物**2**

In order to search for some nitrogenous compounds that were suggested to exist by metabolome analysis of Sanshu ginger extract, EtOH extract of large ginger from Kochi Prefecture were fractionated using LC/MS analysis for the molecular ion peaks of the molecular formula $C_{26}H_{40}N_4O_3$. Two new compounds **1** and **2** were isolated and their structures were determined as a labdane-type diterpene possessing a pyrrole ring and arginine side chain. [1)] In this study, we attempted to isolate related compounds from the same extract. The EtOAc extract was fractionated using the molecular ion peaks of *m*/*z* 457, 475, and 431 in LC/MS analysis to obtain compounds **3**-**5**. Their structures were elucidated by HR-ESITOF-MS and NMR analyses. Compound **3** is a diastereoisomer of **2** at the position of C-12, and **4** has a hydroxyl group at C-13 of **1**. Compound **5** has an asparagine side chain instead of the arginine moiety **1**. All of these compounds are new compounds, and are presumed to be glycated products of labdane-type diterpene and amino acid.

Reference: 1) T. Takenaga, *et al*, The 66th TEAC in Okinawa, Abstracts, p. 131-133 (2022)

Ginger, Rhizome, Labdane-type diterpene

発表責任者：藤田智之（tfujita@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C2p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 C2 会場

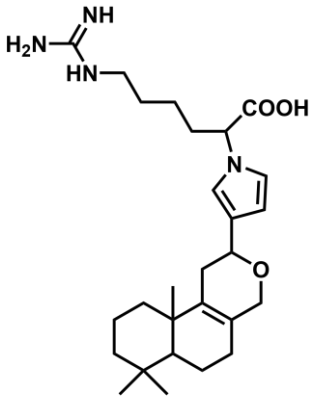
ショウガから単離した新規ラブダン型ジテルペノイドの生成機構の解明

Elucidation of the production mechanism of new labdane-type diterpenoids isolated from ginger

○村上 智拓[1]、武永 朋巳[2]、大坪 弘樹[2]、筒井 歩[1,2]、藤田 智之[1,2] ([1]信州大農、[2]信州大院総合理工)
○Tomohiro Murakami[1], Tomomi Takenaga[2], Hiroki Otsubo[2], Ayumi Tsutsui[1,2], Tomoyuki Fujita[1,2]
([1]Shinshu Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shinshu univ.)

［目的］これまでに千葉県産三州生姜と高知県産大生姜の根茎からピロール環を有する化合物 **1** を含む 5 種の新規ラブダン型ジテルペノイド化合物を単離し、それらの構造を決定した。これらの化合物は構造的特徴として、ラブダン骨格とピロール環及びアミノ酸側鎖を有しており、ショウガ科植物に含まれるラブダン型ジテルペンの一つ miogadial とアミノ酸との糖化様反応生成物であると推定した。そこで、本研究では金時生姜から単離した miogadial とアルギニン（Arg）を反応させ、**1** の生成機構の解明を試みた。

［方法］愛知県産乾燥金時生姜をアセトンに浸漬し、アセトン抽出液を得た。抽出液を濃縮後、酢酸エチルと水で液-液分配抽出を行い、酢酸エチル層を得た。酢酸エチル層を各種カラムクロマトグラフィーに供し、miogadial を得た。得られた miogadial（1 eq）と Arg（3 eq）をエタノールと水の混合溶媒（2:1）中、30℃で反応させ、複数の生成物を得た。各成分を ODS カラムクロマトグラフィーで精製し、構造解析を行った。



Compound **1**

［結果］反応液を経時的に HPLC 分析に供したところ、複数のピークとともに大生姜から得られた化合物 **1** の生成を確認した。各成分を ODS カラムクロマトグラフィーで精製し、4 つの成分を単離した。いずれもピロール環を有し、miogadial の 1,4-ジアール構造と 1 級アミノ基との Paal-Knorr 型のピロール化によって生成することが示唆された。また、溶媒の付加体及び脱プロトン型のピロール環化体といった副生成物を単離した。現在、各化合物の詳細な構造解析を進めている。

Five new labdane-type diterpenoids with a pyrrole ring were isolated from large ginger rhizomes and their structures were determined on the basis of their spectral data. These compounds had a labdane skeleton, a pyrrole ring, and an amino acid side chain. It is assumed that this is glycation products of miogadial and amino acids. First, the acetone extract of Kintoki ginger was subjected to various column chromatography to obtain miogadial. Then miogadial (1 eq) and Arg (3 eq) were reacted at 30°C in EtOH and H_2O (2:1) to obtain some reaction products. Reaction mixture was separated by ODS column chromatography. All of them have a pyrrole ring, and it was suggested that they are produced by Paal-Knorr type pyrrole reaction between the 1,4-dial moiety of miogadial and the primary amino group of Arg.

Ginger, Labdane-type diterpene, Biosynthesis

発表責任者：藤田智之（tfujita@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C2p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 C2 会場

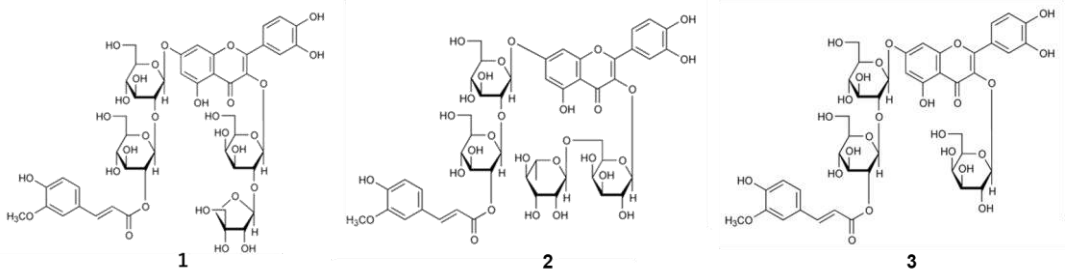
マウンテンキャビア由来新規アシル化フラボノイド配糖体の化学構造および DPP-IV 阻害活性
Novel mountain caviar-derived acylated flavonoid glycosides with DPP-IV inhibitory activities.

○竹田 翔伍[1]、下田 博司[1]、萬瀬 貴昭[2]、森川 敏生[2,3] ([1]オリザ油化株式会社、[2]近畿大・薬総研、[3]近畿大・アンチエイジングセ)
○Shogo TAKEDA[1], Hiroshi SHIMODA[1], Yoshiaki MANSE[2], Toshio MORIKAWA[2,3] ([1]Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd., [2]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [3]Antiaging Center, Kindai Univ.)

【目的】マウンテンキャビアはホウキギ (*Kochia scoparia*) の果実であり，中国では「地膚子（ジフシ)」と呼ばれ，利尿や強壮，抗掻痒作用を目的に用いられてきた。Yoshikawa らは，マウンテンキャビア抽出物のブタノール分画から momordin Ic をはじめとする各種サポニンを単離し，ラットにおける血糖値やアルコールの吸収抑制作用を報告している。[1)] また，著者らも momordin Ic のマウスやヒトの糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用や，Caco-2 形成小腸上皮モデルおよびマウス小腸刷子縁膜へのグルコース取り込み抑制作用を見出している。[2)] 今回，マウンテンキャビア抽出物の水分画の成分研究を実施し，新規アシル化フラボノイド配糖体を含む各種フラボノイド配糖体を単離したので報告する。

【方法・結果】水分画を ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC によって順次分離精製し，3 種の新規アシル化フラボノイド配糖体 (**1-3**) を単離した。**1-3** の化学構造は NMR，高分解能 ESI-MS スペクトルの詳細な解析および分解反応により，下図のように決定した。**1-3** について，インクレチン分解酵素 DPP-IV の阻害活性を評価した結果，**1-3** 全てに濃度依存的な活性が認められた (IC_{50} 1: 66.6 μg/mL, 2: 67.7 μg/mL, 3: 63.2 μg/mL) 。

Kochia scoparia extract and momordin Ic which is contained in the butanol fraction suppress blood glucose elevation in mice and human. However, there had been no studies on the constituents in water soluble fraction. Therefore, we conducted a chemical study of this fraction. The water soluble fraction was sequentially separated and purified by ODS column chromatography and HPLC to isolate three novel acylated flavonoid glycosides (**1-3**). The chemical structures of **1-3** as shown in a below figure were determined by analysis of NMR, high-resolution ESI-MS spectra and degradation reactions. The inhibitory activity of **1-3** on DPP-IV, which decomposes incretin, was evaluated and a concentration-dependent activity was observed for **1-3** (IC_{50} 1: 66.6 μg/mL, 2: 67.7 μg/mL, 3: 63.2 μg/mL).



1) Yoshikawa M. et al., *Chem. Pharm. Bull*., 45, 1300-1305 (1997).
2)下田博司ら，日本薬学会第 143 年会，26P1-am1-054 (2023).

Kochia scoparia, flavonoid glycoside, DPP-IV

講演番号：2C2p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 C2 会場

米由来新規アシル化グルコシルセラミドの化学構造および表皮保湿作用

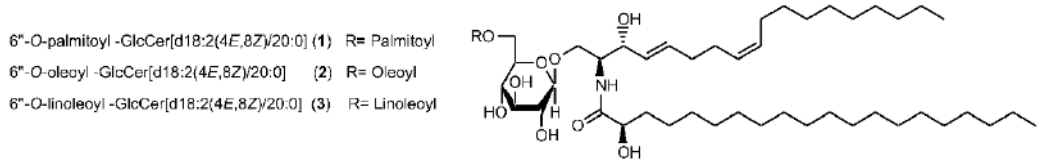
Novel rice-derived acylated glucosylceramides with epidermal moisturizing effect

○米田 朱里[1]、竹田 翔伍[1]、萬瀬 貴昭[2]、下田 博司[1]、森川 敏生[2,3] ([1]オリザ油化株式会社、[2]近畿大・薬総研、[3]近畿大・アンチエイジングセ)
○Akari YONEDA[1], Shogo Takeda[1], Yoshiaki Manse[2], Hiroshi Shimoda[1], Toshio Morikawa[2,3] ([1]Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd, [2]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [3]Antiaging Center, Kindai Univ.)

演者らはこれまでに, 米油副産物から複数のグルコシルセラミド (GlcCer) およびセラミド (Cer) を単一分子種として単離し，表皮保湿作用の構造活性相関や作用機序を明らかにしている [1,2)] 。その研究過程で Cer と共存する未知成分の存在が示唆されていた。そこで本研究では，これら成分の単離・構造解析を行った。米油パイプロダクト（ガム質）から粗精製した GlcCer, Cer 高含有分画をシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィー，C18 および C30 分取 HPLC で精製することによって，新規アシル化 GlcCer (**1**–**3**) を単離した。各種物理化学的手法による構造解析から **1**–**3** の構造を，それぞれ 6''-*O*-palmitoyl-GlcCer[d18:2(4*E*,8*Z*/20:0)] (**1**)，6''-*O*-oleoyl-GlcCer[d18:2(4*E*,8*Z*/20:0)] (**2**) および 6''-*O*-linoleoyl-GlcCer[d18:2(4E,8Z/20:0)] (**3**) と決定し，それぞれ Oryzaceramide A-C と命名した。また，**1-3** の表皮保湿作用をヒト表皮 3D モデルを用いて評価した結果, **1** のみが 10 μM で有意に経皮水分蒸散量を低下させた。本研究で得られた **1-3** は新規化合物であり，これらのうち **1** は米由来 GlcCer 分画の保湿作用に寄与している可能性が示された。

We have so that isolated several types of glucosylceramides (GlcCer) and ceramides (Cer) as the single molecules from gummy by-products of the rice bran oil manufacturing process. Furthermore, we clarified their structure-activity relationship and mechanism of epidermal moisturizing effect. In the course of researches, unknown components were suggested to co-exist with Cer fraction. Therefore, we conducted isolation and structural analysis of these components. As a result, novel acylated GlcCer (Oryzaceramide A-C, **1**–**3**) were isolated by silica gel column chromatography and ODS preparative HPLC from the rice-derived GlcCer fraction. The structures of **1**–**3** were determined as follows: 6''-*O*-palmitoyl-GlcCer[d18:2(4*E*,8*Z*/20:0)] (**1**), 6''-*O*-oleoyl-GlcCer[d18:2(4*E*,8*Z*/20:0)] (**2**) and 6''-*O*-linoleoyl-GlcCer[d18:2(4*E*,8*Z*/20:0)] (**3**) respectively, using various physicochemical methods. In addition, we evaluated the epidermal moisturizing effect of **1-3**, and **1** significantly decreased the transepidermal water loss at 10 μM. In this study, we isolated and identified three novel acylatedGlcCer (**1-3**) from the rice-derived GlcCer fraction and **1** was suggested to contribute to the epidermal moisturizing effect.

［文献］1) Shimoda H., *et al.* (2023) *Glycative Stress Res.*, **10**, 94-109. 2) Takeda S., *et al.* (2023) *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 83.



Chemical Structure of novel acylGlcCer (**1-3**)

Novel acylated Glucosylceramides, Ceramides, The transepidermal water loss

発表責任者：米田　朱里（kaihatsu@mri.biglobe.ne.jp）

講演番号：2C3a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 C3 会場

Acinetobacter 属細菌の 2-フェノキシアセトフェノン変換を担う酵素遺伝子の同定
Identification of the gene responsible for 2-phenoxyacetophenone conversion in an *Acinetobacter* strain

○中川 永理[1]、羽部 浩[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大院・創域理工、[2]産総研・環境創生)
○Hirari Nakagawa[1], Hiroshi Habe[2], Toshiki Furuya[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]EMRI, AIST)

【背景・目的】植物の細胞壁に存在するリグニンは、芳香族化合物がエーテル結合により連結した高分子で、再生可能資源として注目されている。リグニンの低分子化による高度利用に向けて、エーテル結合を効率的に切断する技術の開発が望まれている。我々はこれまでに、細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* TUS-SO1 株がリグニンモデル化合物である 2-フェノキシアセトフェノン（2-PAP）のエーテル結合を酸化的に切断することを明らかにしている[1)]。本研究では、TUS-SO1 株の 2-PAP 変換を担う酵素およびその遺伝子を解析した。
【方法・結果】まず、TUS-SO1 株の 2-PAP 変換を担う成分の局在と変換に必要な化合物を解析した。反応液を HPLC により分析したところ、2-PAP 変換活性は無細胞抽出液中に検出され、当該活性には NADPH が必要なことが明らかとなった。これより、2-PAP 変換を担う成分は NADPH 依存性酸化酵素であることが推測された。さらに、TUS-SO1 株のゲノム配列情報を活用し、当該活性をコードすると予想される複数の候補遺伝子を大腸菌内で発現させ、2-PAP 変換活性を評価した。その結果、Baeyer-Villiger monooxygenase ファミリーに属する酵素の 1 つに当該活性が検出された。

Lignin is a heterogeneous aromatic polymer that forms plant cell walls and the second most-abundant organic substance on earth. Based on its abundance and composition, lignin has attracted attention as a renewable organic substance derived from plant biomass. We have found that *Acinetobacter calcoaceticus* TUS-SO1 oxidatively cleaves the ether bond of 2-phenoxyacetophenone (2-PAP), a lignin model compound.[1)] In this study, we analyzed the components responsible for 2-PAP conversion in strain TUS-SO1. 2-PAP-converting activity was detected in cell-free extracts by HPLC analysis, and NADPH was required for this activity. These results suggest that the component responsible for 2-PAP conversion is an NADPH-dependent oxidase. Furthermore, based on the genome sequence of strain TUS-SO1, we expressed candidate genes for such activity in *Escherichia coli* and assayed 2-PAP-converting activity of the gene products. As a result, the activity was detected in one of the enzymes belonging to the Baeyer-Villiger monooxygenase family.

1) Oya S, Tonegawa S, Nakagawa H, Habe H, Furuya T, Sci Rep, 12, 2874 (2022).

Acinetobacter, biodegradation, lignin

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2C3a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 C3 会場

糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子発現に関わる転写因子の機能分類
A functional classification of the transcriptional factors involved in cellulase and hemicellulase genes expression in the fungus *Talaromyces cellulolyticus*
○藤井 達也、森田 友岳（産総研・機能化学）
○TATSUYA FUJII, TOMOTAKE MORITA (AIST RISC)

バイオエコノミー社会の実現に向け原料確保は喫緊の課題であり、バイオマスを効率的に糖化する技術が求められている。我々は、高効率にバイオマスを糖化可能な糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子の発現に関わる転写因子について解析を進めてきた。これまでに、既知の転写因子に相同性を示す遺伝子、および糖化酵素の生産条件下で高発現していた転写因子の遺伝子を取得し（20 個）、それぞれの遺伝子破壊株を解析することにより、各因子の機能を明らかにした。

今回、他の糸状菌での機能との違いを基準に分類した結果、本菌の各因子は、他の糸状菌と同様の機能を有する XlnR・CreA・Hap complex・ClrB（グループ 1）、本菌では糖化酵素遺伝子の発現を誘導するが他の糸状菌では抑制または関与しない Ace1・Ctf1B（グループ 2）、本菌では発現に関わらないが他の糸状菌では誘導する ClbR・BglR・LaeA・McmA（グループ 3）、の 3 つに分けられることが明らかとなった。これらのうちグループ 2 の因子は他の糸状菌とは異なる機能を有していることから、その制御メカニズムの詳細を明らかにすることにより、本菌と他の糸状菌との糖化酵素遺伝子の発現システムの違いを解明できると考えられた。

A stable supply of sugar sources by saccharification of lignocellulosic biomass is crucial for developing the bioeconomy. We have studied the expression mechanisms of cellulase and hemicellulase genes in the fungus *Talaromyces cellulolyticus*, which can hydrolyze cellulose and hemicellulose efficiently. Specifically, the function of 20 transcriptional factors that showed high similarity to those obtained in other fungi or expressed high levels under the cellulase-producing condition has been revealed.

In this study, the transcriptional factors were classified into three groups based on the functional difference from other fungi; group1: same function as those in other fungi (XlnR・CreA・Hap complex・ClrB), group2: inducers in *T. cellulolyticus*, but repressors or without involvement in other fungi (Ace1・Ctf1B), group3: without involvement in *T. cellulolyticus*, but inducers in other fungi (ClbR・BglR・LaeA・McmA). These results suggest that unique expression systems of cellulase and hemicellulase genes in *T. cellulolyticus* might be revealed by investigating the regulation mechanisms of the group 2 factors, Ace1 and Ctf1B.

cellulase, transcriptional factor, *Talaromyces cellulolyticus*

発表責任者：藤井達也（tatsuya.fujii@aist.go.jp）

講演番号：2C3a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 C3 会場

草食性陸ガニの生産するリグニン分解酵素群の解析
Lignin degradation enzymes from herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *Chiromantes dehaani*
○三宅 克英、北 健、水野 利春、鈴木 壱士（名城大理工）
○Katsuhide MIYAKE, Takeru KITA, Toshiharu MIZUNO, Itsushi SUZUKI (Meijo Univ.)

【背景及び目的】天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。これらの陸ガニ類は落ち葉や木片を食料として利用することが報告されている。これまでの生態観察から、このカニは落ち葉のような柔らかいバイオマスだけでなく、固い切り株なども食料にしている可能性があり、バイオマス有効利用のボトルネックとなっている難分解性リグニン類の分解能力を持っているものと期待している。本研究の目標は、これまで有用生物資源として省みられることのなかった陸ガニ類のバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることである。今回はリグニン分解酵素の候補として RNA-seq 解析で検出したアカテガニ由来 24131 ラッカーゼとクロベンケイガニ由来 65040 ラッカーゼの機能解析を試みた。またもう一つの有力酵素であるグアヤコールパーオキシダーゼについての探索も試みた。
【結果及び考察】ラッカーゼ活性とグアヤコールパーオキシダーゼ活性をリグニン分解酵素の指標としたが、両者とも植物食で飼育したカニからのみ検出された。活性は植食性の強いクロベンケイガニの方が強く、植食性との強い相関を示した。RNA-seq 解析で検出したラッカーゼは大腸菌で生産し、2,6-ジメトキシフェノール（2,6-DMP）を基質として解析した。クロベンケイ由来 65040 の方が強い活性を示したが、十分な活性ではなかったため、*Pichia pastoris* での生産も行った。また、両ラッカーゼに共通の配列ペプチドを抗原として抗体を作製し、植物食による活性化についての解析を行った。アカテガニでの活性化には酵素の分解が関係している可能性が判明した。

Herbivorous land crabs such as *Chiromantes haematocheir* (Akate-gani) and *Chiromantes dehaani* (Kurobenkei-gani) show biomass degrading activities. The land crabs inhabit seaside forests in Japan. The crabs mainly consume plant material and its detritus. Therefore, they are expected to possess the ability to degrade the major components of biomass, cellulose and lignin in order to digest plant materials. In this study, we analyzed biomass-degrading activities of the land crabs, especially oxidation activities against guaiacol and 2,6-dimethoxyphenol (DMP), which seem to be related to lignin degradation. Guaiacol oxidation activity and 2,6-DMP oxidation activity were regarded as laccase activity and peroxidase activity, respectively. Both oxidation activities were detected mainly in the midgut gland of the crabs. These activities were remarkably induced by feeding plant diet to carbs. These oxidation activities might play an important role in the herbivorous behavior of land crabs. *C. dehaani* crabs showed higher activities than *C. haematocheir* crabs. This is consistent with the observation that *C. dehaani* crabs are more herbivorous than *C. haematocheir*. A *de novo* transcriptome assembly in midgut glands of *C. haematocheir* and *C. dehaani* crabs was performed by using RNA sequencing. We identified many laccase genes through BLASTx search against NCBI database.

lignin, land crab, biomass

発表責任者：三宅克英（miyake@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2C3a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 C3 会場

褐藻主要多糖アルギン酸からの油脂生産を目指した油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* におけるエキソ型アルギン酸リアーゼの細胞外発現

Extracellular expression of exo-type alginate lyase from oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce lipids from alginate, a major polysaccharide in brown macroalgae

北村 友香[1]、橋本 渉[2]、○河井 重幸[1] ([1]石川県立大、[2]京大院農)

Yuka KITAMURA[1], Wataru HASHIMOTO[2], ○Shigeyuki KAWAI[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景】海藻、特に褐藻からの油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* による油脂生産を目指している。これまで、褐藻の主要多糖アルギン酸の分解物 DEH の資化に必要な 4 つの遺伝子を *Y. lipolytica* に組み込んだ「代謝改変 Yli」による DEH からの油脂生産を確認している。DEH は、アルギン酸をエンド型アルギン酸リアーゼとエキソ型アルギン酸リアーゼで分解することで生成するモノウロン酸である。両リアーゼを代謝改変 Yli で細胞外発現させることで、プロセス統合化（CBP）によるアルギン酸からの油脂直接生産が可能になる。現在のところ、エンド型アルギン酸リアーゼの細胞外発現は確認している。本研究では、①エキソ型アルギン酸リアーゼの代謝改変 Yli での細胞外発現、②代謝改変 Yli の DEH 代謝能向上、③DEH からの油脂生産量向上を目指した。【結果】①3 つの異なる PL ファミリーに属する各エキソ型アルギン酸リアーゼの細胞外発現を試みたところ、細胞外に発現する当該酵素の存在を示唆する結果を得た。②DEH の資化に必要な 4 遺伝子の強発現させるための DNA カセットを Golden Gate 法で構築した。③油脂蓄積の向上が知られている遺伝子の欠失と導入を行った。

【Introduction】Our purpose is to produce lipids from marine macroalgae, in particular, brown macroalgae by using oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. We have demonstrated lipids production from DEH by utilizing bioengineered *Y. lipolytica* in which the 4 genes needed to assimilate DEH had been introduced. DEH is a monouronate that is formed after enzymatic digestion of alginate, a major polysaccharide in brown macroalgae, by endo- and exo-type alginate lyases. Extracellular expressions of the two lyases in the bioengineered yeast enabled us to directly produce lipids from alginate on the CBP, although we had detected an extracellular expression of endo-type one. In this study, we attempted to (i) extracellularly express exo-type alginate lyase, (ii) to improve the capability to metabolize DEH, and (iii) increase the production of lipids. 【Results】We obtained the evidence suggesting the extracellular expression of the exo-type alginate lyase among the tested 3 ones belonging 3 distinct PL families. We constructed the DNA cassette to overexpress the 4 genes needed for assimilation of DEH by using Golden Gate methodology. We introduced and deleted some genes known to increase lipid productions into and from the bioengineered yeast.

macroalgae, yeast, alginate

発表責任者：河井重幸（kawais@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C3a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 C3 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、上原 直己、江副 佑策、美野 将伴（福山大生命工）
○Hiroaki MATSUZAKI, Naoki UEHARA, Yusaku EZOE, Masatomo MINO (Fukuyama Univ.)

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。また、化石燃料の消費は大気中の二酸化炭素濃度の増加による地球温暖化を招く。そこで、化石燃料の代替燃料として、我々は遺伝子導入によりアルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にセルラーゼ生産能を付与し、セルロース系バイオマスからのバイオ燃料（バイオエタノール）の生産を目指している。本研究では、細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型とエキソ型のセルラーゼ（cenA と cex）、酵母 *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のβ-グルコシダーゼ（BGL1）、および酵母 *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチルセルラーゼ遺伝子 *CMC1*（cDNA)の 4 種類の酵素の生産能を付与することを検討した。*cenA* と *cex* の分泌発現プラスミド pHM1061 は、*cenA* と *cex* を *GAP* プロモーターと *MEL1* 分泌シグナル配列の下流に連結して構築した。また、*BGL1* 分泌発現プラスミド pHM1062 と *CMC1* 分泌発現プラスミド pSC7 は、各々 *BGL1* と *CMC1* を *GAP* プロモーターに連結して構築した。これらのプラスミドを導入した *S. cerevisiae* 三重形質転換体は、コンゴーレッド染色、MUC 発色法、および *p*-NPG 活性からエンド型とエキソ型のセルラーゼおよびβ-グルコシダーゼの分泌生産が確認できた。三重形質転換体は、紙をある程度分解できた。さらに、酵素生産の強化による紙の分解の向上や紙からのエタノール生産を検討している。

Recently, it is apprehensive to run out of the fossil fuel and global warming by consumption of the fossil fuel. We aim for production of bioethanol from cellulosic materials by breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae* using genetic engineering. In this study, we investigated production of four types of heterologous cellulolytic enzymes, endoglucanase cenA, exoglucanase cex, both from *Cellulomonas fimi*, β-glucosidase from *Saccharomycopsis fibligera*, and carboxymethylcellulase CMC1 from *Cryptococcus flavus* in *S. cerevisiae*. We constructed a plasmid pHM1061 for co-expression of *cenA* and *cex* with the *MEL1* signal sequence for secretion under the control of the *GAP* promoter. A plasmid pHM1062 and pSC1 for expression of *BGL1* and *CMC1* under the control of the *GAP* promoter were also constructed. A triple transformant of *S. cerevisiae* with these plasmids was produced and secreted those cellulolytic enzymes. Papers were partly degraded by the triple transformant.

cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

発表責任者：松崎 浩明（matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2C3a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 C3 会場

Microaerobic insights into production of polyhydroxyalkanoates containing 3-hydroxyhexanoate via native reverse ß-oxidation from glucose in *Ralstonia eutropha* H16

○KAI HEE HUONG, IZUMI ORITA, TOSHIAKI FUKUI (Tokyo Inst. of Tech.)

Background: *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator*) H16, a facultative chemolitoautotroph, is an important workhorse for bioindustrial production of useful compounds such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). Despite the extensive studies to date, some of its physiological properties remain not fully understood.

Results: In this study, we unveil that this knallgas bacterium exhibited an altered PHA production behaviors under slow-shaking, microaerobic condition. One of them was a notable increase in PHA accumulation, ranging from 3.0 to 4.5-fold in the mutants lacking of at least two NADPH-acetoacetyl-CoA reductases (PhaB1, PhaB3 and/or phaB2) when compared to their respective aerobic counterpart, suggesting the probable existence of (*R*)-3HB-CoA-providing route(s) independent on PhaBs. Interestingly, PHA production was still considerably high even with an excess nitrogen source under this regime.

The present study further uncovered the conditional activation of native reverse *β*-oxidation (rBOX) allowing formation of (*R*)-3HHx-CoA, a crucial precursor for poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-*co*-3HHx)], solely from glucose. This native rBOX led to the natural incorporation of 3.9 mol% 3HHx in a triple *phaB*-deleted mutant (Δ*phaB1*Δ*phaB1*Δ*phaB2-C2*). Gene deletion experiments elucidated that the native rBOX was mediated by previously characterized (*S*)-3HB-CoA dehydrogenases (PaaH1/Had), b-ketothiolase (BktB), (*R*)-2-enoyl-CoA hydratase (PhaJ4a), and unknown crotonase(s) and reductase(s) for crotonyl-CoA to butyryl-CoA conversion prior to elongation. The introduction of heterologous enzymes, crotonyl-CoA carboxylase/reductase (Ccr) and ethylmalonyl-CoA decarboxylase (Emd) along with (*R*)-2-enoyl-CoA hydratase (PhaJ) aided the native rBOX, resulting in remarkably high 3HHx composition (up to 37.9 mol%) in the polyester chains under the low-aerated condition.

Conclusion: These findings shed new light on the robust characteristics of *Ralstonia eutropha* H16 and have the potential for the development of new strategies for practical P(3HB-co-3HHx) copolyesters production from sugars under low-aerated conditions.

Ralstonia eutropha H16, polyhydroxyalkanoates, microaerobic cultivation

発表責任者：Toshiaki FUKUI（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2C3a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 C3 会場

水電気分解と気相閉鎖循環型リアクターを用いた *Ralstonia eutropha* 改変株による CO_2 からの共重合ポリヒドロキシアルカン酸生合成

Gas fermentation combined with water electrolysis for production of polyhydroxyalkanoate copolymers from CO_2 by engineered *Ralstonia eutropha*

○福居 俊昭[1]、Di Stadio Gabriele[1]、中村 龍平[2,3]、折田 和泉[1]（[1]東工大生命理工、[2]東工大地球生命研、[3]理研）
○Toshiaki Fukui[1], Gabriele Di Stadio[1], Ryuhei Nakamura[2,3], Izumi Orita[1]（[1]Tokyo Tech, [2]Tokyo Tech ELSI, [3]RIKEN）

H_2 の化学エネルギーで CO_2 を固定する水素細菌は高い増殖能・炭酸固定能を有し、CO_2 を原料とするバイオプロセスへの利用が期待されている。水素細菌 *Ralstonia eutropha*（*Cupriavidus necator*）は生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）生産菌としても知られている。我々は糖質を原料としてポリ(3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシヘキサン酸) 共重合体 [P(3HB-*co*-3HHx)]を生合成可能な改変株は、H_2-CO_2-O_2 混合ガス（8:1:1）を基質とした独立栄養培養においても P(3HB-*co*-3HHx)を生合成できることを示してきた (Tanaka et al., *Bioeng*., 2021; 2023)。

水素細菌を用いた H_2 と CO_2 からの物質生産では原料費の大部分を H_2 が占めると想定され、供給した H_2 を有効に物質変換に利用することが低コスト生産に向けて重要となる。本研究では爆発の危険性がない低濃度 H_2 (<4.5%) 混合ガスを循環させる閉鎖型バイオリアクターを用いた *R. eutropha* の独立栄養培養を行った。H_2 および O_2 は MnIrOx と Pt/C を触媒とした固体高分子膜型電解槽による水電気分解で供給し、循環ガス組成が一定となるようにガス供給をフィードバック制御した。*R. eutropha* P(3HB-*co*-3HHx)生産株を本培養系に供したところ、蓄積率 70 wt%で P(3HB-*co*-12 mol% 3HHx)を生産した。培養に供したガス量から供給 H_2 あたりの PHA 収率 63.4 %（水電解電力あたり 44.4 %）、熱力学的変換効率 10.7 %と求められ、水素細菌の高いエネルギー変換効率が示された。

Bioprocess platforms using hydrogen-oxidizing bacteria have been attracted as increasing attention for production of value-added compounds form CO_2. *Ralstonia eutropha* has been known as a facultative chemolithoautotroph as well as efficient producer of biodegradable polyhydroxyalkanoates (PHAs). In this study, a recycled-gas closed-circuit culture system was developed for safe autotrophic cultivation of *R. eutropha*, using a non-combustible gas mixture with low-concentration of H_2 (<4.5%) supplied by water electrolysis. Automated feedback regulation of gas flow enabled input of H_2, CO_2, and O_2 well balanced with the cellular demands, leading to constant gas composition throughout the cultivation. The engineered strain of *R. eutropha* produced poly(3-hydroxybutyrate-*co*-12mol% 3-hydroxyhexanoate) with a 70 wt% cellular content. The yields of biomass and PHA on input H_2 were determined to be 63.4 %, corresponding to 44.4% yield on electricity, highlighting the high energy conversion capability of *R. eutropha*.

Polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*, Gas fermentation

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2C3a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 C3 会場

食品加工残渣を用いたハロモナス属細菌による PHB 生産

PHB production by *Halomonas* sp. using food residues

○中島 亜純[1]、弘埜 陽子[1]、岡﨑 文美[2]、仲山 英樹[3]、原 清敬[1] ([1]静県大食栄、[2]三重大院生資、[3]長崎大)
○Azumi NAKAJIMA[1], Yoko HIRONO[1], Fumiyoshi OKAZAKI[2], Hideki NAKAYAMA[3], Kiyotaka HARA[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Mie Univ., [3]Nagasaki Univ.)

食品残渣は世界で年間約 13 億トン発生している。しかし、食品系バイオマスの再利用率は低く、利用を拡大し資源を循環する必要性が求められている。本研究では、寒天製造残渣に着目した。寒天抽出後のテングサ残渣はミネラルや糖類などの栄養源を豊富に含むものの、寒天による粘性が原因で利用が難しい。そこで多様な炭素源・窒素源を資化することに優れ、酸やアルカリによるバイオマス前処理物を中和した際に生じる塩にも耐性を有する中度好塩性細菌 *Halomonas* sp.を用いて、テングサ残渣から生分解性プラスチック素材であるポリヒドロキシ酪酸（PHB）の生産を試みた。具体的には、11 株の *Halomonas* sp.の中から、最も菌体収量および PHB 生産性の高い株を選抜した。なお、テングサ残渣はアルカリを加えてオートクレーブ抽出後、酸で中和処理をして利用した。テングサ抽出液に糖源および塩を添加した培地で最適培養条件を検討した結果、菌体収量が約 3 倍増加した。さらに、菌体収量の増加に伴って、PHB 生産性も向上した。選抜した *Halomonas* sp.はテングサ残渣を利用した PHB 生産が可能であり、食品残渣からの生分解性プラスチック生産への応用が期待できる。

About 1.3 billion tonnes of food residues are generated annually worldwide. However, the recycle rate of food biomass is low, suggesting the need to expand its use and recycle the resource. This study focused on agar production residues. Although the red algae after agar extraction is rich in nutritional sources such as minerals and sugars, its application as fertilizer is difficult due to the viscosity caused by the agar. We therefore attempted to produce PHB which is a biodegradable plastic material, from the red algae residue using the moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. which is excellent at producing useful compounds from a variety of carbon and nitrogen sources and is tolerant of the salt produced from pretreated biomass resources with acid or alkali. Eleven *Halomonas* sp. strains were compared and the strain with the highest growth and PHB productivity was selected. The red algae residue was extracted with alkali and autoclaved, then neutralized with acid and used for the culture medium. Optimum culture conditions were investigated on a medium containing a sugar source and salt added to the red algae extract, resulting in an approximately three-fold increase cell growth. PHB productivity increased with the growth. The selected *Halomonas* sp. is capable of producing PHB using sugar beet residues and is expected to be applied to produce a material of biodegradable plastics from food residues.

algae, plastic, recycle

発表責任者：原清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2C3a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 C3 会場

東南アジア原産リグノセルロース系バイオマスを原料とした PHB 生産

PHB production from lignocellulosic biomass native to Southeast Asia

○荒井 隆益[1]、藍川 晋平[1]、Sudesh Kumar[2]、Fazita MR Nurul[2]、Cheu Peng Leh[2]、Haafiz MK Mohamad[2]、Guan Seng Tay[2]、小杉 昭彦[1] ([1]国際農研、[2]マレーシア理科大)
○Takamitsu Arai[1], Shimpei Aikawa[1], Kumar Sudesh[2], Nurul Fazita MR[2], Leh Cheu Peng[2], Mohamad Haafiz MK[2], Tay Guan Seng[2], Akihiko Kosugi[1] ([1]Japan International Research Center for Agricultural Sciences, [2]School of Biological Sciences, Universiti Sain Malaysia)

【目的】リグノセルロース系バイオマスは、環境に優しいバイオポリマーであるポリヒドロキシ酪酸（PHB）を合成するための貴重な再生可能な原料である。本研究では、新たに分離した菌株を用いて、発酵阻害物質、特に 5-HMF と酢酸が菌株に与える影響を調べるとともに、酵素加水分解したオイルパーム廃棄木からの効率的な PHB 生産条件について報告する。
【方法と結果】日本の土壌から E5-3 株を分離し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定により *Burkholderia ambifaria* strain E5-3 と同定した。この菌株は、37℃、初期 pH9 で最適生育を示し、キシロース、グルコース、スクロース、グリセロール、セロビオース、そして特にパーム油を含む幅広い炭素基質を処理する多様な代謝能力を示した。本菌株は、リグノセルロース加水分解物由来の発酵阻害物質に対して固有の耐性を示し、3 g/L 5-ヒドロキシメチルフルフラールおよび 1.25 g/L 酢酸に耐性を示した。グルコース、セロビオース、キシロースを含む混合糖液を用いバッチ培養を行ったところ炭素カタボライトリプレッション（CCR）が観られた。1 回に加える混合糖液の量を抑えたフェドバッチ培養を行ったところ、バッチ培養よりも PHB 収量が高く、CCR も最小であった。オイルパームの幹の加水分解物を、阻害剤による前処理なしで、フェドバッチ発酵を行ったところ、乾燥菌体含量が 10g/L、PHB 含量 45wt%となり、細胞が著しく増殖した。

[Purpose]Lignocellulosic biomass is a valuable source for eco-friendly polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis. This study examines the impact of fermentation inhibitors, specifically 5-HMF and acetic acid, on newly isolated strains, and explores conditions for efficient PHB production from enzymatically hydrolyzed oil palm waste wood.
[Methods and results] Strain E5-3, identified as Burkholderia ambifaria, was isolated from Japanese soil. It exhibited optimal growth at 37°C and pH 9, displaying a versatile metabolic capacity for various carbon substrates, including xylose, glucose, sucrose, glycerol, cellobiose, and palm oil. The strain demonstrated resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors, tolerating 3 g/L 5-hydroxymethylfurfural and 1.25 g/L acetic acid. Batch culture with mixed sugar solutions revealed carbon catabolite repression (CCR), which decreased with a reduced amount of added mixed sugar solution, leading to higher PHB yield. Fed-batch fermentation of oil palm stem hydrolysate, without inhibitor pretreatment, achieved significant cell growth (10 g/L dry bacterial weight) and PHB content of 45%.

Lignocellulosic biomass, Polyhydroxybutyrate, Fermentation inhibitor

講演番号：2C3a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 C3 会場

非プロトン性ポリエーテルによる微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸の分子量低下効果の解析

Downregulation of molecular weight of polyhydroxyalkanoate by aprotic polyesters provides an insight into the mechanism of action of chain-transfer agents

○田中 聖也[1]、蜂須賀 真一[2]、菊川 寛史[2]、松本 謙一郎[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Seiya TANAKA[1], Shin-ichi HACHISUKA[2], Hiroshi KIKUKAWA[2], Ken’ichiro MATSUMOTO[2] ([1]CSE.Hokkaido univ, [2]ENG.Hokudai univ)

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物が生産する生分解性プラスチックであり、PHA 合成酵素 PhaC により合成される。PHA の物性に影響を与える因子の 1 つとして分子量が挙げられる。PhaC による重合は開始反応，ポリマー伸長，停止反応の 3 ステップからなり，分子量は停止反応のタイミングによって決定されると考えられている。PHA を生合成する際に、培養系にジエチレングリコール(DEG)のような水酸基を持つ化合物を添加することで, 得られる PHA の分子量が低下することが知られている。本研究では DEG の構造に着目し，DEG に類似した構造を持ち，構造中に水酸基を持たないポリエーテル化合物を添加して PHA を合成し、分子量の解析を行った 。サイズ排除クロマトグラフィーにより，得られたポリマーの分子量を測定した結果，DEG を添加した条件では，先行研究の通り，分子量が低下した。一方で，水酸基を持たないポリエーテルを添加した条件においても，得られるポリマーの分子量が低下した。よって，水酸基の有無が重合停止反応に重要ではない可能性が示唆された。また精製 PhaC を用い，*in vitro* においてポリエーテル化合物の有無による基質消費速度を比較した結果，各エーテル化合物の PhaC 活性を阻害する能力は低いことがわかり，分子量低下が PhaC 活性の低下によるものではないことが示唆された。

Polyhydroxyalkanoic acid (PHA) is a biodegradable plastic produced by microorganisms and synthesized by PHA synthase (PhaC). It is known that the addition of alcohols such as diethylene glycol (DEG) to the culture system during the synthesis of PHA decreases the molecular weight of the resulting PHA. In this study, we focused on the structure of DEG and produced PHA by adding a polyether compound with a structure similar to DEG but without hydroxyl groups in the structure. The molecular weight of the resulting polymers was determined by size exclusion chromatography. As the result, the molecular weight decreased under the DEG-supplemented conditions as in previous studies. Notably, the molecular weight of the obtained polymers decreased under the condition of addition of polyethers with no hydroxyl group. These results suggest that the hydroxyl groups may not be important for the termination. The in vitro analysis demonstrated that the addition of DEG and polyether had little effect on PhaC’s activity, suggesting that the decrease in molecular weight may not be due to a decrease in PhaC activity by the additives.

Polyhydroxyalkanoate, Molecular weight, Chain transfer

発表責任者：田中聖也（tanaka.seiya.n1@elms.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C3a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 C3 会場

水素酸化細菌の独立栄養条件でのジャー培養における発泡要因
Foaming factor in jar cultivation of hydrogen-oxidizing bacterium under autotrophic condition

○田中 賢二[1]、鈴木 慎一郎[2] ([1]近大産理工、[2]電源開発)
○Kenji Tanaka[1], Shinichiro Suzuki[2] ([1]KINDAI Univ., [2]J-POWER)

【目的】化学合成独立栄養細菌である水素細菌を用いた CO_2 を炭素源とする有用物質生産への期待が高まっており、食飼料タンパクや生分解性プラスチック素材であるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）等を目的生産物として実用的な培養技術の開発が進んでいる。タンパクや PHA の効率的な生産では高菌体密度での培養が必須であるが、発泡による発酵槽からの培養液の溢流が問題となる。溢流を避けるために通気撹拌強度を低くしたり消泡剤添加量を多くしたりすると、基質である H_2、O_2 および CO_2 ガスの培地への溶解速度を低下させることになる。そこで、本研究では水素細菌のジャー培養において発泡を激化させる要因について検証した。

【方法･結果】全容 1L の籠型撹拌翼付きガラスジャー発酵槽に無機塩合成培地を入れ、H_2･O_2･CO_2 からなる混合ガスを循環通気させることにより、ホモポリエステル P(3HB)蓄積性の水素細菌 *Cupriavidus necator* H16（野生株）を増殖させた。消泡剤を添加せずに様々な条件で培養を行い、溢流量を比較した。その結果、撹拌速度、通気量、菌体濃度、培地量以外にも培養液の発泡・溢流を激化させる要因を見出した。これら発泡要因を考慮し、溢流量を減らす方法を見出した。

A culture process that uses hydrogen bacteria to produce polyhydroxyalkanoates (PHAs), which is a food protein and biodegradable plastic material, from CO_2 is promising. High cell density culture is essential to produce protein and PHAs, but overflow of the culture broth from the fermenter due to foaming is often serious problem. Lowering the aeration and/or agitation speed or increasing addition of antifoaming agent will worsen the dissolution of the substrate gasses (H_2, O_2, CO_2) into the culture medium. Hence, we investigated the factors intensifying the foaming in high cell density culture of *Cupriavidus necator* H16 (wild strain) in a jar fermenter (total volume; 1 L) with a basket-shaped agitator under various conditions without adding antifoaming agents to compare the volume of overflow. The overflow volume increased as the agitation speed, aeration rate, and medium volume increased, but no clear relationship was observed against the cell concentration but it increased in a specific culture phase. It was also found that the composition of the substrate gas mixture and other factors have a significant influence. We are considering how to suppress the overflow by taking these foaming factors into account.

PHB, Hydrogen-oxidizing bacterium, *Curpriavidus necator*

講演番号：2C3a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 C3 会場

Megasphaera elsdenii を用いた水素生産システムの長期運転過程の発酵性状
Fermentation properties of a hydrogen production system using *Megasphaera elsdenii* on long-term operation

○石川 瑞季、曽 厚嘉、藤本 尚志、大西 章博（東京農大）
○Mizuki ISHIKAWA, Hou-Chia TSENG, Naoshi FUJIMOTO, Akihiro OHNISHI (Tokyo Univ. of Agric.)

嫌気性微生物による暗発酵はバイオ水素生産手法として注目されている。しかしながら、暗発酵のアキレス腱とされている「乳酸菌の汚染」が障害となり社会実装には至っていない。*Megasphaera* 属を用いた暗発酵は、乳酸菌との共存下で乳酸を基質として水素生産を維持することができる。本研究では暗発酵の社会実装に向けて 10L の発酵装置で長期運転を実施した。人工培地に *M. elsdenii* を添加し、グルコースを経時的に添加しながら培養した。暗発酵は 300 日以上維持されて合計で約 57L の水素ガスが得られた。投入基質当たりの水素収率は 1.03 mol H_2 / mol substrate で、既往の加熱殺菌された複合微生物系を利用した水素収率(1.1 ± 0.2 mol H_2 /mol glucose)と同程度であった（Renaudie *et. al.*, 2012)。暗発酵過程の主な構成菌種は 24 属 28 種で、水素生産を担った主な微生物は *M. elsdenii* であると考えられた。さらに、長期の運転ではアミノ酸の添加がバイオガス生成量の回復に寄与した。このように、*M. elsdenii* による暗発酵は複合微生物系で長期的な水素生産を達成できることが示された。

Dark fermentation by anaerobic microorganisms is attracting attention as a biohydrogen production method. Dark fermentation by *Megasphaera* spp. can sustain hydrogen production using lactic acid as a substrate with the presence of lactic acid bacteria. In this study, long-term operation was conducted in a 10L fermenter for social implementation of dark fermentation. *M. elsdenii* was inoculated into the artificial medium and cultured while glucose was added intermittently. Dark fermentation was maintained more than 300 days and a total of about 57 L of hydrogen gas was obtained. The hydrogen yield based on substrate added was 1.03 mol H_2 / mol substrate. Compared to the previous study conducted for 96 hours with heat-treated activated sludge (1.1 ± 0.2 mol H_2 /mol glucose), hydrogen yield of this study was comparable. The microflora of the dark fermentation process was constructed 28 species belonging to 24 genera. And *M. elsdenii* was considered to be the main hydrogen producer. Furthermore, the addition of amino acids contributed to the recovery of the biogas production during long-term operation. Thus, dark fermentation by *M. elsdenii* was suitable to achieving long-term hydrogen production in a complex microbial system.

Hydrogen production, *Megasphaera elsdenii*, Game changer

発表責任者：大西　章博（a1ohnish@nodai.ac.jp）

講演番号：2C3a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 C3 会場

遺伝子組換え *Rhodobacter sphaeroides* によるグルコースからの水素生産検討

Examination of hydrogen production by genetically engineered *Rhodobacter sphaeroides* strains

○徳山 秀太[1]、清水 哲[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Shuta TOKUYAMA[1], Tetsu SHIMIZU[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

【目的】水素は、使用時に二酸化炭素を排出しないクリーンなエネルギーとして注目されており、再生可能資源からのグリーン水素製造法の確立が求められている。これまで我々は、バイオマス由来の糖から大腸菌を用いた暗発酵により水素を生産し、ついで副生物である酢酸から紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* を用いた光発酵によりさらに水素を生産する 2 段階の水素生産プロセスについて検討を進めてきた。今回我々は *R. sphaeroides* が他の紅色非硫黄細菌とは異なりグルコースを利用できる特長に着目し、構築済みのアンモニア耐性水素高生産株 *Δhupcbb*P*によるグルコースからの 1 段階光発酵水素生産について検討した。
【方法と結果】塩化アンモニウムを窒素源としたミネラル培地において野生株はグルコースからほとんど水素を生産しなかった一方で、*Δhupcbb*P*株は高い収率で水素を生産した。ついで *Δhupcbb*P* 株においてプラスミド導入している変異型の窒素固定制御因子(*nifA**)を染色体へ 2 コピー導入することで、プラスミドフリーの水素高生産株 RsHydtrc2 を構築した。現在 RsHydtrc2 株をベースにグルコース代謝を改変した株の構築を進めており、本大会では当該構築株の水素生産についても報告する予定である。

[Purpose] Hydrogen (H2) is attracting attention as a clean energy source and establishment of a green H2 production using renewable resources is required. We have previously studied two-stage H2 fermentation from glucose, where Escherichia coli produces H2 from glucose by dark-fermentation with formation of acetate as a byproduct, then a purple non-sulfur bacterium (PNSB) *Rhodobacter sphaeroides* further produces H2 from acetate. In this study, we focused on a feature of *R. sphaeroides* that can utilize glucose unlike other PNSBs, and investigated one-step photo-fermentative H2 production from glucose by a previously constructed ammonia-tolerant H2-producing strain, *Δhupcbb*P*.
[Methods and results] The *Δhupcbb*P* strain showed high-yield H2 production from glucose in the presence of NH4Cl as the nitrogen source, although the wild-type strain produced traceable H2. We then constructed a plasmid-free H2-producing strain, RsHydtrc2, by two-copy chromosomal integration of the mutated nitrogen-fixation gene regulator (*nifA**). We are currently engineering the glucose metabolism of the strain RsHydtrc2 and H2 production of constructed strains will be presented in the conference.

Hydrogen, *Rhodobacter sphaeroides*, Glucose

講演番号：2C3a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 C3 会場

高集積化酵素複合体を用いた CO_2 を資源とするエチレン生産
Bio-ethylene production from $CO_2$by engineered cyanobacteria

○神藤 定生[1]、陳 韶華[3]、狩野 隼大[2]、松岡 茜[2]、徳田 千優[2]、竹内 一矢[2]、立松 正眞[2]、田村 廣人[2] ([1]名城大理工、[2]名城大農、[3]エボリューション 2 株式会社)
○Sadanari JINDOU[1], SHAOHUA CHEN[3], Hayata KARINO[2], Akane MATSUOKA[2], Chihiro TOKUDA[2], Kazuya TAKEUCHI[2], Shouma TATEMATSU[2], Hiroto TAMURA[2] ([1]Meijo univ. Sci. Tech., [2]Meijo univ. Agri., [3]Evolution 2 Corp.)

エチレンはプラスチックなどの石油化学製品を製造する石油化学工業の基礎原料であり、石油留分の高温分解によって製造される。われわれは炭素循環社会に資するために、CO_2 から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築し、石油を原料やエネルギー源に用いない、新規なバイオエチレン製造法の基盤技術を確立した。具体的には、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-l-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を、嫌気性微生物のバイオマス分解系を模倣した酵素複合体化技術により、複合体化(SOC2)させ、これをシアノバクテリア Synechococcus elongatus PCC 7942 へ導入し SOC2 株とした。結果、得られたエチレンの生産効率は 0.17 mg/L・day であった。また、律速酵素であるところの ACO の追加、メチルチオアデノシン(MTA)分解酵素を新たに組み込んだ SOC4 を構築し、これを保持するシアノバクテリア SOC4 株から SOC2 株比で 2.4 倍高い、0.41 mg/L・day の効率でエチレンを得た。以上の先導研究より、律速酵素の ACO を 1 ヶ増やすことで生産効率を 1.7 倍高められる知見を得た。そこで、さらに生産効率を高めるため、本研究では酵素複合体の拡大を検討した。すなわち、ACO の高集積を目的とした新規の人工酵素複合体 SOC6 の構築を試みた。具体的には、①ACS および MTAN を特異的に保持するコヘシンをもつ Sca1、②ACO を 2 ヶ保持させるコヘシンをもつ Sca2、③Sca1 を 1 ヶおよび Sca2 を 2 ヶ保持するコヘシンをもつ Sca3、の合計 3 種のアダプター骨格タンパク質(Sca)1～3 を構築し、それぞれを発現ベクターpET28a へ連結した。つぎに、大腸菌による発現・精製サンプルを用い、これらが任意のモル比で特異的に結合することをゲル濾過クロマトグラフィーおよび Native-PAGE で確認した。結果、6 ヶの酵素を保持する SOC6 を構築し、また、アダプター構造の確立によって、酵素の高集積化が見込める結果となった。最後に、Sca1～3 をコードする各遺伝子を pUC303 ベクターへ導入し、シアノバクテリア SOC6 株のエチレン生産効率を定量したので、これらの詳細を報告する。

A novel artificial enzyme complex, SOC6, was designed to assemble four ACOs. Three scaffoldin proteins with different properties were prepared: Sca1, which has 2 cohesins that selectively bind to ACS and MTAN; Sca2, with 2 cohesins that bind to ACO; and Sca3, with 3 cohesins that bind to one Sca1 and two Sca2. The rate of ethylene production by strain SOC6 was measured using gas chromatography. The detailed results of the experiment will be presented.

ethylene, synechococcus, cellulosome

発表責任者：神藤定生（sjindou@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2C3p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 C3 会場

マイクロバイオーム解析により明らかとなる生分解性と非生分解性有機化合物の差異
Differences between biodegradable and non-biodegradable organic compounds, which would be revealed by microbiome.
○林 拓矢[1]、鈴木 美和[2]、粕谷 健一[1,2]、高橋 講平[3]、野崎 京子[3]([1]群大院理工、[2]群大食健セ、[3]東大院工)
○ Takuya HAYASHI[1], Miwa SUZUKI[2], Ken-ichi KASUYA[1,2], Kohei TAKAHASHI[3], Kyoko NOZAKI[3] ([1]Gunma Univ., [2]GUCFW, [3]The Univ. of Tokyo)

n-アルカン類は生分解性を示すことが知られている一方で、*n*-アルカン類の高分子量体であるポリエチレン(PE)は生分解を示さない。このことは、*n*-アルカン類の分子量と生分解性との間に、微生物代謝の境界が存在することを示唆している。本研究では、分子量の異なる *n*-アルカンの環境分解機構を明らかにするため、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析をする。土壌職種源を含む培地中で炭素数 6 から 40 までのアルカンの生物化学的酸素要求量(BOD) 生分解度は、100 日後に 58%以上に達した。一方、テトラテトラコンタン($C_{44}H_{90}$)および PE は生分解性を示さなかった。16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析の結果、炭素数 36 以下の *n*-アルカン存在下での微生物叢は類似していたが、テトラコンタン($C_{40}H_{82}$) 存在下での微生物叢は他と異なっていた。$C_{44}H_{90}$ 存在下での微生物叢は炭素源未添加条件の微生物叢と類似していた。そこでテトラデカン($C_{14}H_{30}$)、エイコサン($C_{20}H_{42}$)、ヘキサテトラコンタン($C_{36}H_{74}$)、$C_{40}H_{82}$ および $C_{44}H_{90}$ を単一炭素源、土壌抽出液を接種源として培養し、これらをメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析した。その結果、$C_{40}H_{82}$ 存在下で発現しているアルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子は、これより低分子量の *n*-アルカン存在下での発現遺伝子とは異なっていた。

n-Alkanes are known to exhibit biodegradability. In contrast, polyethylene (PE), a high molecular mass form of *n*-alkanes, does not display biodegradability. This suggests a threshold in microbial metabolism between the molecular mass of *n*-alkanes and their biodegradability. Our study aims to elucidate the environmental degradation mechanisms of *n*-alkanes of different molecular masses by conducting meta-omics analyses. *n*-Alkanes with carbon numbers from 6 to 40 showed over 58% biochemical oxygen demand (BOD) biodegradability within 100 ds in soil environment. $C_{44}H_{90}$ and PE do not show biodegradability. The microflora in the presence of *n*-alkanes with carbon numbers below 36 were similar, whereas that in the presence of $C_{40}H_{82}$ was distinguishable. The microflora of $C_{44}H_{90}$ did not alter it compared to the absence of a carbon source. Soil extracts were incubated with $C_{14}H_{30}$, $C_{20}H_{42}$, $C_{36}H_{74}$, $C_{40}H_{82}$, and $C_{44}H_{90}$ and their microflora were investigated by meta-omics analysis. The results revealed that the expressed alkane-monooxygenase genes in the presence of $C_{40}H_{82}$ were different from those of lower molecular weight *n*-alkanes.

n-alkane, polyethylene, meta-omics analysis

講演番号：2C3p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C3 会場

天然化合物を含むポリブチレンスクシネートの海洋生分解性

Marine biodegradability of poly(butylene succinate) containing a natural compound

○太田 美乃里[1]、鈴木 美和[2]、石井 俊一[3]、鹿島 裕之[3]、権田 昂平[1]、石谷 佳之[3]、橘 熊野[1,2]、粕谷 健一[1,2] ([1]群大院理工、[2]群大食健セ、[3]海洋機構)

○ Minori OTA[1], Miwa SUZUKI[2], Syun-ichi ISHII[3], Hiroyuki KASHIMA[3], Kouhei GONDA[1], Yoshiyuki ISHITANI[3], Yuya TACHIBANA[1,2], Ken-ichi KASUYA[1,2] ([1]Gunma Univ., [2]GUCFW, [3]JAMSTEC)

ポリブチレンスクシネート(PBSu)は海洋環境中での生分解速度が極めて小さい脂肪族ポリエステルであり、海洋環境流出時に長期間滞留する可能性がある。海洋環境中でPBSuを利用するためには、その生分解速度の上昇が望まれる。ところで、プラスチック表面には「プラスティスフィア」と呼ばれる周辺環境と異なる微生物叢が形成される。PBSu へ天然化合物 A を添加し、そのプラスティスフィアの構造を明らかにし、その海洋生分解性を評価した。

PBSu および天然化合物 A を 10w/w%添加した PBSu フィルムを、神奈川県横須賀市海洋研究開発機構岸壁に設置した。海水浸漬 4 ヶ月後の天然化合物 A 添加 PBSu フィルムは初期重量の 22.1%が失われた。天然化合物 A 添加 PBSu フィルム重量減少速度は 35.4 μg/cm^2/day で、PBSu フィルム単体と比較して 18.4 倍であった。フィルム設置場所の海水を微生物摂取源として用い、ASTM D6691-17 に準拠し、天然化合物 A 添加 PBSu フィルムの無機化過程を生物化学的酸素要求量(BOD)に基づき定量した。試験開始 90 日後の天然化合物 A 添加 PBSu フィルムの BOD 生分解度は 90.4%であった。このことから天然化合物 A は PBSu の海洋生分解速度を上昇させることがわかった。

Poly (butylene succinate) (PBSu) is an aliphatic polyester with a low biodegradation rate in the marine environment. Enhancing the biodegradation rate of PBSu for marine applications necessitates innovative technology. We added compound A to PBSu.

After 4 months of seawater immersion, PBSu-containing compound A film lost 22.1% of its initial weight. The weight loss rate was 35.4 μg/cm^2/day, 18.4 times faster than that of the PBSu film. We assessed the mineralization of it in seawater by measuring biochemical oxygen demand (BOD) according to ASTM D6691-17. After 90 days, the BOD biodegradability of it was 90.4%. These results indicate that addition of compound A has significantly enhances the marine biodegradation rate of PBSu.

biodegradable plastics, poly(butylene succinate), marine biodegradability

講演番号：2C3p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C3 会場

移動性細菌 *Paenibacillus* sp. NK-L2 株が有機塩素系殺虫剤分解細菌株を運ぶヒッチハイク現象
Hitchhiking phenomenon in which *Paenibacillus* sp.NK-L2 transports an organochlorine pesticide-degrading bacterial strain
○松添 華子、岸田 なつみ、加藤 広海、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○ Hanako MATSUZOE, Natsumi KISHIDA, Hiromi KATO, Kouhei KISHIDA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA (The Univ. of Tohoku)

汚染物質の分解細菌を利用した環境浄化が期待されている一方で、汚染環境に接種した分解細菌が当該環境に定着できずに死滅してしまうことがしばしば問題になっている。これまでの研究で、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株は、滅菌土壌に単独で接種した際の生残性は良好でないが、swarming 活性のある *Paenibacillus* sp. NK-L2 株と共接種すると長期生存する予備的知見を得ている。固体培地上で NK-L2 株が UT26 株の棲息域を拡げる現象（ヒッチハイク現象）を観察しており、本現象が UT26 株の土壌中での生残性の向上に寄与していると考え、その機構解明を目的に研究を行った。まず、固体培地上でヒッチハイク現象が良好に観察される条件の検討を行った。これまでに、培地の寒天濃度や水分含量がヒッチハイク現象に影響を及ぼす結果を得た。また、増殖開始前の両者の混合がヒッチハイク現象に必要であることが示唆された。一方、蛍光標識した UT26 株と NK-L2 株を用いた観察で、NK-L2 株に運ばれた UT26 株が移動後にコロニーを形成することが示唆された。さらに、NK-L2 株の全ゲノム配列を決定し、ヒッチハイク現象の分子機構の解明を進めている。

Bioaugmentation of environmental pollutants often does not work, mainly because the inoculated bacteria do not survive in the environment. Previous studies showed that the organochlorine pesticide γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH)-degrading *Sphingobium japonicum* strain UT26 did not survive well when inoculated alone in the sterilized soil but stayed for a long time by co-inoculation with *Paenibacillus* sp. strain NK-L2 having the swarming activity. We hypothesized that the 'hitchhiking' phenomenon, in which NK-L2 transports UT26, contributes to the improved survival of UT26 in soil and researched to elucidate the mechanism. First, we obtained results showing that agar concentration and moisture content of the medium affect the hitchhiking phenomenon on solid medium. It was also suggested that mixing the two strains before the start of growth is necessary for the hitchhiking phenomenon. On the other hand, observations using fluorescently labeled UT26 and NK-L2 strains suggested that UT26 carried by NK-L2 forms colonies after migration. Furthermore, the whole genome sequence of strain NK-L2 was determined for conducting genetic analyses to unveil the molecular mechanism of the hitchhiking phenomenon.

hitchhiking, environmental pollutant, *Paenibacillus*

発表責任者：松添華子（matsuzoe.hanako.r3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C3p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C3 会場

微小結晶蛍光測定法および一細胞技術によって得られた多環芳香族化合物分解菌の解析
Analysis of degradation capabilities of PAH-degrading bacterial cultures obtained by PAH crystal fluorescence quantification and cell sorting

○ベハラノ フェリペ[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、PINYAKONG Onruthai[3]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大院・農生科・AgTECH、[2]東大・微生物連携機構、[3]Chulalongkorn Univ.）
○ Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Onruthai PINYAKONG[3], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chulalongkorn Univ.)

多環芳香族化合物（PAH）のバイオレメディエーションを達成するために、環境中の高分解能を持つ微生物の検出・取得が重要である。そのため、微小結晶由来の蛍光測定に基づいたハイスループットなリアルタイム PAH 分解活性評価法を確立し、FACS と併用して PAH 高分解活性微生物を獲得できるシステムを開発した。昨年度の本大会において、環境由来サンプルから抽出したバクテリアを用いた 1000 個以上の一細胞（一種）または二細胞（二種菌叢）培養物によるスクリーニングについて、また、その結果、小麦またはサトウキビ栽培土壌由来サンプルから作製した 15 個の培養物がピレンを分解したことを報告した。本年は振とう培養または静置培養条件におけるピレン分解能を従来法である休止菌体反応 ($10^{9\sim10}$ CFU/mL) および HPLC を用いて測定することで、我々が開発した新規高分解活性微生物単離・評価システムの応用性を検証した。15 個のピレン分解候補培養物を 4 週間振とう培養または静置培養し、ピレン残存量を測定した結果、静置培養時に分解活性が高くなることが明らかになった。ピレン結晶上でバイオフィルムを形成し分解する菌を取得できたと示唆される。また、15 培養物のうち二種菌叢であった 11 個の培養物について 16S rRNA 遺伝子配列解析および固体培地への塗布により菌株組成を確認したところ、3 個の培養物では 2 種菌株が共存していることが確認できた。しかしながら、2 つの培養物について、各菌の単独培養時および共培養時のピレン分解活性を HPLC により比較した結果、1 種の菌がほとんどのピレン分解を担っていることが判明した。

To recover novel polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading bacteria, we developed a high-throughput, fluorescence-based PAH microcrystal quantification system that when coupled to fluorescence activated cell sorting (FACS) can detect PAH degradation from single cell-inoculated cultures without enrichment. After screening more than 1000 cultures inoculated with one or two cells, we previously obtained 15 candidate pyrene degrading cultures originally inoculated with cells from wheat and sugarcane soils. This time, we aimed to validate the pyrene degradation capability of such cultures with routinely used resting cell reactions ($10^{9\sim10}$ CFU/mL) and HPLC in both shaking and static conditions. Our results showed that pyrene degradation tends to be higher in static conditions, which likely favors the formation of biofilms on pyrene crystals by the degradative bacteria. We also determined the strain composition using plating in solid media of 10 cultures which were inoculated with two cells, but only one strain had been detected from the bulk DNA of the sample. Two cultures were confirmed as being composed of two coexisting strains, one of which performs most of the degradation.

High-throughput screening, Microcrystal fluorescence, PAH degradation

発表責任者：野尻　秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C3p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C3 会場

Intermediates accumulation on pyrene degradation within pyrene-degrading bacterial consortia

○Yuanhao ZHU[1], Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Onruthai PINYAKONG[3], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chulalongkorn Univ.)

[Background and objectives] A pyrene-degrading bacterial consortium composed of strains isolated from mangrove sediments from Thailand was constructed (Wanapaisan *et al*. 2018). The consortium primarily involves three strains, including PO1, which contains all the genes for the complete mineralization of pyrene to TCA cycle intermediates, and PY1 and PW1, which contain the genes necessary for the degradation of phthalate and protocatechuate, respectively (Fig. 1). In our previous study, it was found that PY1 and PW1 increased PO1's pyrene degradation capability when added individually but decreased it when added simultaneously. This study aims to elucidate the dynamics of degradation by recording the accumulation of intermediates in these different consortia during pyrene degradation.

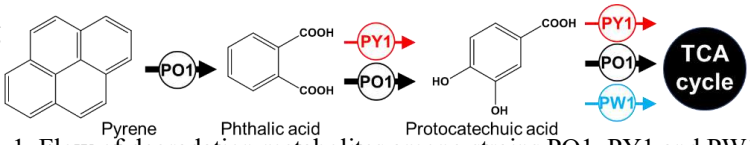


Fig. 1. Flow of degradation metabolites among strains PO1, PY1 and PW1

[Methods] Cells were incubated with pyrene as the sole carbon source in CFMM medium under the resting cell reaction (~10^7 CFU/mL). The HPLC was performed to detect the intermediates under isocratic conditions with 80% methanol in H_2O as the mobile phase, in which 5 mM dibutylamine acetate was added to especially separate the dissolved intermediates.

[Results] The results in Fig. 2A showed that the three-strain consortium hindered pyrene degradation. As shown in Fig.2B and C, compared to PO1 only, on the sixth day, the three-strain consortium showed the highest accumulation of both intermediates, consortium PO1+PY1 showed a higher accumulation of both intermediates and consortium PO1+PY1 showed a higher accumulation of protocatechuate. Moreover, the experiment was conducted under active growth status (~10^3 CFU/mL), and PO1 cell growth and pyrene degradation were hindered in the three-strain consortium, with a similar accumulation for both intermediates as that in the resting cell reaction. These results correspond with the previous research indicating that the accumulation of protocatechuate could potentially lead to toxicity (Prezioso *et al*., 2018) and oxidative stress (Ajiboye *et al*., 2017), adversely affecting cell growth. To further explore this, qPCR will be performed to monitor the changes in the expression of target genes over time.

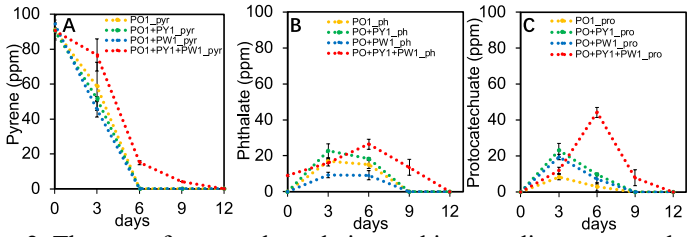


Fig. 2. The rate of pyrene degradation and intermediates accumulation

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Bacterial Interactions, Microbial Degradation

講演番号：2C3p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C3 会場

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 によるネオニコチノイド系殺虫剤 imidaclothiz 代謝機構の解析

Metabolism of a neonicotinoid insecticide imidaclothiz, by the hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○松浦 瑠夏[1]、殷 茹[2]、呉 静[3,4]、長井 薫[5]、森 智夫[3,4]、河岸 洋和[3,4]、平井 浩文[6,7] ([1]静大大学院、[2]静大創造院、[3]静大農、[4]静大キノコ研、[5]京府生命環境、[6]静大グローバル共創、[7]静大グリーン研)

○ Ruka MATSUURA[1], Ru YIN[2], Jing WU[3,4], Kaoru NAGAI[5], Toshio MORI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Hirofumi HIRAI[6,7] ([1]GSIST Shizuoka Univ., [2]GSST Shizuoka Univ., [3]FA Shizuoka Univ., [4]RIMS Shizuoka Univ., [5]GSLES Kyoto Pref. Univ., [6]FGISI Shizuoka Univ., [7]RIGST Shizuoka Univ.)

白色腐朽菌は様々な難分解性環境汚染物質を分解可能であり、当研究グループでは、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株がネオニコチノイド系殺虫剤 (NEOs)やビスフェノール A など様々な環境汚染物質を分解・無毒化可能であること、及びその分解反応の多くに cytochrome P450 (CYP)が関与することを報告している。イミダクロチズ (IMT)は、近年新たに開発された NEOs であり、環境動態や生物分解性に関する情報が殆ど存在しない。本研究では、*P. sordida* YK-624 株が非リグニン分解酵素産生培地である PDB 培地において IMT を代謝可能であることを明らかにし、各種 NMR 及び MS 分析の結果から、IMT のジヒドロイミダゾール基がイミダゾールへと酸化された構造を持つ、IMT よりも細胞毒性が低い代謝物を同定した。また、IMT の分解反応に対する CYP の関与を調査するために、*P. sordida* YK-624 株が保持する CYP 遺伝子 (PsCYPs)の酵母発現ライブラリーを用いて IMT 代謝活性スクリーニングを行ったところ、CYP5037 family と予測される PsCYP 1 種を代謝酵素として選抜することに成功した。

White-rot fungi are well known their ability to degrade various recalcitrant organic pollutants. Our research group has already reported that the hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 can degrade various environmental pollutants such as neonicotinoid insecticides and bisphenol A, and cytochrome P450s (CYPs) play critical roles in those degradation reactions. Imidaclothiz (IMT) is a neonicotinoid insecticide newly developed in recently, and there is less information about environmental fate and biodegradability of IMT. In the present study, it has been revealed that *P. sordida* YK-624 degraded IMT under non-ligninolytic condition, and identified a less-cytotoxic metabolite which has imidazole structure formed resulting oxidation of dihydroimidazole group of IMT. We tried to identify the CYP involved in the degradation of IMTs using the functional screening system, and successfully identified a PsCYP belonging CYP5037 family.

white rot fungi, imidaclothiz, mechanism

発表責任者：平井浩文（hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C3p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C3 会場

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による loxoprofen 分解機構の解析

Analysis of loxoprofen-degradation mechanism by the hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○殷 茹[1]、呉 静[2,3]、長井 薫[4]、森 智夫[2,3]、河岸 洋和[2,3]、平井 浩文[3,5,6]（[1]静大創造院、[2]静大農、[3]静大キノコ研、[4]京府大生命環境、[5]静大グローバル共創、[6]静大グリーン研）
○Ru YIN[1], Jing WU[2,3], Kaoru NAGAI[4], Toshio MORI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Hirofumi HIRAI[3,5,6] ([1]GSST Shizuoka Univ., [2]FA Shizuoka Univ., [3]RIMS Shizuoka Univ., [4]GSLES Kyoto Pref. Univ., [5]FGISI Shizuoka Univ., [6]RIGST Shizuoka Univ.)

白色腐朽菌はリグニンを高度に分解出来る唯一の微生物であり、リグニンを酸化的に分解し、完全に無機化することが知られている。近年では、白色腐朽菌のバイオレメディエーションへの応用研究が盛んに行われている。Loxoprofen は、非選択的非ステロイド性抗炎症薬であり、同系統の薬剤に比べ安全性が高いとされ、日本で最も処方されている消炎鎮痛剤の一つであるが、環境中に排出された際の各種安全性については疑問が残る。本研究では、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の loxoprofen 分解能を評価し、代謝産物の探索・構造決定、毒性評価を行った。YK-624 株は強力な loxoprofen 除去能を示し、分解反応へのシトクロム P450 の関与が示唆された。4 種の代謝物の構造を決定し、それらの構造から YK-624 株による loxoprofen 代謝経路として、側鎖カルボキシル基の酸化的脱炭酸および五員環への水酸基付加を経る経路を予測した（Fig. 1）。代謝物が細胞毒性を示さなかった事から、YK-624 株が loxoprofen の潜在的リスクを低減可能であることが示された。

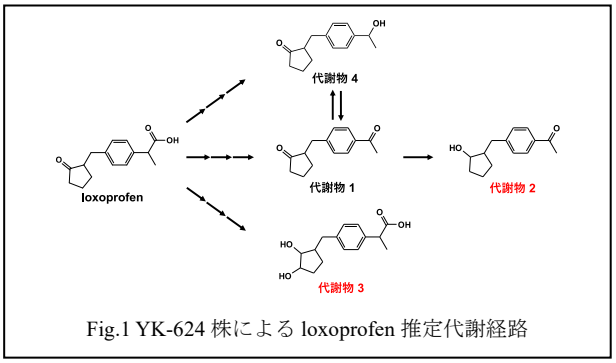


Fig.1 YK-624 株による loxoprofen 推定代謝経路

White-rot fungi are known as the only microorganisms that can mineralize lignin, and there are many reports intended to application use of white-rot fungi for the bioremediation of organic pollutants. Loxoprofen has been the most widely prescribed less-steroidal anti-inflammatory drug. High use and scarce information of loxoprofen fate concerns that potential risks of loxoprofen in environment. In the present study, it was demonstrated that hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 has an excellent ability in loxoprofen biodegradation with a 94.2% removal after 10 days of incubation, and cytochrome P450 plays a significant role in this metabolic process. Four metabolites of loxoprofen were isolated and identified by NMR. Based on these metabolites, the loxoprofen metabolic pathway by *P. sordida* YK-624 was proposed (Fig. 1). Furthermore, these metabolites showed no cytotoxic effect on cell viability tests using Neuro2a cells. These results demonstrate that *P. sordida* YK-624 can efficiently remove the potential risk of loxoprofen.

white rot fungi, loxoprofen, mechanism

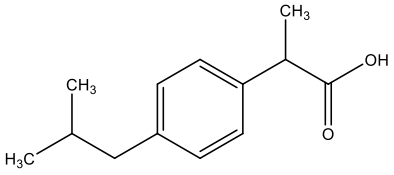
発表責任者：平井 浩文（hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C3p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C3 会場

高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による ibuprofen 分解機構の解明

Degradation mechanism of ibuprofen by the hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○朴 苑喜[1]、呉 静[2,3]、森 智夫[2,3]、河岸 洋和[2,3]、平井 浩文[3,4,5]（[1]静大大学院、[2]静大農、[3]静大キノコ研、[4]静大グローバル共創、[5]静大グリーン研）
○Wonhi PARK[1], Jing WU[2,3], Toshio MORI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Hirofumi HIRAI[3,4,5] ([1]GSIST Shizuoka Univ., [2]FA Shizuoka Univ., [3]RIMS Shizuoka Univ., [4]FGISI Shizuoka Univ., [5]RIGST Shizuoka Univ.)



多くの医薬品は広く使用されている一方で、医薬品類は排泄や廃棄により環境中に規制なく排出され、低濃度で水質汚染を引き起こす新たな環境汚染物質であると考えられている。医薬品類の環境中における動態や環境毒性などは十分に調査されていないために、排出には公衆衛生等に対する潜在的リスクが伴う。ibuprofen (IBU)は、その安定性により環境中での分解が困難であり、その除去技術の確立が求められている。本研究では、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株を用いた IBU の除去技術の確立を目的とし、*P. sordida* YK-624 による IBU の生分解試験を行い、その代謝産物の探索を行った。*P. sordida* YK-624 株はリグニン分解酵素非産生条件下で IBU を速やかに分解し、5 時間で約 75%の IBU を分解した。培養液を溶媒抽出し、各種クロマトグラフィーによって分離・精製することで代謝産物を単離した。現在構造決定を進めている。本代謝反応はシトクロム P450（CYP）阻害剤添加により阻害されたため CYP の関与が示唆された。

Pharmaceuticals including ibuprofen (IBU) have been widely used for human and animal health. On the other hand, pharmaceuticals entered the environment without any control or regulation, and are considered as an emerging contaminant to cause water pollution with low environmental concentrations. Establishment of remediation technology for IBU is highly demanded because ibuprofen degradation is difficult in the environment due to its physicochemical stability. In this study, we performed the biodegradation of IBU by hyper-lignin degrading white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and the identification of its metabolite was attempted, for establishment of bioremediation technique for IBU. *P. sordida* YK-624 is enabled to quickly degrade IBU under non ligninolytic condition, and 75% of IBU was eliminated in 5 hours. Then, the culture supernatant was extracted, and putative metabolite was isolated using with various chromatography. Structure determination of the metabolite is now undergoing. This fungal reaction was inhibited by the addition of cytochrome P450 (CYP) inhibitors, suggesting that CYPs are involved in this degradation reaction.

white rot fungi, ibuprofen, mechanism

発表責任者：平井 浩文（hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2C3p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C3 会場

細菌由来の有機塩素系殺虫剤γ-HCH 分解酵素を発現する形質転換シロイヌナズナの作製と評価
Construction and characterization of transgenic Arabidopsis thaliana expressing bacterial enzyme for degradation of organochlorine pesticide γ-HCH
○鄧 文昊、高田 美信、岸田 康平、大坪 嘉行、渡辺 正夫、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Wenhao DENG, Yoshinobu Takada, Kouhei Kishida, Yoshiyuki Ohtsubo, Masao Watanabe, Yuji Nagata (The Univ. of Tohoku)

残留性有機汚染物質 (POPs)で汚染された土壌の浄化を目的に、人工の有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 分解資化細菌由来のγ-HCH dehydrochlorinase LinA を発現するシロイヌナズナ形質転換植物体を作製し（2022 年度農芸化学会大会）、本形質転換植物がγ-HCH 分解活性を発現することを明らかにした（2023 年度農芸化学会大会）。本研究では、本形質転換植物体の評価を進めた。形質転換シロイヌナズナ中で発現した LinA は、Western blot 解析により細菌細胞で発現する LinA より大きなバンドとして検出された。糖鎖切断酵素処理によりこれが糖鎖付加によるものであることが明らかになった。また、本形質転換植物を 30 ppm のγ-HCH を含む汚染土壌で栽培し、9 日後に土壌中のγ-HCH 残存量を測定したが、コントロールとの明確な差は観察できなかった。しかし、植物体中のγ-HCH 量はコントロール株の半分程度であった。すなわち、本形質転換植物体は、汚染土壌中のγ-HCH の吸収能力は弱いものの、吸収したγ-HCH は分解することが示唆された。

For the remediation of soil contaminated with persistent organic pollutants (POPs), we constructed transgenic Arabidopsis thaliana expressing γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) dehydrochlorinase LinA from a bacterium that degrades the artificial organochlorine pesticide γ-HCH (2022 JSBBA Annual Meeting) and showed that the transgenic plants expressed γ-HCH-degrading activity (2023 JSBBA Annual Meeting). In this study, we proceeded to evaluate the transgenic plants. LinA expressed in the transgenic plants was detected by Western blot analysis as a larger band than that of LinA expressed in bacterial cells. Glycosidase treatment revealed that this was due to glycosylation in the transgenic plants. The transgenic plants were grown in contaminated soil containing 30 ppm of γ-HCH, and after nine days, the amount of γ-HCH remaining in the soil was measured. No apparent difference from the control plants was observed. However, the amount of γ-HCH in the transgenic plants was about half that of the control plants, suggesting that the transgenic plants have a weak ability to absorb □-HCH in soil, but the absorbed γ-HCH was degraded.

transgenic plant, environmental pollutant, organochlorine pesticide

講演番号：2C3p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C3 会場

Comamonas thiooxydans R2 株におけるフェノール分解と機能的分化
Phenotypic heterogeneity contributes to the functional stability of *Comamonas thiooxydans* strain R2 in phenol-fed chemostat

○鈴木 研志[1,2]、上原 悠太郎[3]、水口 千穂[1,2]、栗栖 太[4]、二又 裕之[5,6,7]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]東大院・工、[4]東大院・工・水環セ、[5]静大院・創造、[6]静大院・総合科技、[7]静大・グリーン研)
○Kenshi SUZUKI[1,2], Yutaro UEHARA[3], Chiho MINAKUCHI[1,2], Futoshi KURISU[4], Hiroyuki FUTAMATA[5,6,7], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]UTokyo; CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Eng., UTokyo, [4]Res. Ctr. Water Env Tech., Sch. Eng., UTokyo, [5]Grad. Sch. Sci. & Tech, Shizuoka Univ., [6]Dept. Appl. Chem. & Biochemical Eng., Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., [7]Res. Ins. Green Sci. & Tech., Shizuoka Univ.)

フェノール資化性細菌である *Comamonas thiooxydans* R2 株はそのゲノム上にフェノールのメタ開裂を経由する分解遺伝子群を全て有しており、個体群として完全に分解可能である。その一方で、R2 株はフェノールを唯一の炭素源とする連続培養系で、その分解能を維持できる場合とできない場合があることが明らかとなっている。そこで本研究では R2 株細胞レベルでのフェノール分解能に注目することで機能維持機構を解明することを目的とした。連続培養系を構築し選択培地を用いた CFU 測定の結果、フェノール分解に直接関与する細胞は全体の 1%以下まで減少し増減した。また、細胞生存率は約 93%であり、大半の細胞がフェノール以外の代謝物に依存して生残していることが示唆された。フェノール分解能の喪失が突然変異によるのかどうかを検討するため、選択培地上のコロニーを用いて連続培養系を再構築したところ、同様にフェノール分解細胞と非分解細胞が確認された。従って、非分解細胞の出現は遺伝的な変異にはよらず、発現系の異なる様々な細胞が混在していることが示唆された。培養系内で利用される代謝物を特定するため、培養上清を用いて R2 株を培養することで培養の前後で増減する代謝物を解析した。その結果、少なくとも 51 種の代謝物が増減することが明らかとなった。以上の結果から、R2 株における機能は一部の細胞によって発揮され、様々な代謝物を利用する細胞が環境変化に応答しつつ発揮する能力を切り替えることで個体群として機能維持していることが示唆された。

In this study, we investigated the phenotypic heterogeneity of *Comamonas thiooxydans* R2 in a chemostat culture supplemented with phenol as the sole carbon and energy source. Measurement of colony forming unit using the phenol-medium and 1/10 TSA medium revealed that phenol-degrading cells were less than 1% of total cells in the chemostat. Microscopy observation with Live/Dead staining revealed that approximately 93% of cells were live cell. These results suggested that the non-phenol-degrading cells arose in the chemostat. Therefore, the supernatant of the chemostat was analyzed to reveal what metabolites were used by strain R2. Non-target metabolome analysis revealed that at least 51 metabolites were used by strain R2. In conclusion, the function of phenol degradation was maintained by a part of the cells, and it was suggested that the non-phenol-degrading cells played an important role in the maintenance of the function by using metabolites to smooth the whole function of the system.

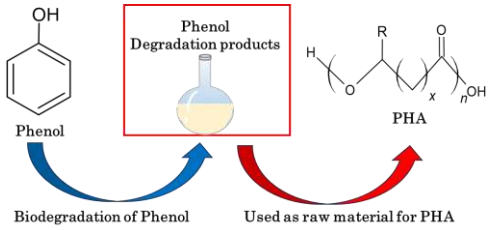
phenotypic heterogeneity, metabolites, phenol

講演番号：2C3p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 C3 会場

フェノールの分解及びフェノール分解産物を基質とする PHA の生産に関する研究

Studies on the degradation of phenol and the production of PHA using phenol degradation products as substrates

○大上 嵩洋、張 容喆（室蘭工業大学大学院）
○Takahiro OGAMI, Youngcheol Chang (Muroran IT)



フェノールを含む廃水の処理がコストの観点から問題となっている。当研究室ではフェノールに付加価値を与えるために、生分解性プラスチック(PHA)の生産基質としての利用可能性を検討した。PHA 生産菌である *Bacillus* sp. CYR1 株（以下、CYR1 株）は芳香族物質を分解及び PHA 生産基質として利用できる。しかし、フェノールの利用可能濃度が最大で 100 mg/L と低かった。本研究では PHA 生産量の向上を目指すために、フェノール分解フェーズと PHA 生産フェーズに分けることで効率的なフェノール分解と PHA 生産量を目指した。フェノール分解は *Comamonas* sp. C1 株によるフェノール完全分解を行った。PHA 生産は一本の三角フラスコ中のフェノール(500 mg/L)を完全に分解し得られた分解産物（液）（以下、500 mg/L 分解液）や、500 mg/L 分解液へフェノール(500 mg/L)の添加・完全分解を 4 回繰り返し行った、計 2000 mg/L のフェノール分解産物（液）（以下、2000 mg/L 分解液）を CYR1 株の PHA 生産基質として用いた。結果、500 mg/L 分解液の条件は細胞乾燥重量（以下、CDW）166 mg/L から 9.8 mg/L の PHA が生産（収率 5.9%）されたのに対し、2000 mg/L 分解液の条件は CDW180 mg/L から 54.5 mg/L の PHA が生産（収率 30.2%）された。この結果から先行研究と比較して細胞乾燥重量及び PHA 生産量は低下したが、フェノール分解産物の蓄積と PHA 生産が行われた。

We investigated the possibility of using phenol-degrading products to produce biodegradable plastic (PHA) to add value to phenol. *Bacillus* sp. CYR1 strain, a PHA-producing bacterium, could degrade aromatic organic compounds and use them as substrates for PHA production. However, the available phenol concentration was as low as 100 mg/L. Therefore, to improve the PHA production amount, we aimed to achieve efficient phenol degradation and PHA production by dividing the phase into a phenol degradation phase and a PHA production phase. Phenol was completely degraded using *Comamonas* sp. C1 strain. PHA production involves the complete degradation of phenol (500 mg/L) in one Erlenmeyer flask, and 2000 mg/L of phenol degradation products (liquid) was used as a PHA production substrate for strain CYR1. As a result, 54.5 mg/L of PHA was produced from 180 mg/L of dry cell weight (production yield, 30.2%). These results indicate that phenol degradation products could be used for PHA production.

Phenol, PHA, Biodegradation

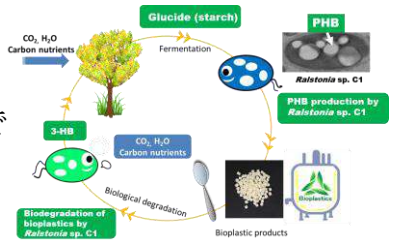
発表責任者：チャンヨンチョル（ychang@muroran-it.ac.jp）

講演番号：2C3p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 C3 会場

Ralstonia sp. C1 株による PHB 分解及び生産に関する研究
Study on PHB degradation and production by Ralstonia sp. C1 strain

○張 イ容喆（室工大院）
○Young cheol CHANG (Muroran Inst. Tech.)

バイオプラスチックの分解に関連する研究のほとんどは、人間の生息地、川、海洋などの下流域に焦点を当てている。 本研究では、生分解性プラスチックであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）を高山地帯などの上流域で分解できるかどうかを評価した。黒岳土壌から 単離した分離株は、*Ralstonia insidiosa* と同定され、分離菌の中で最も高い分解活性を示し、最大 3%（w/v）の PHB を分解する。この菌株は、PHB フィルムだけでなく、マルチフィルム(PBAT)、(P(3HB-co-3HV)、 PHBH)などを 14 ℃の土壌中で分解できる。 さらに、3-ヒドロキシ酪酸（3-HB)、糖、脂肪酸を使用して PHB および P(3HB-co-3HV) を生産することができる。NMR 分析では、生成された生体高分子の成分が主に PHB であることが分かった。さらに、熱重量分析（TGA）および示差走査熱量分析（DSC）分析により、製造された PHB が市販品と同等の物性を示すことが明らかになった。 これらの研究に基づいて、我々は、*Ralstonia insidiosa* C1 株 がさまざまな基質を使用した PHB の生産に適用可能であり、低温土壌中でいくつかの異なる種類の生体高分子を分解する可能性があると結論付けた。 これら C1 株の独自機能を活用し、ゼロエミッションを含むグリーンサーキュラーエコノミーの実現に向けた新たな物質循環モデルを提案できればと考えている。



The isolate identified as *Ralstonia insidiosa* from Mt. Kurodake soil had the highest PHB degradation ability among the isolates. The *Ralstonia insidiosa* C1 could degrade a maximum of 3% (w/v) of PHB. The strain could degrade not only PHB film but also mulch films (PBAT), P(3HB-co-3HV), and PHBH at 14 ºC. In addition, this isolated bacterium can produce PHB and P(3HB-co-3HV) using 3-hydroxybutyric acid (3-HB), sugars, and fatty acids. NMR analysis indicated that the produced biopolymer was PHB. Additionally, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed that the produced PHB exhibited physical properties comparable to those of commercial products. Based on these studies, we concluded that *Ralstonia insidiosa* C1 could be applicable to the production of PHB using various substrates and degrade several different types of biopolymers in low temperature soil. We can propose a new material circulation model using these unique functions of the C1 strain to realize a green circular economy, including zero emissions.

PHB film, Mulch film, Biodegradation

発表責任者：チャン　ヨンチョル（ychang@muroran-it.ac.jp）

講演番号：2C3p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 C3 会場

海洋からのプラスチック分解菌の単離

Isolation of plastic-degrading bacteria from the ocean

○沼田 真吾[1]、東端 啓貴[1,2] ([1]東洋大生命、[2]東洋大学バイオレジリエンス研究プロジェクト)
○Shingo NUMATA[1], Hiroki HIGASHIBATA[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]Toyo University Bio-Resilience Research Project)

現在、年間 800 万トンものプラスチック廃棄物が河川などを通じて海洋へ流入していると推測されている。海洋に流入したプラスチックは容易に自然分解されず、波や紫外線、温度といった物理的影響によって破砕され、マイクロプラスチックとなる。このマイクロプラスチックの問題は、環境や生物に与える影響から世界中で注目が集まっている。海表面を浮遊するプラスチックを観測して予測されるプラスチック量は、海洋へ流入してくるプラスチック廃棄物の 1%に満たないとされている。流入してきたプラスチックは微生物が付着し深海へ沈降するが、海表面で観測されないプラスチックを説明できるほどの量は深海から発見されていない。このことから海洋由来プラスチック分解菌の存在が示唆されたため、海洋環境中を浮遊しているプラスチック片の表面にもプラスチック分解菌が存在すると仮定し、海洋に存在するプラスチックゴミを環境サンプルとして採取した。日常生活の中でよく使用するポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどのプラスチックを単一炭素源として集積培養を行い、プラスチック分解菌の単離を試みた。

It is estimated that 8 million tons of plastic waste is currently flowing into the ocean through rivers and other channels every year. Plastic that enters the ocean does not easily decompose naturally, but is shattered by physical influences such as waves, ultraviolet rays, and temperature, becoming microplastics. The issue of microplastic pollution is attracting attention around the world due to its impact on the environment and living organisms. The amount of plastic predicted by observing plastic floating on the ocean surface is estimated to be less than 1% of the plastic waste that enters the ocean. Microorganisms attach to the incoming plastic and it settles into the deep sea, but the amount of plastic that is not observed on the sea surface has not been found in the deep sea. Since this suggests the presence of marine-derived plastic-degrading bacteria, we assumed that plastic-degrading bacteria also exist on the surface of plastic pieces floating in the ocean environment, and collected environmental samples of plastic debris in the ocean. We attempted to isolate plastic-degrading bacteria by conducting enrichment culture using plastics commonly used in daily life, such as polyethylene, polypropylene, and polystyrene, as a single carbon source.

Plastic-degrading bacteria, Environmental purification, Microplastic

講演番号：2C3p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 C3 会場

陸域からのプラスチック分解菌の単離

Isolation of plastic-degrading bacteria from terrestrial areas

○中島 華子[1]、東端 啓貴[1,2] ([1]東洋大院生命、[2]東洋大学バイオレジリエンス研究プロジェクト)
○Hanako NAKAJIMA[1], Hiroki HIGASHIBATA[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]Toyo University Bio-Resilience Research Project)

プラスチック廃棄物の理想的な処理方法の実現、マイクロプラスチック問題の解決を目的としプラスチック分解菌の探索を行っている。ポリエチレンと同様に長鎖炭化水素鎖をもつ物質、スチレンモノマーと同様の化学構造をもつリモネンと似た物質を環境サンプルとして選定した。プラスチックを唯一の炭素源とした液体培地で集積培養を行い、これまでにプラスチック分解候補株として 401 株を単離した。プラスチックの分解を視覚的に確認するため、ポリエチレン粉末を炭素源として固体培地を作製した。単離菌を固体培地へ塗布し、1 週間培養後、CBB 染色を行うことで、コロニー周辺に現れるクリアゾーンの有無を確認した。ポリエチレンの生分解モデルでは、最初に細胞外酵素によりポリエチレンが酸化され水酸基やカルボニル基が付加される。生分解によって付加された官能基の変化を、FTIR を用いて分析した。その結果、2 株で水酸基由来及び、カルボニル基由来のピークを確認できた。

We are searching for plastic-degrading bacteria with the aim of realizing an ideal treatment method for plastic waste and solving the microplastic problem. Substances with long hydrocarbon chains similar to polyethylene and substances similar to limonene, which has the same chemical structure as the styrene monomer, were selected as environmental samples. We performed an enrichment culture in a liquid medium with plastic as the sole carbon source, and so far we have isolated 401 strains as candidates for plastic degradation. In order to visually confirm plastic degradation, a solid medium was prepared using polyethylene powder as the sole carbon source. The isolated bacteria were applied to the solid medium, and after culturing for one week, CBB staining was performed to confirm the presence or absence of clear zones appearing around the colonies. In the polyethylene biodegradation model, polyethylene is first oxidized by extracellular enzymes to add hydroxyl and carbonyl groups. Changes in functional groups added through biodegradation were analyzed using FTIR. As a result, peaks derived from hydroxyl groups and carbonyl groups were confirmed in two strains.

Plastic-degrading bacteria, Environmental purification, Microplastic

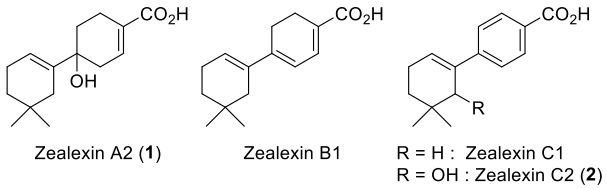
講演番号：2C4a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 C4 会場

トウモロコシが産生するフィトアレキシン zealexin 類の合成研究

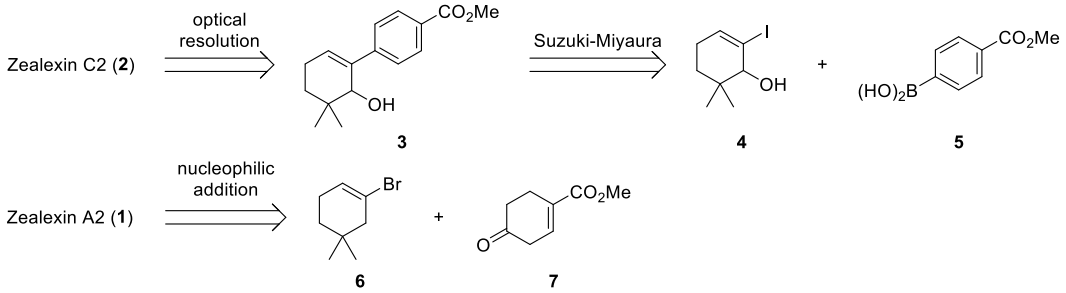
Synthetic studies of zealexins, maize sesquiterpenoid phytoalexins

○栗原 洸、石井 航平、飯嶋 章太、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）
○Akira KURIHARA, Kohei ISHII, Shota IIJIMA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo univ. of Agriculture)

【背景・目的】トウモロコシから単離された zealexin 類は *Aspergillus flavus* などに対する抗菌活性を持つ新規のフィトアレキシンである [1]。これらはトウモロコシから極微量しか得られず、その活性など詳細な研究のためには有機合成による物質供給が鍵となる。本研究では zealexin 類の合成を目的とした。



【方法・結果】Zealexin 類の特徴的な二つの環を直接結合する戦略を検討し、鈴木・宮浦カップリングを鍵反応とした zealexin B1 および C1 の合成を達成している [2) 3)]。Zealexin C2 に関しても、同反応を鍵として骨格を構築し、両エナンチオマーの合成を完了した。Zealexin A2 については、求核付加反応を鍵とする合成計画を立案し、合成の達成を目指している。



Zealexins discovered from maize is novel phytoalexins with antifungal activity against *Aspergillus flavus* and the other fungus. These compounds were isolated from maize in low amounts, therefore the key for further research is to supply these substances by organic synthesis.

We have designed a synthetic strategy to construct the two six-membered ring structures, the frameworks of zealexins by connecting the two rings. According to this strategy, we have accomplished with efficient synthesis of zealexin B1 and C1[2) 3)]. As for zealexin C2, the common framework was constructed using Suzuki-Miyaura coupling as a key reaction, and the synthesis of the optically active form was completed. For zealexin A2, we are working to achieve total synthesis by nucleophilic addition as the key reaction.

1) A. Huffaker *et al*, *Plant Physiol*., **2011**, *156*, 2082-2097.
2) 石井航平、松島芳隆 日本農芸化学会 2020 年度大会 3B11a09, 関東支部大会 1E-4; 2022 年度大会 4F02-03
3) Y. Matsushima, K. Ishii, A. Huffaker, E. A. Schmelz, *Tetrahedron Lett*., **2022**, *91*, 153641.

zealexin, phytoalexin, Suzuki-Miyaura coupling

発表責任者：松島芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

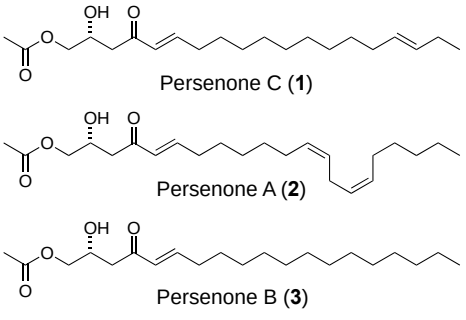
講演番号：2C4a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 C4 会場

HSP70 誘導活性を有する Persenone 類の合成研究

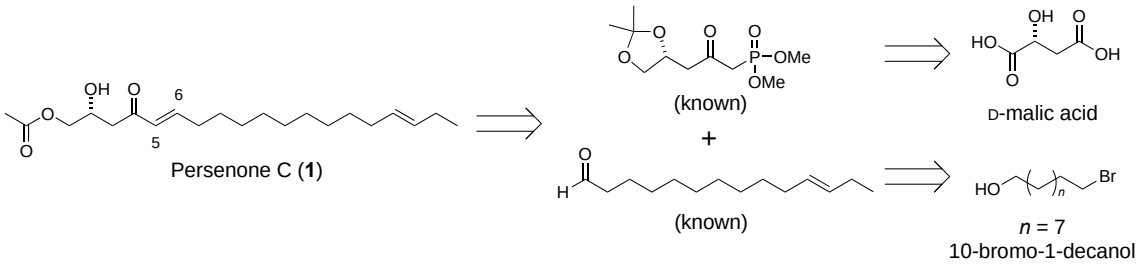
Synthetic Studies of Persenones with HSP70-inducing Activity

○小野 桜、伊木 あゆ美、小田 花音、山本 彩羽、藤巻 貴宏、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学）
○SAKURA ONO, AYUMI IKI, KANON ODA, IROHA YAMAMOTO, TAKAHIRO FUJIMAKI, YOSHITAKA MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】Heat Shock Protein (HSP) 70 はメラニン産生抑制機能を有することが報告されている [1]。当研究室における HSP70 活性化天然物の探索の結果、アボカド種子抽出物から Persenone C (**1**) [2] が同定されたが、少量しか得ることができていない。本研究では活性評価試験のための安定的な物質供給を行うことを目的とし、**1** の初の全合成を行う。



【方法・結果】Persenone C (**1**)の逆合成解析を示す。5-6 位の二重結合は、それぞれ既知のホスホン酸エステルとアルデヒドの Horner-Wadsworth-Emmons 反応によって構築可能であると考えた。ホスホン酸エステルは D-リンゴ酸から、アルデヒドはブロモアルコールから合成可能である。本合成経路は、アルデヒドの側鎖の構造を変更することで類縁体合成にも適応することができるため、汎用的な合成経路であると考えられる。実際の合成について詳細を報告する。



HSP70 was reported to have the ability to inhibit melanin production.[1] Persenone C (**1**)[2] was discovered in our laboratory from avocado seed extract. However, it is obtained only in small amounts. Therefore, we will perform the total synthesis of persenone C (**1**) to provide a stable supply of the substance for further biological studies.

Persenone C (**1**) could be constructed by the Horner-Wadsworth-Emmons reaction of a phosphonate ester and an aldehyde as shown above. The phosphonate ester could be synthesized from D-malic acid and the aldehyde from bromoalcohol. Our synthetic route is versatile because it can be adapted to the synthesis of other persenone analogues. Details of the synthetic studies will be reported.

1) T. Hoshino *et al*., *J. Biol. Chem*., **2010**, *285*, 13254-13263.
2) D. G. Rodríguez-Sánchez *et al*., *J. Agric. Food Chem*., **2013**, *61*, 7403-7411.

Persenone, Heat shock protein, Horner-Wadsworth-Emmons reaction

発表責任者：松島 芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

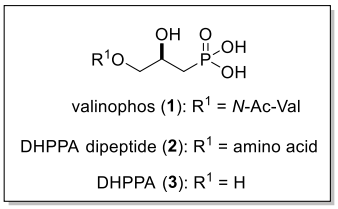
講演番号：2C4a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 C4 会場

Valinophos および DHPPA ジペプチドの合成研究

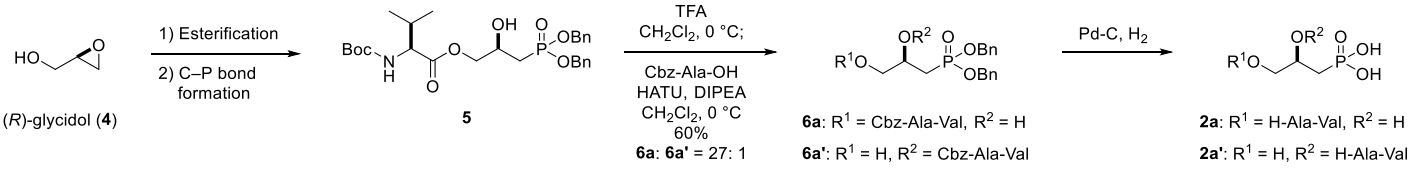
Synthetic study of valinophos and DHPPA dipeptide

○中村 皓毅[1]、松島 芳隆[2] ([1] 乙卯研究所、[2] 東京農業大学)
○Kouki NAKAMURA[1], Yoshitaka MATSUSHIMA[2] ([1]Itsuu Laboratory, [2] 農芸化学)

炭素–リン結合を有する C–P 化合物は興味深い生物活性と生合成経路を有するものが多い。*Streptomyces durhamensis* NRRL-3309 より単離された valinophos (**1**)は、生合成遺伝子クラスター内の酵素によっては生合成されず、DHPPA ジペプチド (**2**)の生合成における副生成物であることが示唆されている。しかし、LC-HRMS 分析において、培養抽出液からこのジペプチドの存在を確認することはできていない。そこで、生物活性を明らかにするため、valinophos (**1**)および DHPPA ジペプチド (**2**)の全合成研究に着手した。



(*R*)-グリシドール (**4**)から C–P 結合形成を経て得られるホスホン酸エステル **5** に対し、Boc 基の脱保護と続く Cbz-Ala-OH の縮合を行うことでジペプチド **6a** を得た。このとき、ジペプチドが 2 級アルコールへ転位した異性体 **6a′**がわずかに副生した。最後に、加水素分解を行うことで Ala-Val-DHPPA (**2a**)と思われる化合物を得た。現在、異性体の分離を検討中である。



Compounds with carbon–phosphorus bonds have unique biological activities and biosynthetic pathways. Valinophos (**1**) is isolated from *Streptomyces durhamensis* NRRL-3309, and has been suggested as a side product produced by a nonspecific enzyme encoded outside of DHPPA dipeptide (**2**) biosynthetic gene cluster. However, this dipeptide has not been detected from culture extract by LC-HRMS. Therefore, we planned a total synthesis of valinophos (**1**) and DHPPA dipeptide (**2**) to elucidate a biological activity.

The Boc deprotection of phosphonate **5** synthesized from (*R*)-glycidol (**4**) via C–P bond formation, followed by condensation with Cbz-Ala-OH was performed to obtained dipeptide **6a**. During the amidation, the rearrangement of the dipeptide moiety to secondary alcohol was slightly observed. Finally, Ala-Val-DHPPA (**2a**) was obtained by the hydrogenolysis. Separation of dipeptide and its structural isomer is now ongoing.

DHPPA dipeptide, natural C-P compound, C-P bond formation

発表責任者：中村皓毅（ecc1216@gmail.com）

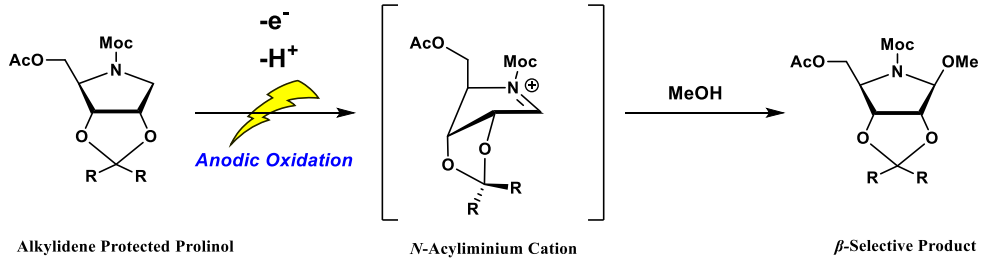
講演番号：2C4a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 C4 会場

アルキリデン保護基を活用する立体選択的な庄野酸化の開発

Stereoselective Shono-oxidations using Alkylidene Protective Groups

○赤羽 晋之介、森住 春香、北野 克和、岡田 洋平（東農工大）
○Shinnosuke Akahane, Haruka Morizumi, Yoshikazu Kitano, Yohei Okada (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

ヌクレオシドを構成するリボース骨格のヘテロ原子を窒素原子に置換した化合物はアザヌクレオシドと呼ばれ、抗ウイルス活性を有する化合物として有望なアナログである。我々はプロリノール誘導体に対して有機電解反応である庄野酸化を用いたアザヌクレオシド電解合成法を見出した [1]。庄野酸化では電解で生じる *N*-アシルイミニウムカチオンが反応中間体となるが、sp2 炭素が反応点であるため中間体への求核付加反応では立体選択性は生じない。そこで我々はヌクレオシドの立体選択的な合成に用いられる 3'-ペンチリデン保護を応用することで立体選択的な庄野酸化を達成した [2, 3]。本研究では立体選択性の発現メカニズムを解明するべく、嵩高さが異なるアルキリデン保護を付与したプロリノール誘導体の庄野酸化を検討した。この結果から立体選択性の発現に寄与する要因としてアルキリデン保護による環配座固定が重要であることを見出した。



Aza-nucleosides are promising candidates for antiviral drugs. In previous research, we developed electrochemical synthesis of aza-nucleosides via Shono-oxidation. However, in the methodology, *N*-α substitution carried out with no stereoselectivity because nucleophile attacks from both upper and lower surfaces of *N*-acyliminium intermediate. Therefore, we adopted 3'-pentylidene protection for stereoselective Shono-oxidation. In this research, we demonstrated Shono-oxidation with various alkylidene protected prolinol derivatives to study the mechanism of higher stereoselectivity. In this presentation, we report that the conformation restriction effect is important for stereoselective addition of nucleophile.

(1) Shoji, T.; Kim, S.; Chiba, K. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 4011
(2) Ichikawa, S.; Hayashi, R.; Hirano, S.; Matsuda, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5107
(3) Morizumi, H. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, **2023**, 26, e202201046

Stereoselective, Shono-Oxidation, Alkylidene Protective Group

発表責任者：岡田洋平（yokada@cc.tuat.ac.jp）

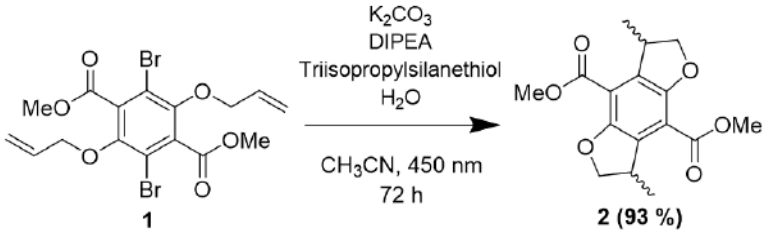
講演番号：2C4a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 C4 会場

光ラジカル環化反応を用いたジヒドロベンゾフラン骨格を有する蛍光色素の合成

Synthesis of fluorophores posessing dihydrobenzofuran skeleton by radical cyclization

○門倉 旦宗[1]、王 子茉[1]、堀口 元規[2]、北野 克和[1]、岡田 洋平[1] ([1]東農工大、[2]産総研)
○ Akitaka KADOKURA[1], Zimo WANG[1], Genki HORIGUCHI[2], Yoshikazu KITANO[1], Yohei OKADA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]AIST)

芳香環に電子供与基と電子求引基を繋げた Push-Pull 系の単一ベンゼン蛍光体は、その分子の小ささから観察対象の性質大きく変えにくく、失活させにくいという優れた性質があると考えられており、生化学や医学の分野での応用が期待できる蛍光物質である。



当研究室では電解反応を用いて、ジヒドロベンゾフラン骨格を基本骨格とする、Push-Pull 系と組み合わせた量子収率の高い新規低分子蛍光色素の合成に成功している [1]。しかし、合成スケールと収量が低い（2.5 mM、14%~59%）という問題があった。

本研究では光を用いたラジカル環化反応を使うことで、2,3-ジヒドロベンゾフラン（**2**）の合成を高収率（93%）で達成し、スケールアップ（80 mM）にも成功した。また、**2** を元にアルデヒド、ケトン、カルボン酸などの電子求引基に変換した蛍光色素の合成にも成功した。本発表では合成に成功した一連の 2、3-ジヒドロベンゾフラン蛍光色素の蛍光特性についても報告する。

Push-pull single benzene fluorophores, which consist of an electron-donating and an electron-withdrawing group connected to an aromatic ring, are considered to have desirable properties that do not inhibit or deactivate the properties of the observed object due to their small molecular size and are expected to have applications in the fields of biochemistry and medicine. Previously, we designed and synthesized a new small molecule fluorescent dye with a high quantum yield in combination with a push-pull system and a dihydrobenzofuran framework, using electrochemical method.[1] However, the synthesis scale and yield were low (2.5 mM, 14%~59%). In this study, by using radical cyclization, the synthesis of **2** was achieved in high yield (93%) and was successfully scaled up (80 mM). We also succeeded in synthesizing fluorescent dyes with other carbonyl groups, including aldehyde, ketone, and carboxylic acid based on **2**. In this presentation, we also report the fluorescence properties of a series of dihydrobenzofuran fluorophores.

(1) Wang, Z.; Horiguchi, G.; Kamiya, H.; Okada, Y. *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202301411.

organic synthesis, fluorophores, radical cyclization

発表責任者：門倉旦宗（akitaka.kadokura@gmail.com）

講演番号：2C4a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 C4 会場

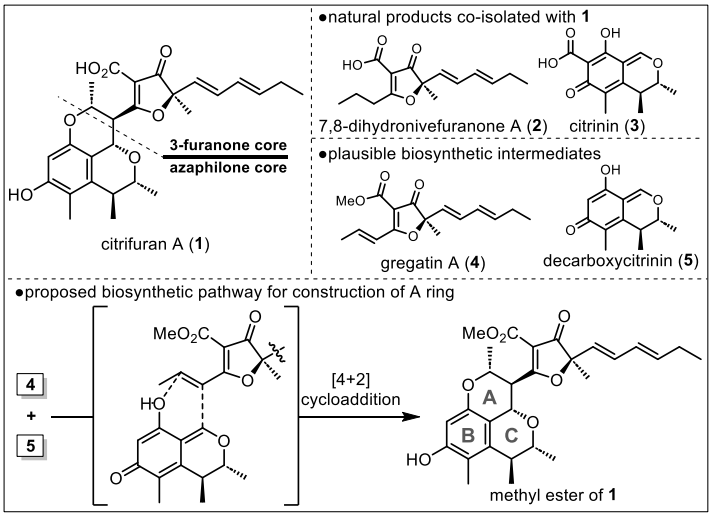
生合成模倣戦略による citrifuran A の合成研究

Biomimetic synthetic study on citrifuran A

○後藤 悠友[1]、町屋 綾佳[1]、奥村 太知[2]、岡 悠介[1]、石橋 理[1]、塩野 義人[3]、目黒 康洋[1]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大院農、[2]東北大農、[3]山形大農)

○Yuto Goto[1], Ayaka Machiya[1], Taichi Okumura[2], Yusuke Oka[1], Osamu Ishibashi[1], Yoshihito Shiono[3], Yasuhiro Meguro[1], Shigefumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agri., [2]Tohoku Univ. Agri., [3]Yamagata Univ. Agri.)

Citrifuran A (**1**)はムカデの腸管に共生する*Aspergillus*属の細菌から単離された天然物であり、マクロファージ RAW 264.7 における一酸化窒素産生阻害活性(IC_{50}=18.3 μM)[1)]を示す。共通の菌体培養液からは 3-furanone 骨格を有する 7,8-dihydronivefuranone A (**2**)および azaphilone 骨格を有する citrinin (**3**)が **1** と共に単離されている。これら化合物の構造上の関連性から **2** の類縁体である gregatin A (**4**)および **3** の脱炭酸誘導体である decarboxycitrinin (**5**)を生合成中間体とした生合成経路が推定される。我々は L-乳酸より 10 工程で合成した **4** を、天然資源から単離した **3** とともにトルエン中 120 ℃で加熱したところ、脱炭酸に伴って[4+2]環化による A 環の構築が進行し、低収率ながらも **1** が有する三環式骨格が形成されることを見いだした。本発表では推定生合成中間体である **4** の全合成および **5** の合成に向けた経過と、**3** を **5** の前駆体とした生合成模倣反応について紹介する。



Citrifuran A (**1**), which is co-isolated with 7,8-dihydronivefuranone A (**2**) and citrinin (**3**), from an *Aspergillus* sp. discovered in centipede intestine, exhibits inhibitory activitie against LPS-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophages (IC_{50} = 18.3 μM)[1)]. Considering that its molecular architecture is composed of gregatin A (**4**) and decarboxycitrinin (**5**), which were analogues of **2** and **3** respectively, the biosynthetic pathway of **1** was presumed to involve [4+2] cycloaddition between **4** and **5**. Herein, we will report our finding that heating a mixture of **4**, prepared from L-lactic acid in 10 steps, and **3**, isolated from a natural source, in toluene at 120 ℃ furnished methyl ester of **1** albeit in low yield. Since the [4+2] cycloaddition seemed to proceed only after decarboxylation of **3** occurred, we are working on the preparation of the precursor of **5**, which can be convertible to **5** in good yield.

Ref： 1) Guo-Ping Yin et al., *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 4058.

biomimetic strategy, total synthesis, polyketide

発表責任者：後藤悠友（yuto.goto.s2@dc.tohoku.ac.jp）

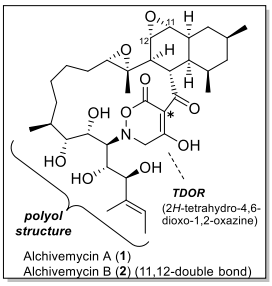
講演番号：2C4a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 C4 会場

Alchivemycin 類のポリオール部位の合成研究

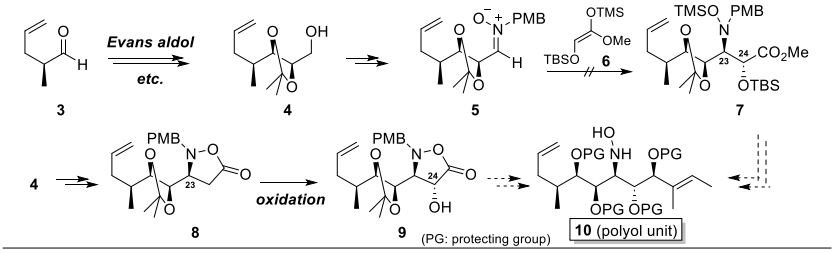
Synthetic study on polyol unit of alchivemycins

○石橋 理[1]、權 垠相[2]、目黒 康洋[1]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院理)
○ Osamu Ishibashi[1], Eunsang Kwon[2], Yasuhiro Meguro[1], Shigefumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Sci., Tohoku Univ.)

【目的】Alchivemycin 類（**1**, **2**）は，植物由来の放線菌より単離されたポリケチド天然物である[1,2]。マウス結腸癌由来細胞に対する浸潤阻害活性を示すことから，がん細胞の浸潤・転移過程を阻害する新規抗がん剤への応用が期待される。我々は，**1** と **2** の世界初の全合成と構造活性相関の解明を目指して研究を開始し，2023 年度大会ではその新奇複素環（TDOR）の構築法を報告した[3]。続いて本法を採用した全合成の達成に向け，6 連続不斉中心を有するポリオール部位の合成に着手した。



【方法・結果】 既知のアルデヒド **3** から Evans アルドール反応を含む数工程の変換によりアルコール **4** へと導いた。続く 2 工程の変換によりニトロン **5** へと導き，**5** に対するケテンシリルアセタール **6** の求核付加を試みたが，C23/24 位の立体化学の制御が困難であった。そこで C23/24 位の不斉炭素を順次構築する戦略に切り替え，**4** から数工程の変換によりジアステレオ選択的に N,O-ラクトン **8** へと変換することに成功した。続いて C24 位を立体選択的に酸化することで **9** へと導いた。現在，ポリオールユニット **10** の完成に向け，残る炭素鎖の伸長に向けた検討を行っている。



1) Igarashi, Y. *et al. Org. Lett.*, **2010,** *12*, 3402. 2) Igarashi, Y. *et al. Org. Lett.*, **2013,** *15*, 3514. 3) 日本農芸化学会 2023年度大会 2F02-05

Alchivemycins (**1**, **2**), polyketides isolated from plant-derived actinomycetes, exhibit selective toxicity against *Micrococcus luteus* and inhibit tumor cell invasion[1,2]. As a part of our efforts toward the total synthesis of **1** and **2**, we tried to construct the polyol moiety incorporated in them.

As an initial attempt at diastereoselective installation of the contiguous C23/24 stereocenters, addition of ketene silyl acetal **6** to nitrone **5**, synthesized from known aldehyde **3** via alcohol **4**, was conducted. Unexpectedly, however, the reaction proceeded with an undesired diastereoselectivity. After considerable experimentations, this task was achieved by hydroxylation at the C24 position of **8**, which was prepared from **4** in several steps. In this presentation, the details of the synthesis of **8** and our ongoing efforts toward the synthesis of polyol unit **10** will be disclosed.

alchivemycin, total synthesis, natural product

講演番号：2C4a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 C4 会場

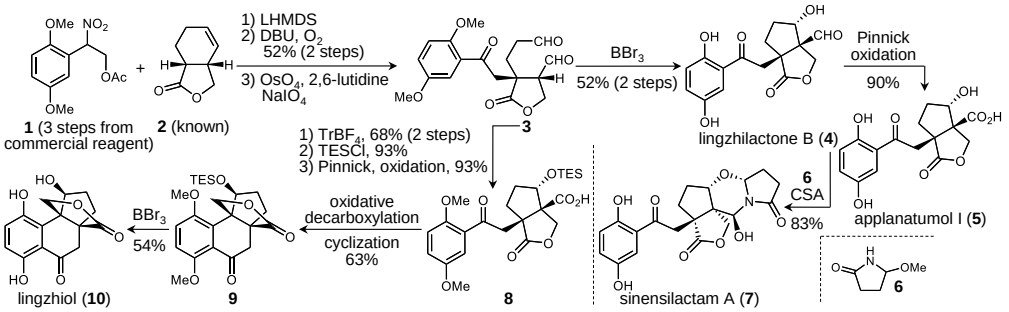
メロテルペノイド型天然物の網羅的全合成
Unified Total Synthesis of Meroterpenoid Natural Products

○目黒 康洋、小宅 真理、榎本 賢、桑原 重文（東北大院農）
○Yasuhiro MEGURO, Mari OYAKE, Masaru ENOMOTO, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

Lingzhilactone B (**4**)、Applanatumol I (**5**)、Sinensilactam A (**7**)及び Lingzhiol (**10**)は、*Ganoderma* 属のキノコからラセミ体として単離されたメロテルペノイドである[1-4]。**4**、**7**、**10** は腎線維化に関わる転写因子 smad3 のリン酸化を選択的に阻害することから、腎線維化の治療薬としての応用が期待されている。今回、我々は特異なハイブリッド型環構造を有するメロテルペノイド天然物の包括的全合成を達成したので、詳細を報告する。

ニトロ **1** とラクトン **2** をカップリングした後、Nef 反応とオレフィンの酸化開裂によりジアルデヒド **3** を合成した。**3** に対して、BBr_3 によるアルドール反応と Me 保護の除去で、**4** へ導いた。**4** を共通中間体として、Pinnick 酸化に付すことで **5** へと変換し、一方でラクタム **6** と縮合して **7** の合成を完了した。**3** から $TrBF_4$ によるアルドール反応、TES 保護及び Pinnick 酸化により **8** を得た。酸化的脱炭酸を伴う環化で **9** へ導いた後、TES 及び Me 保護を除去して、**10** の合成を達成した。

Lingzhilactone B (**4**), Applanatumol I (**5**), Sinensilactam A (**7**) and Lingzhiol (**10**), which exhibit the selective inhibition of Smad3 phosphorylation involved in renal fibrosis, were meroterpenoid natural products isolated as a racemic from the genus *Ganoderma*. The challenging hybrid ring system prompted our efforts toward these total syntheses. Coupling of **1** with **2** followed by the Nef reaction and oxidative cleavage gave **3**, which was then converted into lingzhilactone B (**4**). The preparation of applanatumol I (**5**) and sinensilactam A (**7**) was achieved from **4** by using the Pinnick oxidation and a condensation respectively. The preparation of carboxylic acid **8** was accomplished in 3 steps from **3** via an aldol reaction, a TES protection and the Pinnick oxidation. Oxidative decarboxylation of **8** with ammonium peroxodisulfate followed by a cyclization gave **9**. Finally, deprotection of the TES and Me group of **9** with BBr_3 furnished lingzhiol (**10**).



1) Y.X. Cheng et al., *J. Ethnopharm.* **2015**, *176*, 385. 2) Y.X. Cheng et al., *Tetrahedron* **2016**, 72, 4564.
3) Y.X. Cheng et al., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1565. 4) Y.X. Cheng et al., *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5488.

total synthesis, organic synthetic chemistry, meroterpenoid

講演番号：2C4a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 C4 会場

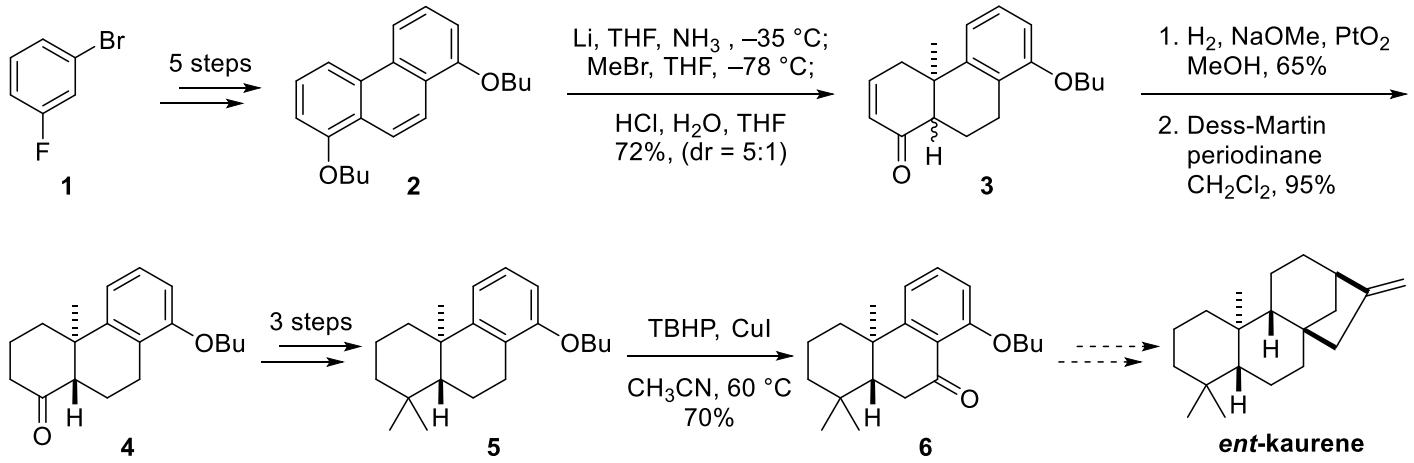
Birch 還元-アルキル化を用いた *ent*　-カウレンの合成研究

Synthetic Study of *ent*-Kaurene Featured by Birch Reductive Alkylation

○阪野 奨太[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大生医工研セ)
○Shota BANNO[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Cent. Toyama Pref. Univ.)

ent-カウレンジテルペノイド類は、これまでに 1000 種類以上が発見されており、その多くは、古くより生薬として利用されるイソドン属の植物から単離されている [1)]。本研究では、多様な *ent*-カウレン類の網羅的合成を目指し、基本骨格である *ent*-カウレンの合成を検討した。

1-ブロモ-3-フルオロベンゼン **1** から 5 工程で誘導したフェナントレン **2** を Birch 還元-アルキル化で第四級炭素の構築とともにエノン **3** へと変換した [2)]。得られた **3** のエノール化と立体選択的な水素添加、続く酸化により、ケトン **4** を合成した。**4** を 3 工程でジメチル体 **5** へと誘導した後、**5** のベンジル位を TBHP により酸化し、2 回目の脱芳香族化反応の基質となるケトン **6** を得た。今後、**6** から *ent*-カウレンを合成する。



More than 1000 kinds of *ent*-kaurene diterpenoids have been discovered so far, and most of them have been isolated from plants of the *Isodon* genus, which have been used as herbal medicines for a long time. Aiming at the comprehensive synthesis of diverse *ent*-kaurene diterpenoids, we targeted *ent*-kaurene for total synthesis.

Phenanthrene **2** derived from 1-bromo-3-fluorobenzene **1** in 5 steps was converted to enone **3** by Birch reductive alkylation with the construction of a quaternary carbon. The enol of the resulting **3** was stereoselectively hydrogenated and subsequent oxidation delivered ketone **4**. **4** was derived to **5** in 3 steps, and the benzylic position of **5** was oxidized by TBHP to give ketone **6**. Efforts toward total synthesis of *ent*-kaurene are underway.

1) Ma, D. *et al*. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 119. 2) Landais, Y. *et al. J. Org. Chem*. **2009**, *74*, 6469.

organic synthesis, natural products, diterpene

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2C4a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 C4 会場

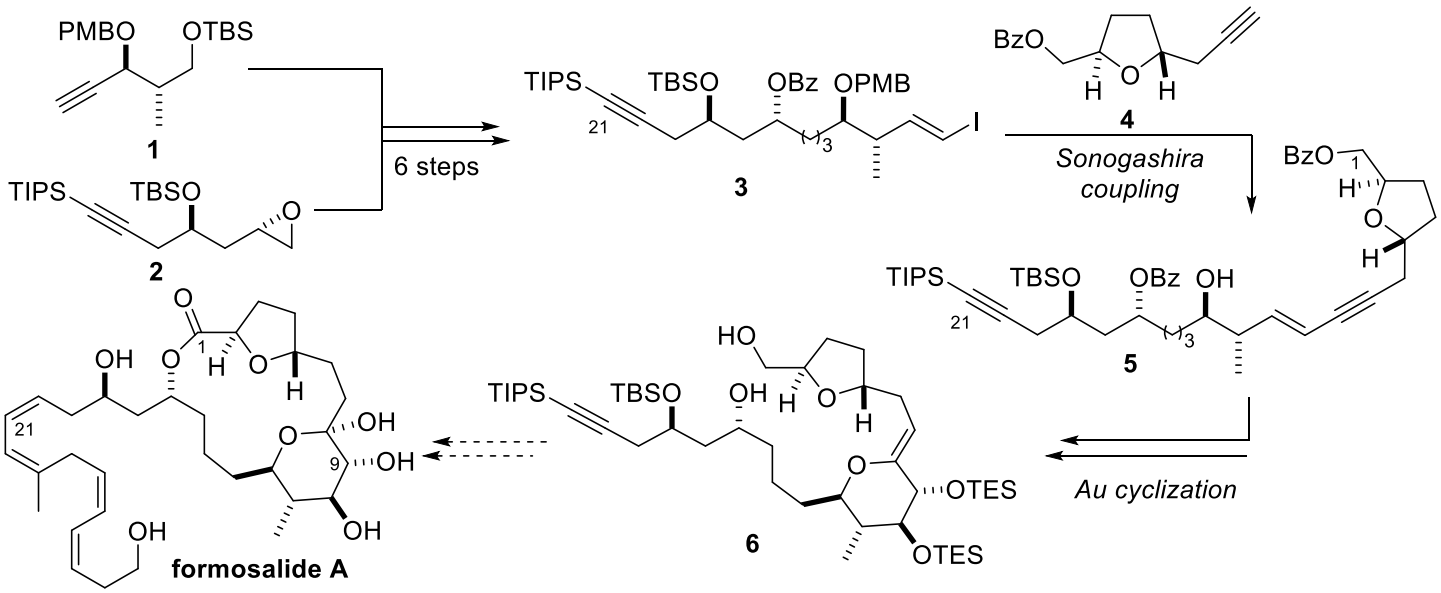
ホルモサリド A C1-C21 フラグメントの合成研究

Synthetic Study of the C1-C21 Fragment of Formosalide A

○伊藤 陽奈[1]、茂住 梨沙[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大生医工研セ)
○Hina ITO[1], Risa MOZUMI[1], Keiseke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Cent. Toyama Pref. Univ.)

ホルモサリド A は、海洋性渦鞭毛藻 *Prorocentrum* sp.より単離された 17 員環マクロリドであり、白血病細胞と結腸腺ガン細胞に対する細胞毒性を有する [1,2)]。我々はホルモサリド類の全合成を目指し研究をおこなっている。

TIPS アセチレンから 6 工程で誘導した **1** と、(*S*)-エピクロロヒドリンから 5 工程で誘導した **2** のカップリングを経て、**3** を合成した。その後、別途 1,2-エポキシ-5-ヘキセンから 5 工程で誘導したテトラヒドロフラン **4** との薗頭カップリングによって **5** を誘導し、Sharpless 不斉ジヒドロキシル化及び金触媒による環化を経て C1-C21 フラグメント **6** を得た。



Formosalide A is a 17-membered ring macrolide, isolated from *Prorocentrum* sp, and shows moderate cytotoxicity to leukemia cells and colon adenocarcinoma cells.[1,2)] Motivated by the complex structure, we started synthetic studies of formosalides.

Vinyl iodide **3** was synthesized from **1** and **2**. **5** was derived from vinyl iodide **3** and tetrahydrofuran ring **4** by Sonogashira coupling. Then, the Au-mediated cyclization provided C1-C21 fragment **6**.

1) Lu, C.-K.; Chen, Y.-M.; Wang, S.-H.; Wu, Y.-Y.; Cheng, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1825. 2) Schulthoff, S.; Hamilton, J. Y.; Heinrich, M.; Kwon, Y.; Wirtz, C.; Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 446.

organic synthesis, natural products, Total synthesis

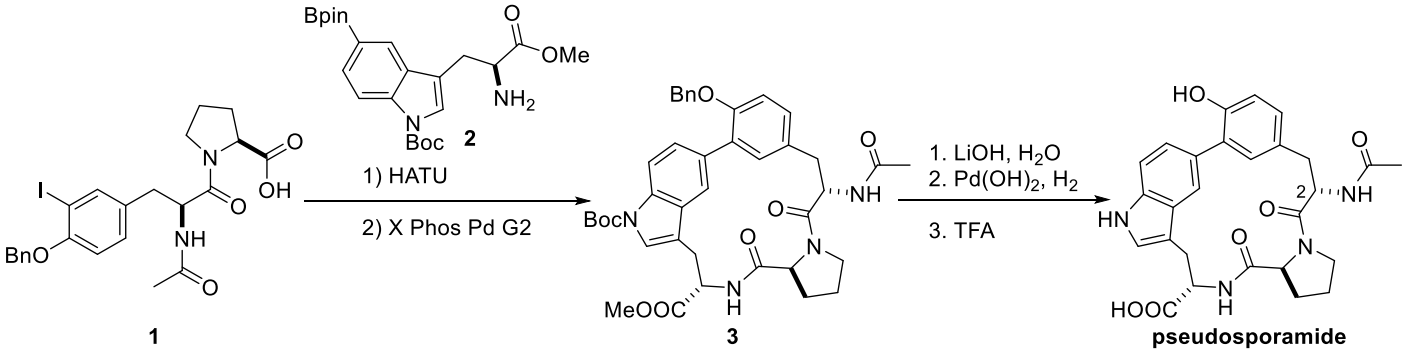
発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2C4a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 C4 会場

Pseudosporamide 類の合成研究
Synthetic Studies of Pseudosporamides
○菊田 依乃[1]、桂川 美咲[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大生医工研セ)
○Yorino Kikuda[1], Misaki Katsuragawa[1], Keisuke Fukaya[1,2], Daisuke Urabe[1,2] ([1]Toyama Pref . Univ, [2]Biotech. Res. Cent. Toyama Prefectural)

Pseudosporamide は放線菌 *Pseudosporangium* 属より単離された環状ペプチドである[1)]。興味深いことに、DFT 計算に基づく配座解析と ECD 計算から、C2 位の立体化学が異なる非天然エピマーは pseudosporamide と比較して分子全体の立体配座が大きく異なることが示唆された。これは C2 位の立体化学がビアリール結合の軸不斉に影響を与えていることを示している。本研究では C2 位の立体化学が軸不斉に及ぼす影響を明らかにするため、pseudosporamide とともに C2 位エピマーの合成研究に着手した。

3-ヨード-L-チロシンを出発原料として L-プロリンとの縮合反応を含む 6 工程でジペプチド **1** を誘導した。次いで、ヒドロキシトリプトファンからホウ素化を含む 6 工程で調整した **2** を **1** と HATU 存在下で縮合し、分子内鈴木カップリングによって環化ペプチド **3** へと誘導した。その後、**3** の脱保護により pseudosporamide を合成した。現在は、C2 位のエピマーの合成を目指している。



Pseudosporamide is a cyclic peptide isolated from the actinomycete genus *Pseudosporangium* . In this study, we aimed at total synthesis of pseudosporamide and its C2 epimer to clarify the effect of C2 stereochemistry on the axial chirality of the biaryl structure. Dipeptide **1**, prepared from 3-iodo-L-tyrosine in 6 steps, and **2**, prepared from hydroxytryptophan in 6 steps, were condensed in the presence HATU, followed by intramolecular Suzuki coupling to provide **3**. The synthesis of pseudosporamide was then achieved by deprotection of **3**. Currently, we are working on the synthesis of the C2-epimer of pseudosporamide.

1) Saito, S.; Atsumi, K.; Zhou, T.; Fukaya, K.; Urabe, D.; Oku, N.; Karim, Md. R. U.; Komaki, H.; Igarashi, Y. *Beilstein J. Org. Chem.,* **2020,** 16, 1100-1110.

Synthetic Studies

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2C4a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 C4 会場

Synthesis and structural elucidation of antatollamide A and its derivatives

○YITONG LI, Keigo Takamatsu, Hiroyuki Konno (Yamagata University)

Antatollamide A and Antatollamide B are organic compounds naturally occurring in the marine organism Didemnum molle, exhibiting noteworthy antibacterial and antitumor activities. Understanding the pharmacological attributes of Antatollamide A and Antatollamide B and their derivatives requires a detailed elucidation of their chemical structures and synthesis methodologies. This pursuit not only contributes significantly to scientific knowledge but also holds promise for advancing practical applications, paving the way for future innovations in pharmaceutical design and synthesis.

In the course of this investigation, three cyclic peptides were synthesized using Fmoc-SPPS (Fmoc solid-phase peptide synthesis). Subsequent to synthesis, a structural analysis of the resulting cyclic peptides was conducted employing techniques such as HPLC, MS, and NMR. Special emphasis was placed on the synthesis and analysis of peptides incorporating Pro residues.

The initial compound synthesized in the study is Desthio-antatollamide A, it's the half of Antatollamide A, wherein the Cys residues were substituted with Ala residues. The process involveed first synthesizing linear peptides (sequence: DAla-Ile-Val-Pro-Pro-Phe), followed by the synthesis of cyclic peptides.

Followed this, the subsequent compound synthesized is a dimerized cyclic peptide with the sequences of Antatollamide A and B, featuring a large cyclic structure. Within this ring, two disulfide bonds exist, making it a unique peptide. This distinctive structural attribute contributes to its distinct properties and potential biological activities. First, linear peptide was synthesized (sequence: Phe-Pro-Pro-Val-Ile-DCys-Phe-Pro-Pro-Val-Ile-DCys), followed by the synthesis of cyclic peptides, and subsequent connect two disulfide bonds.

The final compound synthesized in this research endeavor is Mollamide F. Both Mollamide F and Antatollamide A and Antatollamide B, originating from the same marine organism, share a distinctive feature of differing stereochemistry within the Phe residue. Notably, Mollamide F is characterized by the presence of a thiazoline ring. Initially, linear peptide was synthesized (sequence: DCys-Ile-Val-Pro-Pro-DPhe), followed by the synthesis of cyclic peptides, and then catalyzing sulfur to generate thiazoline.

Antatollamide A and Antatollamide B, Cyclic Peptide Synthesis, Fmoc-SPPS method

発表責任者：Li Yitong（625819200@qq.com）

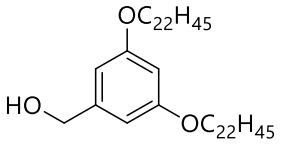
講演番号：2C4a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 C4 会場

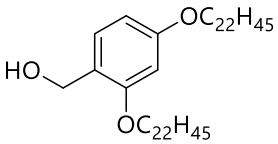
可溶性タグを活用したペプチドの分子内環化

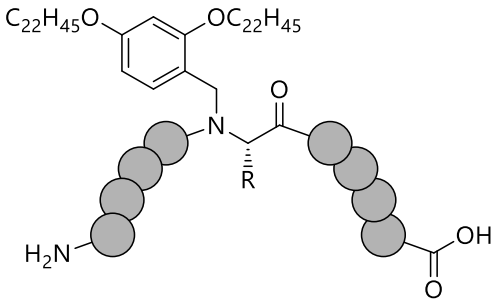
Soluble Tag-Assisted Peptide Intramolecular Cyclization

○岡田 洋平、山上 紗弓理、北野 克和、千葉 一裕（東農工大）
○Yohei OKADA, Sayuri Yamagami, Yoshikazu Kitano, Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

次世代の医薬品候補としてペプチドの研究開発を進める上では、高純度・大スケールで化学合成する技術の確立が必須である。アミン末端とカルボキシ末端を繋ぎ合わせた head-to-tail 型の環状ペプチドは特に有望な化合物群であるにも関わらず、その合成は極めて困難である。我々はこれまで、疎水性のベンジルアルコールを可溶性の「タグ」として用いるペプチドの液相合成技術の研究開発を推進してきた[1]。この方法は head-to-tail 型の環状ペプチドにも適用可能である[2]。本研究では、これらの先行研究を踏まえて head-to-tail 環化におけるタグの位置をチューニングしたところ、効率的な分子内反応が達成できる条件を見出すことに成功した[3]。







To develop peptides as therapeutic candidates, their chemical synthesis must be achieved in larger scales with high purities. Although head-to-tail cyclized peptides are promising compounds in this class, their synthesis remains challenging. We have been developing liquid-phase peptide synthesis using hydrophobic benzyl alcohols as soluble “tags”.[1] We also reported that the method was applicable to the production of head-to-tail cyclized peptides.[2] Based on the previous findings, we herein have tuned the tagging position to study the effect over intramolecular cyclizing reactions and have led to the effective conditions to synthesize the head-to-tail cyclized peptides.[3]

(1) Okada, Y.; Suzuki, H.; Nakae, T.; Fujita, S.; Abe, H.; Nagano, K.; Yamada, T.; Ebata, N.; Kim, S.; Chiba, K. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 320–327.
(2) Fujita, Y.; Fujita, S.; Okada, Y.; Chiba, K. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1155–1157.
(3) Yamagami, S.; Okada, Y.; Kitano, Y.; Chiba, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 3133–3138.

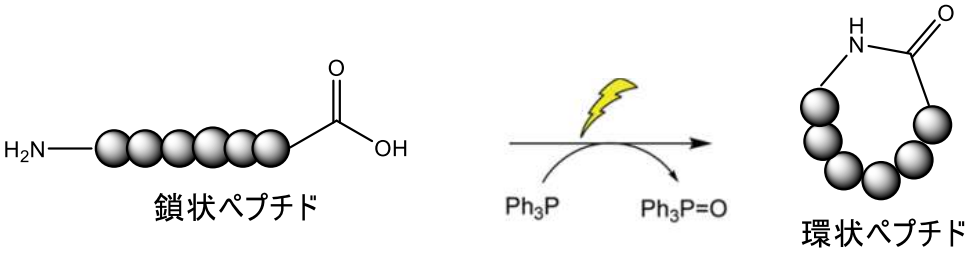
soluble tag, peptide, intramolecular cyclization

発表責任者：岡田洋平（yokada@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2C4a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 C4 会場

ホスフィンを活用した電解ペプチド合成
Electrochemical peptide synthesis by using phosphine
○島村 藍人、永原 紳吾、北野 克和、千葉 一裕、岡田 洋平（東農工大）
○Aito SHIMAMURA, Shingo NAGAHARA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA, Yohei OKADA (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

次世代の医薬品として注目されているペプチドの合成には縮合剤が用いられるが、縮合剤由来の副生成物が廃棄物として蓄積する問題がある。そこで我々は副生成物を回収し、縮合剤の再生が可能なペプチド合成法の開発を目指すこととし、トリフェニルホスフィン（Ph_3P）を陽極酸化することで生じるラジカルカチオンを縮合剤として利用するペプチド合成法の開発に取り組んだ。本反応では副生成物としてトリフェニルホスフィンオキシド（Ph_3PO）が生じるが、Ph_3PO から Ph_3P への変換方法は様々な方法で達成されていることから、縮合剤のリサイクルが可能なペプチド合成法を実現することができると考えた。種々の検討の結果、Ph_3P の陽極酸化によるペプチド合成と Ph_3PO の回収に成功した。さらに、細胞膜透過性や代謝酵素に対する安定性が向上し、医薬品としての活性が向上することで知られている環状ペプチドの合成への応用が可能であることを確認した。



Although peptides have been gaining much attention as promising candidates for medicines. the long-standing problem of an amount of waste produced has not been resolved. One of the causes is using condensation Reagents because they generate byproducts. To address the issue, we envisioned that the development of peptide synthesis using triphenylphosphine (Ph_3P) which is oxidized at the anode and become radical cation. Although triphenylphosphine oxide (Ph_3PO) is produced as byproduct in this reaction, reductions of Ph_3PO to Ph_3P are achieved in various ways. Results of various studies, we achieved peptide synthesis by using Ph_3P as a recyclable condensation reagent and recovery of Ph_3PO. Moreover, we confirmed that this synthesis method could be applied to synthesis of cyclic peptide, which is known to show cell membrane permeability and stability to metabolic enzymes compared to linear peptide.

phosphine, peptide, elctrochemical synthesis

発表責任者：岡田洋平（yokada@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2C4p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 C4 会場

抗マラリア活性を示すβ-カルボリン／クマリンハイブリッド化合物の発見

New antimalarials with a ß-carboline/coumarin hybrid structure

○二村 友史[1]、長 展生[1]、喜久里 貢[1]、新倉 保[2]、早瀬 大貴[1]、清水 猛[1]、小林 富美惠[3]、小山 裕雄[1]、渡辺 信元[1]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS、[2]杏林大・医、[3]麻布大・生命・環境)
○Yushi FUTAMURA[1], Nobuo CHO[1], Ko KIKUZATO[1], Mamoru NIIKURA[2], Hiroki HAYASE[1], Takeshi SHIMIZU[1], Fumie KOBAYASHI[3], Hiroo KOYAMA[1], Nobumoto WATANABE[1], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]Kyorin Univ, [3]Azabu Univ)

マラリアは病原体であるマラリア原虫が蚊を媒介して感染する病気であり、その罹患者は年間、数億人に上る。マラリアの治療にはアルテミシニンなど有効性の高い薬があるものの、その種類は十分ではない。また既存薬に対する耐性原虫の出現が問題となっており、新しい抗マラリア剤の開発が必須である。我々はこれまでに抗マラリア活性を示す化合物を表現型スクリーニングで探索してきた。

今回、天然化合物ライブラリーNPDepo の 17,310 化合物を評価し、β-カルボリンとクマリンのハイブリッド化合物 Malin-e が熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 3D7 に抗マラリア活性を示すことを見出した（IC_{50}=20 nM）。またβ-カルボリンやクマリン、リンカー部分を改変した類縁体を種々合成し、親化合物より 10 倍活性の強い類縁体 Malin-h を得た。さらにこの化合物を *in vivo* マウス感染モデルで評価したところ、40 mg/kg で感染抑制効果が見られた。このことから Malin-h は新しい抗マラリア剤のリードとなることが期待される。

Malaria is a mosquito-borne tropical disease responsible for hundreds of million clinical cases. Currently, several antimalarials are available; however, it is a problem that drug-resistant strains against these drugs are emerging. Thus, the development of antimalarials with unique chemical structures and modes of action are urgently needed. To this end, we set up a cell-based phenotypic screening system and have explored new antimalarials from our natural product resources.

In the course of screening for antimalarial compounds from a chemical library of RIKEN NPDepo, we found that a β-carboline/coumarin hybrid compound (Malin-e) had a potent antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* 3D7. SAR studies on this class of compounds led to discover more potent analogue (Malin-h) 10 times more active than the original one. Furthermore, this compound demonstrated a potent antimalarial effect *in vivo* mouse model, suggesting it holds a promise for the development of new antimalarial drugs.

Malaria, Phenotypic screening, Chemical biology

講演番号：2C4p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C4 会場

抗カンジダ物質 TPPB の構造活性相関とタンパク質－化合物間相互作用解析
SAR and protein-compound interaction analyses of anti*candida* agent, TPPB
○青野 晴美[1]、二村 友史[1,2]、堀 康宏[1]、室井 誠[1]、平野 弘之[1]、本田 香織[1]、西浦 正芳[1]、侯 召民[1]、木野 邦器[2]、長田 裕之[1,2,3] ([1]理研 CSRS、[2]早大理工総研、[3]静岡県立大)
○Harumi AONO[1], Yushi FUTAMURA[1,2], Yasuhiro HORI[1], Makoto MUROI[1], Hiroyuki HIRANO[1], Kaori HONDA[1], Masayoshi NISHIURA[1], Zhaomin HOU[1], Kuniki KINO[2], Hiroyuki OSADA[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Waseda univ, [3]Univ. of Shizuoka)

前年度の本大会で、化合物ライブラリーから見出した抗カンジダ物質テトラキス（ペンタフルオロフェニル）ホウ酸塩（TPPB）(1)が低分子量 G タンパク質 RHO1 を標的とする可能性を報告した。今年度は、1 の構造活性相関研究を実施し、RHO1 との物理的相互作用について検討した。ペンタフルオロフェニル基の置換数が減った類縁体 2 および 3 では抗真菌活性が低下し、またフッ素化されていない類縁体 4 は活性を示さなかったことから構造中のフッ素が重要であることが示唆された。また大腸菌を用いて発現・精製したカンジダ由来のリコンビナント *Ca*RHO1 を蛍光標識し、1 との相互作用をマイクロスケール熱泳動（MST)で解析した。その結果、1 は Kd が 10 μM 程度の親和性を示したが、活性のない 4 では熱泳動に違いが認められなかった。これまでに、RHO1 を標的とする抗真菌剤の報告はなく、1 が初めての報告である。

We have previously studied on the mechanism of action of tetrakis(pentafluorophenyl)borate (TPPB)(1), which shows potent antifungal activity against *Candida albicans*, and we reported that 1 targeting small GTPase RHO1. In this study, the structure-activity relationship of 1 and the physical interaction between RHO1 and 1 were investigated. Among several analogues of 1, tris-(2) and bis-(pentafluorophenyl) borate (3) had less potency, and the non-fluorinated analogue 4 was completely inactive, suggesting that fluorine is important for the antifungal activity. Consistently, binding affinity determined by microscale thermophoresis (MST) using labeled recombinant *Candida albicans Ca*RHO1 showed only borate 1 interract with RHO1 (Kd = Ca. 10 μM) not 4. These data demonstrated that 1 is a first-in-class antifungal targeting RHO1.

Rho1, *Candida albicans*, chemical biology

発表責任者：二村友史（futamuray@riken.jp）

講演番号：2C4p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C4 会場

筋分化促進ホスホロチオエート修飾オリゴ DNA の鏡像異性体に関する計算構造集団解析
Computational study for conformational ensembles of phosphorothioate myogenetic oligo-DNA enantiomer

○榎本 湧也[1]、高谷 智英[1,2,3]、下里 剛士[1,2,3]、梅澤 公二[1,2,3] ([1]信大・農、[2]信大院・総合理工、[3]信大・バイオ研)
○Yuya ENOMOTO[1], Tomohide TAKAYA[1,2,3], Takeshi SHIMOSATO[1,2,3], Koji UMEZAWA[1,2,3] ([1]Fac. of Agric. Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shinshu Univ., [3]IBS. Shinshu Univ.)

筋分化促進オリゴデオキシヌクレオチド iSN04 は一本鎖 18 塩基のアプタマーである．その生理活性の発現に特定の立体構造が示唆されている．iSN04 は安定化のためにホスホロチオエート（PS）修飾ヌクレオチドとして実験に用いられている．PS 修飾によって R 体と S 体の鏡像異性体が生じる．本研究では，鏡像異性体が iSN04 の立体構造へ与える影響を立体構造集団の観点から明らかにすることを目的に分子シミュレーションによって解析した．

これまでにマルチカノニカル分子動力学（McMD）シミュレーションをホスホジエステル体に適用することで, iSN04 の 13-15 番グアニン塩基がスタッキングしている構造的特徴を示した. McMD シミュレーションは効率的に平衡状態の立体構造集団を算出できる．McMD シミュレーションを R 体の PS 修飾 iSN04（(R)-iSN04）及び S 体の PS 修飾 iSN04（(S)-iSN04）へ適用した。

McMD シミュレーションから計算された立体構造集団について塩基間コンタクトを解析した．その結果, (R)-iSN04 及び(S)-iSN04 においても 13-15 番グアニン塩基がスタッキングを形成していた．また，(R)-iSN04 及び(S)-iSN04 の立体構造集団は，ホスホジエステル体と比べて，分子が伸長した立体構造を多く含んでいた．本発表では，これらの分子構造の差異について詳細を述べる．

The single-stranded 18-base oligodeoxynucleotide aptamer, iSN04, promotes myogenic differentiation. It is suggested that iSN04 folds into a biologically active conformation. The molecule of iSN04 is synthesized as a phosphorothioate (PS)-modified nucleotide. The PS-modified nucleotide contains enantiomer: (R)-iSN04 and (S)-iSN04. The stable conformations of iSN04 enantiomer have not been revealed. Then, we conducted molecular simulation to investigate the conformational ensembles of iSN04 enantiomer.

We have performed multicanonical molecular dynamics (McMD) simulation, an enhanced-sampling method, for phosphodiester-iSN04. The results have shown the 13-15 guanine base stacking. In this study, McMD simulations were applied for (R)-iSN04 and (S)-iSN04.

The conformational ensembles were analyzed by inter-base contacts and structural clustering. The results showed that both conformations of (R)-iSN04 and (S)-iSN04 contained the 13-15 guanine base stacking as well as phosphodiester-iSN04 does. The conformations of enantiomers preferred to be extended than that of phosphodiester-iSN04. The details will be discussed.

aptamer, molecular simulation, structure

発表責任者：榎本湧也（20a1007h@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C4p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C4 会場

αシヌクレインを標的とした中分子核酸の開発と神経治療への応用

Development of mid-size molecular nucleic acids targeting α-synuclein and their application to neurotherapy

○村上 一馬[1]、泉尾 直孝[2]、長尾 知生子[3]、水口 賢司[3]、Chawla Esha[4]、Bitan Gal[4] ([1]京大院農、[2]富山大薬、[3]大阪大蛋白研、[4]カルフォルニア大ロサンゼルス校)

○Kazuma MURAKAMI[1], Naotaka IZUO[2], Chioko Nagao[3], Kenji Mizuguchi[3], Esha Chawla[4], Gal Bitan[4] ([1]Kyoto Univ., [2]Toyama Univ., [3]Osaka Univ., [4]UCLA)

核酸アプタマーは 1 本鎖のオリゴ DNA あるいはオリゴ RNA から構成される中分子核酸であり，標的分子に対して高い結合能と選択性をもつ．類似の結合薬である抗体に比べて，コスト面や免疫原性の低さなど核酸アプタマーには優れている点は多い.[1)] アミロイドタンパク質の凝集体であるメタアグリゲートは，単一あるいは複数種の認知症の病態に関わっている.[2,3)] α-シヌクレイン（αSyn）は全長 140 残基のアミロイドタンパク質であり，凝集フィラメントは神経変性および細胞間伝播において重要な役割を果たす．近年，αSyn の N 末領域における KTKEGV の繰り返しモチーフが凝集に重要であることがクライオ電子顕微鏡や NMR 解析から明らかになった．しかしながら，市販抗体の多くは C 末領域に結合するものであり，N 末領域に集中するリシン残基は抗体作成にはやや不向きとされた．本研究は，αSyn の N 末領域を標的とした RNA アプタマーの開発を目的とした．SELEX によって得られたモノクローン (1R6) は，αSyn1-60 とαSyn1-95 にそれぞれ強く結合したが，αSyn96-140 にはまったく結合しなかった．また 1R6 はαSyn の凝集能および細胞間伝播を阻害したことから，シヌクレイノパチーの有望な創薬リードになる可能性がある．さらに脳輸送ナノキャリアの開発に向けて，血液脳関門を指向した人工エクソソームを多段階の圧縮破砕法によって調製する方法を開発した．

Nucleic acid aptamer is a disease modifying drug consisting of single-stranded oligo DNA or oligo RNA, and have high binding ability and selectivity to target molecules. Compared to antibodies, nucleic acid aptamers have advantages such as low cost and immunogenicity.[1)] "MetaAggregates" of amyloidogenic proteins are involved in the pathogenesis of single or mixed dementia.[2,3)] α-Synuclein (αSyn), a 140-residue protein, forms aggregates, which are involved in neurodegeneration and cell-to-cell transmission. KTKEGV repeat motif in the N-terminal region of αSyn is important for aggregation. Most commercial antibodies against αSyn bind to the C-terminal region. We developed RNA aptamers against the N-terminal region of αSyn using SELEX technology. One obtained monoclone (1R6) inhibited the aggregation ability and cell-to-cell propagation of αSyn, suggesting 1R6 as a promising drug lead for synucleinopathy. Toward a brain transport, a method to isolate exosome mimetics with high purity and high yield, which have potential permeability to the blood-brain barrier, was demonstrated.

References 1) **JBC** 2022 *298*, 101478; 2) **FASEB J.** 2022, *36*, e22493; 3) **実験医学増刊** 2023, *41*, 22-29

RNA aptamer, α-synuclein, exosome

発表責任者：村上一馬（murakami.kazuma.4v@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C4p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C4 会場

アルコールによる Meyer-Overton 相関はタンパク質のない人工膜で成立する
Establishment of the Meyer-Overton correlation in an artificial membrane without protein
松本 惇志[2]、○上園 幸史[1] ([1]東大・院理・生物科学、[2]九大・院理・生物)
Atsushi Matsumoto[2], ○Yukifumi Uesono[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyushu University)

薬物は脂質膜と膜タンパク質、どちらに直接作用するのか不明なものが多い。これは“多様な薬物の効力は脂溶性に応じて指数的に増強する”という Meyer−Overton（MO）相関の原理が 120 年以上解明されていないためである。MO 相関は麻酔薬だけでなく、アルコール等の多様な化合物や抗菌・毒性等多様な生物作用でも確認されたため、薬物と生物との何らかの基本的作用を示す極めて重要な相関と考えられ、定量的構造活性相関のひな形にもなった。しかし MO 相関の説明は脂質説とタンパク質説で長年議論され未だに決着していない。これは脂質膜とタンパク質が混在する生体膜の解析では解釈が困難なためである。そこでタンパク質のない人工膜で MO 相関が成立しうるのか検証した。

静置水和法により飽和・不飽和リン脂質とコレステロールの 3 成分で巨大人工膜（GUV）を作製すると、生細胞のラフト様膜ドメインが形成される。このドメイン形成を生物作用の指標として各鎖長アルコールの影響を調べた。その結果、アルコールは膜破壊しない濃度で膜ドメイン形成を阻害し、その半阻害濃度（IC_{50}）は鎖長に応じて指数的に減少したため、MO 相関は脂質膜だけで成立することが初めて判明した。また、各鎖アルコールの膜水分配係数(C_m/C_w)と IC_{50}（水中濃度：C_w）との積（膜内濃度：C_m）は鎖長に依らず一定であった。したがって、MO 相関は薬物と脂質膜との作用を表す相関であり、生物作用を発揮する一定の膜内濃度に達することが MO 相関の原理と考えられる。

The potency of various drugs increases exponentially with the lipophilicity, which is called as the Meyer-Overton (MO) correlation. The MO correlation was explained by either the lipid or protein theories, although the debate has not been resolved, and the principle remains unknown. The gentle hydration method was used to form giant unilamellar vesicles (GUVs) consisting of high- and low-melting phospholipids and cholesterol in the presence of *n*-alcohols (C_2-C_{12}), and the percentage of GUVs with domains was determined. *n*-Alcohols inhibited the domain formation of GUVs, and the half inhibitory concentration (IC_{50}) in the aqueous phase decreased exponentially with increasing chain length (lipophilicity), indicating that the MO correlation is established in protein-free lipid membrane, which supports the lipid theory. The membrane concentrations of alcohols for the inhibition, which is a product of the membrane-water partition coefficient and the IC_{50} values, remained constant irrespective of the chain length. Thus, when alcohols reach the same critical concentration in membrane, similar biological effects appear irrespective of the chain length, which is the principle underlying the MO correlation.

anesthetics, QSAR, lipid theory

発表責任者：上園幸史（uesono@bs.s.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C4p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C4 会場

Girolline is a sequence context-specific modulator of eIF5A activity

○Tilman Schneider-Poetsch[1], Yongjun Dang[2], Mayumi Arata[3], Yuichi Shichino[4], Ali Al Mourabit[5], Celine Morrow[5], Daniel Romo[6], Jun O. Liu[7], Shintaro Iwasaki[4,8], Minoru Yoshida[1,9,10] ([1]Chemical Genomics Research Group, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Saitama 351-0198, Japan, [2]Center for Novel Target and Therapeutic Intervention, Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China, [3]Drug Discovery Seed Compounds Exploratory Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Saitama 351-0198, Japan, [4]RNA Systems Biochemistry Laboratory, RIKEN Cluster for Pioneering Research, Wako, Saitama 351-0198, Japan, [5]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France, [6]Department of Chemistry and Biochemistry, Baylor University, One Bear Place, Waco, TX76798, USA, [7]Department of Pharmacology and Molecular Sciences, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA, [8]Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Chiba 277-8561, Japan, [9]University Professor Office, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan, [10]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

Natural products have a long history of providing potent probes into protein biosynthesis, with numerous molecules serving as valuable therapeutics. The marine natural product girolline has been described as an inhibitor of protein synthesis. Here, we demonstrate that it is not a general translation inhibitor but represents a sequence-specific modulator of translation factor eIF5A. Girolline interferes with ribosome-eIF5A interaction and induces ribosome stalling, primarily on AAA-encoded lysine. Our data furthermore indicate that eIF5A plays a physiological role in ribosome-associated quality control (RQC) and is important in maintaining the efficiency of translational progress. Girolline, therefore, provides a potent tool compound for understanding the interplay between protein production and quality control in a physiological setting and offers a new and selective means of modulating gene expression.

Natural Products, Translation, eIF5A

発表責任者：Tilman Schneider-Poetsch（tsp@riken.jp）

講演番号：2C4p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C4 会場

コレラ菌 Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素の特異的化学修飾と動態観測

Characterization of the conformational change of Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae* through specific chemical modification

○宮地 咲野[1]、田中 比奈子[1]、石川 萌[1]、Blanca Barquera[2]、桝谷 貴洋[1]、村井 正俊[1]、三芳 秀人[1] ([1]京大院農、[2]レンセラー工科大)

○ Saya Miyachi[1], Hinako Tanaka[1], Moe Ishikawa[1], Blanca Barquera[2], Takahiro Masuya[1], Masatoshi Murai[1], Hideto Miyoshi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]RPI)

【背景と目的】Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素（**Na^+-NQR**）は、基質の酸化還元と共役して Na^+を能動輸送する膜タンパク質複合体であり、コレラ菌など多数の病原性細菌に必須のエネルギー代謝酵素である。我々が報告したコレラ菌 Na^+-NQR の cryo-EM 構造を参照すると、一部のコファクター間の距離が異常に長く、酵素反応中に大きな構造変化を伴うと予想される。また諸々の実験から、NqrB サブユニットの N 末端領域（**NqrB-N 末**）が阻害剤の結合部位であり、この領域でも大きな構造変化が起こっていると予想している。本研究では Na^+-NQR の分子レベルでの反応機構の解明を将来的な目標に見据え、NqrB-N 末の動態を観測することを目指した。

【方法と結果】阻害剤結合部位のアミノ酸残基を特異的に化学修飾する手段として ligand directed chemistry （LD 化学）を用いることとし、リガンド分子 **KB2** をデザイン合成した（**図 1**）。LD 化学は、リガンド分子の高い結合親和性を利用し、標的タンパク質にタグ分子を求核置換により固定させるものである。リガンドの鋳型として Na^+-NQR の強力かつ特異的阻害剤であるコロルミシン A を、タグには逆電子要求型クリックケミストリーの足場となるシクロプロペンを設定した。KB2 を用いた修飾実験の結果、NqrB-N 末が特異的かつタンパク質非破壊的に修飾された。

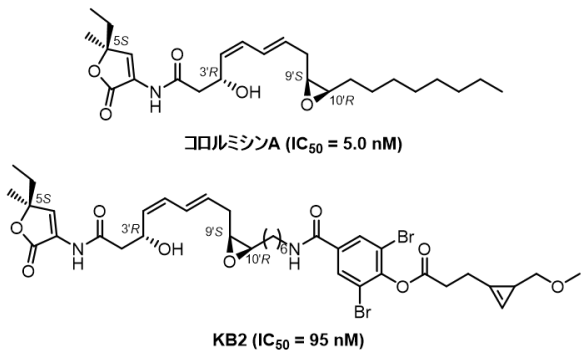


図 1. コロルミシン A と KB2 の構造.

The Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase (Na^+-NQR) is the first enzyme in the respiratory chain of many pathogenic bacteria such as *Vibrio cholerae*. The cryo-EM structures of *V. cholerae* Na^+-NQR and our previous biochemical experiments strongly suggest that the N-terminal region of the NqrB subunit, the binding site of the inhibitors, undergoes conformational changes during turnover; however, there is no direct evidence of this idea. In this study, we developed a means of specific chemical labeling of the enzyme via “ligand directed chemistry” using a synthetic korormicin derivative KB2. The attached cyclopropene can serve as an “anchor” for connecting a secondary functional chemical probe. After incubation of isolated Na^+-NQR from *V. cholerae* with KB2, cyclopropene was predominantly incorporated into NqrB subunit.

Na^+-NQR, korormicin, protein modification

講演番号：2C4p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C4 会場

コオロギにおける交尾直後の交尾拒否反応の sNPF による調節機構
sNPF signaling regulates the duration of post-mating refractoriness in crickets
○祝 貞、永田 晋治（東大新領域）
○Zhen ZHU, Shinji Nagata (The Univ. of Tokyo)

【Background】In most insects, mating motivation is reduced following a completed mating. The periods to reject to mate and to prepare energy and new gametes for next mating is called a refractory stage (RS). In our presentation at the previous conference, we presented that allatotropin (AT) is an endocrine factor from the terminal abdominal ganglion (TAG), the control center of the RS, to modulate the RS duration in the male two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*. We here report the identification of short neuropeptide F (sNPF), with the similar expression pattern in the male TAG to AT, as an additional peptidyl factor contributing to the RS in male crickets.

【Methods and Results】RNA-sequencing analyses revealed that the TAG from sexually matured male adult crickets expressed 28 neuropeptide precursors including AT. Quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization screening indicated that sNPF exhibited male-specific expression in TAG akin to AT. Double staining using immunohistochemistry and *in situ* hybridization revealed sNPF and AT were partially colocalized in the male TAG. Knockdown of sNPF and sNPF receptor (sNPFR) extended the post-mating RS and diminished mating frequency, like the effects of AT knockdown. The expression of sNPF in certain male TAG cells lacking AT production indicated sNPF might also contribute to the regulation of behavioral and physiological activities which were not affected by AT. Notably, a high transcriptional level of sNPFR was observed in seminal vesicles, a crucial component of the male reproductive system, where are directly innervated by TAG and responsible for sperm storage. *sNPF* and *sNPFR* knockdown resulted in a reduction of sperm stored in seminal vesicles. In conclusion, sNPF signaling coordinates the post-mating refractoriness and the sperm storage in cricket.

post-mating refractoriness, neuropeptide, cricket

講演番号：2C4p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C4 会場

ジャスモン酸イソロイシンラクトンによる植物アルカロイド生産活性化
JA-Ile-lactone enhanced alkaloid biosynthesis in Tomato

○奥村 太知[1]、齊藤 里菜[2]、加治 拓哉[1]、安部 洋[3]、上田 実[1,2]([1]東北大院理、[2]東北大院生命、[3]理研 BRC)
○Taichi OKUMURA[1], Rina SAITO[2], Takuya KAJI[1], Hiroshi ABE[3], Minoru UEDA[1,2] ([1]Graduate School of Science, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Life Science, Tohoku Univ., [3]BRC, RIKEN)

植物は二酸化炭素を原料として、医薬品や各種素材など多くの有用二次代謝産物を生産する。これらの有用二次代謝産物の生産は、植物ホルモンである(+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine（JA-Ile）によって制御されている。しかし JA-Ile は、二次代謝産物の生合成を活性化する一方で、植物に深刻な生長阻害を同時に引き起こすという致命的な欠陥があった。

我々は、JA-Ile 誘導体 JA-Ile-lactone（JILa）[1,2] が、ナス科のモデル植物トマトに対して、生長阻害を引き起こすことなく、ステロイドアルカロイド配糖体である tomatine の生合成を活性化することを見出した。さらに JA-Ile 受容体欠損変異株を用いた検討により、JILa の活性が JA-Ile 受容体依存的であることを確認した。本発表では、JILa が生長阻害を引き起こすことなく tomatine 生合成を活性化する作用機構モデルに関する仮説を提案すると共に、JILa の活性本体解明のために行った実験結果について報告する。

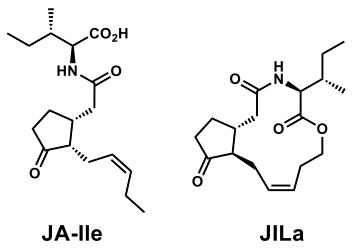


図 1：JA-Ile, JILa の構造

Plants use carbon dioxide to produce valuable secondary metabolites such as pharmaceuticals and materials. These valuable secondary metabolite productions are enhanced by the plant hormone (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile). However, JA-Ile-induced upregulation of secondary metabolite production also causes significant growth inhibition and thus is impractical.

We found that a cyclized JA-Ile (JA-Ile-lactone, JILa)[1,2] induces accumulations of tomatine, a steroidal glycoalkaloid, without causing growth inhibition in *Solanum lycopersicum*. On the other hand, JILa-induced accumulation of tomatine was not observed in JA-Ile receptor-impaired mutants. This result suggests that JILa activates tomatine biosynthesis in a JA-Ile receptor-dependent manner.

1) G. H. Jimenez-Aleman., *et al*., *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3391-3395.
2) G. H. Jimenez-Aleman., *et al*., *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5885-5893

Plant hormone, Secondary metabolites, Mode-of-Action

発表責任者：上田 実（minoru.ueda.d2@tohoku.ac.jp）

講演番号：2C4p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C4 会場

フェアリー化合物（AOH）によるシワ改善効果

Improvement of wrinkles by fairy compound (AOH)

○青島 央江[1]、伊吹 リン太[1]、河岸 洋和[2] ([1]ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社、[2]静岡大学農学部)
○Hisae AOSHIMA[1], Rinta IBUKI[1], Hirokazu KAWAGISHI[2] ([1]Vitamin C60 BioResearch Corp., [2]Shizuoka Univ.)

フェアリー化合物の一種である 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）は、皮膚バリア機能を改善・強化する可能性が示唆され、臨床試験の結果、0.1%AOH を 8 週間塗布することにより、角層水分量が増加し、経表皮水分蒸散量（TEWL）も有意に減少した。本研究では AOH の長期連用試験を実施し、シワパラメーターの解析を行うことを目的とした。

AOH によるシワ改善効果を検証するため、長期連用試験を行った（UMIN 試験 ID: 000050142）。女性 23 名（32～58 歳、平均 44 ± 8 歳）を対象としてシワ改善評価を行った。0.01%または 0.05% AOH 配合化粧水を朝晩 2 回洗顔後の半顔ずつに塗布し、4、8、12 週目のシワ面積率及び最大シワ平均/最大深度をシワ目尻レプリカにより測定し、0 週の値と比較することにより評価した。

0.01%AOH 化粧水塗布では、8 週間でシワ面積率は 0 週に比べて有意に低下した。また最大シワ最大深度は、8 週および 12 週塗布により有意に低下した。0.05%AOH 化粧水塗布では、12 週塗布によりシワ面積率及び最大シワ平均深度が有意に低下した。最大シワ最大深度は、4 週以降で有意な減少が認められた。以上の結果から、AOH の塗布により、シワが改善することが明らかとなった。

The purpose of this study was to conduct a long-term continuous use study of 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) and to analyze wrinkle parameters.

A long-term continuous use study was conducted to verify the efficacy of AOH in improving wrinkles (UMIN Study ID: 000050142). Twenty-three women (32-58 years old, mean 44 ± 8 years old) were evaluated for wrinkle improvement by applying 0.01% or 0.05% AOH-containing lotion to each half-face after cleansing twice a day, morning and evening, and measuring wrinkle area percentage and maximum wrinkle mean/maximum depth at weeks 4, 8 and 12 using a wrinkle eye corner replica and comparing these values to those at week 0 The results were evaluated by comparing them to the 0-week values.

The wrinkle area ratio was significantly lower at 8 weeks for the 0.01% AOH lotion application compared to 0 weeks. In the 0.05% AOH lotion application, wrinkle area percentage and mean maximum wrinkle depth were significantly reduced after 12 weeks of application. A significant decrease in maximum wrinkle maximum depth was observed after 4 weeks. These results indicate that AOH application improves wrinkles.

Fairy chemicals, AOH, Clinical trial

発表責任者：青島　央江（hisae.aoshima@vc60.com）

講演番号：2C4p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 C4 会場

化合物 C の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対する生育阻害作用機構の解析

Mechanism of growth-inhibitory effect of compound C against budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○大竹 拓実[1]、松村 結衣[1]、笹本 要[2]、横田 智也[2]、荒井 孝義[2]、知花 博治[2]、笠原 浩司[1]([1]東農大院生命、[2]千葉大学)
○Takumi Otake[1], Yui Matsumura[1], Kaname Sasamoto[2], Tomoya Yokota[2], Takayoshi Arai[2], Hiroji Chibana[2], Koji Kasahara[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Chiba Univ.)

化合物 C は人工的に合成された化合物であり、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対して生育阻害効果を示すことが明らかとなっている。本化合物の標的分子の同定と作用機構の解明を目指し、遺伝学的手法が高度に発達し、研究材料の豊富な本酵母を用いて遺伝学的な解析を行うこととした。薬剤耐性に関わる遺伝子を 12 個破壊し多剤感受性となった 12geneD0HSR 株（Chinen, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2011）を用いて化合物 C に対する感受性を調べたところ、化合物 C は本株の生育を野生株の約 30 分の 1 以下の低濃度で阻害を示したことから、本株を出発点として解析を行った。本株に対し多コピーのゲノムライブラリーを導入し、耐性を付与するプラスミドを複数得ることに成功した。複数回独立に単離されたゲノム領域を含むプラスミドについて、耐性付与遺伝子の特定を行っており、本会ではそれを中心に報告する。

Compound C, an artificially synthesized compound, was identified to exhibit growth-inhibitory activity against budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Because *S. cerevisiae* has abundant research materials, and experimental techniques have been highly developed for this yeast, we conducted genetic analysis using this *S. cerevisiae* to elucidate the target molecule of this compound and molecular mechanism of growth-inhibitory effect. When we investigated the sensitivity of 12geneD0HSR (a multidrug-sensitive strain by deleting 12 gene involved in drug resistance), this Compound C inhibited the growth of this strain at a concentration more than 30 times lower than that of wild-type strain. Therefore, we conducted genetic analysis using this strain as a starting point. We screened for gene that confer resistance to compound C to this strain from multi-copy based genomic library of *S. cerevisiae*, and isolated several plasmids having such activity repeatedly. Currently, we try to identify responsible genes to confer compound C resistance. In this presentation, we talk about analyses described above.

anti-fungal compound, budding yeast, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：2C4p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 C4 会場

金属依存性プロテイン Ser/Thr ホスファターゼ 1A 新規阻害剤の阻害機構解析
Identification and characterization of novel inhibitors of metal-dependent protein Ser/Thr phosphatase 1A
○鈴木 健友[1]、小島 駿也[2]、饒村 修[2]、大西 素子[1] ([1]中部大院応生、[2]中部大応化)
○Taketomo SUZUKI[1], Syunya KOJIMA[2], Osamu NIYOMURA[2], Motoko OHNISHI[1] ([1]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]Department of Applied Chemistry, Chubu Univ.)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb)は結核を引き起こす細胞内寄生細菌であり、肺胞マクロファージに貪食された後、分解を逃れて細胞内で増殖する。そのため近年では宿主のゼノファジーを誘導することにより Mtb を排除する、新規治療薬の開発が求められている。最近、Mtb が細胞内で金属依存性プロテイン Ser/Thr ホスファターゼ 1A（PPM1A）の発現を誘導することにより、ゼノファジーの主要因子である p62 を不活性化し、分解を逃れることが明らかにされた。即ち PPM1A の阻害によりゼノファジーの活性化が期待できるが、PPM1A の特異的阻害剤はほとんど報告されていない。そこで本研究では PPM1A に対する新規阻害剤の同定を目的とした。GST 融合マウス PPM1A 組み換えタンパク質は、大腸菌で発現し、グルタチオンセファロース 4B を用いて精製した。PPM1A の活性は、α-casein または p62 リン酸化ペプチドを基質として、Malachite Green 法により測定した。探索の結果、PPM1A に高い阻害効果を示す Bis[3-(2-pyridyl)imidazo[1,5-a]pyridin-1-yl] diselenide（L）を配位子とするニッケル錯体（$NiCl_2L$）を同定した。$NiCl_2L$ は既知の PPM1A 阻害剤の sanguinarine よりも阻害活性が高く、混合型非拮抗阻害剤であった。以上の結果より、$NiCl_2L$ は結核に対する宿主標的治療薬としての有効性が期待される。

Tuberculosis is a contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* bacteria (Mtb), which escapes degradation after phagocytosis, proliferates and parasitizes alveolar macrophages intracellularly. Development of novel therapeutic agents to eliminate Mtb by inducing xenophagy in macrophages are required. Recently, Mtb was shown to induce expression of the metal-dependent protein Ser/Thr phosphatase 1A (PPM1A) in the host, inactivate p62 and escape xenophagy. Inhibition of PPM1A is therefore expected to activate xenophagy, but few specific inhibitors of PPM1A have been reported. In this study, we screened and identified novel inhibitors of PPM1A. A malachite green assay was employed to assess PPM1A activity with α-casein or p62 phosphopeptides as substrate. A nickel complex with bis[3-(2-pyridyl)imidazo[1,5-a]pyridin-1-yl] diselenide as ligand ($NiCl_2L$) showed high inhibition of PPM1A. $NiCl_2L$ exhibited mixed inhibition and showed higher inhibitory than sanguinarine, a known PPM1A inhibitor. The results suggest that $NiCl_2L$ is expected to be effective as a host-targeted therapeutic agent for tuberculosis.

protein phosphatase, inhibitor, autophagy

発表責任者：大西素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2C4p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 C4 会場

3,5-ジガロイルフラバン-3-オール誘導体の 3 位の立体が活性やタンパク質との相互作用に与える影響
Effect of the 3-position of 3,5-digalloylflavan-3-ol derivatives on their activity and interaction with proteins

○堀口 諒太[1]、青木 環[1]、道下 僚[1]、室井 誠[3]、長田 裕之[3,4]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工、[2]大阪電通大工、[3]理研 CSRS、[4]静岡県立大薬)
○Ryouta Horiguchi[1], Atoru Aoki[1], Ryo Doge[1], Makoto Muroi[3], Hiroyuki Osada[3,4], Akiko Saito[1,2] ([1]Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU, [3]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [4]Division of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

ポリフェノール化合物の一種であるフラバン-3-オール誘導体は，様々な機能性を有することが知られ注目を集めている。我々はこれまで多くのフラバン-3-オール誘導体を合成し構造-活性相関研究を行ってきた。その中で，3,5-di-*O*-galoyl-(-)-epicatechin (**1**)が，がん細胞(HeLa, A549 など)の細胞周期を G2/M で停止させアポトーシスを誘導することが示唆された。一方で 3 位の立体が異なる異性体 **2** の活性は低い。そこで本研究では，化合物 **1** と **2** の活性の差がタンパク質との相互作用によると考え，光親和型固定化法により両化合物をビーズ上に固定化した化合物ビーズを調製し結合タンパク質の検出を試みた。

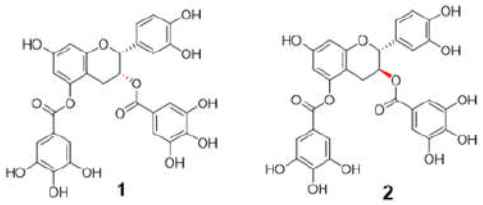


Figure 1. Structure of flavan-3-ol derivatives.

上記化合物ビーズを細胞ライセートに加えてインキュベートし，ビーズ上に結合したタンパク質を SDS-PAGE で検出した。化合物 **1** と化合物 **2** では結合するタンパク質が大きく異なり，3 位の立体がタンパク質との相互作用に大きく影響することが示唆された。また，化合物 **1** の 2D-DIGE による薬剤標的解析 (ChemProteoBase)から類似性は 45%程度と低いながら tubulin をターゲットとする薬剤がピックアップされた。WB 実験を行ったところ tubulin がビーズ上に結合し，化合物 **1** と競合した。化合物 **2** ではこれらのタンパク質との結合は検出されず，3 位の立体の違いが活性に影響を与えていると考察している。

We have synthesized various flavan-3-ol derivatives and performed structure-activity relationship studies. Among them, 3,5-di-*O*-galloyl-(-)-epicatechin (**1**) has been suggested to induce apoptosis in cancer cells (HeLa, A549, etc.) and arrest the cell cycle at G2/M. On the other hand, isomer **2**, which differs only in the steric structure at the 3rd position, has low activity. In order to compare these two compounds, photoaffinity compound beads were prepared and the differences in binding proteins were confirmed. Compounds **1** and **2** have significantly different proteins that bind to beads, suggesting that the steric structure at position 3 influences the interaction with proteins. Furthermore, drug target analysis using 2D-DIGE (ChemProteoBase) of Compound 1 picked up a drug that targets tubulin, although the similarity was as low as 45%. The binding between Compound 1 and tubulin was confirmed by a WB experiment, and it was confirmed that the compound 1 and tubulin were bound significantly.

Photoaffinity immobilization of small molecule compounds, flavan-3-ol derivatives, proliferation inhibitory activity against cancer cells

講演番号：2C4p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 C4 会場

AhR および Nur77 リガンドの探索とその抗ウイルス活性

Exploration of AhR and Nur77 ligands that exhibited antiviral activities

○丸山 華凜[1]、中村 洸[1]、安河内 美月[1]、大橋 啓史[2,3,4]、中嶋 章悟[2,3,5]、齋藤 史季[1]、渡部 翔太[1]、村上 裕信[1,6]、岡田 麻衣子[7]、藤野 寛[1,6]、渡士 幸一[2,3,4]、紙透 伸治[1,6]([1]麻布大獣医、[2]感染研・治療薬・ワクチン開発研究センター、[3]感染研・ウイルス第二部、[4]東理大理工、[5]福祉村病院　長寿医研、[6]麻布大ヒトと動物の共生科学センター、[7]東京工科大応用生物)

○Karin MARUYAMA[1], Kou NAKAMURA[1], Mitsuki YASUKOCHI[1], Hirofumi OHASHI[2,3,4], Shogo NAKAJIMA[2,3,5], Shiki SAITOH[1], Shota WATANABE[1], Hironobu MURAKAMI[1,6], Maiko OKADA[7], Kan FUJINO[1,6], Koichi WATASHI[2,3,4], Shinji KAMISUKI[1,6] ([1]School of Veterinary Medicine, Azabu Univ., [2]Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases, [3]Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, [4]Tokyo Univ. of Science, [5]Choju Medical Institute, Fukushimura Hospital, [6]Center for Human and Animal Symbiosis Science, Azabu Univ., [7]Tokyo Univ. of Technology)

近年、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）が世界で甚大な被害をもたらしたが、今後もこのような新興ウイルス感染症が発生する可能性が想定される。その対策の一つとして広範なウイルス種に効果を示す薬剤が考えられる。これまでの研究で、核内受容体である肝臓 X 受容体(LXR)や芳香族炭化水素受容体(AhR)リガンドが C 型肝炎ウイルス(HCV)や SARS-CoV-2 などに効果を示すことを明らかにしている。そこで本研究では更に AhR リガンドを探索し、各種ウイルスに対する効果を調べることにした。真菌の 2 次代謝産物由来の化合物ライブラリーからレポーターアッセイを用いて AhR アンタゴニストを探索した結果、roquefortine C が得られた。Roquefortine C のヒトおよび動物のウイルスに対する抗ウイルス活性を評価したところ、HCV、オーエスキー病ウイルス（PRV）、単純ヘルペスウイルス 1 型に対して効果を示すことが明らかになった。一方で、LXR や AhR は細胞内の脂肪蓄積に関連するため、他の脂質代謝に関連する核内受容体である Nur77 のリガンドも探索し、その抗ウイルス活性を調べることにした。その結果、Nur77 アゴニストとして alternariol を見出し、各種抗ウイルス活性を評価したところ、抗 PRV 活性を示すことが明らかになった。

In recent years, SARS-CoV-2 has caused enormous damage around the world, and it is assumed that such emerging viral infectious diseases may occur in the future. Broad-spectrum antivirals that target multiple viruses are effective to combat emerging viral infectious diseases. Previously, we revealed that nuclear receptor ligands for liver X receptor (LXR) or aryl hydrocarbon receptor (AhR) exhibitited antiviral actvities against various viruses including HCV and SARS-CoV-2. In this study, we further explored an AhR ligand and examined its effect on various viruses. We screened for an AhR antagonist from compound library comprised of fungal secondary metablites using a reporter assay, and roquefortine C was identified as an AhR antagonist. Roquefortine C was evaluated for antiviral activity against human and animal viruses, and found to be effective against HCV, pseudorabies (Aujeszky's disease) virus (PRV), and herpes simplex virus type 1. On the other hand, we also searched for ligands of Nur77, a nuclear receptor related to lipid metabolism since LXR and AhR are associated with intracellular lipid droplet accumulation. As a result, we found alternariol as a Nur77 agonist and the compound exhibited anti-PRV activity.

nuclear receptor, antiviral activity, natural product

講演番号：2C5a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 C5 会場

乳化した培地中の菌体の発酵生産性の検討

Examination of fermentation productivity of several types of bacteria cells in emulsified medium

○馬場 文雄（ダイナノファー乳化発酵研究所）
○FUMIO BABA (Dynanofer Emulsification and Fermentation Research Lab.)

【目的】
食用油と食品添加物から培地を乳化して、発酵培地の乳化が微生物の発酵生産性にどのような影響を与えるかを検討した。

【方法・結果】
Corynebacterium glutamicum、酵母、乳酸菌の３種の菌を、乳化した培地中で培養して、生産性を調べた。乳化に使用した食品添加物として澱粉、ポリグリセリン脂肪酸エステル、糖エステルの中から選び、食用油とともに反応させて培地を乳化した。この培地中のそれぞれの菌の発酵生産性を調べた結果、3 種類の菌体は、いずれも特定のポリグリセリン脂肪酸エステルの乳化物中で、発酵生産性を向上させることがわかった。種類の異なる３種類の菌体の発酵生産性を向上させたことと、ポリグリセリン脂肪酸エステルの立体構造から、乳化物が微生物の周囲に存在し、外部からの栄養素などの取り込みをサポートするのではないかと推定された。

【Objective】The cooking oil and food additives were emulsified and then added to the fermentation medium. It was investigated how emulsification of the fermentation medium affects the fermentation productivity of bacteria.

【Methods and Results】Three types of bacteria, *Corynebacterium glutamicum*, yeast, and lactic acid bacteria, were fermented in an emulsified medium to examine productivity. One of starch, polyglycerol fatty acid ester, and sugar ester was selected and reacted with cooking oil to emulsify the medium. As a result of emulsifying the culture medium, all three types of bacterial cells were found to improve fermentation productivity in emulsions of specific polyglycerol fatty acid esters. Due to the improved fermentation productivity of three different types of bacterial cells and the influence of 3D structural factors of polyglycerol fatty acid ester, an emulsion exists around the bacteria and support the uptake of nutrients from outside.

emulsifying the culture medium, polyglycerol fatty acid ester, Corynebacterium glutamicum

発表責任者：馬場文雄（wenxion@hotmail.co.jp）

講演番号：2C5a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 C5 会場

酵母エキスの製法と乳酸菌培養への影響

Effects of Yeast Extract Manufacturing prosess on lactic acid bacteria cultivation.

○深野 和紘、二田 昂志郎、周 哲、多和田 悠貴、齊藤 悠希、冨髙 美佐、勝又 忠与次、松島 厳（三菱商事ライフサイエンス株式会社）
○ Kazuhiro FUKANO, Koshiro FUTADA, Zhe ZHOU, Yuki TAWADA, Yuki SAITO, Misa TOMITAKA, Tadayoshi KATSUMATA, Gen MATSUSHIMA (Mitsubishi Corporation Life Sciences Limited)

酵母エキスは、微生物培地において増殖性や有用成分の含量を左右する重要な要素である。工業的に微生物を培養する際には、食品グレードの酵母エキス製品を使用することも多い。しかし食品グレードの酵母エキス製品は、調味料として多様なニーズに応えるため、非常に多くの種類が存在している。そこで、食品グレードの酵母エキス製品から培地原料を選択する際の指標を探索するため、その差異を検証した。最初に 16 種類の酵母エキスについてメタボローム解析を実施した。解析結果を主成分分析しスコアプロットしたところ、原料の酵母の種類や製法により複数のグループに分類されることが確認された。さらにローディングプロットから、原料の酵母の種類ごとに特徴的な成分が示された。次にこれらの酵母エキスを用いて培地を作製し、*Levilactobacillus brevis* KF-9480 の増殖性を濁度で評価した。その結果、酵母エキスの違いにより増殖性が大きく異なることが確認された。この増殖性と、メタボローム解析の主成分分析によって得られた変量の間には、弱い相関関係が示された。これらのことから、食品グレードの酵母エキス製品を培地原料として使用する際、原料の酵母の種類や製法が異なる製品を検討することの重要性が示唆された。

Yeast extract is often used as a medium ingredient for microbial culture, but there are many types of food-grade products on the market, and it is difficult to choose suitable yeast extract for one's own culture. Therefore, we analyzed the components of yeast extracts by metabolome analysis. We could group them into several types based on the yeast origin and/or the manufacturing processes by principal component analysis. Furthermore, from the loading plot, some characteristic components from each yeast origin were shown. Next, we prepared media using these yeast extracts and evaluated the growth of *Levilactobacillus brevis* KF-9480. As a result, the growth of *Levilactobacillus brevis* KF-9480 greatly depended on the yeast extract used in the medium. These results suggest the importance of yeast origin and/or manufacturing processes for choosing yeast extract for media.

Yeast Extract, Culture Medium, Lactic Acid Bacteria

発表責任者：深野和紘（kazuhiro.fukano@mcls-ltd.com）

講演番号：2C5a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 C5 会場

人工代謝経路の増強に向けた適応実験室進化と有用変異の同定

Adaptive laboratory evolution and identification of beneficial mutations for enhancement of artificial metabolic pathway

○井口 元太[1]、山本 啓介[2]、平沢 敬[1]（[1]東工大生命理工、[2]Green Earth Institute 株式会社）
○Genta INOKUCHI[1], Keisuke YAMAMOTO[2], Takashi HIRASAWA[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Green Earth Institute Co.,Ltd.)

我々は、ホモセリン要求性を示すコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* の *hom* 遺伝子欠損株に、大腸菌由来 HpaI と *Lysinibacillus sphaericus* 由来 LeuDH からなる人工代謝経路を構築した。この人工代謝経路では、ピルビン酸とホルムアルデヒドからホモセリンが生産される。構築した菌株について、グルコースとホルムアルデヒドを炭素源とした長時間の植え継ぎによる適応実験室進化を行い、当該人工代謝経路の増強を試みた。その結果、比増殖速度が約 3 倍に向上した進化株を取得した。得られた進化株の全ゲノムリシーケンス解析を行ったところ、NCgl0780 の 5'-非翻訳領域での変異が共通して見られた。また、進化株においては、外来遺伝子産物のうち HpaI はホモセリン要求性の回復に必須であった一方、LeuDH の発現は不要であることが明らかになった。また、NCgl0780 の過剰発現により LeuDH の機能が補完され、比増殖速度が向上することが確認された。

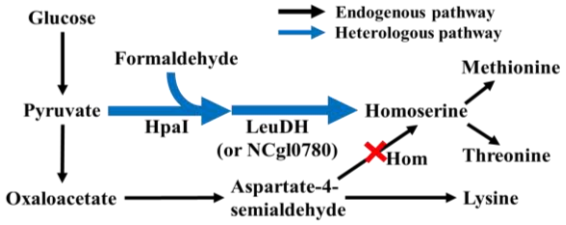


図 本研究で構築した人工代謝経路の概略

なお本研究は、JST 研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP トライアウトの支援を受けて行った。

We constructed an artificial metabolic pathway consisting of HpaI and LeuDH protein from *Escherichia coli* and *Lysinibacillus sphaericus*, respectively, which can partially complement homoserine auxotrophy by formaldehyde addition, in the *Corynebacterium glutamicum hom* disruptant. Adaptive laboratory evolution by long-term passage culture on glucose and formaldehyde was performed to enhance the activity of this artificial metabolic pathway and the evolved strains with higher specific growth rates were obtained. Genome resequencing revealed mutations in the 5'-UTR of NCgl0780 in the evolved strains. Moreover, we found that HpaI was necessary for the recovery of homoserine auxotrophy, while LeuDH was dispensable. In addition, overexpression of NCgl0780 could complement the function of LeuDH in the artificial metabolic pathway and enhance the specific growth rate.

This work was supported by JST Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through Target Driven R&D (A-STEP) Grant Number JPMJTM22C6.

artificial metabolic pathway, adaptive laboratory evolution, *Corynebacterium glutamicum*

発表責任者：平沢敬（thirasawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2C5a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 C5 会場

通気性培養容器による曝気を行わない好気性微生物の培養法

Cultivation of an aerobic micro-organism without aeration using "breathing" culture vessels

○吉田 健一[1]、横山 協佑[1]、石川 周[1]、オクテム アイシュゲル[2]、ヴァンダイル ヤンマルタン[2]、四ツ谷 昌人[3]、佐藤 亮介[3] ([1]神大イノベ、[2]フローニンゲン大、[3]潤工社)
○Ken-ichi YOSHIDA[1], Kyosuke Yokoyama[1], Shu Ishikawa[1], Aysegul Oktem[2], Jan Maarten van Dijl[2], Masato Yotsuya[3], Ryosuke Sato[3] ([1]Kobe Univ, [2]Univ. of Groningen, [3]Junkosha)

好気性微生物の液体培養においては常に十分な酸素を供給する必要があるため、コンプレッサー等により強い圧力をかけて空気を吹き込む曝気を行うが、このための電力は大きな環境負荷となる。また、曝気によって培養液が泡立ち培養器から溢れる不都合もあり、消泡剤の添加や培養容器に充填する培地量を減ずるなどの対策を余儀なくされる。そこで、本研究では水分は全く通過させないが、気体であれば滞りなく通過させることができる ePTFE (expanded Polytetrafluoroethylene)素材で円筒形の通気性培養容器を作成し、培養容器の側表面でのガス交換する 3L スケールの培養を検討した。好気性の枯草菌が曝気を行わずとも正常に増殖する条件を検討し、ミオ-イノシトールをシロ-イノシトールへと転換する物質変換能力についても評価を試みた。通常の撹拌では酸素供給が不十分であるため、下方水流を容器中央に発生するスクリューにより強制的対流を付加すると曝気条件に優るとも劣らない増殖を達成することができた。曝気を行う場合でも、行わない場合でも、培養液中の酸素は細胞濃度の増加に伴い一旦低下して対数増殖の後期に検出されないレベルに至り、その後は再び回復が観察された。イノシトールの変換については、曝気を行わない方が最終的な生産量において上回り、この濃度はフラスコレベルの変換率に匹敵していた。以上より、曝気を行わない好気性微生物の新たな培養法の可能性が示された。

Since oxygen must be supplied in the liquid culture of aerobic microorganisms, aeration is performed by blowing air. The electricity required for this is an environmental burden. It also causes the culture medium to foam and overflow, forcing countermeasures such as adding defoaming agents. Therefore, a 3L-scale culture was investigated using a cylindrical aerated culture vessel made of ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene), which does not allow water to pass through but gas exchange. Under this setup, *Bacillus subtilis* was grown without aeration and evaluated for its ability to convert *myo*-inositol to *scyllo*-inositol. Since the oxygen supply was insufficient with usual agitation, forced convection was added by a screw that generated a downward water flow in the centre of the vessel, and it grew as good as or better than that under aeration conditions. In terms of inositol conversion, the final production rate was higher without aeration, and this concentration was comparable to the conversion rate at the flask level. These results indicate the possibility of a new cultivation for aerobic microorganisms without aeration.

bioreactor, Bacillus subtilis, non aeration

発表責任者：吉田健一（kenyoshi@kobe-u.ac.jp）

講演番号：2C5a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 C5 会場

機械学習による微生物の選択的増殖の培地開発
Machine learning assisted medium development for selective microbial growth
○張 抒楊、會田 穂乃香、イン ベイウェン (筑波大. 生命環境)
○Shuyang Zhang, Honoka AIDA, Bei-Wen YING (University of Tsukuba)

環境検査、臨床分析、多様性研究などの領域では、選択培地が微生物の培養と分離において重要な役割を果たしている。しかし、微生物の増殖を制御するために化学的環境を調節する技術はまだ限られている。この問題に対処するため、本研究では、MRS agar の組成を参照し、様々な濃度で混合した 98 種類の合成培地を作製し、大腸菌と乳酸菌の増殖を測定することで、微生物増殖と環境因子との相関データベースを構築した。 アクティブラーニング技術を用いて、培地中の各成分の濃度を調整する。目的株の増殖促進と対照株の増殖抑制を目指し、複数の増殖パラメーターを組み合わせて、両者の細胞量、増殖速度、および全体的な増殖を最適化した。 また、目的株と対照株を入れ替えても、上記の目的に合わせた培地最適化により良い結果が得られた。さらに、培地最適化プロセスにおける各成分の濃度変動の寄与を調べるため、機械学習解析を用いて培地成分を分類した。それぞれの分類が細菌の増殖に及ぼすさまざまな影響を調べた。 本学会では、2 菌株ベースの選択培地を実現するための最適化と、各培地成分が細菌増殖にどのように影響し、最適化目標にどのように貢献するかについて報告する。
Selective media play an important role in the culture and isolation of microorganisms. However, techniques to modulate the chemical environment to control microbial growth are still limited. To address this issue, this study prepared 98 synthetic media as references and measured the growth of E. coli and Lactobacillus. Active learning techniques are used to adjust the concentration of each component in the media. Aiming to promote the growth of the target strain and inhibit the growth of the control strain, we optimized the cell volume, growth rate, and overall growth of both strains by combining several parameters. Even when the target and control strains were interchanged, good results were obtained by medium optimization for the above-mentioned objectives. To further investigate the contribution of concentration variation of each component in the medium optimization process, machine learning analysis was used to classify the medium components. The various effects of each classification on bacterial growth were investigated. In this conference, we report on the optimization to achieve a two-strain-based selection medium and how each medium component affects bacterial growth and how it contributes to the optimization goal.

bacterial growth, machine learning, media optimization

発表責任者：張　抒楊（shuyangzhang9@gmail.com）

講演番号：2C5a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 C5 会場

細菌の多剤耐性に影響を与える化学成分の網羅的探索

A comprehensive search for chemical components affecting bacterial multidrug resistance

○荒木 駿平、會田 穂乃香、イン ベイウェン (筑波大・生命環境)
○Shunpei ARAKI, Honoka AIDA, Bei-Wen YING (University of Tsukuba)

多剤耐性菌の出現は医療現場を中心に問題視されている。先行研究より、抗生物質耐性は増殖条件によって大幅に変化するとされているが、環境中に存在する化学成分が、どのように細菌の多剤耐性能に影響を与えているのかは明らかになっていない。この課題に対処するために、本研究では抗生物質を含む数十種類以上の化学成分を様々な濃度で混合した複数の合成培地を作製し、大腸菌の経時的な増殖を測定することで、化学環境と大腸菌増殖を関連付けて多剤耐性能への影響を調べた。これらを機械学習分析によって解析することで、大腸菌増殖を代表する 2 つの増殖指標から、多剤耐性能へ最も大きな影響を与える化学成分を明らかにした。また、その結果から抗生物質存在下において大腸菌が増殖しやすいもしくは増殖しにくくなるような培地中の化学成分の組み合わせを探索していく。本学会では、大腸菌の多剤耐性能に影響を与える化学成分を探索した結果について報告する。

The emergence of multidrug-resistant bacteria has become a problem, particularly in medical and clinical areas. Previous studies have shown that antibiotic resistance varies significantly depending on growth conditions, but it is not clear how chemical components in the environment affect the multidrug resistance potential of bacteria. To address this issue, this study examined the relationship between the chemical environment and *E. coli* growth and its effect on multidrug resistance by creating multiple synthetic media containing a mixture of various pure chemical components, including antibiotics, at various concentrations and measuring the growth of *E. coli* over time. By analyzing these results using machine learning analysis, we will identify the chemical components with the greatest impact on multidrug resistance based on two growth indices representative of *E. coli* growth. The results will also be used to identify combinations of chemical components in the culture medium that facilitate or inhibit the growth of *E. coli* in the presence of antibiotics. Here, we will report how and whether the chemical components affect the multidrug resistance potential of *E. coli.*

bacterial growth, machine learning, chemical environment

発表責任者：荒木　駿平（shunpei.araki062913@gmail.com）

講演番号：2C5a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 C5 会場

キノン構造を有する有機触媒は酸化ストレスによる細胞毒性を示す

Organocatalysts with quinone structure exhibit cytotoxicity as a result of oxidative stress

○西山 辰也[2]、宮本 宜英[1]、永澤 健大[2]、上田 賢志[1,2] ([1]日大院・生物資源科学、[2]日大・生物資源科学)
○Tatsuya NISHIYAMA[2], Takahide MIYAMOTO[1], Takehiro NAGASAWA[2], Kenji UEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec, Nihon Univ., [2]College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

放線菌が生産するキノン構造を有する抗生物質であるアクチノロージン(ACT)やグラナチシシン(GRA)は、L-アスコルビン酸の酸化反応を触媒する有機触媒として作用する。これらが触媒する反応では過酸化水素(H_2O_2)が生成することから、H_2O_2 が抗菌活性の本体である可能性が考えられた。そこで、本研究では触媒作用で生成する H_2O_2 が間接的に毒性を引き起こすという新たな抗菌メカニズムの概念を創出することを目的として、これらの化合物が微生物に及ぼす作用を広く検証した。

ACT や GRA は生産菌からの精製が必要なため、市販のチモキノン（TQ）を用いて実験した。TQ はニゲラ植物の種子に多く含まれ、GRA 同様に抗菌作用、抗癌作用などが報告されている物質であり、基質と産物の定量解析の結果から、ACT や GRA と同等の酸化反応を触媒する。GRA や TQ の添加によって形質の変化が認められる菌を調査したところ、GRA や TQ を低濃度で塗布した培地で黄色を呈するものが複数得られた。そのメタノール抽出液の吸光スペクトル測定結果から、黄色色素はカロテノイドである可能性が示された。カロテノイド生産は酸化ストレスの防御応答として知られることから、GRA や TQ が酸化ストレスを与えることで細胞毒性を示すという仮説が支持された。

Actinorhodin (ACT) and granaticin (GRA) are antibiotics with quinone structures produced by actinomycetes, and they act as organic catalysts in the oxidation reaction of L-ascorbic acid. The reactions catalyzed by these compounds result in the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2), suggesting the possibility that H_2O_2 is the active component responsible for their antibacterial activity. Therefore, in this study, the aim was to create a new concept of antibacterial mechanism, suggesting that H_2O_2 generated through catalytic activity indirectly induces toxicity. The effects of these compounds on microorganisms were broadly investigated for this purpose. As purification from the producing organisms is required for ACT and GRA, experiments were conducted using commercially available thymoquinone (TQ). TQ is abundant in the seeds of Nigella and has reported physiological activities such as antibacterial and anticancer effects similar to GRA. Quantitative analysis revealed that TQ catalyzes oxidation reactions equivalent to those of ACT and GRA. By screening for microbial strains that exhibit changes in phonotype when cultured in media with low concentrations of GRA or TQ, multiple strains were obtained that displayed yellow color on media with GRA or TQ. Absorption spectrum measurements of methanol extracts suggested the presence of carotenoids as the yellow pigment. As carotenoid production is known as a defense response against oxidative stress, the hypothesis that GRA or TQ induces cellular toxicity through oxidative stress was supported.

Organocatalysts, granaticin, oxidative stress

講演番号：2C5a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 C5 会場

遺伝子組換え型 DRHS-AFP の抗真菌活性の検討評価
Examination and evaluation of antifungal characteristics of the recombinant DRHS-AFP

○中西 梨奈、髙塚 由美子、山田 麗、原 富次郎（京大エネ研）
○Rina NAKANISHI, Yumiko TAKATSUKA, Akira YAMADA, Tomijiro HARA (IAE of Kyoto Univ.)

我々は *Rhizoctonia solani* 菌糸融合群 AG-1 IA 株が分泌する分子量約 10 kDa の新奇抗真菌性蛋白質を発見し、2023 年度の本大会（広島・オンライン開催）で初めて報告した。本抗真菌性蛋白質はアミノ酸 88 残基で構成され、うち中央の 6 アミノ酸残基を挟んで相同性の極めて高い（92%）41 残基の２回繰り返し構造となっていた。この一次構造的特徴から、我々は本抗真菌性蛋白質を「Double-Repeating Homologous Sequence Antifungal Polypeptide（DRHS-AFP）」と命名した。

本研究では、代表的な水稲伝染性糸状菌 5 株（*Fusarium fujikuroi*, *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus microsporus*, *Pythium* sp.）を被検菌とし、天然型と遺伝子組換え型 DRHS-AFP の同効性を検討するとともに、農薬に使用される抗真菌剤として著名なチオファネートメチルやイプコナゾールとの抗真菌性効果を比較した。最小生育阻止濃度（MIC）や 50%増殖阻害濃度（IC_{50}）の測定により評価した結果について、本大会で新たに報告する。

We have discovered a novel antifungal protein secreted by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA strain and reported it for the first time at the 2023 JSBBA Annual Meeting (held online in Hiroshima). This protein has a molecular weight of approximately 10 kDa and consists of 88 amino acid residues, uniquely composeds of twice repeats of highly homologous (92%) 41-residue sequences flanked by the central six amino acid residues. We have named this antifungal protein as "Double-Repeating Homologous Sequence Antifungal Polypeptide (DRHS-AFP)."

In this study, we evaluated the equivalence efficacy of both natural and recombinant DRHS-AFP against five common strains of rice-infectious filamentous fungi, namely *Fusarium fujikuroi*, *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus microsporus*, and *Pythium* sp. Additionally, we compared its antifungal properties with those of well-known fungicides such as thiophanate-methyl and ipconazole. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) were used to determine these results. We will present the findings of this study at this annual meeting.

DRHS-AFP, *Rhizoctonia solani*, antifungal characteristics

発表責任者：原 富次郎（hara.tomijiro.3e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C5a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 C5 会場

Rhizoctonia solani 菌糸融合群・亜群間における DRHS-AFP 分泌性の違い
Differences in DRHS-AFP secretion among *Rhizoctonia solani* anastomosis groups
○山田 麗、髙塚 由美子、中西 梨奈、原 富次郎（京大エネ研）
○Akira YAMADA, Yumiko TAKATSUKA, Rina NAKANISHI, Tomijiro HARA (IAE of Kyoto Univ.)

我々は *Rhizoctonia solani* 菌糸融合群 AG-1 IA 株が分泌する分子量約 10 kDa の新奇抗真菌性蛋白質を発見し、2023 年度本大会（広島・オンライン開催）で初めて報告した。本抗真菌性蛋白質はアミノ酸 88 残基で構成され、うち中央の 6 アミノ酸残基を挟んで相同性の極めて高い（92%）41 残基の２回繰り返し構造となっていた。この一次構造的特徴から、我々は本抗真菌性蛋白質を「Double-Repeating Homologous Sequence Antifungal Polypeptide（DRHS-AFP）」と命名した。本研究では *Rhizoctonia solani* 菌糸融合群および亜群の中から、AG-1 IA ならびに AG-1 IB、AG-3 PT、AG-5 に分類される菌株を選抜し、DRHS-AFP 分泌性や抗糸状菌活性の有無を遺伝子型と表現型との両面から調査した。多犯性の植物病原真菌である *Rhizoctonia solani* の菌糸融合群分類では、形態の外に伝染性宿主が異なることで特徴づけられる。本調査の結果、AG-3 PT を除く３群の株において、DRHS-AFP 特異的なプライマーを使用した PCR で DRHS-AFP 様遺伝子が増幅検出されるとともに、抗 DRHS-AFP ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで分泌物中に DRHS-AFP 様蛋白質の発現を検出した。菌糸融合群と DRHS-AFP 生産性との相関について、解析を継続中である。

We have reported the discovery of a novel antifungal protein secreted by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA strain at the 2023 JSBBA Annual Meeting. The protein has a molecular weight of approximately 10 kDa and consists of 88 amino acid residues, uniquely composed of twice repeats of highly homologous (92%) 41-residue sequences flanked by the central six amino acid residues. We have named it as "Double-Repeating Homologous Sequence Antifungal Polypeptide (DRHS-AFP)." In this study, we selected four *R. solani* strains belonging to anastomosis group AG-1 IA, AG-1 IB, AG-3 PT, or AG-5, and examined whether they produce DRHS-AFP and fungicidal activities by their genotypic and phenotypic aspects. *R. solani*, a polygenic plant pathogenicity, is characterized by differences in infectivity and morphology, which determine its classification by hyphal fusion group. Our investigation revealed that, except for the AG-3 PT subgroup, the DRHS-AFP genomic sequences were detected by PCR in all subgroups in the genotype. On the other hand, likewise in the genotype, the DRHS-AFP protein expressions were also detected in the phenotype through Western blot analysis using an anti-DRHS-AFP polyclonal antibody. However, why DRHS-AFP was not secreted from the AG-3 PT subgroup must be clarified.

DRHS-AFP, *Rhizoctonia solani*, anastomosis group

発表責任者：原 富次郎（hara.tomijiro.3e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C5p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C5 会場

アンモニアガス絶対要求性放線菌 *Nocardiopsis* sp.の単離とその生育特性

Isolation of ammonia gas obligately requiring actinomycete, *Nocardiopsis* sp., and its growth property

○吉田 ナオト、清 啓自（宮崎大農）
○Naoto Yoshida, Keiji Kiyoshi (Univ. Miyazaki)

簡易トイレは、山岳地帯、イベント会場などで需要があるが、アンモニア臭などの悪臭が問題となる。アンモニアを酸化する微生物の利用はバイオ脱臭技術につなげられる可能性がある。アンモニアガス耐性細菌の単離を試み、生育特性からその新規性を紹介する。単離法としては、7L チャンバーにアンモニアガスを 3000ppm になるように充填し、その中に LB 寒天培地を置き、40˚C で密閉培養した、アンモニアガスは炭酸水素アンモニウムを昇華させることにより調整した。微生物分離源は土壌とした。単離したアンモニアガス耐性細菌は、放線菌様の繊維状の細胞形態をしており、16SrRNA 遺伝子の塩基配列の比較により *Nocardiopsis* 属細菌と思われる。本細菌は栄養寒天培地においてアンモニアガス 10,000ppm の存在下生育可能で、“強いアンモニガス耐性放線菌”とした。奇妙なことにこの細菌は大気中では生育することができない。またアンモニウムイオンの代替でも生育不可であったので、アンモニガス絶対要求性生物であるといえる。また最少培地にても生育可能であるので、化学合成独立栄養としての生育特性がある。既知のアンモニア酸化細菌と類似の機構を有すると思われる。
“弱いアンモニアガス耐性放線菌”も単離しており、それらの生育特性の比較から、アンモニアガスを利用する微生物群の存在を予想することができる。

Simple outdoor toilets are in great demand at specific mountainous areas, event venues, etc., but the serious issue that they produce malodorous gas such as ammonia is including. Microorganisms that convert ammonia could be linked to biodeodorization technology. We attempted to isolate ammonia gas-tolerant bacteria and show their novelty based on their growth property. The LB plates were placed in an airtight plastic chamber (7.0 L) with ammonium hydrogen carbonate, and incubated at 40˚C. Initial ammonia gas concentration in the chamber adjusted at 3,000 ppm. Soil was used as the source for microbial isolation. Ammonia gas-tolerant bacterium showed the filamentous morphology like actinomycetes, and belonged to the genus *Nocardiopsis* based on the sequence of 16S rRNA gene. This bacterium can grow on nutrient agar plate under the presence of 10,000 ppm of ammonia gas, deferred to "strongly ammonia gas-tolerant actinomycete." Strangely, this bacterium could not grow in the atmosphere, thus, was determined obligately ammonia gas requiring bacterium, furthermore, could grow even in a minimal medium, indicating chemoautotrophic growth property similar to ammonia-oxidizing bacteria. "Weakly ammonia gas-resistant actinomycetes" have also been isolated. The specific microorganism group that utilizes ammonia gas can be predicted.

ammonia, actinomycetes, chemoautotroph

発表責任者：吉田ナオト（a04109u@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2C5p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C5 会場

ユニークな増殖形態を示す Sporichthya 属放線菌の生理学研究
Physiological studies of the actinomycete Sporichthya with unique growth morphology
○郭 心哲[1]、竹下 典男[2]、手塚 武揚[1,3]、大西 康夫[1,4] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]筑波大・生命環境系・MiCS、[3]北里大・感染制御、[4]東大・微生物イノベ連携機構)
○Shintetsu Kaku[1], Norio Takeshita[2], Takeaki Tezuka[1,3], Yasuo Ohnishi[1,4] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]MiCS, Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]Grad. Sch. of Infection Control Sci., Kitasato Univ., [4]CRIIM, Univ. of Tokyo)

Sporichthya 属放線菌は分離頻度の低い希少放線菌であり、*Sporichthya polymorpha* と *Sporichthya brevicatena* の 2 種のみが同定されている。これらは単細胞の桿菌であるが、固体培地上では培地上方に鎖状に積み重なるように増殖する特異な形態を示す。本研究では、*Sporichthya* 属放線菌のユニークな増殖メカニズムを解明することを目的とした。*S. brevicatena* の増殖の初期段階の細胞をタイムラプス顕微鏡で観察した結果、細胞分裂は空中に伸びた細胞鎖の培地から遠い先端部と培地に接した基部の両方で起こることがわかった。*S. polymorpha* の十分に空中に伸びた細胞を細胞内のエステラーゼ活性依存的な蛍光試薬で染色し観察したところ、基部近傍の大部分の細胞が染色された一方、先端部近傍の細胞はあまり染色されず、休眠細胞（胞子）に分化していることが示唆された。また、*S. polymorpha* と *S. brevicatena* の超薄切片の透過型電子顕微鏡観察では、貧栄養な培地で培養した細胞の細胞質に貯蔵顆粒と推測される構造体が多数存在していた。栄養豊富な培地で培養した細胞の一部には膨張した細胞が観察され、この細胞と栄養細胞が原形質連絡のような様式で結合している様子が見られた。さらに、固体培地で培養した *S. polymorpha* と *S. brevicatena* の細胞を 0.1％スキムミルクを含むバッファーに懸濁して静置したところ、多数の運動細胞が観察された。これらの運動細胞には走気性が見られ、*S. brevicatena* では気液界面に凝集した細胞が菌膜（ペリクル）を形成した。

The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms of cellular growth in the genus *Sporichthya*, in which rod-shaped cells extend into the air in chains. Time-lapse microscopy of *Sporichthya brevicatena* cells grown on agar media showed that cell division occurred at both the top and bottom of the cell chains. Observation of the *Sporichthya polymorpha* cells grown on agar media by fluorescence microscopy revealed that the cells near the bottom of the cell chains were mostly vegetative cells, while the cells near the top of the cell chains were metabolically inactive and likely to be dormant spores. Transmission electron microscopy of ultrathin sections of *S. polymorpha* and *S. brevicatena* revealed the presence of many storage granules in the cytoplasm of the cells grown on nutrient-poor agar medium. Distended cells were observed on nutrient-rich agar medium, and connections of the cytoplasmic space were observed between the distended and vegetative cells. In addition, motile cells were observed after suspending *S. polymorpha* and *S. brevicatena* cells in buffer containing 0.1% skim milk. The motile cells showed aerotaxis. *S. brevicatena* aggregated at the air-liquid interface to form a biofilm known as a pellicle.

Sporichthya, cellular growth, spore formation

講演番号：2C5p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C5 会場

分離共培養容器を用いたサンゴ共在細菌間相互作用と生理活性物質の解析

Interaction between coral symbiotic bacteria using isolated co-culture vessels and analysis of physiologically active substances

○神山 殊果[1]、中島 玲[2]、西川 有美[3]、深谷 昭三[4]、三浦 夏子[1,2,3]、植田 充美[5]、片岡 道彦[1,2,3]（[1]阪府大生命環境、[2]阪公大院農、[3]阪府大院生命環境、[4]株式会社サンキ精機、[5]京大院農）
○Shuka Kamiyama[1], Rei Nakashima[2], Yumi Nishikawa[3], Shozo Fukaya[4], Natsuko Miura[1,2,3], Mitsuyoshi Ueda[5], Michihiko Kataoka[1,2,3] ([1]Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch. Agriculture, Osaka Metropolitan Univ., [3]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ., [4]Sanki Seiki Co., Ltd., [5]Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ.)

近年、サンゴの共在細菌叢には病原菌等からサンゴを保護する機能があることが示唆されてきた。サンゴ病原菌の中でも、*Vibrio coralliilyticus* はサンゴの細菌性白化などを引き起こす日和見感染菌として知られる。我々は、*V. coralliilyticus* に対して生育阻止活性をもつ *Ruegeria* 属細菌を、*V. coralliilyticus* を保有するアザミサンゴから単離した（Kitamura et al. 2021 Marine Biotechnol.）。サンゴ菌叢に *Ruegeria* 属細菌が一定割合以上存在すると、その分泌する抗菌物質が *V. coralliilyticus* の生育を抑制する可能性が考えられた。そこで 2 種の菌間相互作用を詳しく調べるために、分離培養容器（サンキ精機社製）を用いて検討を行った。本研究で使用した 3 組の分離共培養容器について、3 組の培養器の等価性を確認した。次に、*Ruegeria* 属細菌と *V. coralliilyticus* の 2 菌種を用いて分離共培養を行い、*Ruegeria* 属細菌によって *V. coralliilyticus* の生育が抑制される条件を検討した。また、*Ruegeria* 属細菌が産生する生理活性物質の分画を行った。結果として、*Ruegeria* 属細菌は単独での培養時に比べて *V. coralliilyticus* との非接触による相互作用の方が生理活性物質を放出しやすい可能性が示唆された。

In recent years, it has been suggested that coral commensal flora have a function to protect corals from pathogens. Among coral pathogens, *Vibrio coralliilyticus* is known as an opportunistic pathogen that causes bacterial bleaching of corals. We isolated *Ruegeria* sp. from thistle corals harboring *V. coralliilyticus* (Kitamura et al. 2021 Marine Biotechnol.), which has growth inhibitory activity against *V. coralliilyticus*. It was hypothesized that the presence of a certain percentage of *Ruegeria* sp. in the coral flora may inhibit the growth of *V. coralliilyticus* by the antimicrobial substances they secrete. In order to investigate the interaction between the two bacteria in detail, a novel isolation co-culture vessel (Sanki Seiki Co., Ltd.) was used. The equivalence of the three sets of isolation co-culture vessels used in this study was confirmed for the three sets of incubators. Next, isolation co-cultures were performed using two bacterial species, *Ruegeria* sp. and *V. coralliilyticus*, to examine the conditions under which the growth of *V. coralliilyticus* is inhibited by *Ruegeria* sp. In addition, the bioactive substances produced by *Ruegeria* sp. were fractionated. The results suggest that *Ruegeria* sp. may be more likely to release bioactive substances during non-contact interactions with *V. coralliilyticus* than when cultured alone.

Ruegeria sp., Vibrio coralliilyticus, isolated co-culture vessels

発表責任者：三浦夏子（miuran@omu.ac.jp）

講演番号：2C5p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C5 会場

Clostridium perfringens の 2′-フコシルラクトース資化に伴う病原性関連因子の誘導は *Bifidobacterium* 属細菌との共培養によって抑制される
Upregulation of virulence-associated factors in *Clostridium perfringens* accompanied by its 2′-fucosyllactose assimilation is suppressed by co-cultivation with *Bifidobacterium* species

○中島 有登[1]、ARZAMASOV A. Aleksandr[2]、阪中 幹祥[1]、村上 隆太[3]、小酒井 智也[1]、吉田 圭佑[3]、加藤 紀彦[1]、廣瀬 潤子[4]、長尾 早枝子[5]、清水 金忠[1,3]、小田巻 俊孝[1,3]、RODIONOV A. Dmitry[2]、OSTERMAN L. Andrei[2]、片山 高嶺[1] ([1]京大院生命、[2]Sanford Burnham Prebys、[3]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所、[4]京女大家政、[5]長尾助産院)
○Aruto NAKAJIMA[1], Aleksandr A. ARZAMASOV[2], Mikiyasu SAKANAKA[1], Ryuta MURAKAMI[3], Tomoya KOZAKAI[1], Keisuke YOSHIDA[3], Toshihiko KATOH[1], Junko HIROSE[4], Saeko NAGAO[5], Xiao JIN-ZHONG[1,3], Toshitaka ODAMAKI[1,3], Dmitry A. RODIONOV[2], Andrei L. OSTERMAN[2], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Sanford Burnham Prebys, [3]Next Generation Science Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [4]Kyoto Women' s Univ., [5]Nagao Midwife Clinic)

腸内細菌は宿主の健康に大きな影響を及ぼす。ヒトの乳児期においては、ヒトミルクオリゴ糖（HMO）が *Bifidobacterium* 属細菌に特異的に代謝されることでビフィズスフローラが形成され、乳児の免疫発達等に寄与する。このことから近年、HMO 合成を目指した研究が加速し、2′-フコシルラクトース（2′-FL）など一部の HMO が欧米において実用化された。その科学的背景には、HMO は病原性細菌には資化されないという報告も含まれている。しかしながら我々は、食中毒やガス壊疽の原因菌として知られる *Clostridium perfringens*（*Cp*）が培養条件によっては 2′-FL を非常に良く資化すること、またラクトースを炭素源とした場合と比較して病原性関連遺伝子を誘導発現することを見出した。この結果を踏まえて次に *Bifidobacterium* 属細菌との共培養を実施したところ、いくつかの種の特定の株が *Cp* の生菌数を有意に低下させるのみならず、病原性関連遺伝子の発現も減弱させることが明らかとなった。*Cp* は壊死性腸炎の発症もしくは増悪への関与が示唆されているため、特に早産児や高齢者の 2′-FL 摂取には注意が必要であり、*Bifidobacterium* 属細菌との共投与（シンバイオティクス）が 2′-FL 使用の安全性を高める上で重要であると考えられる。

Gut microbiota impacts our health. In the breastfed infant gut, human milk oligosaccharides (HMOs) serve as the natural prebiotics to support the bifidobacteria-rich microbiota formation, which eventually contributes to immune development during infancy. Recently, research on HMO production has attracted attention, and several HMOs, including 2′-fucosyllactose (2′-FL), have been industrialized. Supplementation of HMOs is considered to be safe because pathogenic gut bacteria are reported to be catabolically inactive on HMOs. Here, we show that *Clostridium perfringens* (*Cp*), which causes food poisoning and gas gangrene, consumes 2′-FL under certain conditions, and induces pathogen-related genes compared to when grown on lactose. With these findings in mind, we co-cultivated *Cp* with several *Bifidobacterium* species and found that selected strains are not only capable of decreasing colony-forming units of *Cp* but also significantly suppressed the expression of pathogen-related genes. Because *Cp* is potentially associated with the onset and/or exacerbation of necrotizing enterocolitis, special care is needed when administering 2′-FL to vulnerable individuals such as preterm infants and the elderly. Symbiotic combinations might be a safer strategy for intervention with 2′-FL.

Clostridium perfringens, bifidobacteria, 2'-fucosyllactose

発表責任者：片山高嶺（katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C5p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C5 会場

黄色ブドウ球菌が分泌する凝乳因子の解析

Analysis of milk coaglation factors from *Staphylococcus aureus*.

○間嶋 朱里、下田 蒼、戸部 隆太、米山 裕（東北大農）
○Akari MAJIMA, So SHIMODA, Ryuta TOBE, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）は、食中毒やウシ乳房炎などの感染症を引き起こす原因菌として知られている。本菌は毒素に加え、酵素や多糖など多様な因子を細胞外へ分泌する。これら細胞外分泌因子は生育環境により種類が異なり、感染した宿主の免疫システムや抗菌薬の殺菌作用からの回避に加担している。本研究では、ウシ乳房炎を誘起する黄色ブドウ球菌の特徴を明らかにするために、乳房炎罹患牛から単離した臨床株の生化学的性状解析を行った。

ウシ乳房炎由来（59 株）及びヒト由来（5 株）の *S. aureus* をスキムミルク添加培地にて培養した結果、ウシ乳房炎由来株ではミルクを凝集（凝乳）させる活性が認められた。この凝乳が *S. aureus* の細胞外分泌因子に起因することを調べるために、培養上清のみをスキムミルク寒天にスポットし、凝乳活性の有無を解析した。その結果、凝乳活性の強い菌株の培養上清ではハローが形成され、凝乳活性の強度とハローの大きさには正の相関が認められた。凝乳に関与する因子を特定するため、培養上清の SDS-PAGE を行った結果、凝乳活性の強い菌株において 34 kDa 付近に高発現しているタンパク質バンドが観察された。さらに、ザイモグラフィー解析を行った結果、凝乳活性を示すタンパク質バンドが認められ、それは凝乳活性の高い菌株で高発現しているタンパク質の位置と一致した。

Staphylococcus aureus is the known cause of bovine mastitis. *S. aureus* secretes a variety of extracellular factors such as toxins, enzymes, and polysaccharides. The type of these factors depends on the growth environment, and they help to evade the antibacterial effects from the immune system and antibiotics. In this study, we performed biochemical characterization of clinical strains to clarify the characteristics of *S. aureus* derived from bovine mastitis.

When bovine mastitis-derived (59 strains) and human-derived (5 strains) *S. aureus* strains were cultured on skim milk-containing medium, we found that the mastitis-derived strains cause milk coagulation. To investigate whether this milk coagulation was caused by secreted factors from the mastitis-derived *S. aureus*, the culture supernatant was spotted on skim milk agar. As a result, a halo was formed in the culture supernatant of the strain with strong coagulation activity. To identify the factors involved in milk coagulation, we performed SDS-PAGE of culture supernatants. It was found that strains with strong coagulation activity highly expressed a 34 kDa protein, and the protein also showed milk coagulation activity on zymographic analysis.

Staphylococcus aureus, milk coaglation, secrated protein

発表責任者：米山　裕（hiroshi.yoneyama.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：2C5p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C5 会場

細菌の増殖を特徴づける化学成分の機械学習支援型探索
Machine learning-assisted investigation of the chemical components characterizing bacterial growth
○會田 穂乃香、イン ベイウェン（筑波大・生命農学）
○Honoka AIDA, Bei-Wen YING (University of Tsukuba)

細胞増殖は、環境中の化学成分によって影響を受けている。しかし、環境中には無数の化学成分が存在するため、どの化学成分が、どのように細胞増殖に影響を与えているかについては不明な点が残っている。この課題に対処するため、本研究では 40 種類以上の化学成分を様々な濃度で混合した 966 種類の合成培地を作製し、大腸菌の経時的な増殖を測定することで、化学環境と大腸菌増殖との大規模な関連づけを実施した。これらを機械学習分析によって解析することで、大腸菌増殖を代表する 3 つの増殖指標それぞれに最も大きな影響を与える化学成分が明らかになった。さらに、遺伝子型の違いによって、大腸菌増殖に最も大きな影響を与える化学成分が変化するかを調べるため、大腸菌単一遺伝子欠損株を用いて、様々な合成培地における増殖測定を実施した。本学会では、大腸菌増殖を代表する 3 つの増殖指標を特徴づける化学成分と、遺伝子型の違いによる増殖指標を特徴づける化学成分の類似性や相違点について報告する。

Cell growth is affected by chemical components in the environment. However, it remains unclear which and how chemical components affect cell growth since there are countless chemical components in the environment. To address this issue, a large-scale association between the chemical environment and *E. coli* growth was conducted by preparing 966 synthetic media mixed with over 40 chemical components at various concentrations and then measuring the temporal growth of *E. coli*. These were analyzed by the machine learning method and revealed the chemical component that has the greatest impact on each of the three growth parameters representative of *E. coli* growth. Additional growth measurements were performed on various synthetic media using *E. coli* single-gene knockout strains to investigate whether genotypic differences alter the chemical components that have the greatest impact on *E. coli* growth. We will report on the chemical components that characterize three growth parameters representative of *E. coli* growth, and the similarities/differences of the chemical components that characterize the growth parameter among the different genotypes.

bacterial growth, machine learning, chemical environment

発表責任者：會田　穂乃香（honoka.aida1123@gmail.com）

講演番号：2C5p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C5 会場

駿河湾表層水・深層水からのポリヒドロキシアルカン酸分解細菌の単離および特性解析
Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoate-degrading bacteria in surface and deep seawater from Suruga Bay

○蜂須賀 真一[1]、櫻井 徹生[1]、水野 匠詞[1]、百武(石井) 真奈美[1]、宮原 佑宜[1]、山﨑 資之[2]、柘植 丈治[1] ([1]東工大 物質理工、[2]静岡県水産・海洋技術研究所)
○ Shin-ichi Hachisuka[1], Tetsuo Sakurai[1], Shoji Mizuno[1], Manami Ishii-Hyakutake[1], Yuki Miyahara[1], Motoyuki Yamazaki[2], Takeharu Tsuge[1] ([1]Tokyo Institute of Technology, [2]Shizuoka Prefectural Research Institute of Fishery and Ocean)

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)は、微生物が細胞内に蓄積するポリエステルであり、プラスチック材料として利用されている。自然界において最も豊富な PHA であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]に対しては分解酵素 P(3HB) depolymerase (PhaZ)が存在し、P(3HB)を始めとするいくつかの PHA は、海洋生分解性を示すことが知られている。本研究では、駿河湾の表層水（水深 24 m)および深層水（水深 397 m)から、計 91 株の PHA 分解細菌を単離した。16S rRNA 解析の結果、それらの株は *Alloalcanivorax* 属、*Alteromonas* 属、*Arenicella* 属、*Microbacterium* 属、*Pseudoalteromonas* 属のいずれかに分類されたが、このうち *Arenicella* 属、*Microbacterium* 属は海洋性 PHA 分解細菌として初めて同定された。プレート培地による分解アッセイにおいて、*Arenicella* 属の分解株は培養温度 10°C では増殖せず、分解活性もわずかにしか示さなかった点で、深層水に比べて温かい表層水のみから単離されたことと矛盾しない結果となった。また *Microbacterium* 属のゲノム塩基配列決定株において PhaZ ホモログを調べると、配列パターンが過去に同定された海洋細菌由来の PhaZ とは大きく異なった。しかし、P(3HB)に対して確かに分解活性を示し、NaCl 存在下に比べて NaCl 非存在下での活性が低くなることがわかった。

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a polyester that microorganisms accumulate in their cells and is used as a plastic material. Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], the most abundant PHA in nature, can be degraded by P(3HB) depolymerase (PhaZ). P(3HB) and several PHAs are known to show marine biodegradability. In this study, we isolated 91 strains of PHA-degrading bacteria from surface (24 m depth) and deep (397 m depth) seawater in Suruga Bay. The isolates fell into *Alloalcanivorax*, *Alteromonas*, *Arenicella*, *Microbacterium*, and *Pseudoalteromonas* based on 16S rRNA analysis, including two novel genera, *Arenicella* and *Microbacterium*, as marine PHA-degrading bacteria. The isolated *Arenicella* sp. did not grow and displayed a weak degradation activity at 10°C, which is consistent with the fact that the *Arenicella* sp. was isolated only from the relatively warmer surface seawater. PhaZ in the genus *Microbacterium* showed a different pattern of domain composition from that in previously identified marine PHA-degraders. The PhaZ showed significant activity with various concentrations of NaCl, and the lowest activity was detected without NaCl.

biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate (PHA), poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase

講演番号：2C5p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C5 会場

Aspergillus 属真菌に対する光触媒反応で生成する活性酸素種の解析
Analyses of reactive oxygen species generated by photocatalysis to fungal genus *Aspergillus*
○小倉 盛史、上田 美祐、鈴木 智順（東理大院生物）
○Shigefumi OGURA, Miyu UEDA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

Aspergillus niger の方が *Aspergillus oryzae* よりも光触媒殺菌に抵抗性のあること、*A. niger* から抽出したメラニンが光触媒殺菌に抵抗性をもたらすことを当研究室で確認した。そこで、菌種の違いやメラニンの有無が光触媒殺菌効果と光触媒反応で生成する活性酸素種に与える影響を検証した。

H_2O_2 のスカベンジャーであるカタラーゼ、$^{\cdot}OH$ のスカベンジャーであるイソプロパノールや D-mannitol を用いて、光触媒反応で生じる H_2O_2 や $^{\cdot}OH$ が真菌に与える影響の評価を行った。

スカベンジャー無添加の *A. niger*、*A. oryzae*、メラニン添加 *A. oryzae* の生存率はそれぞれ 63.2%、21.7%、65.5%であった。これに対し、カタラーゼ添加では 85.8%、65.4%、84.0%、イソプロパノール添加では 81.4%、22.7%、68.4%、D-mannitol 添加では 77.3%、27.1%、66.0%となった。カタラーゼ添加で生存率が高くなったため、光触媒殺菌の主要な要因は H_2O_2 であることが示唆された。一方、イソプロパノールや D-mannitol 添加時の生存率は、*A. niger* では上昇し、*A. oryzae* では変わらなかった。これより、*A. niger* の光触媒殺菌には $^{\cdot}OH$ の関与が示唆され、*A. oryzae* には関与しないことが示唆された。また、メラニンの存在により H_2O_2 や $^{\cdot}OH$ の生成が抑制、または分解される可能性が示唆された。

A. niger、*A. oryzae*、メラニン添加 *A. oryzae* に対して光触媒反応を行うと、H_2O_2 がそれぞれ 0.090 mM、0.19 mM、0.14 mM 生成した。菌体のカタラーゼ活性を測定した結果、*A. niger* は *A. oryzae* よりも活性が高く、 H_2O_2 を減少させる能力が高いことが示された。また、メラニンの存在により H_2O_2 の生成が抑制されることが示唆された。

This study aims to verify the relationship between the resistance to the photocatalytic fungicidal effect of melanin from *Aspergillus niger* and the reactive oxygen species produced in photocatalysis.

Scavengers for H_2O_2 and $^{\cdot}OH$ were used to confirm whether they affected the photocatalytic fungicidal effect. The results suggest that the main factor in the photocatalytic fungicidal effect is H_2O_2. Determination of H_2O_2 quantity and catalase activity showed that *A. niger* was more resistant than *A. oryzae*. Based on these results, it is suggested that the presence of melanin inhibits or decomposes the formation of H_2O_2 and $^{\cdot}OH$.

photocatalyst, melanin, reactive oxygen species

発表責任者：小倉盛史（6422514@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2C5p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C5 会場

分岐鎖脂肪酸が微生物生体膜流動性へ及ぼす影響
Effect of branched-chain fatty acids on microbial biomembrane fluidity
○上畑 季穂、三浦 健太郎、森田 誠一、西本 真琴（和高専）
○Kiho UEHATA, Kentarou MIURA, Seiiti MORITA, Makoto NISHIMOTO (NIT, Wakayama College)

生物は周囲の環境変化に対して、生体膜中の脂肪酸組成を調節することで膜流動性を保っている。高圧・高温環境下で生息する微生物生体膜中に多く含まれる分岐鎖脂肪酸が膜流動性に及ぼす役割を明らかにするため、anteiso 分岐鎖脂肪酸である 12-Methyltetradecanoic acid(anteiso 15:0)が 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)二分子膜流動性へ与える影響を時間分解蛍光異方性測定と示差走査熱量測定(DSC)により調査した。得られた蛍光異方性値から脂質分子間隔と脂質分子運動性に相関するオーダーパラメーター*S* および回転拡散係数 D_w を算出した。温度変化では anteiso 15:0 を添加しても相転移温度に変化は見られず、DSC 測定においても同様の結果が得られた。さらに、*S* 値ではその値は変化しなかったが、D_w 値は高温域での低下を引き起こしたことから、anteiso 15:0 が高温環境下における脂質分子の運動に重要な役割があると考えられる。また、圧力変化における影響についても検討を行った。

Organisms maintain membrane fluidity by regulating the fatty acid composition of their biomembranes in response to changes in the surrounding environment. To clarify the role of branched-chain fatty acids, which are abundant in the biomembranes of microorganisms living in high-pressure and high-temperature environments, we investigated the effect of 12-methyltetradecanoic acid (anteiso 15:0), anteiso branched-chain fatty acid, in 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) bilayer membrane fluidity was investigated by time-resolved fluorescence anisotropy and differential scanning calorimetry (DSC). From the fluorescence anisotropy values obtained, the order parameter *S* and rotational diffusion coefficient D_w, which correlate with lipid molecular spacing and lipid molecular mobility, were calculated. Addition of anteiso 15:0 at different temperatures did not change the phase transition temperature, and DSC measurements showed similar results. Furthermore, anteiso 15:0 caused a decrease in D_w values at higher temperatures, but the values did not change for *S* values, suggesting that anteiso 15:0 may play an important role in the mobility of lipid molecules in high temperature environments. The effect of anteiso 15:0 on pressure changes to DPPC bilayer membrane fluidity was also investigated.

Biomembrane Fluidity, Branched Cain Fatty Acid, Anisotropy

発表責任者：西本真琴（ma-nishimoto@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：2C5p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 C5 会場

微生物に対する空気ファインバブルの効果に関する調査

Investigation of the effect of air-fine bubbles on microorganisms

○岩崎 なつね[1]、豊田 健太[1]、堂本 実咲希[1]、多田 佳織[2]、西内 悠祐[2]、則村 史歩[1]、秦 隆志[2]、西本 真琴[1] ([1]和高専、[2]高知高専)
○Natsune IWASAKI[1], Kenta TOYODA[1], Misaki DOMOTO[1], Kaori TADA[2], Yusuke NISHIUTI[2], Shiho NONORIMURA[1], Takashi HATA[2], Makoto NISHIMOTO[1] ([1]NIT, Wakayama College, [2]NIT, Kochi College)

ファインバブル(FB)の電気的特性には微生物の殺菌効果が期待されているが、気体として二酸化炭素やオゾンを用いた研究がほとんどで空気を用いた例は極めて少ない。そこで本研究では、大腸菌(*Escherichia coli* DH5α株)に対する空気 FB の効果を調査した。大腸菌懸濁液を空気 FB 水に所定の濃度となるように添加し、空気 FB 水への暴露処理を行った。暴露処理したサンプルを LB 寒天培地に塗抹し、37 °C で一晩培養後、コロニー数をカウントして生菌率を決定した。

旋回液流式で発生させた FB 水への暴露では 10^5 CFU/mL の大腸菌の生菌率はコントロールに比べて減少したが、10^6 CFU/mL の大腸菌の生菌率は増加することが示された。一方、加圧溶解式で発生させた空気 FB 水への暴露では、10^5 および 10^6 CFU/mL ともに生菌率がコントロールに比べて減少することが示された。これらの結果と両 FB 発生方法における FB 数密度が異なることを考えると、空気 FB の大腸菌に対する効果は菌濃度や FB 数密度の関係によって異なり、増殖抑制効果および増殖促進効果を持つ可能性が明らかになった。

Electrical characteristics of fine bubbles (FB) are expected to have a bactericidal effect on microorganisms. However, most studies have used carbon dioxide or ozone as the gas in the bubbles, and few have used air. In this study, the effects of air-FB on *Escherichia coli* DH5α were investigated. The *E.coli* suspension was added to air-FB water to reach the specified concentration. Exposure-treated samples was spread on LB agar medium and incubated overnight at 37 °C. Then colonies were counted to determine viability.

Air-FB water generated by the swirling liquid flow system showed a decrease in the viability of *E.coli* at 10^5 CFU/mL and an increase in the one at 10^6 CFU/mL compared to the control. On the other hand, Air-FB water generated by the pressurized dissolution system showed a decrease in the one at both 10^5 and 10^6 CFU/mL. Considering these results and FB number density differs depending on the FB generation method, the effects of air-FB on *E.coli* depends on the concentration of bacteria and FB number density, and it is clear possibility that air-FB has both a growth-promoting effect and a growth-inhibiting effect.

air-FB, *E.coli*, growth-inhibitory action

発表責任者：西本真琴（ma-nishimoto@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：2C5p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 C5 会場

枯草菌に対する空気ファインバブルの効果

Effect of Air Fine Bubbles on Bacillus subtilis

○豊田 健太[1]、岩崎 なつね[1]、堂本 実咲希[1]、多田 佳織[2]、西内 悠祐[2]、則村 史歩[1]、秦 隆志[2]、西本 真琴[1] ([1]和高専、[2]高知高専)

○ Kenta TOYODA[1], Natsune IWASAKI[1], Misaki DOUMOTO[1], Kaori TADA[2], Yusuke NISHIUCHI[2], Shiho NORIMURA[1], Takashi HATA[2], Makoto NISHIMOTO[1] ([1]NIT,Wakayama College, [2]NIT,Kochi College)

近年、ファインバブル(FB)という微細気泡が注目されている。FB は通常の気泡とは異なる特性を有していることから、それらを生かして様々な産業で活用されている。

本研究では、枯草菌に対する空気 FB の効果について調査した。旋回液流方式で 90-180 min 間発生させた空気 FB 水に対して、10^3-10^5 CFU/mL の枯草菌を 90 分間曝露処理し、コロニーカウントを行うことで生菌率を決定した。FB 水は、いずれの枯草菌濃度に対しても増殖を抑制していたが、中でも 10^3 CFU/mL が最も生菌率が低く、FB の効果が大きく表れることがわかった。また、FB 発生時間を長くすることでも FB 効果を高められることが確認できた。FB 発生時間が長くなることで、水中の FB 水密度が増加することを考慮すると、FB 効果の程度の違いは、枯草菌濃度と FB 数密度の関係に依存していると考えられる。さらに、加圧溶解方式によって発生させた空気 FB についても同様に調査した結果、旋回液流方式とは異なる結果が得られた。

Fine bubbles (FB) have different characteristics from ordinary bubbles and are a technology that has been attracting attention in recent years, being used in a variety of industrial fields to take advantage of these characteristics.

In this study, the effect of air-FB on *Bacillus subtilis* was investigated. The air-FB water was generated by a swirling flow system for 90 to 180 minutes. The viable bacterial population was determined by exposing 10^3-10^5 CFU/mL of Bacillus subtilis to air FB water for 90 minutes and performing a colony count. The FB water inhibited the growth of *B. subtilis* at all *B. subtilis* concentrations, with 10^3 CFU/mL having the lowest viability, indicating the effectiveness of FB. It was also confirmed that the air-FB effect could be enhanced by increasing the air-FB generation time; considering that the FB number density in the water increased as the FB generation time increased, the difference in the degree of air-FB effect may depend on the relationship between the *B. subtilis* concentration and the FB number density. Furthermore, air-FB generated by the pressurized dissolution method was also investigated in the same way, and the results were different from those of the swirling liquid flow method.

air-FB, *B.subtilis*, growth inhibition

発表責任者：西本真琴（ma-nishimoto@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：2C5p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 C5 会場

茶えのき清酒製造における沸騰水の検討

Investigation of boiling water in sake production using Flammulina filiformis.

○西島 七海[1]、竹本 尚未[1]、佐々木 裕子[2]、山口 真弥[3]、福田 史織[4]、松井 徳光[1,4,5] ([1]武庫女大院食栄、[2]甲子園大栄養、[3]中野市農業協同組合、[4]武庫女大食栄、[5]武庫女大栄養科学研究所)
○Nanami NISHIJIMA[1], Naomi TAKEMOTO[1], Hiroko SASAKI[2], Masaya YAMAGUCHI[3], Shiori FUKUDA[4], Tokumitsu MATSUI[1,4,5] ([1]Grad. sch. of Mukogawa Univ., [2]Koshien Univ., [3]JA Nakano-city, [4]Mukogawa Univ., [5]Res. inst. for Nut Sci. of Mukogawa Univ.)

これまでに、エノキタケを用いた清酒製造が見出され、特徴として線溶活性および抗トロンビン活性が報告されている。しかし、エノキタケ清酒製造に用いられたオートクレーブ処理が必要な滅菌水は、大量生産に適していない。そこで、本研究では、茶えのき清酒製造における沸騰水の検討を行った。茶えのきの菌糸を蒸米に生育させたものをきのこ麹とした。調製したきのこ麹 120 g にオートクレーブ処理した滅菌水、沸騰させた沸騰水、オートクレーブ処理していないかつ沸騰させていない天然水をそれぞれ 200 mL 添加し、静置培養（25℃、13 週間）を行った。天然水ではコンタミネーションを起こしたが､滅菌水および沸騰水では起こらなかった｡最も高いアルコール濃度は､滅菌水で 3.9%（培養 9 週)、沸騰水で 4.6%（培養 8 週）であった。線溶活性は、コウジカビと酵母で調製した清酒に比べ茶えのき清酒の沸騰水において有意に付加された。抗トロンビン活性は、コウジカビと酵母で調製した清酒および茶えのき清酒の沸騰水のいずれも著しい活性がみられた。以上のことから、茶えのき清酒は沸騰水による培養が可能であり、線溶活性が付加されることが示唆された。

Sake production using *Flammulina filiformis* has been found, and fibrinolytic activity and antithrombin activity have been reported as characteristics. However, the sterile water used for sake production with *F.filiformis*, which requires autoclaving, is not suitable for mass production. Therefore, this study examined boiling water in sake production with *F.filiformis*. *F.filiformis* mycelia were grown on steamed rice and used as mushroom koji. To 120 g of prepared mushroom koji, 200 mL each of autoclaved sterile water, boiled boiling water, and unautoclaved or unboiled natural water were added and incubated statically (25°C, 13 weeks). Contamination occurred in natural water, but not in sterile or boiling water. The highest alcohol concentrations were 3.9% in sterile water (9 weeks of incubation) and 4.6% in boiling water (8 weeks of incubation). Fibrinolytic activity was significantly increased in the boiling water of sake prepared with *F.filiformis* compared to sake prepared with *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Antithrombin activity was significant in both sake prepared with *A.oryzae* and *S.cerevisiae* and in boiling water of sake with *F.filiformis*. These results suggest that the sake with *F.filiformis* can be cultured in boiling water, which adds fibrinolytic activity.

boiling water, Flammulina filiformis, Sake

発表責任者：松井徳光（tokamura@mukogawa-u.ac.jp）

講演番号：2C5p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 C5 会場

Lepista nuda に存在する ADH の特性およびワイン製造に及ぼす影響
Characteristics of ADH by *Lepista nuda* and its influence on wine production
○竹本 尚未[1]、鮫島 由香[2,4]、福田 史織[3]、松井 徳光[1,3,4]([1]武庫女大院食栄、[2]羽衣国際大食栄、[3]武庫女大食栄、[4]武庫女大栄養科学研究所)
○Naomi TAKEMOTO[1], Yuka SAMESHIMA[2,4], Shiori FUKUDA[3], Tokumitsu MATSUI[1,3,4] ([1]Grad. sch. of Mukogawa Univ., [2]Hagoromo Univ., [3]Mukogawa Univ., [4]Res. inst. for Nut Sci. of Mukogawa Univ.)

これまでに，担子菌を用いたアルコール飲料製造において，担子菌に存在する alcohol dehydrogenase（ADH）は，EtOH の分解に関与する ADH および生成に関与する ADH の両方の作用により，アルコール発酵期間中に EtOH 濃度が増減し，ピークに達するまで 1 カ月以上の時間を要することが報告されている．一方，*Lepista nuda* を用いたワイン製造では，EtOH 濃度が増減すること無く，培養 1 週間の短期間で EtOH 生成がピークとなり，これまでの担子菌によるアルコール発酵と異なる特徴を明らかにした．そこで本研究では，*L. nuda* を用いたワイン製造時のワイン成分の変化並びに *L. nuda* に存在する ADH の比活性に関する pH および補酵素への影響について検討した．

L. nuda ワインの pH は培養期間の経過によりアルカリへ傾いた．主要有機酸であるリンゴ酸，酒石酸が減少したことから，pH に影響した可能性を示唆した．Native-PAGE において検出された約 160，100，70 kDa の EtOH 生成型 ADH を分取し比活性を測定した．全ての ADH の至適 pH は 5 あるいは 7 であった．約 70 kDa の ADH の比活性は NADH を補酵素とした場合はエタノール生成に最も関与しており，NADPH を補酵素とした場合はブタノール生成に関与することが示唆された．よって，*L. nuda* に存在する ADH は補酵素により適した基質が異なることを明らかにした．

It has been reported that it takes more than a month for the EtOH concentration to reach its peak when producing alcoholic beverages using basidiomycetes. This is because the alcohol dehydrogenase (ADH) in basidiomycetes acts on both ADH, which is involved in the decomposition of EtOH, and involved in the production of EtOH. However, *Lepista nuda* produced EtOH within a short period of one week of culture. In this study, we investigated the wine component during wine production by *L. nuda* and the ADH of *L. nuda*. *L. nuda* wine became alkaline as the culture period progressed. This is because malic acid and tartaric acid, the main organic acids in wine, have decreased. The ADHs involved in EtOH production in *L. nuda* were detected by Native-PAGE at ~160, 100, and 70 kDa. The optimum pH of ADHs of each molecular weight was 5 or 7. The ～ 70 kDa of ADH was most involved in EtOH production when NADH was used as a coenzyme. However, when NADPH was used as a coenzyme, The ～ 70 kDa of ADH was suggested that it was involved in the production of butanol. It was elucidated that L. nuda ADH has different substrates suitable for different coenzymes.

alcohol dehydrogenase, *Lepista nuda*, wine

発表責任者：松井徳光（tokamura@mukogawa-u.ac.jp）

講演番号：2C6a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 C6 会場

もち麦の経口投与が免疫機能に及ぼす影響ついて

The effect of naked barley on immune functions

○若木 学、田村 基、庄司 俊彦、小堀 俊郎、高山 喜晴、後藤 真生（農研機構食品研究部門）
○ Manabu WAKAGI, Motoi TAMURA, Toshihiko SHOUJI, Toshiro KOBORI, Yoshiharu TAKAYAMA, Masao GOTO (NFRI)

もち性はだか麦（もち麦）はβ-グルカンの含有量が高く、様々な健康機能性を有することが知られている。本研究では、もち麦 10%（w/w）混餌 AIN93G を DO11. 10 マウス（16 週齢、雌）に 6 週間自由摂取させ、免疫機能への影響を評価した。糞便中 SIgA 抗体量を測定したところ、もち麦投与群の糞便中 SIgA 抗体量は全投与期間を通して対照群より有意に高かった。また末梢血免疫細胞において、もち麦投与群では対照群よりも CD86 陽性樹状細胞数が有意に増加したとともに、特に B220 の発現強度が中程度の B 細胞集団において IgM 陽性細胞、粘膜固有層へのホーミングに重要なα4ß7 陽性細胞が有意に増加した。さらに、小腸回腸部の遺伝子発現を検討したところ T 細胞非依存的な IgA 産生に重要なサイトカインである BAFF (B cell activating factor)発現がもち麦投与群で有意に増加した一方、IgA の管腔外トランスポータである pIgR (polymeric immunoglobulin receptor)の発現に差は認められなかった。以上より、もち麦は樹状細胞や B 細胞に作用し、SIgA 産生を高めると示唆された。

Naked barley (NB) is known to have high ß-glucan content and a variety of functional properties. In this study, DO11.10 mice (16 wk, female) were fed *ad libitum* AIN-93G diet containing 10% (w/w) NB for 6 weeks to investigate effects of NB on immune functions. The amount of fecal SIgA antibody of NB diet group showed significantly higher than that of the control diet (AIN93G) group through experimental periods. Flow cytometry analysis showed a significant increase in the number of CD86-positive dendritic cells in peripheral blood of the NB group compared to the control group. There was also a significant increase in IgM-positive B cells and α4ß7-positive B cells with B220 medium expression. Gene expression of the ileum showed that the expression of BAFF (B cell activating factor) in the NB group significantly increased compared to the control group, but no significant difference was observed in the expression of pIgR (polymeric immunoglobulin receptor). Therefore, these results suggest that NB acts on dendritic cells and B cells to enhance SIgA production.

naked barley, IgA, GALT

発表責任者：若木学（mana5998bu@affrc.go.jp）

講演番号：2C6a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 C6 会場

新規分光学的網羅解析技術を活用した食品素材の健康機能性の評価
Evaluation of Health Functionality of Food Ingredients Using Novel Spectroscopic Exhaustive Analysis Technology
○後藤 真生[1]、若木 学[1]、小堀 俊郎[1]、石川 千秋[1]、塚原 正俊[2]、石川（高野） 祐子[1]([1]農研機構食品研、[2]（株）バイオジェット)
○Masao GOTO[1], Manabu Wakagi[1], Toshirou Kobori[1], Chiaki Ishikawa[1], Masatoshi Tsukahara[2], Yuko Ishikawa-Takano[1] ([1]NFRI, [2]BioJet Co,.LTD)

【目的】農林水産物等の品質の定量化や作用機作の解明へのメタボロミクスの活用が試みられているが、網羅的測定条件の設定や多数の試料を分析するコストなど課題が多い。そこで、我々は自ら開発した蛍光メタボロミクス技術により課題解決に取り組んだ。
【方法】凍結乾燥粉末化した試料 1 g を用い、ヘキサン、アセトン、水を段階的に混合したステップグラジエント溶媒で成分が緩やかに異なる 11 画分を抽出、4 回繰り返して得た計 44 画分を DMSO に再溶解し、測定用サンプルとした。成分の分光学的性質と量を網羅的に示す 3D スペクトル（Emission Excitation Matrix:EEM）及び、抗酸化能と免疫機能修飾活性の評価値を測定し、44 組の EEM と評価値から評価値の推定モデルを作成、また励起波長・蛍光波長を両軸とする座標上に評価値と相関が高い成分をマッピングした。
【結果】1 試料から決定係数が 0.7 を越えるモデルを作成でき、関与成分マップから免疫応答修飾能成分の作用機序を推定した。従来、機能性関与成分の特定や作用機序の解析には、試料の化学的な分離と評価を繰り返す必要があったが、蛍光メタボロミクスがこれらを代替しうる可能性を示した。
本研究は、生物系特定産業技術研究支援センター 「イノベーション創出強化研究推進事業」（JPJ007097）により行われた。

When using metabolomics for quality quantification of agricultural and food products, there are problems such as difficulty of exhaustive analysis, large number of samples, and high cost of measurement. Therefore, we have developed our own technology to solve these problems. 11 fractions were extracted from 1 g of the powder sample by a step-gradient mixture of solvents. This was repeated four times to obtain 44 fractions. Subsequently, 3D spectral data (Emission Excitation Matrix: EEM) and the values for antioxidant capacity and immune functional activity were evaluated. These data were subjected to multivariate analysis to produce estimating models of the evaluated values and heatmaps of components that exhibit high correlation with the assessed values. As a result, estimating models were successfully formed from data of a single sample, with coefficients of determination exceeding 0.7. Furthermore, the mechanism of the immune functional component was estimated based on heatmaps. The identification of components responsible for functionality and the analysis of their mechanisms have required repeated chemical separation, but fluorescence metabolomics has shown the potential to replace these methods.

metabolomics, EEM, Immune function

発表責任者：後藤真生（masaogot@affrc.go.jp）

講演番号：2C6a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 C6 会場

ウシラクトフェリンがヒト末梢血単核球中の免疫細胞に及ぼす影響の検討

The effect of bovine lactoferrin on immune cells in human peripheral blood mononuclear cells

○矢後 拓己[1]、久保 周太郎[1]、多田 明日翔[1]、織田 浩嗣[1]、岩淵 禎弘[2]、田中 美順[1]、橋本 真一[2]
([1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所、[2]和歌山県立医科大学 医学部 先端医学研究所 分子病態解析研究部)
○Takumi YAGO[1], Shutaro KUBO[1], Asuka TADA[1], Hirotsugu ODA[1], Sadahiro IWABUCHI[2], Miyuki TANAKA[1], Shinichi HASHIMOTO[2] ([1]Innovative Research Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]Department of Molecular Pathophysiology, Wakayama Medical University)

ラクトフェリン（LF）は、牛乳から発見された鉄結合性の糖タンパク質で、多様な生理活性を有する。我々はヒト臨床試験にて LF の摂取が末梢血中プラズマサイトイド樹状細胞（pDC）の活性を維持し、呼吸器や全身の健康状態を維持することを確認した。pDC はウイルスを認識するとサイトカイン産生や抗原提示により自然免疫系や獲得免疫系の幅広い免疫細胞を活性化する。したがって LF の体調の維持の機序として pDC の関与が考えられるが、LF の pDC およびその他の免疫細胞に対する作用の詳細は不明であった。そこで LF が末梢血中の免疫細胞に及ぼす影響を *ex vivo* にて検討した。健康な成人から末梢血を採取し、pDC などの免疫細胞を含む単核球（PBMC）を調製した。PBMC をウイルス由来 1 本鎖 RNA を認識する Toll 様受容体（TLR）-7 のリガンドと共に 37℃で最大 24 時間培養した。この系に LF を添加した結果、培養上清中の IFN-α、IFN-γ および IL-12 の濃度が有意に増加した。これらはナチュラルキラー細胞や Th1 細胞の活性化因子である。また、pDC の IFN-α、HLA-DR、および CD86 の発現レベルが有意に増加した。これらのことから、LF は pDC のウイルスに対する応答性を高め、細胞性免疫を活性化することが示唆された。

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein found in bovine milk. LF has various bioactivities. We have shown in human clinical trials that LF intake supports the activity of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in peripheral blood, and maintains respiratory and systemic physical conditions. pDCs recognize viruses and activate innate and adaptive immune cells by cytokine production and antigen presentation. Therefore, pDCs may be involved in the mechanisms involving LF that maintain physical conditions. However, the effects of LF on pDCs and other immune cells are unclear. We investigated the effect of LF on immune cells in peripheral blood ex vivo. Peripheral blood was collected from healthy adults. Mononuclear cells (PBMCs) containing immune cells, including pDCs, were prepared. PBMCs were incubated with the ligand of Toll-like receptor- 7, which recognizes viral single-stranded RNA, at 37℃ for up to 24 hours. The addition of LF significantly increased the concentrations of IFN-α, IFN-γ, and IL-12 in the supernatant. The molecules activate natural killer cells and Th1 cells. In addition, LF significantly upregulated the expressions of IFN-α, HLA-DR, and CD86 in pDCs. Therefore, LF may enhance the response of pDCs to viruses and activate cellular immunity.

lactoferrin, peripheral blood mononuclear cells, plasmacytoid dendritic cells

講演番号：2C6a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 C6 会場

健常成人の呼吸器と全身の健康維持に対するウシラクトフェリンの効果

Effects of bovine lactoferrin on the maintenance of respiratory and systemic physical conditions in healthy adults

○久保 周太郎[1]、織田 浩嗣[1]、多田 明日翔[2]、矢後 拓己[1]、杉田 千泰[3]、吉田 裕樹[3]、戸井田 達典[3]、田中 美順[1]、黒川 昌彦[3]([1]森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所、[2]森永乳業株式会社 海外事業本部、[3]九州保福大薬)

○Shutaro KUBO[1], Hirotsugu ODA[1], Asuka TADA[2], Takumi Yago[1], Chihiro SUGITA[3], Hiroki YOSHIDA[3], Tatsunori TOIDA[3], Miyuki TANAKA[1], Masahiko KUROKAWA[3] ([1]R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]International Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [3]Kyushu University of Health and Welfare)

ウシラクトフェリン(LF)の摂取は種々の免疫細胞を活性化させること、体調の維持に有用であることが報告されている。免疫応答でリーダー的な役割を担う細胞として、幅広い免疫細胞の活性を調節するプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)が知られるが、我々は *in vitro* およびヒト試験で LF が pDC を活性化することを示した。すなわち、LF は pDC への作用を介して免疫系を調節し体調の維持に寄与している可能性がある。そこで LF の摂取が pDC の活性と全身の体調に与える効果を評価する目的で、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。試験では健常成人に LF(200mg/日)またはプラセボを 12 週間摂取させ、呼吸器症状と全身症状の総スコア（主要評価項目）、末梢血中の pDC の活性指標（副次評価項目）を評価した。157 名が試験に参加し、145 名を最大の解析対象集団とした。LF 摂取群はプラセボ摂取群に対して呼吸器症状と全身症状の総スコアが有意に低値を、pDC の活性指標は有意に高値を示した。健常成人における LF の摂取は pDC の活性の維持を介して正常な免疫機能を保ち、健常者の呼吸器と全身の体調を維持することが示唆された。

Oral administration of bovine lactoferrin (LF) enhances the activity of various immune cells and is beneficial for maintaining physical condition. Our *in vitro* and clinical studies suggest that orally ingested LF can activate plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which are well known key modulators of immune cells. Ingested LF may thus benefit the immune system and help maintain physical condition by modulating pDCs. We investigated the effects of LF on maintenance of pDC activity and systemic physical conditions, and conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. In this trial, healthy adults ingested a placebo or LF (200 mg/day) for 12 weeks. The primary endpoints were total respiratory and systemic symptom scores. The secondary endpoint was pDC activity in peripheral blood. A total of 157 participants were randomized and 145 were included in the full analysis set. Total scores for respiratory and systemic symptoms were significantly reduced, and pDC activity indices were significantly elevated in the LF group relative to the placebo group. These results suggest that orally ingested LF supports the normal immune system by maintaining pDC activity, and maintains respiratory and systemic physical conditioning in healthy adults.

lactoferrin, systemic symptoms, plasmacytoid dendritic cells

講演番号：2C6a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 C6 会場

パラミロン高含有 *Euglena gracilis* EOD-1 株の摂取が唾液中免疫グロブンリン A の親和性に与える影響

Effect of ingestion of paramylon-rich *Euglena gracilis* EOD-1 on the affinity of salivary immunoglobulin A

○河野 高徳[1]、内藤 淳子[1]、西田 典永[1]、新藏 礼子[2] ([1]神鋼環境ソリューション、[2]東大 定量研)
○Takanori KAWANO[1], Junko NAITO[1], Norihisa NISHIDA[1], Reiko SHINKURA[2] ([1]Kobelco Eco-Solutions, [2]The Univ. of Tokyo)

【背景】パラミロン高含有 *Euglena gracilis* EOD-1 株 (PM EOD-1)は、特徴的なβ-グルカンであるパラミロンを 70~80%と高含有する。パラミロンは、腸管の免疫グロブンリン A（IgA）産生経路に影響を与えることや唾液中の IgA 分泌を促進することが報告されているが、IgA の機能に大きく寄与する親和性に与える影響は不明である。【目的】PM EOD-1 の摂取がヒトの IgA の親和性に与える影響を検証する【方法】50 歳以上 65 歳未満の健康な中高年者 24 名を対象に、ランダム化二重盲検並行群間比較試験を実施した（試験 1)。被験者は PM EOD-1 またはプラセボカプセルを毎日 12 週間摂取した。摂取前後で唾液を回収し、ELISA 法により唾液中 IgA の A 型インフルエンザウイルス（H1N1）のヘマグルチニン（HA）および SARS-CoV-2 (オミクロン株)のスパイクタンパク質に対する親和性を評価した。また、20 歳以上 65 歳未満の健康な成人 100 名を対象に、同様の試験を実施した（試験 2)。【結果】試験 1、2 ともに、PM EOD-1 群において IgA のインフルエンザウイルスの HA に対する親和性が摂取前と比較して有意に上昇していた。また、試験 2 では SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に対する親和性は両群で有意に上昇していたが、PM EOD-1 群の方が顕著な変化であった。【考察】PM EOD-1 摂取により、様々な抗原に対する IgA の親和性が高まることが示唆された。

[Background] Paramylon-rich *Euglena gracilis* EOD-1 (PM EOD-1) contains high paramylon content (70~80%). It has been reported that paramylon affects the immunoglobulin A (IgA) production pathway in the intestinal tract and promotes IgA secretion in saliva, but its effect on the affinity of IgA is unknown. [Objective] To investigate the effect of PM EOD-1 intake on human IgA affinity. [Methods] A randomized clinical trial was conducted on 24 healthy adults aged 50 to 65 years (Study 1). Participants ingested PM EOD-1 or placebo capsules daily for 12 weeks. Saliva was collected before and after ingestion, and the affinity of salivary IgA for influenza A virus (H1N1) hemagglutinin (HA) and SARS-CoV-2 (Omicron) spike protein were evaluated by ELISA. A similar trial was conducted on 100 healthy adults aged 20 to 65 years (Study 2). [Results] In both Study 1 and 2, the affinity of IgA for influenza virus HA was significantly increased in the PM EOD-1 group compared to that before intake. In Study 2, the affinity of IgA for SARS-CoV-2 spike protein increased in both groups, but the change was more pronounced in the PM EOD-1 group. [Discussion] PM EOD-1 ingestion may increase affinity of various IgA.

paramylon, immunoglobulin A, affinity

講演番号：2C6a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 C6 会場

漬物由来乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* TK61406 株の免疫賦活作用の検討
A study of immune-modulatory effect of *Lactiplantibacillus plantarum* TK61406 isolated from pickles.

○中村 優一[1]、杉浦 俊作[1]、大野 友也[1]、田中 沙智[2]、森下 美香[1]([1]東海漬物(株)、[2]信州大院農)
○Yuichi Nakamura[1], Shunsaku Sugiura[1], Tomoya Ohno[1], Sachi Tanaka[2], Mika Morishita[1] ([1]Tokai Pickling Co.,Ltd., [2]Shinshu University)

Lactiplantibacillus plantarum TK61406 は高い人工消化液耐性を有することで選抜された漬物由来乳酸菌株であり、腸内環境改善作用をはじめとするプロバイオティクス機能が知られている。しかしながら、TK61406 の殺菌体が有するバイオジェニクス機能については不明である。そこで本研究では、その機能の１つとして免疫賦活作用を評価した。はじめに、C57BL/6 マウス脾臓細胞に TK61406 殺菌体を添加して培養したところ、培養上清中の IFN-γ および IL-12 p70 の産生レベル、さらに、マウスリンパ腫由来細胞株 YAC-1 細胞への傷害活性が増加した。次いで、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に TK61406 殺菌体を添加して培養したところ、培養上清中の TNF-α および IL-6 の産生レベルが増加した。よって、TK61406 殺菌体はマクロファージに直接作用し、サイトカイン産生を誘導することが示された。以上のことから、TK61406 殺菌体は免疫賦活作用として IFN-γ 産生によって NK 細胞を活性化する機能を有することが明らかとなった。また、その作用機序としてマクロファージの活性化を介した IL-12 p70 の誘導が関与していることが示唆された。

Lactiplantibacillus plantarum TK61406 strain is a pickles-isolated lactic acid bacteria selected for high resistance to artificial digestive juices, and is known for its probiotic functions, including its ability to improve the intestinal environment. However, the biogenic function of sterilized TK61406 is unknown. Therefore, in this study, we evaluated the immune-modulatory effect as one of its functions. First, treatment of C57BL/6 murine spleen cells with sterilized TK61406 increased IFN-γ and IL-12 p70 production, in addition, increased the cytotoxic activity against YAC-1 murine lymphoma-derived cell line. Next, treatment of RAW264 murine macrophage cell line with sterilized TK61406 increased TNF-α and IL-6 production. Therefore, it was shown that sterilized TK61406 acts directly on macrophage cells and induces cytokine production. Taken together, sterilized TK61406 was shown to have the function of activating NK cells through IFN-γ production as the immune-modulatory effect. Furthermore, the mechanism was suggested to be related to the induction of IL-12 p70 via macrophage activation.

Lactiplantibacillus plantarum TK61406, immune-modulatory effect, INF-γ

発表責任者：中村 優一（nakamura-yuichi@kyuchan.co.jp）

講演番号：2C6a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 C6 会場

皮膚感作が食品アレルギーに与える影響の解析

The effect of skin sensitization on food allergy

○篠原 真梨、服部 誠、好田 正（東農工大院・応生化）
○Mari SHINOHARA, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

近年、皮膚を介した抗原接触（皮膚感作、経皮療法）と食品アレルギーの関係が注目されている。しかし、皮膚での局所的な抗原感作が消化管での応答に影響を与えるメカニズムは未解明である。

本研究では、まずリンパ球の遊走阻害剤である FTY720 を用いて皮膚感作のメカニズムを解析した。T 細胞の多くがオボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体を発現している DO11.10 マウスに、背部皮膚への OVA 溶液の塗布と FTY720 の腹腔内投与を行った後に、OVA 含有飼料を与えて食品アレルギーを誘発した。食品アレルギーの指標として、血清中の OVA 特異的 IgE 産生量を測定した。その結果、皮膚感作後に食品アレルギーを誘導することで OVA 特異的 IgE 産生量が増加したが、その影響は FTY720 の投与により有意に抑制され、リンパ球の遊走が皮膚感作による食品アレルギーの増悪化に重要な役割を担うことが示唆された。

次に、食品アレルギーを誘導したマウスに OVA 溶液を塗布した後に、再び OVA 含有飼料を与えて治療効果を検討した。その結果、食品アレルギーの誘導後に OVA 溶液を塗布した場合でも、抗原の塗布により OVA 再摂食時の OVA 特異的 IgE 産生量が上昇し、食品アレルギー誘導の前後に関わらず皮膚への抗原塗布は食品アレルギーを増悪化した。

Recently, the influence of antigen contact via the skin on food allergy has attracted attention. However, the details of how local antigen sensitization on the skin affects the response to food antigens in the gastrointestinal tract are not yet understood.

After application of ovalbumin (OVA) to the back skin of DO11.10 mice, an OVA diet was fed to induce food allergy. The mice were also treated with FTY720 during antigen application. The results showed that OVA-specific IgE production was increased by inducing food allergy after skin sensitization, but this effect was significantly suppressed by FTY720, suggesting that lymphocyte migration plays an important role in exacerbating food allergy caused by skin sensitization.

Next, after applying OVA to DO11.10 mice that had been induced food allergy, the mice were given the OVA-containing diet again to confirm the therapeutic effect. The results showed that even when OVA was applied after induction of food allergy, antigen application increased OVA-specific IgE production induced by the OVA diet.

Food allergy, Skin sensitization, EPIT

講演番号：2C6a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 C6 会場

Procyanidin B2 3,3″-di-O-gallate によるグルタミン取り込みの阻害を介した T 細胞機能制御
Procyanidin B2 3,3″-di-O-gallate suppresses the T cell function via inhibition of glutamine influx
○遠藤 勝紀、阿蘇 晴香、新妻 史絵、柾 明弘、真壁 秀文、田中 沙智（信州大院農）
○Katsunori ENDO, Haruka ASO, Fumie NIITSUMA, Akihiro MASAKI, Hidefumi MAKABE, Sachi TANAKA (Shinshu University)

免疫細胞の一つである T 細胞は、サイトカインを産生することで免疫反応を活性化するが、過剰なサイトカイン産生は炎症性疾患や自己免疫疾患の原因となることから、適切に制御することが重要である。先行研究では、ポリフェノールの一種である Procyanidin B2 3,3″-di-O-gallate (PCB2DG)が、細胞代謝に関わる mTOR を制御することで、T 細胞の過剰なサイトカイン産生を顕著に抑制することを見出した。しかしながら、PCB2DG の T 細胞における標的タンパク質は明らかになっていない。そこで本研究では、PCB2DG が mTOR を上流で制御するグルタミントランスポーターASCT2 と直接結合すると予想し、マウス由来 T 細胞を用いて検証を行った。その結果、活性化 T 細胞における細胞内グルタミン量が PCB2DG の添加により減少した。しかしながら、ASCT2 の mRNA およびタンパク質の発現レベルは、PCB2DG による影響を受けなかった。そこで、低分子化合物とタンパク質の結合を解析する DARTS アッセイおよび in silico ドッキングシミュレーションを実施したところ、PCB2DG は ASCT2 と多数の水素結合を介して結合することが示唆された。以上の結果から、PCB2DG は T 細胞上の ASCT2 と直接結合することで、グルタミン取り込みを抑制することが明らかになった。

Excessive activation of T cells increases cytokine production substantially and induces immune-mediated diseases. Procyanidin B2 3,3″-di-O-gallate (PCB2DG), a one of the polyphenol inhibits cytokine production through the suppression of mTOR, a regulator of cell-metabolism in T cells. However, the mechanisms underlying the effects of PCB2DG, including its interaction partners, have yet to be clarified. In the present study, we hypothesized that the glutamine transporter ASCT2, which regulates mTOR, is a target protein of PCB2DG. We found that PCB2DG treatment reduced intracellular glutamine levels in T cells. In addition, the mRNA and protein expression levels of ASCT2 were not altered by PCB2DG treatment. Further analysis using a target identification strategy and in silico docking simulation revealed that PCB2DG binds to ASCT2 via hydrogen bond formation, suggesting that PCB2DG interacts directly with this major glutamine transporter to inhibit glutamine influx. Overall, this study indicates that ASCT2 is a novel target protein of a dietary polyphenol and provides new insights into the mechanism underlying the immunomodulatory effects of polyphenols.

Polyphenol, T cell, Target protein

発表責任者：田中沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C6a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 C6 会場

食物繊維サイリウムは、タフト細胞の苦味受容体と 2 型免疫応答を介して、小腸 GasderminC 発現を増大する

Supplemental Psyllium Increases Small Intestinal GasderminC Expression via Bitter Taste Receptors on Tuft Cells and Type 2 Immune Responses

○松永 太陽、石井 南葵、山本 祥也、鈴木 卓弥（広大院統合生命）
○TAIYO MATSUNAGA, YOSHIKI ISHII, YOSHINARI YAMAMOTO, TAKUYA SUZUKI (The Univ. of Hiroshima)

【目的】 食物繊維は、腸内細菌の代謝を介して生理機能を発揮する一方で、腸管上皮細胞を直接的に刺激して生体機能に影響することもわかってきている。また腸管上皮の GasderminC（GSDMC）発現は、上皮の生存や構造の維持に重要な役割を持つことが報告されている。これまでに私たちの研究において、インドオオバコ（*Plantago ovata Forssk.*）種皮由来の食物繊維サイリウムの摂取がマウス小腸における GSDMC の発現を増大させること、この作用には小腸タフト細胞によるサイリウムの受容と 2 型自然リンパ球（ILCII）が関与している可能性が提案されている（第 27 回食物繊維学会学術集会）。また過去の研究において、タフト細胞が持つ苦味受容体が 2 型免疫応答の制御に関わることも報告されている。そこで本研究では、サイリウムによる小腸上皮 GSDMC 発現誘導における、タフト細胞の持つ苦味受容体と ILC2 の関わりを調べることを目的とした。【方法・結果】実験 1：マウス（C57BL/6J、メス、7 週齢）にサイリウム（5%）および苦味受容体の阻害剤（Probenecid、6-Methoxyflavanone、GABA）の混餌を 5 日間摂取させた。その結果、サイリウムの摂取により増大した小腸 GSDMC 発現は阻害剤の投与により減少した。実験 2：マウスにサイリウム食（5%、5 日間）を摂取する 2 日前から、ILC2 阻害剤であるジスルフィラムを経口投与した。その結果、サイリウム摂取による GSDMC 発現、IL13 発現、STAT6 のリン酸化の上昇が、ジスルフィラム投与により減弱した。以上のことから、サイリウムによる小腸 GSDMC の増加には、タフト細胞の苦味受容体を介した 2 型免疫の活性化が関与していることが示唆された。

Dietary fiber has direct effects in addition to those mediated by intestinal bacteria. GasderminC (GSDMC) expression is important for homeostasis. Previous studies suggest that dietary fiber psyllium intake increases GSDMC expression through the involvement of ILCII according to small intestinal tuft cells (bitter taste receptors) Therefore, the purpose of this study was to explore the involvement of bitter taste receptors possessed by tufted cells and ILC2 in the induction of GSDMC expression by psyllium. Experiment 1: Mice were fed a mixture of psyllium (5%) and an inhibitor of bitter taste receptors for 5 days. As a result, GSDMC expression, which was increased by psyllium consumption, was reduced. Experiment 2: Mice were orally administered an ILC2 inhibitor, for 2 days prior to consumption of a psyllium diet (5%, for 5 days). As a result, GSDMC expression and IL13 expression due to psyllium ingestion, pSTAT6 elevation were attenuated. These results suggest that the psyllium-induced increase in small intestinal GSDMC involves activation of type 2 immunity via bitter taste receptors on tuft cells

Dietary fiber, Tuft cell, Type 2 immunity

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C6a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 C6 会場

健常者での *Lacticaseibacillus paracasei* MCC1849 殺菌体の免疫指標への影響検討ー無作為化、二重盲検、プラセボ対照、並行群間比較試験ー
Effects of Heat-killed *Lacticaseibacillus paracasei* MCC1849 on Immune Parameters in Healthy Adults -A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group Study-
○加藤 久美子[1]、新井 聡[1]、佐藤 壮一郎[1]、岩淵 紀介[1]、高良 毅[2]、田中 美順[1]（[1]森永乳業株式会社研究本部基礎研究所、[2]医療法人社団盛心会タカラクリニック）
○Kumiko Kato[1], Satoshi Arai[1], Soichiro Sato[1], Noriyuki Iwabuchi[1], Tsuyoshi Takara[2], Miyuki Tanaka[1] ([1]Innovative Research Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]Medical Corporation Seishinkai, Takara Clinic)

これまでの臨床研究で、*Lacticaseibacillus paracasei* MCC1849 殺菌体の摂取が風邪様症状の軽減に作用することが示されてきたが、そのメカニズムは十分に示されていなかった。そこで新たに、MCC1849 を経口摂取した際の免疫機能への作用を検討することを目的に試験を実施した。健常成人 100 名を 2 群に分け、MCC1849 500 億個またはプラセボを 4 週間摂取する、二重盲検プラセボ対照並行群間試験を行った。免疫機能は、樹状細胞の CD86、HLA-DR それぞれの発現量、好中球貪食能・殺菌能、NK 活性、PBMC 細胞の Cpg2216 刺激時の IFN 遺伝子発現により評価を行った。有効性は Per-protocol set (PPS)解析にて行った（プラセボ群 47 名、MCC1849 群 49 名）。その結果、4 週間の摂取後にプラセボ群と比較し MCC1849 群で pDCs の CD86 発現上昇、および IFN-α, -β, -γ の遺伝子発現量維持が示された。今回の報告は、MCC1849 の摂取がヒト免疫細胞に有用な作用を示すことを初めて示したものであり、MCC1849 摂取による体調維持への作用機序の一端を説明するものであることが示唆された。

Previous clinical studies have shown that heat-killed *Lacticaseibacillus paracasei* MCC1849 suppresses subjective symptoms among healthy adults. However, the mechanism underlying this beneficial effect remains unclear. This clinical study aimed to investigate the effects of MCC1849 on immune functions in humans. In this randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study, 100 healthy adults were randomly divided into MCC1849 or placebo groups. Participants ingested test powder with 5×10^{10} MCC1849 cells or placebo powder for 4 weeks. Immune functions were evaluated using expression levels of CD86 and HLA-DR on dendritic cells (DCs), neutrophils and natural killer cells. The expression levels of IFNs in peripheral blood mononuclear cells incubated with Cpg2216 in vitro were quantified. Efficacy analysis was performed on participants in the per-protocol set (placebo group; n =47, MCC1849 group; n = 49). The expression level of CD86 on pDCs and the gene expression levels of IFN-α, -β and -γ upon TLR9 agonist stimulation were significantly higher in the MCC1849 group at 4 weeks. This is the first study to show the positive effects of MCC1849 on human immune cells. The findings reveal one possible mechanism of how MCC1849 maintains the physical condition of healthy adults

Lacticaseibacillus paracasei, immune function, postbiotics

講演番号：2C6a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 C6 会場

アルツハイマー病患者対象ロスマリン酸介入試験における発現変動 microRNA の機能解析

MicroRNA function of patients with Alzheimer's disease after rosmarinic acid intake

○松井 美涼[1]、山本 萌乃[1]、篠原 もえ子[2]、小野 賢二郎[2]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1]、小林 彰子[1]（[1]東大院農、[2]金沢大医）
○ Misuzu MATSUI[1], Moeno YAMAMOTO[1], Moeko SHINOHARA[2], Kenjiro ONO[2], Takumi MISAKA[1], Keiko ABE[1], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kanazawa Univ.)

当研究グループは、軽度アルツハイマー型認知症（AD）患者に対するロスマリン酸（RA）の臨床試験を実施し、24 週間の RA 摂取で患者の行動・心理症状が改善されることを報告した（Noguchi-Shinohara *et al*., *Sci Rep*, 2020）。一方、患者脳脊髄液中では RA は検出されなかったことから、RA 摂取後に生成する microRNA（miRNA）が脳で抗 AD 作用を発揮する機構を考えた。

臨床試験で得られた患者血漿中の miRNA を次世代シーケンシングにより解析した結果、RA 群で発現低下が抑制された miRNA の 1 つが認知機能の指標である MMSE-score と強く相関しており、AD 病理の改善に寄与する可能性が考えられた。そこで本研究ではこの miRNA の機能解析により RA の抗 AD 作用機作を解明することを目的とした。

ウェブ解析ツール Target Scan により、当該 miRNA は炎症経路の活性化に関与する塩化物細胞内チャネル（CLIC）を標的遺伝子とすることが推定された。ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y への導入により *CLIC*s の発現が抑制され、ルシフェラーゼアッセイでは 3' UTR 上の配列との結合性が確認された。また当該 miRNA を導入すると、SH-SY5Y 細胞における LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生が抑制された。

以上のことから、RA 摂食により産生される miRNA が脳内で炎症を抑制することが抗 AD 効果の一端を担う可能性が示唆された。

We previously reported that 24 weeks of rosmarinic acid (RA) intake improved behavioral and psychological symptoms of patients with mild Alzheimer's disease（Noguchi-Shinohara *et al*., *Sci Rep*, 2020）. Since RA levels were undetectable in the cerebrospinal fluid, we hypothesized that microRNAs (miRNAs) produced after RA intake prevented the development of AD.

The miRNA expression profile was analyzed by next-generation sequencing. RA suppressed the downregulation of some miRNAs' expressions, and one of them had a correlation with MMSE-score.

The miRNA targets *CLIC*s, which is related to inflammation. This miRNA suppressed the expression of *CLIC*s and thereby suppressed LPS-induced inflammatory cytokine production in SH-SY5Y cells.

rosmarinic acid, alzheimer disease, microRNA

発表責任者：小林彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C6a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 C6 会場

３種類の水溶性食物繊維がヌードマウスにおいて腸管 IgA 産生に与える影響

The effect of three forms of soluble dietary fiber on the production of intestinal IgA in nude mice

○松本 健司、大坪 茉里奈（石川県大生資環）
○Kenji MATSUMOTO, Marina Otsubo (Ishikawa Pref Univ)

【目的】水溶性食物繊維（SDF）にはプレバイオティクスなど様々な生理作用があり、機能性食品素材として多くの商品が上市されている。今回、3 種類の水溶性食物繊維（フラクトオリゴ糖 : FO、難消化性グルカン：IG、ポリデキストロース：PD）の摂取がヌードマウス（BALB/cAJcl-*nu/nu*）の腸管 IgA 産生に与える影響について明らかにすることを研究の目的とする。
【方法】精製飼料 AIN-93G に含まれるセルロースのうち、3%を各サンプルに置き換え、8 週齢の雄ヌードマウスに 10 週間摂取させた（各群 n=6）。糞中 IgA に加え、血漿中、肺、顎下腺における IgA 量を測定した。また、糞中のムチン、および盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量を測定した。
【結果】実験開始 2 週間後以降、各 SDF 摂取群はコントロール群と比較して糞中 IgA 量が有意に高かく、9 週目において PD 群が 3.0 倍、IG 群が 2.7 倍、FO 群が 2.3 倍であった。一方、血漿、肺、顎下腺では IgA 量の増加は各 SDF 群で見られなかった。糞中のムチン含量は IG 群でのみ増加しており、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量は、FO 群で酢酸、プロピオン酸、酪酸が増加し、IG 群でプロピオン酸が増加していた。

【Objective】Soluble dietary fibers (SDFs) provide physiological benefits for human health, such as prebiotics. This study was designed to identify the effect of three forms of SDFs, fructooligosaccharides (FO), indigestible glucan (IG), and polydextrose (PD), on the production of intestinal IgA in nude mice (BALB/cAJcl-*nu/nu* mice).
【Methods】Eight-week old male nude mice were divided into four groups (n=6 per group) according to their body masses and daily fecal IgA content. The control group was fed the AIN93G diet, and the FO, IG, and PD groups were fed the same diet, with the replacement of cellulose by 3% (w/w) FO, IG, or PD, respectively. We examined IgA content in the feces, plasma, lung, and submandibular gland. We also examined fecal mucin content and cecal short-chain fatty acid content.
【Results】Consumption of each SDF sample significantly increased the fecal IgA content after 2 weeks. At 9 weeks, 3.0, 2.7, and 2.3-fold increase of the fecal IgA content was observed in the PD, IG, and FO groups, respectively, while the increase of IgA concentration in the plasma, lung, and submandibular gland were not observed. The increased fecal mucin content was observed only in the IG group. FO consumption increased the quantities of cecal acetic, propionic, and n-butyric acids, and IG consumption increased that of propionic acid.

soluble dietary fiber, IgA, nude mouse

発表責任者：松本健司（kmatsu@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C6a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 C6 会場

ヨーグルトの摂取が小学校児童の感冒症状および体調に与える影響

The Effects of the Yogurt Intake on Common Cold Symptoms and Physical Conditions in Elementary School Children

○山田 成臣[1]、勝倉（江橋） 由夏[1]、唐 舒宜[1]、高木 理沙[1]、指原 紀宏[1]、鴨狩 淳一[2]、松土 和広[2]、東郷 信一[2]、安斎 祥江[2]、田中 譲[3]、北條 研一[1]（[1]株式会社 明治、[2]八王子市教育委員会、[3]医療法人社団永生会みなみ野病院）

○Naruomi YAMADA[1], Yuka KATSUKURA-EHASHI[1], Shuyi TANG[1], Risa TAKAGI[1], Toshihiro SASHIHARA[1], Junichi KAMOGARI[2], Kazuhiro MATSUDO[2], Shinichi TOGO[2], Yoshie ANZAI[2], Yuzuru TANAKA[3], Kenichi HOJO[1] ([1]Meiji Co., Ltd., [2]Board of Education in Hachioji City, [3]Eisei Association Minamino Hospital)

【背景・目的】ヨーグルトには様々な健康効果が知られている。そこで、小学校児童を対象に市販ヨーグルトの摂取が健康状態に与える影響を検証した。

【方法】試験デザインは非摂取対照オープンクロスオーバー試験で行った。八王子市内の 6 校の小学校に通う児童を対象に、ヨーグルトを 112g/日（登校日のみ）、8 週間摂取させた。主要評価項目は感冒症状による欠席者数、副次評価項目は累積欠席日数と体調アンケートとした。

【結果・考察】解析対象となる児童は 2,179 名であった。ヨーグルト摂取期間（以下ヨーグルト摂取）では非摂取期間（以下非摂取）と比較して、感冒症状による欠席者数には差がなかったものの、累積欠席日数は有意に減少した。さらに感冒症状を理由とした欠席者を対象として解析したところ、ヨーグルト摂取では非摂取に比較して平均欠席日数が有意に減少した。体調アンケートはヨーグルト摂取で感冒症状や睡眠が非摂取に比べて有意に改善された。以上の結果から、ヨーグルトの摂取によって児童の健康状態を改善させることが示唆された。

【Background and Objective】It is widely known that yogurt has various health benefits. We investigated effects of a commercial yogurt intake on the health conditions in elementary school children. 【Methods】The study design was a non-intake controlled open crossover study. School children in six elementary schools of Hachioji City were given 112 g/day of the yogurt (on school days only) for 8 weeks. The primary endpoint was the number of absentees with common cold symptoms. The secondary endpoints were the cumulative number of days of absence and physical conditions obtained by a questionnaire. 【Results and Discussion】The participants for analysis were 2,179. The number of absentees with common cold symptoms was not significantly different during the yogurt intake period ("yogurt intake") compared to the yogurt non-intake period ("non-intake"), but the cumulative number of days absent decreased significantly. Further analysis for the absentees with common cold symptoms showed that "yogurt intake" significantly reduced the average number of days absent compared to "non-intake". The results of physical condition questionnaire showed that "yogurt intake" significantly improved common cold symptoms and sleep compared to "non-intake". These results suggest that the yogurt intake improves the healthy conditions of elementary school children.

yogurt, common cold symptom, elementary school children

講演番号：2C6a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 C6 会場

薬用植物由来乳酸菌の単離・同定および菌株の特性解析
Characterization of lactic acid bacteria isolated from medicinal plants
○新妻 史絵[1]、阿蘇 晴香[1]、柾 明弘[1]、遠藤 勝紀[1]、塚元 美奈子[2]、高橋 知也[2]、田中 沙智[1]([1]信大院農、[2]株式会社アルソア慧央グループ)
○ Fumie NIITSUMA[1], Haruka ASO[1], Akihiro MASAKI[1], Katsunori ENDO[1], Minako TSUKAMOTO[2], Tomoya TAKAHASHI[2], Sachi TANAKA[1] ([1]Shinshu University, [2]Arsoa Keio Group Corporation)

薬用植物は薬として高い機能性をもつが、共生する乳酸菌については明らかになっていない。植物は花蜜を有するため、フルクトースを資化する乳酸菌が共生している可能性がある。また樹状細胞は、乳酸菌刺激により IFN-αおよび IL-12p70 産生を促進し、NK 活性およびウイルス複製阻害を増強することが知られている。本研究では、薬用植物より抗ウイルス免疫を増強する乳酸菌株を単離・同定し、菌株の特性を明らかにすることを目的とした。その結果、ハッカクレイシ、ジオウ、スイカズラ由来乳酸菌株が高いサイトカイン産生誘導能を有していた。特に産生誘導能の高い 4 株の菌種同定を行い、4 株全てが *Weissella cibaria* であった。ハッカクレイシおよびジオウ由来乳酸菌株の増殖速度を解析したところ、いずれの菌もグルコースとフルクトースの両方を資化でき、好気条件にて増殖が促進された。糖資化性解析では、両菌株とも *W. cibaria* 特有の発酵パターンを示した。以上より、単離された乳酸菌株は、高いサイトカイン産生誘導能をもち、グルコースおよびフルクトースを資化でき、好気条件で増殖が促進される *W. cibaria* であることが明らかになった。

Medicinal plants have high functionality as remedies, but lactobacillus strains living symbiotically with medicinal plants is yet to be clarified. Containing fructose in floral nectar has the potential to make good environments for lactobacillus strains living within plants. Moreover, lactobacillus stimulation is known to enhance IFN-α and IL-12p70 produced by dendritic cells, activating antiviral immune response. In this study, we intended to identify lactobacillus strains enhancing antiviral immune response from medicinal plants and reveal these characterization. Lactobacillus strains derived from *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, *Rehmannia glutinosa*, and *Lonicera japonica* were capable of inducing high levels of cytokine production, and these strains were identified as *Weissella cibaria*. The growth curves analysis of lactobacillus strains derived from the *R. nasutus* (L.) Kurz and *R. glutinosa* revealed that these two strains metabolized both glucose and fructose and grew faster under aerobic conditions. Furthermore, the result of carbohydrate metabolism showed that both strains exhibited the same fermentation pattern of *W. cibaria*. These results indicate that the isolated *W. cibaria* strains induce high levels of cytokine production, metabolize glucose and fructose, and grow better in the presence of oxygen.

medicinal plant, *Weissella cibaria*, antiviral immunity

発表責任者：田中沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C6p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 C6 会場

酵母死菌粉末 PA 酵母 SC-1 はマクロファージのサイトカイン産生を調節する

PA yeast SC-1 regulates the cytokine-production of macrophages

○高橋 絵里歌[1]、野出 純一[1]、安井 謙介[2]、菊池 洋介[1]([1]（株）日清製粉グループ本社、[2]日清ファルマ（株））
○Erika TAKAHASHI[1], Jyunichi NODE[1], Kensuke YASUI[2], Yosuke KIKUCHI[1] ([1]Nisshin Seifun Group Inc., [2]Nisshin Pharma Inc.)

【背景・目的】酵母はアミノ酸や多糖類、ビタミンなどの多彩な栄養素を有し、健康機能性素材として活用されている。例えば酵母細胞壁に含まれる β－グルカンは免疫賦活効果や抗炎症効果を示すことが知られる。本研究では酵母死菌粉末「PA 酵母 SC-1」（以下、PA 酵母；日清ファルマ㈱）の免疫調節機能を、マクロファージのサイトカイン産生能を測定することで評価した。
【方法】無刺激のマクロファージに対して PA 酵母が与える影響を調べるため、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に Phorbol-12-myristate-13-acetate（PMA）を添加してマクロファージ様に分化させた後、PA 酵母を加えて 24 時間培養し、サイトカイン産生量を ELISA 法にて測定した。またリポ多糖（LPS）刺激により活性化したマクロファージに対する影響を調べるため、LPS と PA 酵母を共に加えて 24 時間培養した時のサイトカイン産生量も併せて測定した。
【結果・考察】無刺激のマクロファージに PA 酵母を加えた結果、IL-6、IL-12、TNF-α などの各種サイトカイン産生量が増加した。一方 LPS 刺激により活性化したマクロファージでは、PA 酵母を加えることで、炎症性サイトカインのうち IL-6、TNF-α の産生量が低減した。以上から、PA 酵母はマクロファージの状態に応じてサイトカイン産生能を調節し、免疫応答を調節する可能性が示唆された。

Yeast is utilized as a health functional material because of its various nutrients. For example, β-glucan is known to have an immunostimulatory effect or an anti-inflammatory effect. In this study, the immunomodulatory function of the "PA yeast SC-1" (hereafter PA yeast; Nisshin Pharma strain) was evaluated by measuring the cytokine production of macrophages. To examine the effect of PA yeast on unstimulated macrophages, PA yeast was added to THP-1 cells to differentiate into macrophages with PMA, and then cultured for 24 hours. Cytokine production was measured by ELISA method. In order to examine the effect of LPS-stimulated activation on macrophages, cytokine production was also measured when both LPS and PA yeast were added and cultured for 24 hours. The addition of PA yeast to unstimulated macrophages increased the production of various cytokines such as IL-6, IL-12, TNF-α. In the meantime, in the macrophage activated by LPS stimulus, the production quantity of IL-6, TNF-α was lowered in the inflammatory cytokine by adding PA yeast. These results suggest that PA yeast may modulate the ability to produce cytokines and modulate immune responses in response to macrophage status.

yeast, immune modulation, macrophage

発表責任者：高橋　絵里歌（takahashi.erika@nisshin.com）

講演番号：2C6p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C6 会場

自己免疫疾患における交差性 IgE 抗体の解析

Analysis of cross-reactive IgE antibodies in autoimmune disease

○藤田 夏歩子、中村 亘希、阿南 優佑、板倉 正典、内田 浩二（東大院農）
○Kahoko FUJITA, Koki NAKAMURA, Yusuke ANAN, Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (The Univ. of Tokyo)

自己免疫疾患の一種である SLE は原因不明の難病であり、抗 DNA 抗体などの自己抗体の増加により全身で紅斑などの様々な症状が生じる。近年の報告では IgG 型だけでなく IgE 型の自己抗体も顕著に増加することが明らかとなっており、SLE と IgE の関連性が注目されている。一方で、SLE では過酸化脂質が増加することがわかっており、とりわけ過酸化脂質の一種であるアクロレイン(ACR)については、DNA と ACR 修飾タンパク質に交差性を持つ IgE が発見されている。そこで本研究では、ACR 修飾タンパク質に対して生じた IgE 抗体が DNA にも結合することで SLE の発症に関わると予想した。

まず ACR 修飾タンパク質が SLE モデルマウス体内で起こす免疫応答について解析を行ったところ、SLE モデルマウスは ACR 修飾タンパク質刺激に対し IgE を介した免疫応答を示すことが明らかとなった。次に DNA と ACR 修飾タンパク質に交差性を持つ IgE について解析を行ったところ、ACR 修飾タンパク質を免疫したマウスで生じた IgE 抗体が DNA も認識することが示唆された。最後にファージディスプレイ法を用いて DNA と ACR 修飾タンパク質に交差性を持つ IgE 抗体のシーケンス解析を試みたところ、4 種類の二重交差性 IgE 抗体可変部のシーケンスを読むことに成功した。

今後は交差性 IgE 抗体を産生するハイブリドーマを作成し、詳細なエピトープ構造解析を行う予定である。

SLE is an intractable disease of unknown cause, in which an increase in autoantibodies causes various symptoms throughout the body. Recent reports have shown that not only IgG but also IgE antibodies are markedly increased in SLE. On the other hand, lipid peroxidation has been found to be increased in SLE, especially acrolein (ACR), and IgE with cross reactivity between DNA and ACR-BSA has been discovered. In this study, we hypothesized that IgE antibodies generated against ACR-BSA would cross-react with DNA and thus be involved in the pathogenesis of SLE.

We found that SLE model mice exhibit an IgE-mediated immune response to ACR-modified protein stimulation and IgE antibodies generated in mice immunized with ACR-modified proteins also recognize DNA. Then we attempted to read sequences of IgE antibodies those have cross-reactivity with DNA and ACR-modified protein using a phage display. As a result, we succeeded in reading the sequences of four different cross-reactive IgE antibody.

IgE, Acrolein, Autoimmune disease

講演番号：2C6p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C6 会場

BLaER1 を用いたヒトマクロファージモデルの構築

Establishment of a human macrophage model using BLaER1

○児玉 梨佳[1]、Van Zandbergen Ger[2]、戸田 雅子[1] ([1]東北大院農、[2]Paul-Ehrlich-Institut)
○Rika KODAMA[1], Ger Van Zandbergen[2], Masako TODA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Paul-Ehrlich-Institut)

【背景】マクロファージ(Mφ)はパターン認識受容体を介して外来性分子を認識し、免疫賦活や免疫調整に中心的な役割を果たす。微生物成分や食品成分などの免疫機能性素材に対する Mφ の応答性を解析するために、汎用性の高いヒト Mφ モデルの確立が必要とされている。本研究は、Mφ 分化能を持つと報告されているヒト B 細胞前駆体白血病細胞株 (B cell Leukemia C/EBP alpha ER clone 1：BLaER1)の Mφ モデルとして有用性の検討を目的とした。【方法】BLaER1 細胞を rM-CSF や rIL-3、β エストラジオールの存在下で培養後、Mφ マーカー(CD11b)、トル様受容体(Toll like receptor: TLR)や C 型レクチン受容体(C type lectin receptor: CLR)の発現を FACS で解析した。また TLR リガンドや CLR リガンドに対するサイトカイン応答を ELISA により解析した。【結果と考察】培養 3 日目の BLaER1 細胞では、約 80%が CD11b を発現した。トル様受容体(TLR2 や TLR4 など)や C 型レクチン受容体(CD206 や CD209 など)の発現も検出され、これらのリガンドに対する IL-6 や IL-10 産生が検出された。マクロファージ株モデルとして利用されてきたヒト単球由来細胞株 THP1 における TLR や CLR の発現レベルは低い。本研究は新たな Mφ モデルとしての BLaER1 の有用性を示唆するものである。

Macrophages (Mφ) are antigen presenting cells that recognize exogenous molecular patterns through pattern recognition receptors and play a crucial role in activating and regulating immune system. In order to assess the reactivity of Mφ to microbial and food-derived molecules, establishment of a versatile human Mφ model has been desired. In this study, we aimed to assess whether a human B cell precursor leukemia cell line (B cell Leukemia C/EBP alpha ER clone 1: BLaER1) can be a Mφ model. BLaER1 cells were cultured in the presence of rM-CSF, rIL-3 and β-estradiol. FACS analysis showed that 80% of cells expressed CD11b on day 3 of culture. In addition, expressions of toll like receptors (e.g., TLR2 and TLR4) and c-type lectin receptors (e.g., CD206 and CD209) and production of cytokines (e.g., IL-6 and IL-10) against these receptor's ligands were detected. THP1 (Human Acute Monocytic Leukemia cell line) cells, which have been used as a macrophage line model, express only marginal levels of TLRs and CLRs. Our study suggests a potential application of BLaER1 as a new Mφ model.

macrophage, C type lectin receptor, Toll like receptor

講演番号：2C6p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C6 会場

リポ多糖との相互作用に着目した乳酸菌表層タンパク質の生理学的役割の解明
Elucidation of physiological roles of surface layer protein derived from lactic acid bacteria focusing on interaction with lipopolysaccharide
○山本 祥也、安井 健太、鈴木 卓弥（広大院統合）
○Yoshinari YAMAMOTO, Kenta YASUI, Takuya SUZUKI (Grad. Sch. Integr. Sci., Hiroshima Univ.)

乳酸菌の表層タンパク質（SLP）は、炎症疾患に対する保健効果が期待される機能性成分である。一部の乳酸菌由来の SLP には大腸炎の改善効果やリポ多糖（LPS）誘導性炎症応答の抑制作用が認められているが、その作用機序は明らかになっていない。我々は以前の研究で、*Lentilactobacillus hilgardii* H-50 が LPS に直接結合することで抗炎症作用を示すことを見出している。そこで本研究では、*L. hilgardii* H-50 を含む 5 種類の乳酸菌に由来する SLP による LPS 結合能および抗炎症作用を解析し、炎症応答の制御における乳酸菌由来 SLP の新たな生理学的役割を追究した。

L. hilgardii H-50 由来 SLP（H-50 SLP）と LPS を DMEM 中で反応し、遠心分離で得られる上清中の遊離 LPS 濃度を測定したところ、SLP 濃度依存的な減少が認められた。また、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 と H-50 SLP、LPS を共培養した上清における一酸化窒素（NO）および IL-10 産生量も SLP 濃度依存的に減少した。続いて、5 種類の乳酸菌に由来する SLP の LPS 結合能と NO 産生阻害能を検証したところ、LPS 対照群と比較して *Lactobacillus acidophilus* JCM1132^{T} および *Lactobacillus crispatus* JCM2009 由来の SLP と H-50 SLP が両項目における有意な減少を示し、さらに各種 SLP における LPS 結合能と NO 産生阻害能には正の相関が見られた。以上より、一部の乳酸菌由来の SLP は LPS 結合能を有し、炎症応答を制御することが示唆された。

Surface layer proteins (SLPs) on lactic acid bacteria (LAB) are functional components that are expected to have health benefits against inflammatory diseases. However, the underlying mechanism of anti-inflammatory effects of their SLPs are unclear. We have found that *L. hilgardii* strain H-50 exhibits anti-inflammatory effects through direct binding to lipopolysaccharide (LPS). Based on this finding, we analyzed the LPS-binding and anti-inflammatory abilities of SLPs from five types of LAB to investigate a novel physiological role of SLP from LAB in the regulation of inflammatory responses. Each SLP derived from H-50 strain, *L. acidophilus* JCM1132^{T}, and *L. crispatus* JCM2009 decreased free LPS concentration in the supernatant obtained after incubation with LPS. These SLPs also significantly inhibited LPS-induced nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells. Furthermore, a positive correlation was observed between the LPS binding and NO production inhibitory abilities of 5 types of SLP used in this study, suggesting that a part of SLP from LAB could regulate inflammatory responses through their LPS-binding abilities.

Surface layer protein, Lactic acid bacteria, Lipopolysaccharide

発表責任者：山本 祥也（yamamo59@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C6p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C6 会場

Lentilactobacillus hilgardii strain H-50 は TLR2 を介して IL-6 を誘導し、免疫グロブリン A の分泌を向上する。

Lentilactobacillus hilgardii strain H-50 induces immunoglobulin A secretion through IL-6 in TLR2 dependent manner

○金沢 里奈[1]、三浦 大典[1]、鈴木 卓弥[2]、三本木 至宏[2]、山本 祥也[2] ([1]広大生生、[2]広大院統合)
○Rina KANAZAWA[1], Hironori MIURA[1], Takuya SUZUKI[2], Yoshihiro SAMBONGI[2], Yoshinari YAMAMOTO[2] ([1]The Univ. of Hiroshima, [2]Grad. Sch. Integr. Sci., Hiroshima Univ.)

免疫グロブリン A（IgA）は、粘膜の表面で病原体に結合することにより感染防御機能を担う生体内分子である。一部の乳酸菌は IgA 誘導能を有するため、感染防御機能を増強する機能性食品素材として期待されている。我々の研究グループでは、清酒の腐敗・腐造を引き起こす乳酸菌（火落菌）の中から、マウス小腸パイエル板（PP）細胞において強力な IgA 誘導作用を示す *Lentilactobacillus hilgardii* strain H-50（H-50 株）を選抜することに成功している。本研究では、健常マウスへ H-50 株を自由摂取させることで、H-50 株による腸管 IgA の誘導作用を検証した。加えて、PP 細胞を用いて H-50 株による IgA 産生誘導の作用機序を解析した。

0.5%(w/w)の H-50 株（死菌体、凍結乾燥物）を含む飼料をマウスに 21 日間自由摂取させたところ、対照群と比較して糞便 IgA 量が有意に上昇した。続いて、PP 細胞における解析では、H-50 株刺激により IgA 産生関連因子である IL-6 と IL-10 産生量が著しく増加した。PP 細胞をこれらの中和抗体で処理し、H–50 株で刺激すると上清中の IgA 産生量は有意に減少した。また、HEK-Blue human-TLR2 細胞を H-50 株で刺激すると SEAP 活性が有意に増加した。TLR2 の中和抗体で処理した PP 細胞を H-50 株で刺激すると上清中の IgA 産生量は有意に減少した。以上のことより、H-50 株は TLR2 を介して IL-6 の産生量を増加させることで IgA 産生を促進することを明らかにした。

Immunoglobulin (Ig) A plays a protective role against infection by binding to pathogens on the mucosal surface. Specific lactic acid bacteria (LAB) can induce IgA production and enhance the defense against infection. Hiochi bacteria are LAB that cause spoilage of sake. Our research group has succeeded in screening *L. hilgardii* strain H-50 from Hiochi bacteria, which has potent ability to induce IgA in mouse small intestinal Peyer's patch (PP)c ells. In this study, we examined the effect of free intake of strain H-50 on intestinal IgA in mouse. We also analyzed the mechanism to induce IgA production from PP cells by strain H-50.

Fecal IgA levels were significantly higher in mouse fed diet containing strain H-50 than in the control group. IL-6, and IL-10 levels in PP cells and SEAP activity in HEK-Blue TLR2 cells were markedly increased by strain H-50. When cells treated with the respective neutralizing antibodies were stimulated with strain H-50, IgA production in the supernatant was significantly decreased. Collectively, we found that strain H-50 promotes IgA production by inducing IL-6 through TLR2.

Lentilactobacillus hilgardii, Immunoglobulin A, Peyer's patch

発表責任者：山本祥也（yamamo59@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C6p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C6 会場

Tempe starter-fermented wheat bran attenuated DSS-induced colitis by increasing fecal SCFA

○Afifah Zahra Agista[1], Yushan Chien[1], Yusuke Ohsaki[1], Takuya Koseki[2], Michio Komai[1], Hitoshi Shirakawa[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. Agri., Yamagata Univ.)

Introduction

Wheat bran (WB) is a by-product of the milling industry of wheat, the second most produced cereal crop in the world. It is known for its high content of fiber, which contributes to its low nutritional bioavailability. Tempe is a traditional fermented soybean product from Indonesia that has been alluded to have multiple health benefits. Tempe starter has also been reported to be able to reduce the content of anti-nutritional factors and increase the nutritional value of soybeans. In this research, we fermented WB with tempe starter (*Rhizopus oligosporus,* etc.) to improve its nutritional quality. This study aimed to investigate whether this fermented wheat bran (FWB) can prevent the onset of DSS-induced colitis in a mouse model.

Materials and methods

Twenty-five mice (11-week-old C57BL/6N male mice) were divided into three groups. The first group was fed with the control diet (n=8), the second group received a 10% WB-supplemented diet (n=8), and the last group a 10% FWB-supplemented diet (n=9). The diet treatment was given for 4 days before DSS (3% in drinking water) was given. Simultaneous DSS and diet treatments were continued for another 9 days before mice were euthanized.

Results and conclusion

Fermentation increased WB total phenol content. It also elevates WB's ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities. FWB treatment in mice prevented body weight loss and reduced their disease activity index. FWB supplementation also increased the fecal short-chain fatty acid (SCFA) content. Furthermore, dietary FWB increased the colonic mRNA levels of *Il-17* and *Il-22* along with regulating anti-bacterial peptides, suggesting that the colitis-ameliorating effect of FWB was achieved via the regulation of Th17 cells in the intestine by the gut microbiota-produced SCFA.

fermentation, wheat bran, inflammation

講演番号：2C6p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C6 会場

イミダゾールジペプチドの経口投与がマウス腸内細菌叢及び腸管免疫応答に与える影響

Effect of oral administration of imidazole dipeptides on gut microbiota and intestinal immune responses in mice

○村山 瑠[1]、志波 優[1]、佐藤 謙一郎[3]、八村 敏志[2]、戸塚 護[1]（[1]東農大院生命、[2]東大院農、[3]東海物産（株））
○ Ryo MURAYAMA[1], Yuh SHIWA[1], Kenichiro SATO[3], Satoshi HACHIMURA[2], Mamoru TOTSUKA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]The Univ. of Tokyo, [3]TOKAI BUSSAN CO.)

イミダゾールジペプチド（IDP）は、β-アラニンと L-ヒスチジンまたはその誘導体からなるジペプチドの総称である。以前の研究で IDP の一つであるカルノシン（Car）を BALB/c マウスに経口投与すると小腸での IgA 抗体産生が有意に亢進することが示された。抗生物質投与により腸内細菌を除去した場合にはその効果は認められなかったことから、Car の IgA 抗体産生増強作用に腸内細菌叢が関与していることが示唆された。そこで、BALB/c マウスを用い、Car あるいは Car の構成アミノ酸であるβ-アラニンと L-ヒスチジンの混合物を 2 週間自由飲水により経口投与し、腸内細菌叢および腸管免疫系への影響を解析した。採取した大腸・小腸の粘膜および内容物、糞便のサンプルについて、16S rRNA 遺伝子による網羅的細菌叢解析、HPLC による有機酸濃度の測定、ELISA による IgA 抗体および IL-6 量の測定を行った。その結果、対照群およびアミノ酸投与群と比較して Car 投与群で盲腸内容物、糞便中の IgA 抗体産生が有意に増加し、回腸における腸内細菌叢の多様性が増加した。Car 投与群でセグメント細菌（SFB）とも呼ばれるマウスの免疫系発達に重要な細菌である *Candidatus*_Arthromitus 属の高い占有率が観察されたことから、Car 投与による IgA 産生の増強には *Candidatus*_Arthromitus 属細菌の増加が関与することが示唆された。

Imidazole dipeptides (IDPs) are dipeptides composed of ß-alanine and L-histidine or its derivatives. Our previous study showed that oral administration of carnosine (Car), one of IDPs, upregulated intestinal IgA antibody production in mice, while the effect was cancelled by administration of antibiotics, suggesting the involvement of gut microbiota. Here we investigated the effects of oral administration of Car or a mixture of its constituent amino acids, ß-alanine and L-histidine, on gut microbiota and intestinal immune responses in BALB/c mice. We performed gut microbiota analysis by 16S rRNA gene sequencing, organic acid analysis by HPLC, and IgA and cytokine analysis by ELISA. Oral administration of Car was found to upregulate IgA antibody production in feces and cecal contents and diversity of microbiota in the ileum. Analysis of the ileal microbiota showed increased occupancy of *Candidatus*_Arthromitus, also known as segmented filamentous bacteria (SFB), in Car-treated mice. Since SFB is important for the development of gut immune system, the IgA-enhancing effect of Car might be attributed to the increase of SFB.

Imidazole dipeptides, Mouse immune system, Mouse gut microbiota

講演番号：2C6p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C6 会場

酵母由来α-マンナンの樹状細胞における IL-10 産生に関与する代謝経路の解析

Analysis of metabolic pathways involved in IL-10 production by yeast-derived α-mannan in dendritic cells.

○鄭 廷宇[1]、武藤 優奈[1]、宮澤 大樹[2]、安部 知純[2]、大森 慶河[3]、高橋 恭子[3]、戸田 雅子[1]([1]東北大院・農、[2]東北大・未来研、[3]日大生資科)
○Ting Yu CHENG[1], Yuna MUTO[1], Taiki MIYAZAWA[2], Chizumi ABE[2], Keiga OHMORI[3], Kyoko TAKAHASHI[3], Masako TODA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NICHe, [3]Nihon Univ.)

酵母由来 α-マンナンは樹状細胞における抗炎症性応答を誘導し、免疫調節分子としての活用が期待されている。近年、免疫細胞の機能発現には代謝リプログラミングが関与することが示されている。本研究は α-マンナンによる樹状細胞の抗炎症性獲得、特に抗炎症性サイトカイン IL-10 産生の誘導に関与する代謝経路の同定を目的とした。LPS と α-マンナンで共刺激した細胞では炎症性サイトカイン IL-6 も産生されるが、IL-10 産生が顕著に増強される。GC-MS/MS によるメタボローム解析を行ったところ、LPS 単独刺激に比較して、α-マンナンと LPS で共刺激した細胞では、解糖系産物の乳酸やポリアミン経路産物のプトレシンが増加していた。qPCR 解析により、オルニチンデカルボキシラーゼなどのポリアミン経路における代謝酵素の発現増加が検出された。乳酸デヒドロゲナーゼ阻害剤により解糖系を阻害した場合には、IL-6 と IL-10 の産生を共に抑制した。一方、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤は IL-10 産生だけを抑制した。さらにポリアミン経路を制御すると報告のある mTOR の阻害剤ラパマイシンで処理したところ、ポリアミン経路の代謝物レベルが減少し、IL-10 産生も抑制された。以上より、α-マンナンによる IL-10 の産生増強には解糖系と mTOR シグナルで制御されるポリアミン合成経路が寄与することが示された。本研究は、樹状細胞における抗炎症性獲得の新たな機序解明につながるものである。

Yeast-derived α-mannan induces anti-inflammatory responses in dendritic cells and is expected to be an immunomodulatory molecule. The aim of this study was to elucidate mechanisms for α-mannan-enhanced regulatory property, in particular production of anti-inflammatory cytokine IL-10, and its associated metabolic shift in dendritic cells. Co-stimulation of bone marrow derived murine dendritic cells (BMDCs) with LPS and α-mannan produced inflammatory cytokine IL-6 but enhanced IL-10 production remarkably. GC-MS/MS analysis showed the increased levels of lactate (the final product of glycolysis) and putrescine (a metabolite in polyamine pathway) in the cells. qPCR analysis showed increased expression of several enzymes, e.g. ornithine decarboxylase (ODC) in polyamine pathway. Inhibition of glycolysis by lactate dehydrogenase inhibitor reduced IL-10 and IL-6 production, whereas inhibition of polyamine pathway by ODC inhibitor reduced only IL-10 production. Furthermore, inhibition of mTOR signaling, which regulates the polyamine pathway, decreased putrescine levels and IL-10 production in the cells. These results suggest that enhanced IL-10 production in DCs by α-mannan is mediated by enhanced glycolysis and polyamine pathway which regulates by mTOR signaling.

Dendritic cell, α-Mannan, Metabolome

講演番号：2C6p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C6 会場

Weizmannia coagulans SANK70258 の樹状細胞を介した免疫調節作用機構と経口摂取による腸管免疫への効果

Enhancement of IgA production by *Weizmannia coagulans* SANK70258 activating dendritic cells via TLR2 and NOD2 signaling

○山下 二矢[1]、伊藤 直人[1]、池田 裕樹[1]、南川 夏己[1]、八代 拓也[1]、八須 匡和[1]、長田 和樹[1]、相田 正典[2]、山田 良一[2]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]三菱ケミカル (株))

○Niya YAMASHITA[1], Naoto ITO[1], Yuki IKEDA[1], Natsuki MINAMIKAWA[1], Takuya YASHIRO[1], Masakazu HACHISU[1], Kazuki NAGATA[1], Masanori AIDA[2], Ryouichi YAMADA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]Mitsubishi Chemical Co.)

耐熱・耐酸性に優れた芽胞形成乳酸産生細菌 *Weizmannia* (*Bacillus*) *coagulans* SANK70258 (SANK70258)は，プロバイオティクスとして利用され，ブロイラーのコクシジウム感染耐性を増強し，成長を促進することが報告されている。一方，SANK70258 の宿主免疫応答への作用は不明であることから，私達は SANK70258 の免疫細胞への作用について解析を行い，これまでに SANK70258 のγ線照射菌体が樹状細胞(DC)からのサイトカイン分泌を促す結果，NK 細胞の IFN-γ産生や B 細胞の IgA 産生を代表的な乳酸菌類と比べて同等以上に強く誘導することを見出した。今回，siRNA を用いた DC のノックダウン実験から，DC は NOD2 や TLR2 を介して SANK70258 菌体成分に応答することが示唆され，菌体成分の粗分画を進めた結果，各種溶媒に不溶性の画分に活性が残存することが判明した。次に，SANK70258 の経口摂取がもたらす免疫賦活効果を検証するため，SANK70258 生菌（500mg/kg/day）を Balb/c マウスに 14 日間連日経口投与したところ，糞便中の IgA 量やパイエル板中の IgA^+ B 細胞数の有意な増加が確認された。この時，SANK70258 投与群では非投与群と比較して糞便中の酢酸と乳酸が有意に増加していた。以上，SANK70258 は不溶性成分が TLR2 や NOD2 をはじめとした PAMP 受容体を介して DC を活性化し，その生菌の経口摂取は腸内細菌代謝産物に影響を及ぼし，IgA 分泌を促進することが示唆された。

Weizmmania (*Bacillus*) *coagulans* SANK70258 (SANK70258) is a spore-forming lactic acid bacterium used as probiotics. Although it is reported that oral administration of SANK70258 promotes the growth of broiler chickens with conferring the protection ability against *Coccidia* infection, the roles of SANK70258 on the host immune systems are still unknown. Previously, we revealed that γ-ray irradiated SANK70258 induced production of IFN-γ from NK cells and IgA from B cells via stimulation of DCs. In the present study, we found that SANK70258-mediated stimulation was suppressed in DCs transfected with *Nod2* siRNA or *Tlr2* siRNA. DC-stimulation activity of SANK70258 was enriched in fractions that were insoluble in various vehicle. Oral intake of live SANK70258 (500mg/kg/day) for 14 days significantly increased the amount of feces IgA and the number of IgA^+ B cells in the Peyer's patch of Balb/c mice accompanied with increased concentrations of acetate and lactate in feces. We conclude that SANK70258 modulates the metabolites of intestinal bacteria and IgA production via PAMP receptor-mediated DC stimulation.

IgA, probiotics, dendritic cell

発表責任者：西山 千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2C6p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C6 会場

ポリフェノールおよび酸化酵素含有製剤 DEOATAK P1 のヒト単球細胞に及ぼす効果
The effect of DEOATAK P1 on human peripheral blood mononuclear cells.
○後藤 有貴[1]、長田 和樹[1]、片桐 万由佳[1]、神田 寛登[1]、時田 隆世[1]、大田黒 晴樹[2]、武田 寿弘[2]、平本 忠浩[3]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]高砂香料工業 研究開発本部、[3]高砂フードプロダクツ)
○Yuki GOTO[1], Kazuki NAGATA[1], Mayuka KATAGIRI[1], Hiroto KODA[1], Ryusei TOKITA[1], Haruki OTAGURO[2], Toshihiro TAKEDA[2], Tadahiro HIRAMOTO[3], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]Takasago International Corporation, Corporate R&D Division, [3]Takasago Food Products Co., Ltd.)

DEOATAK®P1（以降 P1）は、ポリフェノールとポリフェノール酸化酵素を含有する粉末製剤であり、経口摂取可能な消臭素材として利用される。吸水をきっかけに酵素反応によるポリフェノールの酸化が促進され、硫黄系や窒素系の悪臭成分に対して消臭効果を発揮すると考えられているが、生体内細胞に及ぼす作用は多くが不明なままである。本研究では、クロロゲン酸を主体としたコーヒー生豆抽出物とゴボウ粗酵素からなる P1 を用いて、ヒト末梢血由来単球系細胞の炎症反応に及ぼす P1 の作用を解析した。健常人の末梢血より精製した単核球画分にリポポリサッカロイドを添加すると、炎症性サイトカイン IL-6 や TNF-αの mRNA 発現が誘導されたが、P1 で前処理した細胞ではそれらのサイトカイン産生が顕著に抑制された。このような効果は、少なくとも前処理時間 2～20 時間の範囲で持続していることが確認された。一方、個々の原料素材による前処理では、その効果は限定的であった。更に、ヒト単球系細胞株 THP-1 に対し、硫黄系化合物であるメチルメルカプタンを THP-1 の遺伝子発現に影響を及ぼす濃度で添加しても、同時に P1 を添加することによりメチルメルカプタンの作用を打ち消すことが確認された。以上、DEOATAK®P1 にはヒト細胞の炎症反応を抑制する作用があること、臭気性化合物の中和作用が遺伝子発現の恒常性維持に寄与することが示唆された。
DEOATAK®P1 (P1) is a powdered deodorant material made with natural food ingredients; briefly composed of green coffee extracts containing chlorogenic acid-based polyphenols and burdock extracts as a source of polyphenol oxidases. Oral intake P1 absorbs water, and subsequently enzyme activity of polyphenol oxidase is triggered, which enhances oxidation of polyphenols that eliminate some malodorous compounds. Although the deodorant effects of P1 on odor compounds are well studied, the biological effects of P1 in the body are largely unknown. In the present study, we investigated the effects of P1 on gene expression of human cells. We purified human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from health donors and treated PBMCs with LPS. LPS-induced upregulation of mRNAs for *IL6* and *TNF* in PBMCs was suppressed by P1 treatment but not by green coffee extracts nor burdock extracts. Methyl mercaptan-induced gene expression in THP-1, a human monocyte cell line, was canceled in the presence of P1. From these results, we conclude that DEOATAK®P1 suppresses inflammatory response of human monocytes and contributes to the homeostasis of human cells exposed to odor compounds.

deodorant material, polyphenol oxidase, peripheral blood mononuclear cell

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2C6p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 C6 会場

高脂肪食摂取モデルの病態発症における STAT1 を介した宿主免疫応答の関与

Involvement of STAT1-mediated host immune responses in the pathogenesis of high-fat diet intake models

○中庭 和奏[1]、中里 海翔[1]、小栗 勇魚[1]、志智 俊介[2]、木村 沙織[2]、中本 裕紀[2]、白川 智沙斗[2]、武冨 紹信[2]、北村 秀光[1,3]([1]東洋大理工、[2]北大院医、[3]北大遺制研)
○Wakana Nakaniwa[1], Kaito Nakazato[1], Isana Oguri[1], Shunsuke Shichi[2], Saori Kimura[2], Hiroki Nakamoto[2], Chisato Shirakawa[2], Akinobu Taketomi[2], Hidemitsu Kitamura[1,3] ([1]Eng., Sci. & Eng., Toyo Univ., [2]Hokkaido Univ., Grad. Sch Med., [3]Inst. Genetic Med., Hokkaido Univ.)

近年、生活習慣病と生体の恒常性維持機構である免疫系との関係が明らかにされつつあるが、疾患発症および重篤化における詳細な作用メカニズムについては未だ不明の部分も多い。そこで本研究では、感染症予防や抗腫瘍免疫に重要な STAT1 を欠損するマウスを使用して高脂肪食摂取モデルを構築し、生活習慣病の発症における STAT1 の関与を明らかにした。野生型マウスおよび STAT1 欠損マウスに対して、通常食あるいは高脂肪食を 8 週間摂取させた。その結果、野生型マウスで認められた体重の増加が STAT1 欠損マウスでは確認されず、精巣上体脂肪や腎周囲脂肪の増加も軽減された。また血中の各種生化学マーカーを解析した結果、ALT(GPT)レベルが野生型マウスに比べ低値であることが分かった。さらに、肝臓組織を解析したところ、野生型マウスの肝臓組織で多数の脂肪滴の形成が認められたが、STAT1 欠損マウスでは脂肪滴の形成が著しく低下していた。

本研究から、高脂肪食の摂取による生活習慣病の発症において、STAT1 を介したシグナル伝達経路による宿主免疫応答の活性化が、肝炎の発症に寄与する可能性が示唆された。

In recent years, the relationship between lifestyle-related diseases and the immune system, the homeostatic mechanism of the body, has been increasingly clarified. However, the detailed mechanisms of action in disease onset and severity are still largely unknown. In this study, we established a high-fat diet model using mice deficient in STAT1, which is important for infection prevention and anti-tumor immunity, to clarify the involvement of STAT1 in the development of lifestyle-related diseases. Wild-type and STAT1-deficient mice were fed a normal or high-fat diet for 8 weeks. As a result, the increase in body weight observed in wild-type mice was not observed in STAT1-deficient mice, and the increase in epididymal and perirenal fat was also reduced. Analysis of various biochemical markers in the blood also revealed that ALT (GPT) levels were lower than in wild-type mice. In addition, analysis of liver tissue revealed the formation of numerous fat droplets in the liver tissue of wild-type mice, whereas the formation of fat droplets was significantly reduced in STAT1-deficient mice.

This study suggests that activation of the host immune response through STAT1-mediated signaling pathways may contribute to the development of hepatitis in lifestyle-related diseases caused by the consumption of a high-fat diet.

High-fat diet, STAT1, Hepatitis

発表責任者：北村秀光（kitamura012@toyo.jp）

講演番号：2C6p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 C6 会場

ブタプラセンタ抽出成分によるヒト免疫担当細胞の免疫賦活効果

Immunostimulatory effects of porcine placenta extract on human immunocompetent cells

○根上 愛梨[1]、江嶌 伸[1]、村山 拓海[1]、加藤 和則[2]、北村 秀光[1,3] ([1]東洋大理工、[2]東洋大院健康スポーツ科学、[3]北大遺制研)
○Airi NEGAMI[1], Shin Ejima[1], Takumi Murayama[1], Kazunori Kato[2], Hidemitsu Kitamura[1,3] ([1]Sci. & Eng., Toyo Univ., [2]Grad. Health & Sports Sci., Toyo Univ., [3]Inst., Genetic Med., Hokkaido Univ.)

近年、食品やサプリメント成分が持つ機能性の一つとして、生体内での免疫賦活効果が明らかにされつつあるが、その詳細な作用機序については未だ不明の部分も多い。本研究では、ブタ由来のプラセンタ抽出成分の新規機能性に着目し、各種ヒト免疫担当細胞を使用した細胞培養評価系により、その免疫賦活効果について明らかにした。

ブタ由来のプラセンタ抽出成分について、各種ヒト免疫担当細胞を使用した in vitro 細胞培養系に添加し、CD3/28 刺激あるいは polyI:C 刺激による活性化に及ぼす効果について、細胞増殖アッセイおよびフローサイトメトリーにて解析・評価した。その結果、ヒト T 細胞株に対してブタプラセンタ抽出成分が細胞増殖を亢進する効果を見出した。さらに人工合成二本鎖 RNA である poly I:C を介した細胞死の誘導に対して、有意に抑制する作用効果を持つことが分かった。

本研究から、ブタプラセンタ抽出成分が、ヒト T 細胞の免疫応答性の亢進効果のみならず、ウイルス感染に伴う細胞死の誘導に対して耐性を寄与する作用効果も有する可能性が示唆された。

In recent years, immunostimulating effects in vivo have been revealed as one of the functional properties of foods and supplements, but the detailed mechanism of action remains unclear in many areas. In this study, we focused on the novel functionality of porcine-derived placenta extract and clarified its immunostimulatory effects by a cell culture system using various human immune cell lines.

Porcine-derived placenta extracts were added to in vitro cell culture systems using various human immunocompetent cells, and their effects on activation by CD3/28 stimulation or poly I:C stimulation were analyzed and evaluated by cell proliferation assay and flow cytometry. As a result, we found that the porcine placenta extract had an effect of enhancing cell proliferation against human T cell lines. It was also found to have a significant inhibitory effect on the induction of cell death induced by treatment with poly I:C, an artificial synthetic double-stranded RNA.

This study suggests that porcine placenta extract may have not only an enhancing effect on the immune responsiveness of human T cells, but also an action effect that contributes to resistance against the induction of cell death associated with viral infection.

Placenta, T cell, Immune response

発表責任者：北村秀光（kitamura012@toyo.jp）

講演番号：2C6p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 C6 会場

微細藻類ユーグレナおよびその成分である パラミロンの免疫調節機能の検討

Immunomodulatory functions of *Euglena gracilis* and its component paramylon

○中島 綾香[1]、鈴木 健吾[1]、安達 貴弘[2] ([1]株式会社ユーグレナ、[2]東京医科歯科大学)
○ayaka NAKASHIMA[1], kengo SUZUKI[1], takahiro ADACHI[2] ([1]Euglena Co., Ltd., [2]Tokyo Medical and Dental University)

微細藻類ユーグレナは、幅広い栄養素、また貯蔵多糖としてのパラミロン（β-1,3-グルカン）を含んでおり、健康食品等として活用されている。これまでに、ユーグレナもしくはパラミロンの摂取によって、インフルエンザ感染症状の緩和等、免疫が関わる諸症状の緩和が確認されている。2022 年大会では、マウス脾臓由来細胞にパラミロンを添加した実験により、さらに、2023 年大会では、ゲノム編集技術により作出したパラミロンを蓄積しないユーグレナ株を用いた実験により、RNA sequence における変動遺伝子のエンリッチメント解析から、パラミロンの炎症反応の制御や白血球への分化への関与を見出し、パラミロンの貢献によって免疫機能が調整されることを報告した。今回、その中でも炎症反応の制御について考察を深めるために、IgA/IL-22 欠損マウスにユーグレナを摂取させたところ、特に、パイエル版での CD11b 陽性細胞の低下が確認された。これを受けて、マウス由来脾臓細胞に LPS などの TLR のリガンドのみ、もしくは TLR のリガンドとパラミロン、パラミロンのみをそれぞれ添加し、培養後の CD11b 陽性細胞の分布を確認したところ、control とパラミロンのみを比較すると、パラミロンのみを添加したほうが、CD11b 陽性細胞が増加した一方で、リガンドのみの添加と比較し、リガンドとパラミロンを添加していることで、CD11b 陽性細胞の低下が起こることが確認された。以上のことから、パラミロンは、自然免疫を活性化するが、別の要因で自然免疫が強く活性化されている状況においては、過剰な炎症の抑制に寄与している可能性が示された。

Euglena is a single-celled microalga that contains β-glucan paramylon as a storage polysaccharide. In previous studies, we reported that paramylon regulates inflammatory responses and differentiation into leukocytes. In this study, to further elucidate the regulatory mechanism of paramylon in inflammatory reactions, we fed IgA/IL-22-deficient mice with euglena and found a decrease in CD11b-positive cells, especially in the Peyer's patches. Next, using mouse spleen cells, we confirmed that the addition of paramylon caused a decrease in CD11b-positive cells stimulated by TLR ligands. These results strongly suggest that paramylon suppresses excessive inflammation mediated by innate immunity, although it potentiates to activate the immune responses.

Euglena gracilis, paramylon, Immunity

講演番号：2C6p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 C6 会場

がん免疫逃避に関与する制御性 T 細胞の機能に及ぼす乳脂肪球皮膜の影響

Effect of milk fat globule membrane on the regulatory T cells functions in cancer immune escape

○森澤 美希、橋本 啓、山田 潔 (宇都宮大農)
○Miki MORISAWA, Kei HASHIMOTO, Kiyoshi YAMADA (Utsunomiya Univ.)

がん組織内微小環境では、制御性 T 細胞（Treg）が CD8 キラーT 細胞を抑制するため、がん細胞が免疫逃避している。Treg は、CD36 を介してがん細胞由来の脂質を取り込み、CD36 発現の上昇と CD8 キラーT 細胞の抑制が促進されることが報告されている。CD36 を含む乳脂肪球皮膜（MFGM）は、マクロファージの CD36 を介した脂質の取り込みを阻害することから、Treg の CD36 を介した脂質の取り込みも阻害する可能性が考えられた。本研究では、MFGM が脂質の取り込みを阻害することにより、がん細胞の免疫逃避に関わる Treg の機能を調節できるか検討した。C57BL/6J マウスの脾臓 CD4 T 細胞をサイトカイン存在下で 5 日間培養し Treg へ分化させた。B16 メラノーマを透析 FCS 含有低グルコース RPMI 培地（コントロール培地）で 48 時間培養し、得られた培養上清を conditioned medium（CM）とした。コントロール培地または CM で Treg を 2 日間培養後、CD36 発現をフローサイトメトリーにより測定した結果、CM 培養の Treg で CD36 発現の上昇が認められた。また、CM での Treg の培養中に MFGM を添加した結果、DMF 懸濁した MFGM の添加により CD36 発現が有意に減少した。このことから、がん組織内微小環境での Treg の CD36 発現上昇が MFGM によって抑制されることが示唆された。MFGM は、Treg の CD36 発現上昇を抑制することで、がん細胞の免疫逃避を調節する可能性が考えられた。

In the microenvironment within cancer tissue, regulatory T cells (Treg cells) suppress CD8 killer T cells, causing cancer cells to escape immunity. It has been previously reported that Treg cells take up cancer cell-derived lipids via CD36, which promotes upregulation of CD36 expression and suppression of CD8 killer T cells. Since milk fat globule membrane (MFGM), in which CD36 is present, inhibits CD36-mediated lipid uptake by macrophages, it is possible that it also inhibits CD36-mediated lipid uptake by Treg cells. In this study, we investigated the effect of MFGM on Treg cells functions. Treg cells were differentiated from C57BL/6J mouse spleen CD4 T cells and the CD36 expression was measured by flow cytometry. When Treg cells were cultured in the conditioned medium (CM) of B16 melanoma, the CD36 expression was increased. The addition of DMF-suspended MFGM in the culture of Treg cells with CM showed a significant decrease in the CD36 expression, suggesting that MFGM suppressed the elevated CD36 expression of Treg cells in the microenvironment of cancer tissue.

regulatory T cells, tumor, milk fat globule membrane

講演番号：2C7a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 C7 会場

細菌叢サンプルに含まれる黄色ブドウ球菌の multi-locus sequence typing を単離せずに実施にするための multiplex-nested PCR 法

A multiplex-nested PCR method for multi-locus sequence typing of *Staphylococcus aureus* in microbiota samples without isolation.

○小倉 康平[1,2]、古屋 紘花[3]、竹本 訓彦[4] ([1]京大院農、[2]金沢大新学術、[3]金沢大院医薬保、[4]医療研究センター研)
○Kohei OGURA[1,2], Hiroka Furuya[3], Norihiko Takemoto[4] ([1]Kyoto Univ., [2]Inst. Front. Sci. Init., Kanazawa Univ., [3]Inst. Med. Pharm. Health Sci., Kanazawa Univ., [4]Nat. Cent. Glob. Health. Med.)

【背景】黄色ブドウ球菌は主に鼻腔や皮膚に常在し、感染症原因菌として単離された際には、7 つの対立遺伝子（allele 遺伝子）配列を用いた Multilocus Sequence Typing（MLST）により配列型（Sequence Type, ST）を決定する。しかし現状の MLST 法では、他の細菌、特に近類の細菌種が混在する際には非特異的な増幅が起こるため、細菌叢サンプルなどには使用できず、黄色ブドウ球菌の単離が必要となる。本研究では、細菌叢サンプル中に存在する黄色ブドウ球菌の配列型を培養レスで決定するための multiplex-nested PCR 方法を開発したので報告する。
【方法と結果】7 つの allele 配列の上流領域ならびに下流領域から、黄色ブドウ球菌のみで保存されている配列を選定し、multiplex PCR を実施可能な 7 つのプライマーペアを設計した。multiplex PCR サンプルをエキソヌクレアーゼ I/アルカリフォスファターゼ処理した後ただちに、allele 配列それぞれについて nested PCR を実施した。その結果、ヒト皮膚常在菌ならびにヒト培養細胞由来の非標的 DNA の存在下でも、本 PCR 法により黄色ブドウ球菌の 7 つのアリル配列が特異的に増幅されることを確認した。また、ヒト皮膚から得られた DNA サンプル中の ST を決定することに成功した。本 PCR 法を用いることで、単離培養を介さずに黄色ブドウ球菌を検出できることを提案する。
Background: *Staphylococcus aureus* is mainly colonized on the human nasal cavity and skin. When it is isolated as a causative bacterium of infectious diseases, sequence types (ST) are determined by Multilocus Sequence Typing (MLST) based on seven allele sequences. However, the conventional MLST approach cannot be used in microbiota DNA owing to the contamination from other bacteria species. In this study, we developed multiplex-nested PCR method in determining *S. aureus* MLST in microbiota samples without isolation.
Methods and Results: The seven pairs of forward and reverse primers designed in the upstream and downstream regions, which were conserved specifically in *S. aureus*. After the multiplex PCR and exonuclease I/alkaline phosphatase treatment, nested PCR and Sanger sequencing were performed for the each allele sequence. The seven allele sequences of *S. aureus* were specifically amplified even in the presence of DNAs of other human-commensal bacteria and human cells. Using this PCR method, we succeeded determination of STs in DNA samples obtained from human skins. We propose that this culture-free approach can be used in detecting *S. aureus*.

Staphylococcus aureus, multi-locus sequence typing, multiplex PCR

発表責任者：小倉康平（ogura.kohei.7x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C7a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 C7 会場

難培養微生物の可培養化と有用機能の同時探索を可能にする革新的スクリーニング手法の開発

The innovative screening method for simultaneous cultivation of uncultureds and testing their target functions and activities

○新山 海[1]、下村 有美[1]、加藤 節[1]、中島田 豊[1,2]、青井 議輝[1,2]([1]広島大院統合生命、[2]広島大瀬戸内 CN 研究センター)
○Una NIIYAMA[1], Yumi SHIMOMURA[1], Setsu KATO[1], Yutaka NAKASHIMADA[1,2], Yoshiteru AOI[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Seto Inland Sea CN Research Center)

環境中には多くの未利用微生物資源が存在すると期待できるが、２つの重大な課題が存在する。１つは微生物のほとんどは従来技術では培養できないことであり、もう１つは目的活性を有する微生物の割合は極めて低いことである。従ってその２つを同時に解決することは極めてチャレンジングな課題である。本研究では、未培養および難培養微生物の可培養化と有用微生物のスクリーニングを同時に実現可能な新規ハイスループットスクリーニング手法を開発することを目的とした。本手法では、まずゲルマイクロドロップレット（GMD）凝集培養という新規培養手法により難培養微生物を可培養化し、さらに逐次的に約 10^8 個の独立した培養系を全て機能ベースのスクリーニングに供試することを可能にする。本手法の POC として抗菌活性をベースとしたスクリーニング系を構築した。抗菌性のバクテリオシンを生産する *Lactobacillus* をモデル微生物に用いた。まず、*Lactobacillus* を GMD 内で培養、続いて GFP を発現するセンサー菌と GMD 内で共培養し、バクテリオシンの生産によってセンサー菌が死滅して蛍光強度が減衰した GMD をセルソーターで分取した。*Lactobacillus* が封入された GMD を選択的に分取可能であることが示されたことから本手法は新規抗菌活性微生物のスクリーニング、そして多様な未培養・難培養有用微生物のスクリーニングに有効であることが示唆された。

The objective of this study is to develop a new high-throughput screening method that can simultaneously realize the cultivation of uncultivable microorganisms and the screening of useful microorganisms. In this method, unculturable microorganisms are first cultivated by a novel method called gel microdroplet (GMD) aggregation cultivation, and then approximately 10^8 independent cultures can be sequentially tested for function-based screening. A screening system based on antimicrobial activity was constructed as a POC for this method. *Lactobacillus*, which produces antibacterial bacteriocins, was used as a model microorganism. First, *Lactobacillus* were cultured in a GMD, followed by co-culturing with GFP-expressing sensor bacteria in the GMD. The GMD, in which the sensor bacteria were killed by bacteriocin and the fluorescence intensity was attenuated, was sorted by a cell sorter. The result *Lactobacillus*-encapsulated GMDs could be selectively sorted suggests that this method is effective for screening microorganisms possessing antibiotic activity and for screening a variety of uncultivated but useful microorganisms.

gel-micro-droplet, high-throughput screening, antibiotic activities

発表責任者：青井 議輝（yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C7a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 C7 会場

1 細胞ラマン・蛍光顕微分光分析により明らかにする葉圏微生物の色素多様性

Pigment diversity in phyllosphere bacteria revealed by single cell Raman and fluorescence microspectroscopy

○菅野 菜々子、重藤 真介（関西学院大理）
○Nanako KANNO, Shinsuke SHIGETO (Kwansei Gakuin Univ.)

植物の地上部である葉圏には 10^6~10^7 cells/cm^2 程度の細菌が生息しており，宿主である植物や大気成分と相互作用をしている．太陽光の降り注ぐ環境であるため，光防御や光利用のために色素を保有する細菌が多いと考えられるが，培養を介さずに，実環境下で色素を発現している細胞の割合やその色素多様性の評価を行った例はほとんどない．本研究では，葉面細菌の生態を光との関係から明らかにすることを目的に，ラマン分光法と蛍光を利用して細胞の分光特性を分析することにより，葉圏微生物の 1 細胞レベルでの色素多様性を評価することを試みた．

野外に生育するシロツメクサの葉面より< 5 μm 画分の粒子を回収してリン酸緩衝液に懸濁し，測定に用いた．測定には，励起波長 633 nm 共焦点レーザーラマン顕微鏡を用い，カロテノイドの共鳴ラマンスペクトルと蛍光スペクトル（660-780 nm 範囲）を粒子ごとに取得した．その結果，細菌様の粒子のうち，約 80%からカロテノイド色素に由来する共鳴ラマンスペクトルが検出された．そのうちの一部の細胞からはバクテリオクロロフィルを光合成色素として持つ光合成細菌様の蛍光スペクトルも観察された．発表では色素種の多様性と微生物種との関係について議論したい．

The phyllosphere contains about 10^6~10^7 cells/cm^2 of bacteria, which interact with host plants and the atmosphere. Many phyllosphere bacteria are thought to possess pigments for photoprotection and light utilization, but few studies have assessed their pigment expression states in natural environments without cultivation methods. In this study, we sought to assess the pigment diversity of phyllosphere bacteria at the single cell level by analyzing the spectral characteristics of cells using Raman scattering and fluorescence, with the aim of clarifying the ecology of phyllosphere bacteria in relation to light.

Particles in the < 5 μm fraction were collected from the leaf surface of white clover (*Trifolium repens*) growing in the natural environment. A confocal laser Raman microscope with an excitation wavelength of 633 nm was used to obtain resonance Raman spectra of carotenoids and fluorescence spectra (660-780 nm) for each particle. Spectra derived from carotenoid pigments were detected in approx. 80% of the bacterial-like particles. Some of them also showed fluorescence spectra similar to those of phototrophic bacteria containing bacteriochlorophylls. In the presentation, we will discuss the relationship between the diversity of pigments and microbial species.

Plant microbiome, Phototrophic bacteria, Methylobacterium

講演番号：2C7a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 C7 会場

酸性ゲルマイクロドロップレットを活用した環境中からのハイスループットな油脂酵母スクリーニング法の開発

Development of high-throughput oleaginous yeasts screening methods from environmental samples using acidic gel microdroplets

○橘 駿介[1]、若月 良子[1]、鈴木 義之[2]、志田 洋介[3]、小笠原 渉[2]、赤澤 真一[1]([1]長岡高専・物質工、[2]長岡技大・技学イノベ、[3]長岡技大・物生)
○ Shunsuke Tachibana[1], Yoshiko Wakatsuki[1], Yoshiyuki Suzuki[2], Yosuke Shida[3], Wataru Ogasawara[2], Shin-ichi Akazawa[1] ([1]Dept. Mater. Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll., [2]Dept. Sci. Tech. Innov., Nagaoka Univ. Tech., [3]Dept. Mat. Sci. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

現在，油脂酵母等の油糧微生物による油脂生産が注目されており，油脂高生産及び特色有る油脂組成を有する株をハイスループットでスクリーニングする手法の開発が求められている．そこで，我々は直径 100 μm 程度の微小な Gel microdroplets（GMD）とドロップレットソーターを用いて，環境土壌中から油脂酵母をハイスループットにスクリーニングする手法の開発を目指した．始めに油脂酵母のスクリーニングに適した低 pH（pH 3 程度）GMD 作成法を構築し，ドロップレットソーターで油脂高生産微生物の単離を試みたところ，乾燥菌体重量当たり 21%の油脂を生産する菌株が取得された．しかしながら本法で取得した酵母様株は分取した GMD の 2%と少なかったため，酵母様株取得数の向上を目指し，低 pH GMD を従来のフッ素系オイル中ではなく液体培地中で中温（25 °C）培養条件下で培養したところ，酵母様株の取得率は分取 GMD の 22%に向上した．最後に，構築した手法で油脂高生産並びに特色有る油脂組成株の取得を低温（10 °C）及び中温（25 °C）培養条件下で試みたところ，10 °C 培養で取得した株中に乾燥菌体重量当たり 24%の油脂を生産し，不飽和脂肪酸を多く含んだ特色有る菌体が取得された．以上より，低 pH GMD を使用した環境中からのハイスループットスクリーニング法はバラエティに富んだ油脂酵母を迅速に取得できる可能性が示された．

Lipid production by oleaginous yeast is attracting attention, and high-throughput screening methods for strains that have high lipid production and unique fatty acid composition are required. Therefore, we aimed to develop high-throughput screening methods for oleaginous yeasts from environmental soil samples using a gel microdroplets (GMD) and a droplet sorter. Firstly, we constructed a method for preparing low-pH (pH 3) GMD suitable for screening oleaginous yeast, and a droplet sorter was used to isolate high-lipid-producing microorganisms. However, the number of yeast-like strains obtained by this method was only 2% of the sorted GMD. To increase the number of yeast-like strains obtained, we changed the GMD culture conditions, the yeast-like strains obtained increased to 22% of the sorted GMD. Finally, we attempted the obtain high-lipid production or unique fatty acid composition strains using a constructed high-throughput screening method under low (10 °C) and medium temperature (25 °C) culture conditions. The results, we succeeded in obtaining high lipid-producing strain. These results indicate that the constructed high-throughput screening method using low pH GMD has the potential to rapidly obtain a variety of oleaginous yeasts.

Oleaginous yeast, Gel microdroplet, lipid

発表責任者：赤澤真一（s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：2C7a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 C7 会場

人工知能画像処理技術に基づく放線菌の探索方法

Searching method for actinomycetes based on artificial intelligence imaging techniques

○鬼頭 紬[1]、一 真帆[1]、宮野 嶺[2] ([1]三田国際学園高等学校、[2]北里大学 大村智記念研究所 微生物機能研究室)
○Tsumugi Kito[1], Maho Hajime[1], Rei Miyano[2] ([1]MITA International School, [2]Omura Satoshi Memorial Institute, University of Kitasato)

細菌由来の生理活性物質のうち 7 割以上は放線菌由来の物質であることから分かるように、放線菌は生理活性物質の重要な探索源である。放線菌は種ごと、株ごとにユニークな生理活性物質を生産するため、放線菌を環境中から分離することは新薬の開発などに貢献する事ができる。しかしながら、放線菌を分離する際は寒天培地上のコロニーが放線菌であると見分けるための知識の経験を要する。本研究は人工知能による画像認識技術を利用し、簡便に寒天培地上のコロニーが放線菌であると判別する手法の確立を目的とした。これにより、放線菌を観察してきた経験がなくてもコロニーの種類を素早く見分けたり、人間の判定で発見できなかった新しい放線菌の発見ができたりすることが期待される。研究の初期段階として、主要な放線菌である *Streptomyces* 属とそれ以外の希少放線菌を見分ける実験を行った。本大会ではこの過程と結果を報告する。

More than 70% of bioactive substances derived from bacteria are from actinomycetes, indicating that actinomycetes are an important source of bioactive substances. Since each species and strain of actinomycetes produces unique bioactive substances, isolation of actinomycetes from the environment can contribute to the development of new drugs. However, isolating actinomycetes requires knowledge and experience to identify a colony on an agar medium as an actinomycete. The purpose of this study was to establish a method to easily identify colonies on agar media as actinomycetes by using image recognition technology based on artificial intelligence. This is expected to enable rapid identification of the type of colony even without experience in observing actinomycetes and the discovery of new actinomycetes that could not be found by human judgment. As an initial step in our research, we conducted experiments to distinguish the major actinomycetes, *Streptomyces sp.* from other rare actinomycetes. This process and results will be presented at the conference.

Actinomycetes, image analysis, isolation method

発表責任者：辻敏之（t.tsuji@mita-is.ed.jp）

講演番号：2C7a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 C7 会場

in silico 解析に基づく *Apilactobacillus kunkeei* の分類方法の評価

Assessment of *Apilactobacillus kunkeei* classification methodologies through *in silico* analysis

○前野 慎太朗[1]、遠藤 明仁[2] ([1]山口大農、[2]東農大応用生物科学)
○Shintaro MAENO[1], Akihito ENDO[2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Tokyo Univ. of Agri.)

近年の膨大なゲノムデータの蓄積により、Average Nucleotide Identity (ANI) をはじめとしたゲノムの類似度に基づく手法が、現在の細菌分類に広く利用されている。一方で、我々はblast による ANI (ANIb) がフルクトフィリック乳酸菌の一種である *Apilactobacillus kunkeei*とその近縁株（以下、*A. kunkeei* 関連株とする）の分類には適さず、Genome-to-Genome Distance calculation (GGDC) では分類群が細分化され過ぎることをこれまでに明らかにし、*A. kunkeei* 関連株はゲノムの相同性に基づく正確な分類及び同定の困難さが強く示唆されている。そこで本研究では、*A. kunkeei* 関連株のシーケンスデータを用いた複数の分類手法に基づく分類結果とコア遺伝子に基づく系統関係を比較し、*A. kunkeei* の分類の妥当性を検討することを目的とした。

まず、33 菌株の *A. kunkeei* 関連株を Genome Database Taxonomy toolkit (GTDB-tk) により分類を行った。そして、その結果をシングルコピー遺伝子 191 個を用いて作成した系統樹と合わせて解析した。その結果、GTDB-tk では *A. kunkeei* 関連株は 6 菌種相当とアサインされたが、2菌株のアサイン結果が系統関係と一致しなかった。そこで、GTDB-tk で用いられる細菌界でコアな 120 個のシングルコピー遺伝子を用いて Multilocus sequence analysis (MLSA) を行った。その結果、191個のコア遺伝子の系統樹と MLSA による系統樹は、それぞれ非常に類似したクラスターを形成した。そこで、MLSA に用いた配列の相同性を計算したところ、全ての菌株が*A. kunkeei* の基準株に対して、97.9% 以上の相同性を示し、3 株を除いては 99% 以上の相同性を示した。ことから、*A. kunkeei* 関連株は遺伝子配列の相同性では十分に分別出来ないことが示された。これは、*A. kunkeei* 関連株は ANI や GGDC ではいくつかの別菌種として分類される一方、実際は同一菌種として扱われるレベルに近縁関係にあり、正確な分類が困難であることを強く示唆していると考えられた。本発表ではこれらの結果を含めて総合的に、近年広く使用される *in silico* 解析に基づくゲノムの類似度による菌種分類における問題点の一端について議論する。

Our previous study has suggested a difficulty in accurate classification and distinguishment of *A. kunkeei* related strains based on genomic homology. This study further assessed the validity of several genome-based classification methods for the strains. Based on our outcomes, this presentation will discuss potential issues in the present *in silico* genome similarity methods for bacterial classification.

lactic acid bacteria, Apilactobacillus kunkeei, taxonomy

発表責任者：前野　慎太朗（maeno.s@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2C7a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 C7 会場

ゲノム情報から予測した大規模タンパク質量情報と質量分析による広範囲な原核微生物の迅速同定
A large-scale genomically predicted protein mass database enables rapid and broad-spectrum identification of bacterial and archaeal isolates by mass spectrometry

○関口 勇地[1]、寺本 華奈江[2]、Tourlousse Dieter[1]、大橋 明子[1]、濱嶋 麻裕[1]、三浦 大典[1]、山田 賢志[2]、岩本 慎一[2]、田中 耕一[2] ([1]産業技術総合研究所、[2]島津製作所)
○ Yuji Sekiguchi[1], Kanae Teramoto[2], Dieter Tourlousse[1], Akiko Ohashi[1], Mayu Hamajima[1], Daisuke Miura[1], Yoshihiro Yamada[2], Shinichi Iwamoto[2], Koichi Tanaka[2] ([1]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), [2]Shimadzu Corporation)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF MS）による微生物同定法は、迅速同定技術として特に臨床検査分野等で広く活用されている。本技術は、参照情報として菌体培養液等を利用した実測参照スペクトルが必要であり、未培養微生物を含む多様な分離株の同定は不可能であった。本研究では、MALDI-TOF MS による細菌および古細菌にまたがる広範囲な微生物種の同定のため、大規模ゲノム情報を利用した新しいアプローチを考案、その有効性を検証した。公共データベース上で利用可能な約 20 万件の細菌および古細菌のゲノム配列情報を取得、予測されるタンパク質量の大規模データベースを構築した（およそ 3 万種にまたがる原核微生物理論タンパク質量情報）。本データベースを利用した新しい同定アルゴリズムを開発、本技術により種レベル以下で微生物を識別する能力を検証したところ、測定されたスペクトルの 90%以上について正しく同定されることが確認された。さらに、メタゲノム情報から得られた再構築ゲノム配列を上記データベースに追加することにより、メタゲノム情報を得た同じ試料からの微生物培養、分離での未培養微生物の同定が可能であることも実証した。本技術とメタゲノミクスの活用により、マイクロバイオーム研究でのカルチャロミクスにおける分離株のスクリーニングの有効性が確認された。これら技術により、微生物検査における MALDI-TOF MS のさらなる活用範囲の拡大が期待される。
MALDI-TOF MS enables rapid and high-throughput microbial identification, but its reliance on reference spectral libraries limits the screening of diverse collections of isolates, including uncultured lineages. We present a new strategy and toolkit for broad-spectrum identification of bacterial and archaeal isolates by MALDI-TOF MS. This is enabled by a large-scale database of protein masses predicted from nearly 200,000 publicly available bacterial and archaeal genomes. We verified the ability of the toolkit to identify microorganisms at the species level and below, achieving correct identification for >90% of measured spectra. We further demonstrate its utility by identifying uncultured strains from mouse faeces with metagenomics; this allows the identification of new strains by customising the database with metagenome-assembled genomes. We anticipate that our toolkit will substantially accelerate the screening of the thousands of isolates generated in microbiome studies and further support the broader use of MALDI-TOF MS in microbial testing.

genomics, proteomics, microbial identification

発表責任者：関口勇地（y.sekiguichi@aist.go.jp）

講演番号：2C7a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 C7 会場

ゲノムベースの次世代微生物分析システムによる 乳酸菌の MALDI-MS プロテオタイピング
MALDI-MS Prototyping of Lactic acid bacteria by a Novel Genome-based Microbial Analysis System

○寺本 華奈江[1]、相原 茉耶[1]、岩本 慎一[1]、田中 耕一[1]、関口 勇地[2]([1]島津製作所、[2]産業技術総合研究所)
○ Kanae TERAMOTO[1], Maya AIHARA[1], Shinichi IWAMOTO[1], Koichi TANAKA[1], Yuji SEKIGUCHI[2] ([1]Shimadzu Corporation, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

我々は MALDI-MS により観測されるタンパク質のピークを遺伝子情報に基づき帰属して細菌を種より詳細に分類する MALDI-MS プロテオタイピングをヒトの皮膚常在菌等の分析に適用してきた．ピークを帰属するため，分析結果の根拠が明確で信頼性の高い手法ではあるが，バイオインフォマティクスの専門知識が要求される点が課題であった．そこで，公共データベース上で利用可能な約 200,000 株の細菌および古細菌のゲノム配列情報に基づくゲノムベースタンパク質 DB と，この DB を用いた新規同定アルゴリズムを備えた次世代微生物分析システムを開発した[1)]．本研究では，この次世代微生物分析システムにより，市販ヨーグルト由来の乳酸菌を分析した．比較には，ヨーグルト製造に使用されている乳酸菌およびその近縁種の基準株を用いた．その結果，ヨーグルト由来の菌株と比較に用いた基準株は亜種レベルで正答が得られた．本次世代微生物分析システムにより，専門知識を必要とせず，簡単に MALDI-MS プロテオタイピングを実装できた．なお，本システムでは原理的に装置の機種や培養条件を問わず解析できる．迅速簡便かつ理論的に膨大な数の微生物群の分析を可能にする本次世代微生物分析システムは，研究や微生物検査などあらゆる分野の微生物分析への貢献が期待される．

We have applied MALDI-MS proteotyping, which classifies bacteria at the subspecies or strain level by assigning protein peaks observed by MALDI-MS based on gene information, for classification of *Cutibacterium acnes*. Although this technique is a theoretical and reliable, it requires bioinformatics expertise. Therefore, we developed a new strategy and toolkit for broad-spectrum identification of bacterial and archaeal isolates by MALDI-TOF MS[1)]. In this study, lactic acid bacteria isolated from commercial yogurt were analyzed using this toolkit. Type strains of lactic acid bacteria used in commercial yogurt as starter cultures and their closely related subspecies were used for comparison. The results were correct at the subspecies level. In principle, this toolkit allows to analyze any model of linear MALDI-MS and culture conditions. The toolkit, which requires no expertise and enables easy MALDI-MS prototyping, is expected to contribute to all fields of microbial analysis, including research and microbial testing.

1) Y. Sekiguchi *et al., Genome Biol.* (2023), in press.

MALDI-MS, microbial identification, proteomics

講演番号：2C7a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 C7 会場

フーリエ変換赤外分光光度計による乳酸菌の菌株識別
Strain identification of Lacticaseibacillus using Fourier transform infrared spectrometer
○荒木 貴久[1]、寺本 華奈江[1]、藤 里砂[1]、岩﨑 祥子[1]、岩本 慎一[1]、田中 耕一[1]、関口 勇地[2] ([1]株式会社　島津製作所、[2]産業技術総合研究所)
○Takahisa ARAKI[1], Kanae TERAMOTO[1], Risa FUJI[1], shoko IWASAKI[1], Shinichi IWAMOTO[1], Koichi TANAKA[1], Yuji SEKIGUCHI[2] ([1]Shimadzu Corporation, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

近年、赤外スペクトルの指紋領域から細菌の株を識別する測定手法が食品微生物検査、臨床微生物検査分野を中心に注目されている。本研究では、乳酸菌 *Lacticaseibacillus casei* グループに属する合計 7 株をモデル菌株としてフーリエ変換赤外分光光度計による菌株識別解像度を調べた。なお、これらモデル菌株は、MALDI-MS プロテオタイピング [1)]により亜種レベルで正しいことを確認済である。測定にはフーリエ変換赤外分光光度計 IRXross™ (島津製作所製)を用いた。試料菌株から得られた赤外スペクトルはクラスター解析、PCA 解析により分類した。

測定の結果、赤外スペクトルのパターンは非常に類似しており、赤外スペクトルの比較のみで株を識別することは困難であった。そこで、二次微分スペクトルについてクラスター解析、PCA 解析を試みた。解析の結果、本研究に用いた 7 株のモデル菌株は、それぞれ明確に異なるクラスターを形成し、株レベルの識別解像度が確認された。迅速、簡便に株識別ができる本手法は、微生物に関わる迅速菌株識別に適用可能なことが示唆された。

1) K. Teramoto *et al., Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2019**, *95,* 612-623.

This study investigated the strain-level identification of bacteria by using a Fourier-transform infrared spectrophotometer (FTIR). 7 different strains from the same genus, *Lacticaseibacillus casei*, were used as model strains, which had been previously identified at the subspecies-level by MALDI-MS proteotyping[1)]. The measurements were conducted with the IRXross™ (Shimadzu).

The infrared spectra originally obtained from the 7 strains were highly similar, making the strain identification difficult by solely comparing the spectra. Therefore, attempts were made to perform cluster analysis and PCA analysis on second derivative spectra from the fingerprint regions. As a result, the 7 model strains formed distinctly different clusters, confirming the availability of the identification. This method, with rapid and convenient measurements by FTIR, suggests its applicability in swift strain-level identification, which may contribute to various fields such as food and clinical microbiology testing.

1) K. Teramoto *et al., Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2019**, *95,* 612-623.

Strain identification, Lacticaseibacillus, FTIR

講演番号：2C7a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 C7 会場

乳酸菌 *Companilactobacillus alimentarius* KH4 のキシラン特異的な凝集に関わる細胞表層タンパク質の特性解析

Characterization of cell surface protein related to xylan-mediated aggregation in *Companilactobacillus alimentarius* KH4

○矢野 嵩典、山本 万結、三井 亮司（岡山理大生命）
○Takanori YANO, Mayu YAMAMOTO, Ryoji MITSUI (Okayama Univ. of Sci.)

近年植物由来乳酸菌の保健機能に注目が集まっており、その食品への積極的利用が見られる。乳酸菌が植物や植物成分と相互作用する可能性に興味を持ち、種々の解析を行った。その結果、現在までに食物繊維キシランに対して高い凝集性を示す菌株として発酵食品キムチ由来乳酸菌である *Companilactobacillus alimentarius* KH4 を見いだした。塩化リチウム（LiCl）処理により細胞表層タンパク質を除去した KH4 株を用いてキシランに対する凝集性を評価したところ、KH4 株の特徴であるキシランに対する凝集性が失われたことから、細胞表層タンパク質が凝集に関与することがわかった。LiCl 処理後に得られた細胞表層タンパク質を SDS-PAGE に供し、そのゲル上で検出されたタンパク質を対象に N 末端アミノ酸配列解析または PMF 解析を行った。その結果、乳酸菌の細胞表層タンパク質として報告があるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）が同定された。さらに特徴的な細胞表層タンパク質としてリジン豊富なアミノ酸配列を有し等電点（pI）が 11.1 の機能未知タンパク質が同定された。本研究の凝集性試験に用いているキシランは中性条件で負の電荷を持つグルクロン酸を側鎖に有することから、この機能未知タンパク質は静電的な作用により KH4 株のキシランに対する付着・凝集に関わっていると推定し、さらなる検討を進めている。

Various health functions of lactic acid bacteria (LAB) from vegetables have a positive impact on the development of fermented foods. Several analyses were performed to examine the interaction between LAB and plant materials. The experiment for measuring dietary fiber-mediated aggregation rate in LAB revealed that *Companilactobacillus alimentarius* KH4 isolated from fermented food (napa cabbage kimchi) shows high level of xylan-mediated aggregation. Measurement of aggregation rate using LiCl treated cells of KH4 indicated that cell surface proteins of KH4 extracted with LiCl are related to the xylan-mediated aggregation. The cell surface proteins were examined by SDS-PAGE and the identification of proteins by N-terminal amino acid sequence analysis or PMF analysis was conducted. We found that KH4 possesses glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as cell surface protein. Moreover, the lysine-rich protein of unknown function (pI: 11.1) is also found as cell surface protein. We start to examine whether the lysine-rich protein can be related to the xylan-mediated aggregation.

lactic acid bacteria, cell surface protein, xylan-mediated aggregation

発表責任者：矢野 嵩典（tyano@ous.ac.jp）

講演番号：2C7a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 C7 会場

ナノ内視鏡 AFM によるバクテリア細胞内部の可視化
Visualizing the intracellular structures of bacteria using Nanoendoscopy-AFM
○牛嶋 勇貴[1]、後藤 拓海[2]、江本 光毅[3]、宮澤 佳甫[2,4]、水口 千穂[1,5]、岡田 憲典[1]、福間 剛士[2,4]、野尻 秀昭[1,5]([1]東大院・農生科・AgTECH、[2]金沢大院・自然科学、[3]東大・農、[4]金沢大・WPI-NanoLSI、[5]東大・微生物連携機構)
○ Yuuki USHIJIMA[1], Takumi GOTO[2], Koki EMOTO[3], Keisuke MIYAZAWA[2,4], Chiho MINAKUCHI[1,5], Kazunori OKADA[1], Takeshi FUKUMA[2,4], Hideaki NOJIRI[1,5] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Kanazawa Univ., [3]Agric., UTokyo, [4]WPI-NanoLSI, Kanazawa Univ., [5]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】宿主染色体上遺伝子の転写はプラスミド保持により変動する。当研究室では、プラスミド pCAR1 を宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株に保持させた際に生じる染色体上遺伝子の転写変動に、pCAR1 と染色体の両方にコードされる核様体タンパク質が関与することを明らかにしてきた。このメカニズムの一端にはプラスミド保持に伴う核様体立体構造の変化が示唆される一方、バクテリアにおいて核様体立体構造を調べる手法は限られる。そこで我々は、近年開発された生きた細胞の内部構造を可視化できるナノ内視鏡 AFM [Penedo *et al.*, *Sci Adv.*, 2021] という AFM（原子間力顕微鏡）の新しい応用技術を用いて、本課題の解決を目指した。本研究では *P. putida* KT2440 株を対象に、ナノ内視鏡 AFM で細胞内部構造の可視化を試みた。【方法】寒天培地に生育した KT2440 株のコロニーを、ポリ-L-リジンコートのガラスボトムディッシュに塗り付け、PBS で充填後 1.5 h 静置し、PBS でリンス・充填したものをサンプルとし、液中観察を行った。探針は EBD（電子線堆積法）で作製した自作ニードル探針を用い、AFM は Bruker 社 JPK-AFM の QI モードで計測した。【結果】ニードル探針がバクテリア内部に挿入され、細胞内部の密度分布を反映した AFM 像が取得された。また、*P. putida* KT2440 をカルノア液で内部固定した後にナノ内視鏡 AFM 計測をしたところ、固定化に伴う細胞内部の硬さや密度分布の状態変化を示す結果が得られた。今回の報告は、ナノ内視鏡 AFM で生きたバクテリア内部を可視化できる可能性を示した初の事例である。今後は、本手法を用いて pCAR1 保持株と非保持株の細胞内部構造の比較を行う予定である。

Horizontal transfer of the catabolic plasmid pCAR1 alters the transcriptional network of the host *Pseudomonas putida* KT2440. Nucleoid-associated proteins encoded on the chromosome of KT2440 and on the plasmid pCAR1 are key factors regulating the transcriptional network. The acquisition of pCAR1 may also alter the 3D structure of a nucleoid. Here, we used a recently developed Nanoendoscopy-AFM [Penedo *et al.*, *Sci Adv.*, 2021] to visualize the intracellular structure of KT2440. We measured the cells on a poly-L-lysine coated glass bottom dish in PBS using a needle tip. The obtained AFM image showed local contrasts reflecting the intracellular density. In addition, when the cells were fixed with Carnoy's solution, the AFM image showed a change of the local density and stiffness of the intracellular structure. This result suggests the possibility of Nanoendoscopy-AFM for visualizing intracellular structures of living bacteria.

Nanoendoscopy-AFM, *Pseudomonas*, nucleoid

発表責任者：牛嶋勇貴（ushijima-yuuki6806@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C7a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 C7 会場

BepA と BamB を欠損する大腸菌変異株における SDS 感受性の解析
Analysis of SDS sensitivity in Escherichia coli strains lacking BepA and BamB
○成田 新一郎[1]、渡邉 きくの[1]、秋山 芳展[2] ([1]山形県立米沢栄養大、[2]京大医生研)
○Shin-ichiro Narita[1], Kikuno Watanabe[1], Yoshinori Akiyama[2] ([1]Yonezawa Univ. Nutri. Sci, [2]Kyoto Univ.)

グラム陰性細菌の外膜が異物に対する効果的な透過障壁として働くためには、外膜に存在するタンパク質の構造と機能が正常に保たれていることが重要である。外膜タンパク質の膜組み込みに働く BAM 複合体の構成因子 BamB を欠損する大腸菌では、抗生物質などの異物に対して感受性を示す。BepA は BAM 複合体と相互作用しながら外膜タンパク質のアセンブリを促進するとともに、アセンブリが阻害された外膜タンパク質を分解することで外膜の機能維持に働くと考えられており、*bamB* と *bepA* を共に欠失する変異株では抗生物質や SDS に対する感受性が上昇する。一般に *bepA* 欠失株の抗生物質感受性は、リポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質 LptD のアセンブリ阻害に起因すると考えられるが、*bepA*/*bamB* 二重欠失株が SDS 感受性を示す理由は十分に明らかになっていない。本研究では *bepA*/*bamB* 欠失株から SDS 耐性株を選択することにより、BepA および BamB の未知の機能を探ることを目的とした。選択した SDS 耐性株の変異はアデニル酸シクラーゼをコードする *cyaA* 遺伝子に起きていたことから、cAMP および CRP による転写制御を受ける遺伝子が *bepA*/*bamB* 欠失株の SDS 感受性に関係していることが示唆された。

The structure-functional robustness of outer membrane proteins is important for the function the outer membrane of Gram-negative bacteria as a permeability barrier. *Escherichia coli* strains lacking the gene for BamB, a component of the BAM complex responsible for membrane assembly of outer membrane proteins (OMPs), show susceptibility to antibiotics and detergents such as SDS. BepA interacts with the BAM complex to promote assembly of OMPs, but degrades them if their normal assembly is impaired. Mutant strains lacking both *bepA* and *bamB* show an increase in sensitivity to antibiotics and SDS. The antibiotic sensitivity of *bepA*-deleted strains is thought to result from inhibition of the assembly of LptD, an OMP involved in the transport of lipopolysaccharides, but the mechanism by which *bepA*/*bamB* double deletion strains exhibit increased SDS sensitivity is not fully understood. The aim of this study was to explore the unknown functions of BamB and BepA by selecting SDS-resistant mutants from a *bepA*/*bamB* deletion strain. Mutations in the SDS-resistant mutants were mapped in the *cyaA* gene encoding adenylate cyclase, suggesting that genes regulated by cAMP and CRP are involved in the SDS sensitivity of the *bepA*/*bamB* deletion strain.

bacterial cell surface, outer membrane protein, protease

発表責任者：成田新一郎（snarita@yone.ac.jp）

講演番号：2C7a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 C7 会場

リボソーム安定性によるセシウム耐性：大腸菌 ZX-1 株のケーススタディ
Cesium resistance through ribosome stability: a case study of *Escherichia coli* strain ZX-1
○小嶋 大喜[1]、黒崎 綾音[2]、伊藤 政博[1,2,3] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大生命科学、[3]東洋大バイオレジリエンス研究プロジェクト)
○Daiki Kojima[1], Ayane Kurosaki[2], Masahiro Ito[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Bio-resilience research project, Toyo Univ.)

Microbacterium sp. TS-1 から単離されたセシウム（Cs）耐性菌は Cs^+/H^+アンチポーター（CshA）を持ち、Cs^+耐性に寄与している。しかし、大腸菌への CshA 形質転換では耐性は得られず、これは大腸菌の Cs^+耐性が CshA が機能する基質濃度より低いためと考えられた。その後、CshA の基質親和性向上株の取得実験を行い、偶然、高濃度 Cs^+耐性の大腸菌 ZX-1 株が得られた。ZX-1 株は CshA を除いても Cs^+耐性を示すことが確認された。この現象はリボソーム複合体の安定性に関連している可能性があると推察された(1)。そこで、実際にリボソームへの影響を調査するために、ショ糖密度勾配超遠心法を用いてリボソーム複合体を分離し評価した結果、ZX-1 株と ΔZX-1 株（CshA を除去した株）は 700 mM の Cs^+存在下でもリボソーム複合体が安定していることが確認された。これにより、ZX-1 株の Cs^+耐性にはリボソーム複合体の安定性向上の寄与が示唆された。ZX-1 株全ゲノム解析の結果からリボソーム関連遺伝子に変異が同定されたことから今後、この遺伝子について解析を進める。本研究は、セシウム耐性のメカニズムを理解するための重要な一助となり、Cs^+汚染環境などの問題に対処するためのバイオレメディエーションに新しいアプローチを提供する可能性がある。

Cesium (Cs)-resistant bacteria isolated from *Microbacterium* sp. TS-1 have a Cs^+/H^+ antiporter (CshA), enhancing Cs^+ resistance. However, Cs-resistance was not obtained by CshA transformation into *Escherichia coli*, which was thought to be because the Cs^+ resistance of *E. coli* was lower than the substrate concentration at which CshA functions. In experiments to enhance the affinity of the substrate for CshA, the high-Cs^+ resistant *E. coli* strain ZX-1 was accidentally obtained. ZX-1 maintained Cs^+ resistance without CshA, which might be linked to ribosomal complex stability (1). Investigating this, ribosomal complexes isolated using sucrose density gradient ultracentrifugation were stable in both ZX-1 and ΔZX-1 (CshA-removed) strains, even under 700 mM Cs^+. This indicates that the Cs^+ resistance of strain ZX-1 involves ribosomal complex stability. Whole-genome analysis of the ZX-1 revealed an SNP in a ribosome-related gene, warranting further investigation. This study aids in understanding cesium resistance mechanisms and could inform bioremediation strategies for Cs^+ contaminated environments.

(1) Ishida Y, et. al. (2023) Physiological importance and role of Mg^{2+} in improving bacterial resistance to cesium. *Front. Microbiol.* **14**:1201121.

Cs-resistant microorganism, ribosome, *Escherichia coli*

発表責任者：伊藤政博（masahiro.ito@toyo.jp）

講演番号：2C7a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 C7 会場

接合伝達における細胞膜リン脂質の役割
A role of bacterial membrane phospholipids in conjugation
○熊谷 連、大坪 嘉行、永田 裕二、岸田 康平（東北大院・生命科学）
○Ren KUMAGAI, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Kouhei KISHIDA (Graduate School of Life Sciences,Tohoku University)

[背景・目的]接合伝達は、細菌の主な遺伝子の水平伝播現象のひとつであり、生物の進化に大きく貢献している。接合伝達は供与菌から受容菌に、これら細菌細胞が接着した状態で DNA が伝達する現象であるが、細胞同士の接着に重要な因子として性線毛が挙げられる。供与菌細胞で形成される性線毛は 1-10 μm からなる巨大な繊維状タンパク質複合体であり、伸長・退縮することで液体培地などの流動性の高い条件下においても受容菌を引き寄せ、効率的な接合伝達を可能にしている。近年のタンパク質構造解析から性線毛には、pilin タンパク質だけではなく、ホスファチジルグリセロール（PG）などのリン脂質が含まれていることが明らかとなった。このリン脂質は、性線毛の安定性に重要であることが MD シミュレーションによって推定されているが、実データに基づく接合伝達におけるリン脂質の役割に関する知見は皆無であった。本研究では、F-plasmid と大腸菌の各種リン脂質合成遺伝子の変異株を用い、接合伝達におけるリン脂質の生物学的役割を明らかにすることを目的とした。
[結果] リン脂質合成遺伝子の変異株を受容菌株とした接合伝達を行ったところ、PG 合成能が著しく欠失した菌株への接合伝達が顕著に低下する傾向が見出された。PG は F-plasmid の性線毛の主要なリン脂質種であり、性線毛上の PG と受容菌の細胞膜中の PG の相互作用が効率的な接合伝達に重要である可能性が考えられた。現在、これらリン脂質合成遺伝子の変異株を供与菌株とした接合伝達試験やそれら株が形成する性線毛の解析に着手している。

[Background & Objective] Bacterial conjugation is a key phenomenon for horizontal gene transfer. Conjugative pili are large fibrous protein complexes that can extent and retract, enabling effective DNA transfer even in liquid environments. Recent analyses have revealed that the pili are not only composed of pilin proteins but also include phospholipids such as phosphatidylglycerol (PG). Although MD-simulations suggest that these phospholipids stabilize the pili, their role in conjugation based on experimental results was unknown. This research aimed to elucidate the biological significance of phospholipids in conjugation.
[Results]The study observed that conjugative frequency significantly decreases in a PG synthesis mutant as recipient. Since PG is a major phospholipid in F-plasmid pili, the interaction between PGs on the pili and in the recipient bacterial cell membrane may be crucial for efficient conjugation. Our ongoing research is focused on examining how pili are elaborated in the mutant strain and on carrying out conjugation experiments using the mutant as the donor bacteria.

Conjugation, Plasmid, Phospholipids

発表責任者：熊谷 連（kumagai.ren.t5@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C7p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 C7 会場

循環型汚水浄化槽に由来する複合微生物系内での有機物分解促進細菌株の探索

Exploration of bacteria enhancing the decomposition of organic matter in a microbial ecosystem derived from the lab-scale circulating wastewater treatment system

○奥山 勇太、鈴木 智順（東理大院生物）
○Yuta OKUYAMA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

浄化槽に存在する微生物による有機物分解プロセスの詳細は未だ不明である。先行研究において、当研究室で運用している循環型汚水浄化槽から分離した細菌 41 株のうち、5 株それぞれを分離株で構成された複合細菌系へ添加すると、有機物分解を促進することが明らかになっており、これらを好影響株とした。そこで本研究では、好影響株が循環型汚水浄化槽に存在する微生物からなるミクロ生態系の有機物分解能に与える影響を評価し、より実際の有機物分解メカニズムの解明を目的とした。

生活排水を模した人工汚水培地に循環型汚水浄化槽から採取した微生物懸濁液を接種してミクロ生態系を構築した。そこに、好影響株 5 株をそれぞれ接種した後、振盪培養を行い、経時的に生物化学的酸素要求量（BOD）を測定した。その結果、ミクロ生態系の BOD 減少を促進する傾向はみられたが、有意差はなかった。そこで、先行研究では選抜されなかった細菌株や、浄化槽から今回新たに分離した細菌株を用いて同様の実験を行い、化学的酸素要求量（COD）を測定した。その結果、培養初期の COD 減少を促進する細菌株が新たに選抜された。現在、これらの株を添加したミクロ生態系の BOD 測定や系統解析を行っており、これらの結果も併せて報告する予定である。

In our previous study, 41 bacterial strains were isolated from the lab-scale circulating wastewater treatment system, and five of them promoted the decomposition of organic matter when added to a mixed culture of bacterial isolates from our wastewater treatment system. In this study, to gain a deeper understanding of the actual mechanisms involved in organic matter decomposition, we evaluated the effects of the five bacterial strains on the organic matter decomposition ability of a microbial ecosystem consisting of microorganisms present in our wastewater treatment system, rather than a composite bacterial system.

We constructed a microbial ecosystem using the microbial suspension collected from our treatment system. The above five strains were each inoculated into this system, and BOD was measured over time. The results showed a tendency for enhanced BOD reduction, although the difference was not statistically significant. We then conducted similar experiments using newly isolated strains from the treatment tank and measured COD. In the results, we found that some strains promoted COD reduction, especially in the early stage of cultivation. Currently, we are conducting BOD measurements of the microbial ecosystem supplemented with these strains.

wastewater treatment, degradation, microbial ecosystem

発表責任者：奥山勇太（6423519@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2C7p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 C7 会場

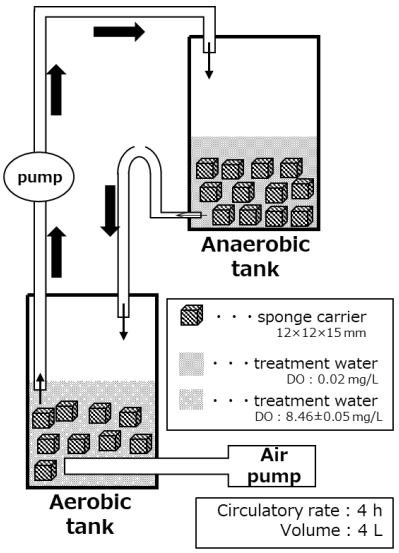
循環型汚水浄化槽から分離した代謝産物要求細菌株が汚水浄化に与える影響の解析

Analysis of the effects of metabolite-dependent bacteria isolated from the lab-scale wastewater treatment system on wastewater purification

○小野里 昂大、鈴木 智順（東理大院生物）
○Kota ONOZATO, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

微生物の多くは現時点で分離・培養できておらず、それら微生物の詳細は明らかにされていない。この問題は微生物を用いた汚水処理工程でも同様である。そこで本研究では、好気槽と嫌気槽からなるラボスケール循環型汚水浄化槽を構築・運用し、そこから分離することに成功した難培養細菌の汚水浄化への関与を調べることを目的とした。

当研究室では、これまでに他の細菌の代謝産物を生育に必要とする難培養細菌（代謝産物要求細菌）を 14 株分離してきた。本研究では、好気槽由来の B7r, H41r, F12r 株と嫌気槽由来の 5Br, 3Cr, HS3r 株が汚水浄化に与える影響を水質測定で評価した。その結果、好気槽由来の 3 株は窒素除去を促進する傾向が示された。また、HS3r 株と F12r 株からは脂肪滴様顆粒が検出され、生分解性プラスチックのひとつであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）蓄積の可能性が示された。



Lab-scale wastewater treatment system

なお、上記の研究とともに、代謝産物要求細菌の脱窒遺伝子と PHA 合成遺伝子の解析、そしてこれまで系統学的位置づけが不明であった嫌気槽由来の 5Br, 6Br, 5Dr, 5Er 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づいた系統学的解析についても報告する予定である。

Currently, most microorganisms in the environments cannot be isolated or cultured, and their characteristics remain unclear. This problem also extends to the biological wastewater treatment processes utilizing microorganisms. This study aims to investigate the involvement of unculturable bacteria successfully isolated from the lab-scale wastewater treatment system.

In our laboratory, we isolated 14 bacterial strains from our treatment system, which require metabolites produced by other bacteria. In this study, six strains were selected from them, and the effects of these strains on wastewater purification were assessed through water quality measurements. In the results, strains B7r, H41r, and F12r showed a tendency to enhance nitrogen removal. Additionally, lipid droplet-like granules were detected in strains HS3r and F12r, showing the potential accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHA), a type of biodegradable plastic.

unculturable bacteria, wastewater purification, denitrification

講演番号：2C7p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 C7 会場

循環型汚水浄化槽内の代謝産物要求細菌がヘルパー細菌の生育に及ぼす影響

Effects of metabolite-requiring bacterium isolated from the laboratory-scale circulating sewage purification tank on the growth of helper bacterium also isolated from the same tank

○田邉 詩織、鈴木 智順（東理大院生物）
○Shiori TANABE, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

当研究室で運転しているラボスケール循環型汚水浄化槽から数多くの難培養微生物が分離されている。その中には、他の細菌（ヘルパー細菌）が生産する代謝産物を生育に必須としている代謝産物要求細菌が多数存在している。本研究は、代謝産物要求細菌はヘルパー細菌によって生かされているだけではなく、ヘルパー細菌の生育に対して影響を及ぼすことの検証を目的とした。

ヘルパー細菌 JS15h 株（*Lysinibacillus sphaericus* との 16S rDNA 相似値 99.6%)と代謝産物要求細菌 5Fr 株（*Alcanivorax pacificus* との相似値 96.6%)を供試した。まず、代謝産物要求細菌の培養上清の添加によりヘルパー細菌の増殖が変化するかを観察した。また、その増殖が先行研究により 5Fr 株の生育因子であると判明している 3-β-D-グルコシドの添加や残存培地成分量によってどのような影響が見られるかを調べ、併せて代謝産物要求細菌の培養上清の添加および非添加培地での各生育期の長さの変化についても調査した。その結果、代謝産物要求細菌の培養上清を添加した培地では、ヘルパー細菌の誘導期および対数増殖期がおよそ半分から 1/3 程度までに短縮されることが判明した。

In previous studies, unculturable bacteria have been isolated from the laboratory-scale circulating sewage purification tank. These include metabolite-requiring bacteria that require the metabolites of other bacteria (helper bacteria) for growth. The purpose of this study is to investigate not only the facts that metabolite-requiring bacteria are sustained the growth by helper bacteria but also to verify their impact on the growth of helper bacteria.

We used the helper bacterial strain JS15h (99.6% 16S rDNA similarity to *Lysinibacillus sphaericus*) and the metabolite-requiring bacterial strain 5Fr (96.6% to *Alcanivorax pacificus*). First, we observed whether the addition of the supernatant from the culture of strain 5Fr changed the growth of strain JS15h. We also investigated how the growth was affected by the addition of 3-ß-D-glucoside, identified as a growth factor for strain 5Fr in previous studies, and by the amount of residual medium components. Additionally, the changes in the length of each growth phase in media with and without supernatants of strain 5Fr were also investigated. As a result, it was found that in the medium supplemented with the supernatant of strain 5Fr, the stationary and logarithmic growth phase of strain JS15h were shortened by approximately half to one-third.

metabolite, unculturable bacterium, wastewater treatment

講演番号：2C7p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 C7 会場

高濃度 CO_2 に適応した海洋性好アルカリ藻類の探索

Isolation of alkaliphilic marine microalgae adapting to high-level CO_2

○金井 大智、藤井 克彦（工学院大院化学応用学）
○Daichi KANAI, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

現在、産業排気ガスに含まれる CO_2 を、微細藻類を用いて固定し有効活用する研究が注目されている。しかし、酸性や中性の pH では培地への CO_2 の溶解度は低く、継続的な CO_2 通気により pH が下がり、微細藻類の生育が阻害される場合がある。他方、アルカリ性 pH 下では CO_2 の溶解度が高まるが、強いアルカリ性では生育できない藻類が多い。従って、好アルカリ性の微細藻類を生育させたアルカリ性の培地に CO_2 を通気すれば、酸性や中性の pH よりも効率良く CO_2 を固定できると期待される。海水の pH は一般に 8.4 程度であり、アルカリ性で良好に生育する藻類株を分離できると期待される。また、産業排気ガスに利用する藻類には、高濃度の CO_2 に対して耐性を持つことが求められる。そこで本研究では、高濃度 CO_2 かつアルカリ性 pH 下で生育可能な海産微細藻類を探索した。

海岸の岩場などから環境試料を採取し、塩分濃度を 3.0%、pH を 9.0 にした無機塩培地で集積培養した。その際に、10% CO_2 を培養容器の気相に充填して培養を行った。集積培養の結果、前述のような条件下で生育が確認されたものが 11 サンプル見つかった。微細藻類株の純粋分離を試みたところ、7 株の分離に成功した。分離株の系統解析を行うとともに、生育可能な条件範囲を検討した。

Research on the fixation of CO_2 in industrial exhaust gas using microalgae has been received much attention. However, the solubility of CO_2 in the culture medium with acidic or neutral pH is comparably lower than that at alkaline pH. While strong alkaline pH inhibits the growth of most microalgae, an employment of alkaliphilic microalgae and a medium with alkaline pH may accomplish efficient CO_2 fixation. Seawater generally has pH of around 8.4, and marine microalgal strains grow well at that pH. Therefore, we attempted to isolate marine alkaliphilic microalgae which prefer high level CO_2 for their growth.

Environmental samples were collected from coastal areas, and enriched with a mineral salts medium (pH 9.0) containing 3.0% (w/v) NaCl. Gas phase of a serum bottle for the enrichment culture was filled with a mixed gas of 10% (v/v) CO_2 and 90% (v/v) air. As a result of the enrichment, microalgal growth was observed in 11 samples. Seven microalgal strains, most of which were eukaryotic strains, were isolated from the enriched samples, and characterized biochemically and phylogenetically.

marine microalgae, alkaliphilic algae, CO_2 tolerance

発表責任者：藤井克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2C7p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 C7 会場

油脂を蓄積する気生微細藻類の探索

Isolation of aerial microalgae with oil-accumulating activity

○飯塚 理子、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大院化学応用学）
○Riko IIZUKA, Nobuhiro ABURAI, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

これまでに、多くの微細藻類で油脂を蓄積する株が報告されており、バイオディーゼル原料油の生産源として関心が持たれている。他方、栄養飢餓、強光、温度変化など過酷な陸上環境で生活する藻類として気生微細藻類が知られているが、油脂を蓄積する気生微細藻類はあまり研究が進んでいない。本研究では、油脂を蓄積する気生微細藻類を単離し、その性質を検討した。

本学八王子キャンパス内の岩や金属製イスの表面を綿棒でこすり、これを滅菌水に懸濁したものを無機塩培地で集積培養した。培養の結果、岩表面基質から 13 株、金属表面基質から 1 株、の合計 14 株の単離に成功した。得られた 14 株をいくつかの条件（光強度、窒素源、塩ストレス、pH 条件）をふって培養し、油脂を豊富に含む株をスクリーニングした。単離株の生育能は波長 750nm の吸光度測定で、油脂蓄積の有無はナイルレッド染色法で評価をした。その際、光強度 40 µmol photons m^{-2} s^{-1}、温度 25℃、窒素源 NO_3^-、pH8.0、40 mM NaCl の条件で培養した *Chlorella vulgaris* を比較対象とした。実験の結果、高アルカリ性（pH10.0、12.0）、光条件は 60 µmol photons m^{-2} s^{-1}、温度 25℃、窒素源 NO_3^-、500 mM NaCl の塩ストレスで油脂の蓄積を示す株が得られた。得られた 14 株のうち 7 株が高い生育能を示し、油脂産生能が優れていることが示唆された。

While many microalgal strains are known as oleaginous and received an attention as the sustainable source of biodiesel production, only a few aerial microalgae which inhabit in harsh terrestrial environments are reported to accumulate oil. In this study, we attempted to isolate novel aerial microalgal strains possessing oil-accumulating activity. Enrichment of the samples obtained in the university campus leads to isolation of 14 microalgal strains, 13 strains were derived from rock surface and 1 strain from a surface of a metal bench. The isolates were screened for their growth under stressed condition as well as oil-accumulating activity. Growth of the isolates was evaluated by absorbance measurement of their grown culture at a wavelength of 750 nm, and oil accumulation in their cells was evaluated by Nile-red staining. *Chlorella vulgaris* cultured under 40 µmol photons m^{-2} s^{-1}, 25°C, NO_3^- as a nitrogen source, pH8.0, 40 mM NaCl was used for comparison. The result of the screening showed that 7 strains exhibited oil accumulation at high alkalinity (pH 10.0 and 12.0), 60 µmol photons m^{-2} s^{-1}, 25°C, NO_3^- as a nitrogen source, and salt stress of 500 mM NaCl.

aerial microalgae, oleaginous microalgae, Nile red screening

発表責任者：藤井克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2C7p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 C7 会場

海洋からの粘性マトリクス産生微生物の探索

Exploration of novel mucilage-producing marine microbes

○渡辺 丈、藤井 克彦（工学院大院化学応用学）
○Joe WATANABE, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

ある種の微生物が細胞外に分泌する粘性マトリクスは、バイオフィルムの形成に寄与する物質であることが知られている。納豆菌が産生する納豆の糸(ポリグルタミン酸とフラクタンの混合物)や *Xanthomonas* 属が生産するキサンタンなどの様に、その産業利用性に関心が寄せられているものもあり、いくつかは実際に産業利用に至っている。そこで本研究では、海洋環境から新奇の粘性マトリクスを産生する微生物を探索し、そのマトリクスの性状を解析した。九十九里浜沿岸で 6 つの環境サンプルを採集し、寒天培地に接種し、静置培養した。寒天培地には、納豆菌の培養で使われる MSgg 培地の成分を人工海水に溶解したものを用いた。寒天培地上に出現したコロニーを爪楊枝で突き、糸を引くものを 6 株選び、純粋分離した。分離株が産生するマトリクスを水に溶解し、オストワルド粘度計で粘度を測定した。最も粘性が高いマトリクスを産生していた株の系統解析を行ったところ、*Cobetia* 属に分類されることがわかった。マトリクスの還元粘度(6.23 $mL \cdot mg^{-1}$)は、比較対象である微生物多糖であるキサンタンガム(7.67 $mL \cdot mg^{-1}$)と同程度となった。マトリクスの成分は約 80%が多糖で、残り約 20%はタンパク質であることが示唆された。多糖の構成糖を調べたところ、フコース、グルコース、ガラクトース、アラビノース、グルコサミン、グルクロン酸、ガラクツロン酸（おおよその mol 比=21:14:11:2:2:1:1)を含んでいることがわかった。

Mucilage secreted by certain microbes are known to contribute to biofilm formation, and some of them have attracted attention for their industrial application. In this study, we searched for marine microbes which produce novel mucilage, and analyzed their characteristics. Six environmental samples were collected at the Kujukurihama coast (Chiba), inoculated on seawater-based agar medium, and incubated statically. Emerging colonies were screened for their mucilage producing activity by lifting their colonies with a sterilized toothpick, and six mucilage producing strains were isolated. Viscosity of the mucilage solution was measured with an Ostwald viscometer, and the strain GM was found to produce mucilage whose viscosity was comparable to xanthan. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene showed that the strain GM belongs to the genus *Cobetia*. Biochemical analysis suggested that ~80 % of the mucilage was polysaccharide composed of fucose, glucose, galactose, arabinose, glucosamine, glucuronic acid, and galacturonic acid (approximate mol ratio = 21:14:11:2:2:1:1).

mucilage, marine, microbes

発表責任者：藤井克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2C7p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 C7 会場

活性汚泥構成細菌 Shinella zoogloeoides に感染するバクテリオファージの探索
Exploring bacteriophages for the activated sludge bacterium Shinella zoogloeoides

○丁 ジャウェ、久保田 貴、藤井 克彦（工学院大院化学応用学）
○Jiawei DING, Takashi KUBOTA, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

下水処理で発生する余剰汚泥は下水中の有機物を分解して増殖した微生物のバイオマスであり、最も多く排出される産業廃棄物である。汚泥の資源化のため、メタン発酵することでバイオガスを得るとともに減容を行うことがあるが、減容率は 3 割程度であり、可溶化効率は高くない。汚泥の可溶化効率を高めるために、様々な物理化学的処理や酵素処理が検討されているが、ファージによる汚泥微生物の可溶化はまだ検討されていない。そこで本研究では、余剰汚泥を構成する主な細菌のひとつである *Shinella zoogloeoides*（以下、*S. zoogloeoides*）に感染するファージを探索し、その性質を検討することとした。下水処理場から流入下水、好気処理槽汚泥、嫌気処理槽汚泥、無酸素処理槽汚泥、濃縮汚泥を採集し、0.45 μm フィルターでろ過したろ液を調製した。ろ液と *S. zoogloeoides* を混合し、二層寒天培地で培養した。実験の結果、合計で 40 個以上のプラークを分離することができた。どの試料からもプラークは得られたが、最も多くプラークが得られたのは流入下水であった。ファージから DNA を抽出し、制限酵素処理による DNA 断片のパターンを比較した結果、多種類のファージが存在することが示唆された。

Excess sludge is a grown microbial biomass generated in wastewater treatment, and it is one of the major industrial wastes. While methane fermentation is generally employed to reduce sludge volume and obtain biogas, only about 30% of it can be reduced. Therefore, the solubilization efficiency must be improved to enhance sludge reduction. Although various physicochemical or enzymatic treatments for sludge solubilization have been reported, application of bacteriophages remains to be studied. In this study, we aimed to explore bacteriophages which infect and lyse *Shinella zoogloeoides*, one of the major bacterial members of excess sludge, and investigate their properties. , Sludge samples obtained from aerobic treatment tank, anaerobic treatment tank, and anoxic treatment tank, as well as untreated wastewater and concentrated sludge were collected from the wastewater treatment plant. They were filtered through the 0.45 μm filter, mixed with *S. zoogloeoides*, and cultured in a double-layer agar medium. More than 40 plaques have been isolated. While phages were found ubiquitously from all samples, they were suggested most abundant in untreated wastewater. The result of RFLP patterns of phage DNA implied various types of *S. zoogloeoides* phages inhabit in a wastewater treatment plant.

bacteriophage, Shinella zoogloeoides, activated sludge

発表責任者：藤井克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2C7p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 C7 会場

レッサーパンダ粘膜便症の原因解明にむけた腸内細菌叢解析

Analysis of the Intestinal microbiota for elucidating the cause of mucosal feces syndrome in lesser pandas

○上江洲 海、鈴木 智順（東理大院生物）
○Kai UEZU, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

近年、動物園で飼育されているレッサーパンダにおいて、粘液が付着した水様便を排泄して食欲不振を示す症状（粘膜便症）が世界的に認知されているが、症状を引き起こす原因菌や、その治療法については未解明である。そこで本研究は、糞便細菌叢中で特徴的な相対量や変化量を示す細菌分類群に着眼点をおき、粘膜便症など腸内疾患の原因菌特定を目的とした。

市川市動植物園にてレッサーパンダの糞便を回収し、糞便中のメタゲノム解析を 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づいて行った。糞便中の細菌分類群組成データを生成し、個体・特定グループ間での糞便細菌叢の比較を行った。

その結果、粘膜便症のレッサーパンダの糞便表面に付着した粘膜組織内の細菌叢には *Clostridium perfringens* が顕著に多く存在していた。なお、疾患個体群と健常個体群間での糞便細菌叢中の相対量の比較を網羅的に行い、これら２群間で有意差を示す細菌が存在するか検証し、その結果も併せて報告する予定である。

A mucosal feces syndrome, characterized by the excretion of mucus-adhered watery feces leading to a loss of appetite, has been globally recognized in lesser pandas kept in zoos. However, the causative bacteria for the syndrome remain unclear. Therefore, this study aims to identify the causative bacteria for mucosal feces syndrome.

Fecal samples from lesser pandas were collected at Ichikawa City Zoo, and the metagenomic analysis of the feces was conducted based on the 16S rRNA gene sequence. Bacterial taxonomic composition data in the feces were generated, and a comparative analysis of fecal microbiota was performed.

As a result, *Clostridium perfringens* was notably abundant in the bacterial community within the mucosal tissues attached to the surface of feces from red pandas exhibiting mucosal feces syndrome. We plan to conduct a comprehensive comparison of the relative abundance of fecal microbiota between the group with the observed condition and the healthy group, systematically examining whether bacteria showing significant differences exist between these two groups and reporting the results accordingly.

lesser panda, Intestinal microbiota, 16S rRNA sequence analysis

発表責任者：上江洲海（6423514@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2C7p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 C7 会場

陸域地下深部透水性砂岩層における微生物群集の解明

Microbial communities in Permeable Sandstone in terrestrial subsurface

○吉田 晶、幸塚 麻里子、鈴木 庸平（東大院理）
○Aki YOSHIDA, Mariko KOUDUKA, Yohey SUZUKI (The Univ. of Tokyo)

近年の研究で、地下深部岩石の空隙や亀裂に微生物が生息することが明らかになりつつある。特に、陸域地下においては、10^{29} cells 程度の微生物から成る巨大な生態系が存在すると試算されている。一方で、地下には様々な岩石の種類が存在するにも関わらず、岩石の種類と微生物特性の関係性は明確ではない。

そこで、地下深部岩石の中でも、空隙率が高く、微生物が生息しやすい環境であると考えられる透水性砂岩に着目し、微生物群集組成解析を行った。サンプルは、栃木県那須烏山市で地上から 352 m 掘削し回収された掘削コア試料のうち、深度 300-310 m に形成された粗粒な凝灰岩層を用いた。

深度 300 m と深度 303 m の 16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、どちらの深度でも β-Proteobacteria の優占が確認され、中でも、*Acidovorax* や *Aquabacterium* 属の割合が高かった。*Acidovorax* や *Aquabacterium* 属の細菌は硝酸還元をするものが多く、これらの結果は、凝灰岩層の間隙水から硝酸や亜硝酸が検出された先行研究の結果と整合的であった。深度 303 m のコア試料に対する Catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH)の結果、鉱物粒子に付着した β-Proteobacteria プローブで染色される細菌の存在が明らかとなった。以上の結果から、本研究で用いた凝灰岩質砂岩には β-Proteobacteria 主体の硝酸に依存した微生物生態系が存在していることが示唆された。

Recent studies have revealed that the existence of microbial life is extended into the deep subsurface. Especially, the terrestrial subsurface is estimated to host 2 to 6×10^{29} prokaryotic cells. Despite the variety of lithologies in the subsurface, its relationship with microbiological properties remains largely unknown. In this study, we analyzed microbial communities in drill cores samples from coarse-grained tuffaceous sandstone at depths of 300 and 303 m in Nasukarasuyama City, Tochigi Prefecture, Japan. 16S rRNA gene amplicon analysis of the 300- and 303-m deep core samples revealed the β-proteobacterial dominance represented by high proportions of the genera *Acidovorax* and *Aquabacterium*. Catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH) confirmed the β-proteobacterial dominance in the core sample. As most cultivated members of the genera *Acidovorax* and *Aquabacterium* are nitrate-reducers, their dominance is consistent with our previous results demonstrating the enrichment of nitrate and nitrite in porewater from the 300- and 303-m deep core samples.

Deep biosphere, Microbial community analysis, Drilling core samples

発表責任者：吉田 晶（a.yoshida@eps.s.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C7p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 C7 会場

リクガメ異種間での腸内細菌叢の比較とヘルマンリクガメ腸内細菌の分離
Comparison of gut microbiota analysis among different species of tortoises and isolation of intestinal bacteria from *Testudo hermanni*

○髙橋 侑女[1]、山本 裕司[2]、落合 優[2]、稲橋 佑起[1,3]、向井 孝夫[2]（[1]北里大院感染制御、[2]北里大獣医、[3]北里大大村研）
○Yume Takahashi[1], Yuji Yamamoto[2], Masaru Ochiai[2], Yuki Inahashi[1,3], Takao Mukai[2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Sch. Vet. Med., Kitasato Univ., [3]Omura Inst. Kitasato Univ.)

長寿動物であるリクガメは、遺伝子（Glaberman S. *et al.*, *Genome Biol. Evol.*, 2021）や細胞（Quesada V. *et al.*, *Nat. Ecol. Evol.*, 2019）などの様々な面からその長寿要因に関して研究されているが、宿主の寿命と密接な関係性があると推察される「腸内細菌」に関する研究はほとんど行われていない。腸内細菌は、自身が産生する代謝物を介して宿主の健康状態に影響を与え、結果として宿主の寿命に関与している（Junki M *et al.*, *JSBBA*, 2017）ものの、その研究はヒトやマウスに限られ、他の動物では未だ不明な点が多い。本研究は、長寿動物であるリクガメを用いて有益な腸内細菌の探索を行うことにより、腸内細菌という新たな視点からリクガメ長寿要因の探索を行うことを目的とした。

まず、リクガメ腸内細菌叢を理解するため、6 種 30 匹のリクガメ異種間腸内細菌叢比較を行った。全リクガメ種の腸内細菌は、*Bacillota* 門が約 80%を占め、その内 *Clostridiaceae* 科および *Lachnospiraceae* 科が全体の各約 26%ずつ占めていた。リクガメ種特異的な腸内細菌叢が見られたので、その特徴について報告する。さらに、変温動物であるリクガメ腸内細菌の機能性を調べるため、様々な温度条件で腸内細菌の分離を行った。その結果、25~37℃では 20℃以下の 2 倍以上のコロニーが出現した。一方、20℃以下で分離された腸内細菌は、既知種と 16S rDNA の相同性が低く、新規性が示唆された。

Various factors that contribute to the longevity of the tortoise have been studied such as genetic (Glaberman S. *et al.*, *Genome Biol. Evol.*, 2021) and cells (Quesada V. *et al.*, *Nat. Ecol. Evol.*, 2019), but there have been no studies on the intestinal bacteria. It was suggested that intestinal bacteria influence host health through metabolites produced by themselves and consequently contribute to host longevity in mouse (Junki M *et al.*, *JSBBA*, 2017). In this study, we aimed to explore the longevity factors of tortoises from a new perspective of intestinal bacteria.

First, we compared the intestinal microbiota of different species of tortoises. As a result, we observed common or species-specific gut microbiota among different species of tortoises. Next, we isolated the intestinal bacteria under various temperature conditions from *Testudo hermanni*. As a result, At 25-37℃, more than twice as many colonies appeared as at 20℃ or lower. On the other hand, strains with low 16S rDNA homology to known species were isolated at low temperature.

Tortoise intestinal bacteria, Longevity factor search, Isolation of novel bacteria

発表責任者：髙橋 侑女（takahashi.yume@st.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2C7p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 C7 会場

天然酵母の取得及びその利用

Screening and use of natural yeast

○中島 美咲、大土 光経、竹内 海光、有谷 博文、秦田 勇二（埼玉工大工）
○ Misaki NAKAJIMA, Hironobu OTSUCHI, Kairi TAKEUCHI, Hirohumi ARITANI, Yuji HATADA (Saitama Inst. of Tech.)

［背景・目的］ カーボンニュートラル社会の実現に向けてバイオエタノールへの期待は高い。バイオエタノールを生産出来る微生物として酵母が知られている。今回、樹液、花、果実などを分離源として天然酵母の取得を試みた。取得した天然酵母に関してはエタノール生産量の測定と使用出来る炭素源の検討を行った。
［結果］本研究では、クヌギの樹液から 10 種類の天然酵母を取得した。rDNA の ITS 領域のダイレクトシークエンス解析による同定を行った結果、新規性のある *Saccharomyces* 属が 6 種検出された。また、これらの酵母に対してガスクロマトグラフィーによるエタノールの生産性評価を行った結果、工業的生産株である *Saccharomyces cerevisiae* NBRC101557 株と比較し、同一培養条件下におけるエタノールの生産量が高いものがいくつか認められた。

［Background and Purpose］Expectations for bioethanol are high for the realization of a carbon-neutral society. Yeast is known as a microorganism that can produce bioethanol. In this study, we tried to obtain natural yeast using sap, flowers, and fruits as isolation sources. For the acquired natural yeast, the ethanol production was measured and the carbon sources that could be used were examined.
［Results］In this study, 10 types of natural yeast were obtained from the sap of the oak tree. As a result of direct sequencing analysis of the ITS region of rDNA, six novel species of the genus *Saccharomyces* were detected. In addition, as a result of evaluating the productivity of ethanol by gas chromatography for these yeasts, compared to *Saccharomyces cerevisiae* NBRC101557 utilized industrially, some of them produced higher ethanol under the same culture conditions.

Bioethanol, Fermentation, Yeast

発表責任者：中島美咲（c0131csc@sit.ac.jp）

講演番号：2C7p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 C7 会場

国内における自然環境からの *Saccharomyces cerevisiae* の分離と性質

Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* from natural environments in Japan

○森谷 千星、柴山 洋翔、島村 具仁子、田渕 由希子、宮崎 由美子、山口 薫（独立行政法人製品評価技術基盤機構）
○ Chise MORIYA, Kaito SHIBAYAMA, Kuniko SHIMAMURA, Yukiko TABUCHI, Yumiko MIYAZAKI, Kaoru YAMAGUCHI (NITE-NBRC)

産業に欠かせない微生物資源である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、以前は、目的の製造工程から分離することが主流であったが、近年は、地域ブランド商品の開発や既存製品との差別化のために、地域に関連した花や果実など、自然環境からも分離することが増えた。しかし、自然環境からの分離株の多くは、各種製造工程からの分離株と比較して、製造に適さないことも多く、実用化に至る株は限られている。これについては、ゲノム解析の結果、製造工程からの分離株は製造環境に応じた耐性や物質産生能に関わる遺伝子の保持や重複が見出されているのに対し、多くの自然環境からの分離株はそのような製造環境への適応がなされていないためと考えられる。近年、自然環境から分離された野生分離株のゲノム系統解析や表現型の解析が進み、産業に適応した株の起源は極東アジアの野生分離株であることが推察されている。未だ情報の少ない日本の野生分離株の多様性を調査することにより、製造に適した菌株の選択及び *S. cerevisiae* の進化に関して、新たな知見を提供できるものと考えられる。そこで、本研究では、予備調査として主に千葉県木更津市の樹皮やリター、果実、花などから *S. cerevisiae* を分離し、NBRC が保有している産業に関連した株も併せた生理学的特性について調べることとした。本講演では、ビタミン要求性や糖類発酵性などの生理学的性質について報告する。The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an industrially important microorganism used in wide applications. In the past, the industrial strains were mostly isolated from the production process in the target products. In recent years, in order to develop new products with regional brand and/or with differentiated characteristics, the increased attempts are conducted to isolate new strains from natural environments, such as flowers, fruits grown in the local area. However, many strains isolated from natural environment often do not show suitable characters for production, compared to those isolated from the production process. That is partially because industrial strains have genes related to the ability to produce substances, and/or to survive in the production environment, based on the previous studies. Recent reports have hypothesized that industrial strains are evolved from wild isolates which inhabited in Far East Asia. Therefore in this study, to provide new knowledge for the selection of the strains suitable for various industrially, and the evolution in *S. cerevisiae*, we report on the physiological properties of *S. cerevisiae* isolated from natural environments, mainly at Kisarazu.

Saccharomyces cerevisiae, physiological properties, Japanese isolates

発表責任者：森谷　千星（moriya-chise@nite.go.jp）

講演番号：2C7p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 C7 会場

日光東照宮文化財とその周辺環境に生育する真菌叢の網羅的解析

Comprehensive analysis of the fungal flora growing on the cultural properties of Nikko Toshogu Shrine and in its surrounding environments

○苅山 駿太、大島 祥、須崎 裕人、小笠原 麻衣、鈴木 智順（東理大院）
○Shunta KARIYAMA, Joe OSHIMA, Yuto SUZAKI, Mai OGASAWAR, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

日光東照宮文化遺産の多くには漆が塗装されており、そこに膠や桐油を用いた彩色が施されている。しかし、これらが微生物の栄養源として利用され、文化財表面に真菌が発生することが問題となっている。そこで本研究では、真菌防除試験の前段階として、培養法および非培養法にて文化財および周辺環境の真菌叢解析を行うことを目的とした。

これまでに培養法によって、真菌 69 株の系統解析が完了し、PDA 培地や M40Y 培地で分離した菌株の多くが *Penicillium* 属および *Cladosporium* 属であることが判った。非培養法では、一部サンプルから難培養性真菌であり、エタノールを唯一の炭素源とする *Baudoinia* 属真菌が多く検出された。現在、この真菌の純粋分離を試みている。また、培養法で多く検出された *Cladosporium* 属真菌は、非培養法では検出されていない。この原因として、*Cladosporium* 属真菌は他の真菌属より細胞壁が強固で、従来の DNA 抽出法では十分量のゲノム DNA を得られなかったことが考えられた。そこで、DNA 抽出法を再検討し、微量の *Cladosporium* 属真菌胞子からゲノム DNA を抽出できる条件を決定した。この条件での非培養法解析で *Cladosporium* 属真菌の検出を試みた結果も併せて報告する予定である。

Most of the cultural heritage items at Nikko Toshogu shrine feature colored decorations applied with glue and tung oil. However, the problem has arisen with fungi growing infestation on the surface of these cultural properties. Therefore, in this study, we analyzed the fungal flora on the cultural properties and in their surrounding environments using both culture and non-culture methods.

To date, the phylogenetic analysis of 69 fungal strains has been completed using culture methods, and many of the strains isolated on PDA or M40Y media were found to belong to the genera *Penicillium* and *Cladosporium*. In non-culture methods, many *Baudoinia* fungi, which are difficult to culture and utilize ethanol as their sole carbon source, were detected. We are trying to isolate this fungus. In addition, *Cladosporium* fungi, frequently detected by culture methods, were not detected by non-culture methods. This discrepancy is thought to be due to the stronger cell walls of *Cladosporium* fungi compared to other fungi, and that conventional DNA extraction methods could not yield sufficient amounts of DNA. Therefore, we have reviewed the DNA extraction methods and determined the conditions for extracting DNA from trace amounts of *Cladosporium* fungal spores. The results of our attempt to detect *Cladosporium* fungi by non-culture analysis using these conditions will also be reported.

Fungal flora, Cultural properties, Baudoinia

発表責任者：苅山駿太（6423525@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2C7p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 C7 会場

ドロップレットスクリーニングにおける蛍光物質拡散の抑制

Suppression of Fluorescent Material Diffusion in Droplet Screening

○村山 祐樹[1]、中村 彰宏[2]、鈴木 義之[2]、志田 洋介[1]、小笠原 渉[2]([1]長岡技大院工、[2]長岡技大院イノベ)
○YUKI MURAYAMA[1], AKIHIRO NAKAMURA[2], YOSHIYUKI SUZUKI[2], YOSUKE SHIDA[1], WATARU OGASAWARA[2] ([1]Eng. Nagaoka Univ. of Tech., [2]Innov. Nagaoka Univ. of Tech.)

微生物の探索や育種は膨大な検体をスクリーニングする必要があるため、更なるスクリーニングの効率化が望まれる。ドロップレット（微小液滴）とマイクロ流体デバイスを用いたスクリーニング技術は、超効率的な微生物探索のツールとして注目されている。特に、フルオロカーボンオイルを油相とした Water-in-Oil（w/o）ドロップレットが、本スクリーニング技術で多用される。フルオロカーボンオイル（油相）と液滴（水相）は界面活性剤で隔てられており、微生物を nL から pL のドロップレットに「区画化」培養し、「低コスト」かつ「高効率」なスクリーニングを可能する。ここで、ドロップレット内における微生物機能・活性の検出には蛍光基質が利用されるが、その疎水性度に応じてドロップレット外部（疎水性）へ拡散するという技術的課題がある。蛍光基質の拡散はドロップレット内の機能・活性の評価を妨げるため、ドロップレット内で検出可能な機能・活性の種類が多くない現状である。本研究ではドロップレット内部の化学的組成を変化させて物質の拡散が抑制されるか検証した。また、糖質加水分解酵素を標的としたスクリーニングを試みることで、w/o ドロップレットを用いたマイクロ流体システムにおいて、選抜可能な機能・活性の拡大を図った。

The exploration and breeding of microorganisms require screening a vast number of samples, hence further efficiency in screening is desired. Screening technologies using droplets and microfluidic devices are gaining attention as ultra-high throughput tools for the exploration of microbe. In particular, Water-in-Oil (w/o) droplets using perfluorocarbon oil as the oil phase are widely used in this screening technology. Perfluorocarbon oil (oil phase) and droplets (water phase) are separated by surfactants, allowing microorganisms to be 'compartmentalized' and cultured in droplets ranging from nL to pL, enabling 'low-cost' and 'high throughput' screening. Here, fluorescent substrates are used to detect microbial functions and activities within droplets. However, there is a technical challenge that the substrates diffuse to the exterior (hydrophobic phase) depending on their hydrophobicity. This diffusion of fluorescent substrates hinders the evaluation of functions and activities within the droplets, resulting in a current situation where there are not many detectable functions and activities. This study tested whether altering the chemical composition inside the droplets would suppress the diffusion of substances. Furthermore, by attempting to screen for glycoside hydrolase enzymes, the study aimed to expand the range of selectable functions and activities in a microfluidic system using w/o droplets.

この成果の一部は、NEDO の委託業務（JPNP20011）の結果で得られたものです

Screening, Droplet, Glycoside hydrolase

講演番号：2D1a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D1 会場

ヒト大腸細菌叢 *in vitro* モデルにおいてグルコサミン添加は酪酸菌を選択的に増加させて酪酸産生を誘導する

Effects of dietary glucosamine on butyrate production and butyrate-producing bacterium in vitro human colonic microbiota culture model

○新谷 知也[1]、佐々木 大介[1]、吉田 崇伸[1]、猪熊 健太郎[1]、松木 泰[1]、蓮沼 誠久[1,2]、近藤 昭彦[1]([1]神戸大院・科技イノベ、[2]神戸大・先端バイオ)

○TOMOYA SHINTANI[1], DAISUKE SASAKI[1], TAKANOBU YOSHIDA[1], KENTARO INOKUMA[1], YASUSHI MATSUKI[1], TOMOHISA HASUNUMA[1,2], AKIHIKO KONDO[1] ([1]Sch of Sci., Technol. and Innov. Kobe Univ, [2]EGBRC, Kobe Univ.)

【目的】グルコサミン(GN)は、大規模な疫学研究により、関節への効果に関係なく GN 摂取がヒトの死亡率の低下に寄与していることが報告されている。また実験動物においては、GN 摂取により老化を遅延する効果が報告されている。一方で、経口摂取した GN は、吸収を免れた約半分量が大腸に到達することが報告されている。しかし、大腸細菌叢に対する GN の影響に関する報告は非常に限られている。そこで、本研究ではヒトの大腸内に生息する腸内細菌叢やその代謝物を *in vitro* 培養で模擬できるヒト大腸内細菌叢モデル（Kobe University Human Intestinal Microbiota Model; KUHIMM）を用いて、GN 添加が腸内細菌叢とその代謝物に及ぼす影響を解析した。

【方法・結果】13 名の健康なヒトの糞便を接種源として KUHIMM にて培養を開始し開始 24 時間後に GN を 0.2%（w/v）または 0.5%ずつ添加した。GN 添加後 48 時間後まで培養して培養液を回収して、上清の短鎖脂肪酸の産生量や菌体の菌叢構造について、非添加培養系と比較した。その結果、GN の添加によって、酪酸の産生が増加した。次に培養菌体から DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子解析を行い、菌叢の多様性を解析したところ、GN 添加によって多様性指数に変化はなかったが、一部の菌群の相対占有率の変化が観察された。GN 添加により、*Anaerostipes* 属（酪酸産生菌）の相対占有率が増加することが確認された。次に、種々の単糖類を含む培地で *Anaerostipes caccae* を培養して、培養上清中の短鎖脂肪酸の生産量を測定した。その結果、酪酸生産は GN を添加した場合に最も高いことが確認された。最後に、LC-MS/MS を用いて 3 名の KUHIMM 培養液のメタボローム解析を行ったところ、一次代謝物の増減が観察された。

【結論】GN は、ヒト大腸細菌叢において *Anaerostipes* 属を選択的に増加させ、酪酸を産生した。

Knowledge on the effects of glucosamine (GN) on the colonic microflora is very limited. We analyzed the effect of GN addition on the intestinal microbiota using the human colonic microbiota model (KUHIMM), which can simulate the intestine. GN was added at 0.2% or 0.5% each 24 hours after the start of incubation in the KUHIMM using feces from 13 subjects as the inoculum source. Cultures were grown until 48 hours after the addition of GN, and the culture medium was collected. The results on the analysis of the collected samples showed that the addition of GN increased butyric acid, some primary metabolites and *Anaerostipes* sp.. Also, when only Anaerostipes was cultured in media containing various monosaccharides, butyrate production was highest in GN.

colonic microbiota, culture model, glucosamine

発表責任者：新谷知也（shintani@person.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2D1a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D1 会場

ヒト腸内細菌叢培養の高精度化およびハイスループットモデルの開発

Development of a highly accurate and high-throughput in vitro human colonic microbiota culture model

○佐々木 大介、新谷 知也、松木 泰、近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）
○ Daisuke SASAKI, Tomoya SHINTANI, Yasushi MATSUKI, Akihiko KONDO (Sch of Sci., Technol. and Innov. Kobe Univ.)

【背景】近年、大腸に棲息する腸内細菌叢の構造や多様性とヒトの健康や疾患との相関が注目され、それらの研究はますます加速している。神戸大学では、ヒトの大腸内腸内細菌叢に焦点を当て、その菌叢構造や代謝物産生について糞便を接種源とした *in vitro* 培養で模擬できる KUHIMM（Kobe University Human Intestinal Microbiota Model）を開発してきた。今回、従来の KUHIMM の培養スケール（100 mL）をさらに小型・多連化したモデルの開発やこれまで以上の菌叢の再現性を達成できる糞便接種量や培地成分などの培養条件を再検討した。
【方法・結果】96well プレートを用いた KUHIMM の培養方法について、経時的に取得した培養液の菌叢構造や代謝産物濃度など検証した結果、培養ウェル間、培養装置間および従来スケールと比較して、同一かつ非常に安定な培養方法の構築に成功した。また、従来法およびハイスループット化したモデルの両方で、元糞便と培養菌叢の構造の相関が 0.6-0.9（ピアソン相関係数）と非常に高い再現性を達成する培養条件を見出した。本講演では比較検討や培養条件のデータを報告し、議論したい。

In recent years, the correlation between the structure and diversity of the colonic microbiota and human health and disease has been attracting attention, and research on these fields is accelerating. Our team at Kobe University has developed the KUHIMM (Kobe University Human Intestinal Microbiota Model), which can simulate the structure and metabolic production of the colonic microbiota by in vitro culture using human feces as an inoculum. In this study, we developed a more compact and multiplexed model of the conventional KUHIMM culture scale (100 mL), and re-examined the culture conditions, such as fecal inoculum volume and medium components, to achieve higher reproducibility of the colonic microbiota.

The culture method of KUHIMM using 96-well plates was validated in microbial structure, diversity, and metabolite concentrations in the culture medium at each time point. As a result, we succeeded in establishing an identical and stable culture method using 96-well plates compared to culture well-to-well, culture device-to-device, and conventional KUHIMM scales. In addition, we found culture conditions that achieved very high reproducibility with a correlation of 0.6-0.9 (Pearson correlation coefficient) between the original feces and the cultured microbiota structure in both the conventional method and the new high-throughput model. In this presentation, we would like to report and discuss the data of comparative study and new culture condition.

colonic microbiota, culture model, in vitro

発表責任者：佐々木大介（daisuke@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2D1a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D1 会場

マイクロカプセル化シーベリー果実油経口摂取による肌環境改善効果

The Effects of Oral Intake of Microencapsulated Seabuckthorn Pulp Oil on the Skin Condition

○森 大輔[1]、岡本 拓也[1]、鈴木 直子[2]、和泉 達也[3]（[1]岐阜セラツク製造所、[2]オルトメディコ、[3]広尾皮フ科クリニック）
○Daisuke MORI[1], Takuya OKAMOTO[1], Naoko SUZUKI[2], Tatsuya IZUMI[3] ([1]Gifu Shellac MFG. Co., Ltd,, [2]ORTHOMEDICO Inc., [3]Hiroo Dermatology Clinic & Mentors inc.)

シーベリー（*Hippophae rhamnoides, L*）は、ヨーロッパ等の寒冷地域で栽培され、美容、健康目的で食される、オレンジ色の果実をもつ植物である。本講演では 20 歳以上の健常な日本人女性を対象に、シーベリー果実油含有食品を 8 週間継続摂取した際の肌環境に及ぼす影響について検証した結果を報告する。被験食品に含有されるシーベリー果実油は、㈱岐阜セラツク製造所のシーベリー果実油マイクロカプセル(MC)を指し，脂質を高吸収かつ水分散性の高い粉末化にするマイクロカプセル化が施された原料である。本試験はランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験であった。試験参加に同意した 141 例のうち、適格基準を満たした 99 例がコンピュータによってランダムにシーベリー果実油 MC を 0 mg/日（プラセボ群)、180.0 mg/日（低用量群)、540.0 mg/日（高用量群）含んだ食品を摂取する群に、33 例ずつ割り付けられた。試験食品は 1 日 4 カプセルを任意のタイミングで、水とともに 8 週間摂取させた。評価項目として皮膚表面水分量、経皮水分蒸散量、皮膚粘弾性、皮脂量､および肌に関する自覚症状を測定し､摂取 8 週間後における皮膚水分量を主要アウトカムとした。シーベリー果実油 MC の高用量（540.0 mg/日）あるいは低用量（180.0 mg/日）の摂取は，肌の弾性の維持に寄与することで，肌の健康の維持に有用であることが示唆された。

In this presentation, we will report the results of a study of the effects on the skin environment of healthy Japanese women over 20 years of age after 8 weeks of continuous consumption of a food product containing seabuckthorn pulp oil. The seabuckthorn pulp oil contained in the test food refers to seabuckthorn pulp oil microcapsules (MC) from Gifu Shellac Mfg. This was a randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel-group study. Of the 141 subjects who agreed to participate in the study, 99 subjects who met eligibility criteria were randomly assigned by computer to receive 0 mg/day (placebo group), 180.0 mg/day (low-dose group), or 540.0 mg/day (high-dose group) of seabuckthorn pulp oil MC in 33 subjects each. The subjects took 4 capsules per day at any time of the day for 8 weeks with water. Skin surface water content, transdermal water transpiration, skin elasticity, sebum content, and subjective skin symptoms were measured, and the primary outcome was skin water content after 8 weeks of intake. In healthy Japanese adult women, high (540.0 mg/day) or low (180.0 mg/day) doses of seabuckthorn pulp oil MC contributed to the maintenance of skin elasticity, suggesting that it helps maintaining skin health.

Sea buckthorn, Palmitoleic acid, Skin

発表責任者：森大輔（gsm.rd@gifushellac.co.jp）

講演番号：2D1a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D1 会場

ヒト皮膚線維芽細胞の光老化に対するシーベリー果実油の機能解析
The Functional Analysis of Seabuckthorn Pulp Oil on Photoaging in Normal Human Dermal Fibroblasts

○岡本 拓也[1]、中島 史恵[2]、柴田 貴広[2]、森 大輔[1]([1]（株）岐阜セラツク製造所、[2]名大院農)
○Takuya OKAMOTO[1], Fumie NAKASHIMA[2], TAKAHIRO SHIBATA[2], Daisuke MORI[1] ([1]Gifu Shellac Mfg. Co., Ltd., [2]The Univ. of Nagoya)

シーベリー果実油含有食品の経口摂取が肌環境に及ぼす影響について検証したランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験の結果、シーベリー果実油が肌の弾性の維持に寄与することで肌の健康の維持に有用であることが示唆された。シーベリー果実油はキャリアオイルとして外用品に用いられる他、スーパーフードとして食され美容効果等が期待されているが、肌弾力を維持するメカニズム等については明らかになっていない。肌への紫外線(UV)照射は光老化と呼ばれる老化を引き起こし、肌弾力の維持を担う真皮の細胞外マトリクスの減少を引き起こすことが知られている。我々は、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)に対する UV 照射実験系を構築し、シーベリー果実オイルが細胞生存率やコラーゲン代謝関連遺伝子、タンパク質発現に与える影響に着目した解析を行った。

その結果、シーベリー果実油の NHDF への投与により UV 照射細胞の生存率が投与濃度依存的に回復すること、コラーゲン分解酵素 MMP-1 の遺伝子発現量及びそのタンパク質発現量が抑制されることが示唆された。本発表では、シーベリー果実油の活性成分に着目した解析、及び UV 保護活性のメカニズムについても報告する。これらの結果から、線維芽細胞における光老化をシーベリー果実オイルが抑制することにより、肌の弾力の維持に寄与することが示唆された。

The results of clinical trial showed that the oral intake of seabuckthorn pulp oil is useful for skin health by helping to maintain skin elasticity. But the details of its mechanisms have been still unclear. It is known that photoaging of skin induced by ultraviolet (UV) irradiation leads to a decrease in the extracellular matrix of the dermis, which is responsible for maintaining skin elasticity. We constructed a UV irradiation experimental system for normal human dermal fibroblasts (NHDF) and analyzed the effects of seabuckthorn pulp oil on cell viability, collagen metabolism-related genes, and protein expression.

The results showed that the treatment of seabuckthorn pulp oil to NHDF restored the viability of UV-irradiated cells in a dose-dependent manner and suppressed both gene and protein expression level of MMP-1. Analysis of active components of seabuckthorn pulp oil and the mechanism of UV-protective activity will be also reported. These results indicate that seabuckthorn pulp oil contributes to the maintenance of skin elasticity by suppressing photoaging in fibroblasts.

Seabuckthorn pulp oil, Normal human dermal fibroblasts, photoaging

発表責任者：森大輔（gsm.rd@gifushellac.co.jp）

講演番号：2D1a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D1 会場

栄養調整による身体データ改善のための個別栄養最適食

The "Personal Nutrition Optimized Diet" for Improving Physical Data through Nutritional Adjustments

○中村 浩蔵[1]、後藤 和馬[1]、宮川 竜征[1]、鈴木 ゆみ子[1]、山口 翔平[1,2]、小山 正浩[2]([1]信大農、[2](株)ウェルナス)
○ Kozo NAKAMURA[1], Kazuma GOTO[1], Ryusei MIYAGAWA[1], Yumiko SUZUKI[1], Shohei YAMAGUCHI[1,2], Masahiro KOYAMA[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Wellnas Co., Ltd.)

Well-being 実現のためには個別化が重要であり、フードテック分野では、スマートフォンなどのデジタル機器を用いた食の個別化技術の研究開発が進んでいる。我々は、デジタル機器で測定・記録した摂取栄養成分量と身体データ（体重、血圧など）の相関関係を多変量解析で明らかにして、身体データを目的変数、摂取栄養成分量を説明変数とする回帰式を求め、身体データに関与する栄養成分を特定、目標とする身体データとなるように関与栄養成分量を調整した「個別栄養最適食」を開発した。個別栄養最適食は、日常の食事の食材量を調整したものであり、安全に、あらゆるシーンで利用可能である。また、身体データは日常的に定量可能なものであれば制限はなく、適応範囲が広い。これまでの実証試験で、個別栄養最適食が従来の食事や食成分の身体データ改善効果を上回り、この効果が優れた統計量に裏付けられていることが実証試験で明らかとなった。本発表に続く連続発表で個別栄養最適食の血圧改善および体重改善実証試験事例を紹介する。

To realize well-being, personalization is important, and in the foodtech field, research and development of personalized food technology using digital devices such as smartphones is in progress. We have developed the "Personal Nutrition Optimized Diet" in which the amount of nutrients is adjusted to achieve one's desired physical data. The nutritional factors involved in the body data were identified from the regression equation obtained by multivariate analysis of body data (weight, blood pressure, etc.) and nutritional intake measured and recorded by digital equipment, i.e., the regression equation is expressed with the body data as objective variable and the nutritional factor as explanatory variable. The personal nutrition optimized diet is an adjusted amount of a food item in the daily diet and can be used safely and in any situation. In addition, there is no limit to the type of physical data that can be quantified on a daily basis, and the adaptability of the system is broad. Previous empirical studies have demonstrated that the personal nutrition optimized diets outperform the physical data improvement effects of conventional diets and food components, and that this effect is supported by superior statistics in empirical studies. This presentation will be followed by a series of presentations on case studies of the personal nutrition optimized diets for blood pressure and weight improvements.

foodtech, healthcare, personalized diet

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D1a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D1 会場

体重改善を目的とした個別栄養最適食の効果検証（シングルアーム試験）
Verification of the effectiveness of the "Personal Nutrition Optimized Diet" for body weight improvement (single arm study)
○後藤 和馬[1]、山口 翔平[1,2]、宮川 竜征[1]、鈴木 ゆみ子[1]、小山 正浩[2]、中村 浩蔵[1]([1]信大農、[2](株)ウェルナス)
○Kazuma GOTO[1], Shohei YAMAGUCHI[1,2], Ryusei MIYAGAWA[1], Yumiko SUZUKI[1], Masahiro KOYAMA[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Wellnas Co., Ltd.)

個人の日々の摂取栄養成分量と体重を解析して体重改善のための「個別栄養最適食」を作成し効果を検証した。体重改善のための個別栄養最適食は、摂取エネルギーを維持して個別に栄養調整し、日本人の食事摂取基準に配慮した栄養バランスのとれた献立とした。試験はシングルアーム試験とし、健常な成人男女 40 名を対象とした。参加者が毎日測定・記録した体重および日常の食事から摂取した 19 種類の栄養成分量を、それぞれ目的変数および説明変数として個人毎に重回帰分析し、体重を摂取栄養成分量で表す回帰式を作成、体重に影響する栄養成分（関与栄養成分）を個別に特定した。回帰式に基づいて目標体重となるように関与栄養成分量を決定、参加者毎にエネルギーを維持した体重改善のための個別栄養最適食献立を毎日 3 食作成、参加者自身が調理し摂取した。その結果、個別栄養最適食の 9 週間の摂取により、解析対象者 35 名の体重が有意に減少した（摂取前 59.9±14.8 kg、摂取後 58.7±14.4 kg、日常食エネルギー1468 kcal、個別栄養最適食エネルギー1521 kcal、$p<0.001$）。摂取頻度を変更した群（個別栄養最適食摂取 1 日 1 食、1 日 2 食、平日 3 食）においても摂取前と比較して有意な体重減少が見られ（$p<0.05$）、摂取頻度が高いほど体重減少効果が高かった。また、栄養成分調整に使用した回帰式の統計量は優れており、高精度なデータ解析に基づいて設計された個別栄養最適食の体重改善効果を裏付ける結果が得られた。本結果は、個別に特定した体重に影響する栄養成分の調整により、安全かつエネルギーを維持した質の高い食事で体重改善ができる可能性を示すものであり、個別栄養最適食は well-being 実現のための新しい食のヘルスケアとして期待される。

We verified the efficacy of the "Personal Nutrition Optimized Diet" for weight improvement. We used multiple regression equations based on multiple regression analysis of body weight and nutrients for each individual subject, individually identified nutrients that affected body weight. Subjects consumed three of the personal nutrition optimized diet daily, with no change in energy content. As a result, weight was significantly reduced ($p<0.001$) after 9 weeks of the personal nutrition optimized diet intake. The weight of the group with lower frequency of the diet intake was also significantly reduced, and the higher the frequency of intake, the greater the weight loss effect. In addition, the statistics of the multiple regression equation were excellent. These results suggest that the personal nutrition optimized diet is expected to be a novel dietary healthcare for the realization of well-being.

foodtech, body weight, personalized diet

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D1a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D1 会場

血圧改善を目的とした個別栄養最適食の効果検証（シングルアーム試験）
Verification of the effectiveness of the "Personal Nutrition Optimized Diet" for blood pressure improvement (single arm study)

○小山 正浩[1]、山口 翔平[1,2]、後藤 和馬[2]、宮川 竜征[2]、鈴木 ゆみ子[2]、小泉 創[3]、中村 浩蔵[2]([1](株)ウェルナス、[2]信大農、[3]日本たばこ産業(株))
○Masahiro KOYAMA[1], Shohei YAMAGUCHI[1,2], Kazuma GOTO[2], Ryusei MIYAGAWA[2], Yumiko SUZUKI[2], So KOIZUMI[3], Kozo NAKAMURA[2] ([1]Wellnas Co., Ltd., [2]Shinshu Univ., [3]Japan Tobacco Inc.)

個人の日々の摂取栄養成分量と血圧を解析して血圧改善のための「個別栄養最適食」を作成し効果を検証した。血圧改善のための個別栄養最適食は、減塩せず個別に栄養調整し、日本人の食事摂取基準に配慮した栄養バランスのとれた献立とした。試験はシングルアーム試験とし、健常な成人男女 20 名を対象とした。参加者が毎日測定・記録した家庭血圧（起床時収縮期血圧）および日常の食事から摂取した 14 種類の栄養成分量を、それぞれ目的変数および説明変数として個人毎に重回帰分析し、血圧を摂取栄養成分量で表す回帰式を作成、ナトリウム以外の血圧に影響する栄養成分（関与栄養成分）を個別に特定した。回帰式に基づいて目標血圧となるように関与栄養成分量を決定、参加者ごとに血圧改善のための個別栄養最適食献立を毎日 3 食作成・調理し、参加者に届け摂取させた。その結果、個別栄養最適食の 3 週間の摂取により、解析対象者 13 名の起床時収縮期血圧が有意に低下した（摂取前：139.3±2.4 mmHg、摂取後：133.8±2.2 mmHg、$p<0.001$）。参加者個別の結果では、13 名中 6 名で有意な血圧低下を、他 6 名では低下傾向を示した。本結果は、個別に特定したナトリウム以外の血圧に影響する栄養成分の調整により、安全かつ減塩をしない質の高い食事で血圧改善できる可能性を示すものである。個別栄養最適食は、QOL を維持しながら優れた健康効果を発揮できる、well-being 実現のための新しい食のヘルスケアとして期待される。

We verified the improvement of blood pressure (BP) by the personal nutrition optimized diet, which was designed based on the relationship between daily intakes of nutrients and BP. The personal nutrition optimized diet was a nutritionally balanced menu with individual adjustment of nutrients without reducing salt. The test was conducted as single arm with 20 Japanese adults with higher BP. The daily data of home BP (systolic BP) and intakes of nutrients were multivariate analyzed to prepare a regression equation and identified nutrients that affects BP individually. The intakes of nutrients needed to achieve the target BP were determined, and the personal nutrition optimized diets were prepared. Ingestion of the personal nutrition optimized diet significantly decreased the mean systolic BP on the 13 subjects analyzed (before: 139.3±2.4 mmHg, after: 133.8±2.2 mmHg, $p<0.001$). In individual results, 6 subjects had significantly lower BP, and the other 6 subjects showed a decreasing trend. These results demonstrated that the individual adjustment of nutrients could improve BP without reducing salt. The personal nutrition optimized diet is expected to be a novel healthcare for realizing well-being, which can maximize health effects while maintaining QOL.

foodtech, blood pressure, personalized diet

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D1a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D1 会場

酒造好適米を用いた米飯の摂取が Balb/c マウスの成長と脂質代謝に及ぼす影響

The consumption of cooked rice products made from rice suitable for sake brewing influences growth and lipid metabolism in Balb/c mice

○大石 怜実[1]、牧田 友香[2]、松岡 信[3]、松田 幹[3]、平野 可奈[2] ([1]金城学院大院・人間生活・消費者科学、[2]金城学院大・生活環境・食環境栄養、[3]福島大・食農学類・附属発酵醸造研究所)
○Remi OISHI[1], Yuka MAKIDA[2], Makoto MATSUOKA[3], Tsukasa MATSUDA[3], Kana HIRANO[2] ([1]Consumer Science Major, Graduate School of Human Ecology, Kinjo Gakuin University, [2]Department of Food and Nutritional Environment, College of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University, [3]Fukushima University, Institute of Fermentation Sciences (IFeS), Faculty of Food and Agricultural Sciences)

胚乳にマンノースを構成糖とする多糖を含む品種と含まない品種があることが知られていたが、最近、マンナン(Mn)合成酵素遺伝子の関与が明らかにされた[1)]。Mn 等の食物繊維には、血漿コレステロール(Cho)の低下作用が知られている。そこで、Mn を含む酒造好適米の米飯(S)摂取時の脂質代謝への影響を明らかにするために、Mn を含まない食用米の米飯(R)を比較対照として飼育実験を行った。4 週齢の Balb/c マウスに AIN-93M を基本として、S または R のみを糖質・タンパク質源とした食餌の S 群及び R 群、米飯の成分組成に合わせて標準飼料の材料で調製した食餌の対照(C)群に分けて 11 週間飼育した。飼育開始から 4 週以降、C 群では顕著な体重増加を示した一方、S 群及び R 群では緩やかに増加し、最終体重は C 群より有意に低かった。屠殺解剖時の各臓器重量において、盲腸以外の臓器における差異はみられなかった。血清トリグリセリド(TG)は S 群が C 群と比べて有意に低下、肝臓 TG は C 群と比べ低下傾向であった。血清 Cho も R 群と S 群が C 群と比べて有意に低下し、肝臓 Cho は S 群が C 群および R 群と比べて有意に増加した。以上より、米飯ベースの飼料と対照飼料では体重増加の程度と脂質代謝が異なり、さらに米飯の Mn も脂質代謝に影響することが示唆された。

It was found that some rice varieties contain polysaccharides with mannose as a constituent sugar in the endosperm while others do not, due to the mannan (Mn) synthase gene[1)]. Dietary fibers such as Mn are known to lower plasma cholesterol (Cho). Therefore, to clarify the effects of the consumption of rice with Mn (S) on lipid metabolism, we conducted an animal study using rice without Mn (R) as a control. 4-week-old Balb/c mice were divided into 3 groups, which were fed a diet based on AIN-93M with only S or R as the carbohydrate and protein source, and the control (C) group, which was fed a diet prepared with cornstarch and casein to match the composition of cooked rice. After 4 weeks, C group showed significant weight gain, while S and R groups showed slower gains and were finally lower than those of C group. At the time of slaughter and dissection, there were no differences in other organs except the cecum. Serum triglyceride (TG) decreased significantly S group compared to C group, and liver TG tended to decrease compared to C group. These results suggest that rice-based diets differ from control diets in the degree of weight gain and lipid metabolism, and that Mn contained in rice also affects lipid metabolism.

1) Yoshida H. et al., Mol Plant. 2023 Sep 4;,16(9):1460-1477.

cooked rice, rice suitable for sake brewing, lipid metabolism

講演番号：2D1a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D1 会場

酒造好適米を用いた米飯の摂取が Balb/c マウスの腸内細菌叢に及ぼす影響

The consumption of cooked rice products made from rice suitable for sake brewing influences the intestinal microbiota of Balb/c mice.

○牧田 友香[1]、明治 真結[2]、大石 怜実[3]、日野 真吾[4]、西尾 俊亮[5]、松岡 信[5]、松田 幹[2,5]、平野 可奈[1] ([1]金城学院大・生活環境・食環境栄養、[2]福島大・食農学類、[3]金城学院大院・人間生活・消費者科学、[4]静岡大・農学部・応用生命、[5]福島大・食農学類・附属発酵醸造研究所)
○Yuka MAKIDA[1], Mayu MEIJI[2], Remi OISHI[3], Shingo HINO[4], Shunsuke NISHIO[5], Makoto MATSUOKA[5], Tsukasa MATSUDA[2,5], Kana HIRANO[1] ([1]Department of Food and Nutritional Environment, College of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University, [2]Fukushima University, Faculty of Food and Agricultural Science, [3]Consumer Science Major, Graduate School of Human Ecology, Kinjo Gakuin University, [4]Applied Life Sciences, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [5]Fukushima University, Institue of Fermentation Sciences (IFeS), Faculty of Food and Agricultural Science)

米飯を用いた飼料でマウス飼育試験を行った結果、食用米および酒造好適米(酒米)摂取群において成長後の体重増加の抑制と血清 Cho の低値が観察され、さらに酒米摂取群においては血清 TG の低値が観察された。そこで本研究では、米飯の摂取による脂質代謝の変化には、食餌に依存した腸内細菌叢の変動も関与すると想定し、菌叢解析を行った。4 週齢の Balb/c マウスを、AIN-93M を基本として酒米のみを糖質・タンパク質源とした酒米摂取群(S 群)、同様の食用米摂取群(R 群)、コーンスターチ･カゼインを摂取する対照群(C 群)に分けて飼育した。飼育 10 週後の糞便と盲腸内容物から抽出した DNA の 16S rRNA V3/V4 領域を増幅し、高重複度で塩基配列を解析し、QIIME2 を用いて配列データを解析し可視化した。各群での菌叢の α 多様性を示す Chao1 指数は、盲腸内容物において R 群で高い傾向がみられ、S 群では有意に高かった(p=0.0117)。一方、S、R 群の間の細菌叢の差異は小さかった。さらに、Galaxy LEfSe を用いて各群での優勢な細菌種を調べた結果、S 群では糞便中に酪酸を産生する細菌が、盲腸内容物には酢酸を生成し体脂肪の蓄積を抑制することが報告されている細菌が有意に多かった。以上より、酒米を用いた米飯摂取による腸内細菌のα多様性の増加と脂質代謝に関わる腸内細菌への関与が示唆された。

Our studies have suggested that rice consumption alters lipid metabolism. We assumed that diet-dependent changes in the intestinal microbiota may also be involved in it, we analyzed the intestinal microbiota. 4-week-old Balb/c mice were divided into 3 groups: sake rice-diet group (S group), edible rice-diet group (R group), and control-diet group (C group). We analyzed the sequence data of DNA extracted from the feces and the contents of the cecum collected after 10 weeks of rearing, and visualized using QIIME2. The Chao1 index, indicating α diversity of bacterial flora in each group, tended to be higher in the R group and significantly higher in the S group in the cecum contents (p=0.0117). On the other hand, differences in bacterial flora between the S and R groups were small. In the S group, butyrate-producing bacteria were significantly higher in the feces, and acetic acid-producing bacteria were significantly higher in the cecum contents. Acetic acid-producing bacteria have been reported to suppress the accumulation of body fat. These results suggest an increase in α diversity of intestinal bacteria and the involvement of intestinal microflora in lipid metabolism due to the consumption of sake rice.

rice, rice suitable for sake brewing, intestinal microbiota

講演番号：2D1a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D1 会場

血圧関与栄養成分の調整による高血圧自然発症ラットの血圧改善

Improvement of blood pressure by adjusting nutrients affected blood pressure on spontaneously hypertension rats

○山口 翔平[1,2]、鈴木 美穂[1]、後藤 和馬[1]、小山 正浩[2]、中村 浩蔵[1] ([1]信大農、[2](株)ウェルナス)
○ Shohei YAMAGUCHI[1,2], Miho SUZUKI[1], Kazuma GOTO[1], Masahiro KOYAMA[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Wellnas Co., Ltd.)

ヒト試験で血圧改善が確認された個別栄養最適食の血圧改善メカニズムを明らかにするため、高血圧自然発症ラットを用いた動物実験を行った。観察期間（21 日間）に、7 種の栄養成分量の組成を毎日ランダムに変えた飼料（ランダム食）で飼育し、毎日、血圧測定（テイルカフ法）した。血圧と摂取栄養成分量を重回帰分析して個体ごとに作成した回帰式から、血圧に関与する栄養成分を特定し、血圧が低下するように個別に栄養調整した飼料（血圧改善食）を調製した。回帰式の重相関係数の平均値は 0.72±0.05 と強い相関が見られた。その後の介入期間（21 日間）では、7 匹ずつ被験群と対照群に分け、被験群には血圧改善食を対照群にはランダム食を給餌した。なお、両飼料のナトリウム量とエネルギー量は統一した。飼育は代謝ケージで行い、血圧を毎日測定し、介入期間初日と最終日に尿を、介入期間最終日に血液を採取し成分分析を行った。血圧改善食で飼育した被験群の収縮期血圧は、対照群と比較して有意に低値（$p<0.05$）で、尿中のカテコールアミン（昇圧物質）が有意に低下（$p<0.05$）した。これらの結果は、被験群における血圧低下が、血圧改善食摂取による交感神経活動の抑制を介したカテコールアミン分泌の減少によって引き起こされたことを示している。また、血圧に影響する栄養成分は個体ごとに異なっており、交感神経活動に関与する栄養成分が個体に特異的であることが示唆された。本試験の結果は、臨床試験による個別栄養最適食の血圧改善効果を裏付けるものであり、栄養調整が生体の血圧調節系へ作用し血圧を改善すると考えられる。

In order to clarify the mechanism of blood pressure (BP) improvement of the personal nutrition optimized diet, animal experiments were conducted using spontaneously hypertensive rats. From regression equations created for each individual by multiple regression analysis of BP and nutrient intake, the nutrient involved in BP were identified, and BP-improvement diet were individually adjusted to reduce BP. For 21 days, the test group was fed the BP-improvement diet and the control group was fed a non-nutritional adjustment diet. The sodium and energy levels of both diets were standardized. As results, systolic BP in the test group was significantly lower ($p<0.05$) than in the control group, and urinary catecholamines (a hypertensive substance) were significantly lower ($p<0.05$). These results indicate that the decrease in BP in the test group was caused by a decrease in the catecholamine secretion via suppression of sympathetic nerve activity due to consumption of the BP improving diet.

foodtech, blood pressure, spontaneously hypertension rats

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D1p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 D1 会場

梅干し果肉に含まれるヒト皮膚線維芽細胞における老化予防物質の探索

Anti-aging effects of *Prunus mune* extracts and its components on the human skin fibroblast cells

○夏見 宙茉[1]、奥野 祥治[1]、河野 良平[2]、宇都宮 洋才[2] ([1]和歌山高専、[2]大阪河崎リハ大)
○ SORAMA NATSUMI[1], YOSHIHARU OKUNO[1], RYOUHEI KONO[2], HIROTOSHI UTUNOMIYA[2] ([1]Nat. Inst. Technol., Wakayama collage, [2]Osaka Kawasaki Rihabilitation Univ.)

シワやタルミなどの皮膚の老化現象は、皮膚の弾力やツヤを保っているコラーゲンやエラスチンの減少が主な原因であり、老化にはコラーゲンやエラスチンの分解酵素群である MMP-1 が大きく関与している。そのため、コラーゲンの産出を促進させることや、MMP-1 の産出を抑制することで老化の予防効果が期待できる。

梅（*Prunus mume* SIEB *et.* Zucc）は中国中南部が原産のバラ科サクラ属の落葉樹であり、和歌山県の特産品である。梅には様々な機能性成分が含まれていることが報告されているが、MMP-1 産出抑制物質やコラーゲン産出促進効果物質の報告はされていない。そこで、本研究ではヒト皮膚線維芽の NB1RGB 細胞におけるコラーゲン産出促進効果および MMP-1 産出抑制効果について検討した。

梅干し果肉を MeOH で浸漬し、得られた MeOH 抽出物を Hexane、CH_2Cl_2 、EtOAc の順で転溶することにより各有機層抽出物を得た。得られた各有機層抽出物を培養した NB1RGB 細胞に添加し、NB1RGB 細胞への影響を MTS 試験を行い評価した。現在、培養細胞における梅干し果肉抽出物のコラーゲン産出促進効果および MMP-1 産出抑制効果について検討を進めている。

Skin aging phenomena such as wrinkles and flabbiness are mainly caused by a decrease in collagen and elastin, which maintain the elasticity and luster of the skin. MMP-1, a group of enzymes that degrade collagen and elastin, is a major player in aging. Therefore, it is expected to have a preventive effect on aging by promoting collagen production and inhibiting MMP-1 production. *Prunus mume* is a deciduous tree of the family Rosaceae native to south-central China and a specialty of Wakayama Prefecture. Various functional components have been reported to be contained in *P. mume*., but no MMP-1 production inhibitors or collagen production enhancers have been reported. Therefore, in this study, we investigated the effects of NB1RGB cells of human dermal fibroblasts on promoting collagen production and inhibiting MMP-1 production.

P. mume. was extracted in MeOH, and each extract was re-extract by Hexane, CH_2Cl_2 , and EtOAc in that order. Each of the extracts was added to cultured NB1RGB cells, and their effects on NB1RGB cells were evaluated by MTS assay. Currently, we are investigating the effects of *P. mume.* extracts on the promotion of collagen production and the inhibition of MMP-1 production in cultured cells.

Prunus mume, anti-aging, NB1RGB

講演番号：2D1p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 D1 会場

大豆フェリチンによるオートファジーの促進と細胞老化抑制作用の検討

Examination of autophagy promotion and cell aging inhibition by soybean ferritin

○上野 有紀[1]、川本 善之[2]、増田 太郎[3] ([1]愛知学院大健康科学、[2]中部大生命健康科学、[3]摂南大農)
○Yuki UENO[1], Yoshiyuki KAWAMOTO[2], Taro MASUDA[3] ([1]Aichi Gakuin Univ., [2]Chubu Univ., [3]Setsunan Univ.)

【背景】昨年度の本大会では、我々はリコンビナント大豆フェリチン（rSFER）がヒト由来腸管上皮株化細胞 Caco-2 における抗酸化酵素 superoxide dismutase 2 遺伝子の発現誘導に関連するシグナル伝達分子（AKT、ERK、FOXO1）に与える影響を報告した。本研究では、我々は培養細胞を用いて rSFER とオートファジーの関連、ならびに抗老化作用に関する検討を行った。
【方法】Caco-2 細胞に rSFER を添加し、ウエスタンブロッティングにより、オートファジー関連分子（FOXO3a、LC3A/B）を検出した。またヒト正常肺繊維芽細胞 WI-38 細胞に rSFER を添加し、細胞増殖度ならびに細胞老化マーカー(SA-β-gal)を測定した。
【結果・考察】rSFER は、Caco-2 細胞、WI-38 細胞において LC3A/B を増加させた。また、rSFER は WI-38 細胞の継代回数の増加による細胞増殖度の低下を抑制し、さらに細胞老化マーカーを減少させた。以上の結果から、rSFER はオートファジー誘導能を示し、抗老化作用を持つ可能性が示唆された。

At last year's annual meeting of JSBBA, we investigated the effects of recombinant soybean ferritin (rSFER) on AKT, ERK, and FOXO1 as a signaling molecule related to the induction of the expression of the antioxidant enzyme superoxide dismutase 2 gene in human intestinal epithelial cell line Caco-2. In this study, we investigated the relationship between rSFER and autophagy and their anti-aging effects using culture cells. rSFER was added to Caco-2 cells, and autophagy-related molecules (FOXO3a, LC3A/B) were detected by western blotting. Furthermore, rSFER was added to human normal lung fibroblast WI-38 cells, and the degree of cell proliferation and cell senescence marker (SA-β-gal) were measured. rSFER increased LC3A/B in Caco-2 cells and WI-38 cells. In addition, rSFER suppressed the decline in cell proliferation rate caused by increasing the number of passages in WI-38 cells, and furthermore, decreased cell senescence markers. These results suggest that rSFER exhibits the ability to induce autophagy and may have anti-aging effects.

soybean ferritin, autophagy

発表責任者：上野　有紀（ueno@dpc.agu.ac.jp）

講演番号：2D1p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 D1 会場

ユズ果皮抽出物のヒト皮膚角化細胞におけるエストロゲンに類似した作用を介した機能性解析
Functional analysis of Yuzu pericarp extract via estrogen-like action in human keratinocytes
○田村 紀人[1]、河本 美幸[2]、木曽 昭典[2]、川嶋 善仁[2]、河原 岳志[1,3] ([1]信大院 総合理工、[2]丸善製薬株式会社 総合研究所、[3]信大 学術研究院農)
○ Kazuto TAMURA[1], Miyuki KOMOTO[2], Akinori KISO[2], Yoshihito KAWASHIMA[2], Takeshi KAWAHARA[1,3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shinshu Univ., [2]Research Center, Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd., [3]Academic Assenbly School of Science and Technology, Institute of Agriculture, Shinshu Univ.)

エストロゲンは女性ホルモンとして知られる性ホルモンで、主に卵巣顆粒層細胞から分泌され、卵巣において排卵制御などをおこなう。近年の研究で、皮膚においてもエストロゲン受容体(ERs)が発現していることが明らかとなっており、創傷治癒力の向上やしわなどの予防や紫外線の影響で悪化する皮膚を健康に保つ作用などが明らかとなっている。

発表者は皮膚角化細胞におけるエストロゲンの有用性に着目し、それと類似の作用をもたらす化粧品原料を探索した結果、ユズ(*Citrus junos*)果皮を見出した。実際にヒト皮膚角化細胞株である HaCaT 細胞において、ユズ果皮 50%EtOh 抽出物の添加によって、エストロゲン制御下にある遺伝子として知られるプロゲステロン受容体(PGR)やⅢ型コラーゲン(COL3A1)及びエラスチン(ELN)の発現を増強する研究結果を得ている。本研究では、ユズ果皮抽出物のもつエストロゲンに類似した作用を検証するとともに、そのメカニズムの解明や機能性化粧品素材としての応用に向けて、天然で最も強力なエストロゲンである 17βエストラジオールに対する応答性との違いについて報告する。

Estrogen is a sex hormone known as the female sex hormone which is mainly secreted by the ovarian granulosa cells to control ovulation in the ovary. Recent studies have revealed that estrogen receptors (ERs) are expressed in the skin, and it has been shown that ERs improve wound healing, prevent wrinkles, and maintain healthy skin that is deteriorated by ultraviolet radiation.

The presenter focused on the usefulness of estrogen in skin keratinocytes and searched for a cosmetic ingredient that has similar effects to estrogen. In fact, they found that the addition of a 50% EtOh extract of Yuzu (*Citrus junos*) peel enhanced the expression of Progesterone Receptor (PGR), Type III Collagen (COL3A1), and Elastin (ELN), which are known to be estrogen-regulated genes, in HaCaT cells, a human dermal keratinocyte cell line. The study has shown that Yuzu peel is a good candidate for the treatment of cancer. In this study, we will verify the estrogen-like effects of Yuzu peel extract, elucidate the mechanism of these effects, and report the difference in response to 17ß-estradiol, the most potent estrogen in nature, for application as a functional cosmetic material.

Keratinocyte, *Citrus junos*, Estrogen

発表責任者：河原 岳志（tkawafb@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D1p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 D1 会場

パッションフルーツ種子由来ピセアタンノールによる骨格筋細胞 C2C12 における SIRT1 とその関連遺伝子の活性化

Activation of SIRT1 and Associated Genes in C2C12 Skeletal Muscle Cells by Piceatannol Derived from Passion Fruit Seeds

○田中 健太、山口 拓見、川上 晋平（森永製菓）
○Kenta Tanaka, Takumi Yamaguchi, Shinpei Kawakami (Morinaga ＆CO., LTD)

NAD^+依存的な脱アセチル化酵素である SIRT1 は、さまざまな因子に作用することで骨格筋における分化、成長、修復、炎症反応に関わり、慢性疾患や肥満とも関連があることが知られている。ピセアタンノールは、レスベラトロールに類似したスチルベン骨格を持つポリフェノールであり、パッションフルーツの種子に豊富に含まれていることが明らかとなっている。ピセアタンノールは脂肪の消費促進などさまざまな健康効果が示されているが、骨格筋細胞における SIRT1 の活性化やその作用についてはまだ十分には明らかになっていない。
そこで本研究では、骨格筋由来細胞株 C2C12 を用いて、ピセアタンノールを作用させた際の SIRT1 や関連遺伝子の発現に与える影響を検討した。その結果、ピセアタンノールは SIRT1 の発現を有意に誘導することが明らかとなった。レスベラトロールとの効果の比較や、関連遺伝子の発現への影響についても現在検討中である。

SIRT1, a NAD^+-dependent deacetylase, is known to influence various factors in skeletal muscle, including differentiation, growth, repair, and inflammation, and has associations with chronic diseases and obesity. Piceatannol, a polyphenol with a stilbene skeleton, has been found to be abundant in passion fruit seeds. Piceatannol has demonstrated health benefits, including the promotion of fat metabolism. However, its activation of SIRT1 in skeletal muscle cells and its effects have not been fully elucidated.
In our study, we used the skeletal muscle-derived C2C12 cell line to investigate the effect of piceatannol on the expression of SIRT1 and related genes. The findings indicated that piceatannol treatment led to a significant increase in SIRT1 gene expression. Our current research are focused on comparing these effects with resveratrol and assessing the impact on the expression of other related genes.

Piceatannnol, SIRT1, Mitochondria

発表責任者：田中健太（k-tanaka-bb@morinaga.co.jp）

講演番号：2D1p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D1 会場

近縁なコイとゼブラフィッシュの苦味受容体機能の比較解析
Comparative analysis of bitter taste receptor function in closely related common carp and zebrafish
○神戸 優香里、浅岡 亮太、清水 駿希、糸井川 壮大、中北 智哉、戸田 安香、石丸 喜朗（明大農）
○Yukari KAMBE, Ryota ASAOKA, Toshiki SHIMIZU, Akihiro ITOIGAWA, Tomoya NAKAGITA, Yasuka TODA, Yoshiro ISHIMARU (Meiji Univ.)

脊椎動物において、多様な化学構造を持つ苦味物質は T2R ファミリーと呼ばれる G タンパク質共役受容体によって検出される。コイ（*Cyprinus carpio*）は近縁種のゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）より 1 回多い 4 回の全ゲノム重複を経験しているが、両種の機能的 *T2R* 遺伝子数はほとんど同じである（コイ：8 種類、ゼブラフィッシュ：7 種類）。

本研究では、培養細胞発現系を用いて、コイ T2Rs（ccT2Rs）とゼブラフィッシュ T2Rs（drT2Rs）が、約 40 種類の苦味物質に対してどのような応答プロファイルを示すかを比較解析した。その結果、アミノ酸配列の相同性は約 95%と高いが、天然苦味物質 amarogentin に対して異なる応答を示す drT2Rs のペアを見出した。次に、これらの受容体間でキメラ変異体や点変異体を作製し、amarogentin に対する応答に不可欠な二つのアミノ酸残基を同定した。さらに、コイの相同な T2R においてもこれらの残基が amarogentin への応答に重要であった。以上より、amarogentin の結合部位は両種の相同な受容体間で保存されていることが示唆された。

Bitter compounds with diverse chemical structures are mediated by the T2R family of G-protein coupled receptors in vertebrate. Common carp (*Cyprinus carpio,* cc) has experienced an additional fourth round of whole-genome duplication after divergence from zebrafish (*Danio rerio,* dr) lineage. However, these species have almost the same number of intact *T2R* genes, 8 and 7*,* respectively.

In this study, we compared the response profiles of common carp T2Rs (ccT2Rs) and zebrafish T2Rs (drT2Rs) against 40 different bitter compounds using a heterologous expression system. As a result, we found a pair of highly conserved drT2Rs (95% amino acid identity) that showed different response manners against a natural bitter compound, amarogentin. Then, by performing chimeric and mutant analyses of these receptors, we identified two residues responsible for the response to amarogentin. Furthermore, mutant analyses revealed that these residues were also crucial for the response to amarogentin in ccT2R orthologs. These results suggested that the binding site of amarogentin is conserved between the orthologous receptors of two cyprinid species.

bitter taste receptor, Cyprinidae, functional analyses

発表責任者：石丸喜朗（yishimaru@meiji.ac.jp）

講演番号：2D1p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D1 会場

豆苗の再栽培環境における抗酸化作用

Antioxidant activity of pea seedling by the growing environment during re-cultivation

○鶴岡 由紀、細谷 孝博（東洋大院食環境）
○Yuki TSURUOKA, TAKAHIRO HOSOYA (Toyo Univ.)

豆苗（*Pisum sativum* L.）はエンドウの若葉で、安価でかつ高い栄養価に加え、持続的な栽培が可能である。豆苗の栄養素や機能性については、数多くの報告がある一方で、可食部を切り取り、再栽培した豆苗に関する研究報告は少ない。そこで本研究では、再栽培する際の栽培環境による機能性の変化を明らかにすることを目的とした。購入した豆苗の可食部を切り取り、再栽培する際の環境を、日中に日光が当たる室内（環境①）、日光が当たらない室内（環境②）、遮光した室内（環境③）で栽培した。それぞれの可食部をメタノールで抽出し、抽出物に対して DPPH ラジカル法による抗酸化作用を評価したところ、環境①が最も高い抗酸化作用を示した。次に豆苗に含まれる抗酸化成分を明らかにするため、活性を指標にした成分の分離および LC/MS 分析により、ケルセチン配糖体（**1**）およびケンフェロール配糖体（**2**）を抗酸化成分として推定した。環境①～③のこれら成分を比較したところ、環境②に比べ、環境①の成分 **1** は 1.6 倍、成分 **2** は 1.3 倍高含有していた。本研究では、再栽培環境により、機能性成分に差異を示すことが明らかとなった。

Pea seedlings (*Pisum sativum* L.) are young pea plants with the potential for sustainable cultivation, offering both cost-effectiveness and high nutritional value. Although numerous studies have explored the nutritional content and functionality of pea seedlings, there have been few reports on the regrowth of pea seedlings after harvesting the edible parts. Hence, this study aims to elucidate the functional changes influenced by the growing environment during re-cultivation. Edible parts of commercially acquired pea seedlings were cut and re-cultivated in three different environments: under sunlight during the day (environment 1), indoors without sunlight (environment 2), and in a shaded area (environment 3). The edible parts of each were extracted with methanol, and the antioxidant activity of the extracts was evaluated using the DPPH radical method. Environment 1 exhibited the highest antioxidant activity. Subsequently, an investigation into the antioxidant components of pea seedlings identified quercetin glycoside (**1**) and kaempferol glycoside (**2**) as potential antioxidant constituents. This determination was based on the separation of components utilizing activity as an indicator and LC/MS analysis. Comparative analysis of these components across environments 1 through 3 revealed that both component **1** and component **2** were 1.6 and 1.3 times higher, respectively, in environment 1 than in environment 2. This study highlights the variation in functional components based on the recultivation environment.

Pisum sativum L., recultivation environment, antioxidant activity

講演番号：2D1p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D1 会場

サフラン花弁抽出物の抗糖化作用および MMP 阻害作用の評価

Evaluation of the Anti-glycation and MMP Inhibition Effects of Saffron Petal Extract.

○中垣内 美里[1]、走 優名[1]、角谷 晃司[1,2] ([1]近畿大・薬学総合研、[2]近畿大・アンチエイジングセ)
○Misato NAKAGAKIUCHI[1], Yuna HASHIRI[1], Koji KAKUTANI[1,2] ([1]PRTI of Kindai Univ., [2]Anti-Aging Centers of Kindai Univ.)

【目的】サフラン（*Crocus sativus* L.）は「番紅花」とも呼ばれ、主に婦人病治療を目的として生薬製剤に配剤される世界一高価な薬用植物である。国内生産量の減少により希少な生薬であるため、我々の研究室ではサフランの室内栽培を行ない、主成分を含む雌蕊組織の生産を可能にしてきた。しかし、その際花弁組織の大量廃棄が課題となっていたため、本研究では、花弁組織に含まれる抽出成分について抗酸化作用、抗糖化作用、MMP 阻害について調査した。
【方法】本研究では、サフラン球根を 15℃、16 時間 LED 照射で栽培し、開花直後の雌蕊組織および花弁組織を回収した。花弁組織をメタノール抽出し、減圧乾固後、水に溶解したものを使用した。各抽出液の DPPH フリーラジカル消去活性、コラーゲン AGEs 抗糖化アッセイキットを用いた抗糖化作用、ゼラチンザイモグラフィーによる MMP 阻害試験を行った。
【結果・考察】花弁組織抽出物にはルチン、クエルセチン配糖体が含まれ、強い抗酸化力を示した。また、抽出物の抗糖化作用を測定したところ、AGEs の産生を抑えることが示された。中でも、花弁の成分であるルチン、クエルセチンにおいて AGEs 産生の低下が見られた。以上のことから、花弁組織は美容分野での利活用が可能になることが示された。

Saffron (*Crocus sativus* L.) is the world's most expensive medicinal herb, primarily utilized in the preparation of crude drugs for the treatment of women's health issues. A challenge arises with the large-scale disposal of petal tissue during cultivation. In this study, we investigated the antioxidant, anti-glycation, and MMP inhibition effects of the extraction ingredients from the petal tissue.

The pistil tissue and petal tissue of saffron were cultivated artificially (at 15°C with 16 hours of LED irradiation) and harvested from flowers immediately after blooming. The petal tissue was extracted with methanol, and the solution obtained after vacuum drying was dissolved in water. We examined DPPH free radical scavenging activity on the extract, anti-glycation assays using the Collagen AGEs assay kit, and MMP inhibition effects through gelatin zymography.

Rutin and quercetin glucoside were included in a petal tissue extract and exhibited strong antioxidant activity. Furthermore, inhibitory effects on AGEs production and MMP inhibition of the extract were demonstrated.

Crocus sativus, anti-glycation, MMP

発表責任者：中垣内美里（2111710047k@kindai.ac.jp）

講演番号：2D1p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D1 会場

ボイセンベリー葉抽出物が結腸がん細胞へ及ぼす細胞毒性の解析

Analysis of cytotoxic effect of Boysenberry leaf extract on colon cancer cells

○中村 聡太[1]、水木 徹[4]、三浦 健[1,2,3] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大学・生命科学、[3]東洋大・ライフイノベーション研究所、[4]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Sota NAKAMURA[1], Toru MIZUKI[4], Takeshi MIURA[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Science, Toyo Univ., [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo Univ., [4]BNERC, Toyo Univ.)

ボイセンベリーはカリフォルニア北部を原産地とする果実で、東洋大学板倉キャンパス近隣の群馬県館林市でも特産品のひとつとして生産が行われている。「バイオマスとして廃棄されているボイセンベリーの葉を有効利用する事」を目標に、その含有成分について研究を行っている。これまでの研究で、葉抽出物をヒト由来の培養細胞に添加したところ、細胞の生存率を強く低下させる効果があることを見出した。そこで本研究の目的を、ボイセンベリー葉抽出物が持つ細胞毒性およびそのメカニズム解析とした。ボイセンベリー葉が持つ細胞毒性の解析には、2 つの結腸がん細胞 (DLD-1、SW480) を用いた。フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡による多角的な解析により、葉抽出物がアポトーシスを誘導していることが示された。アポトーシス誘導について詳細に解析すべく、カスパーゼ活性、DNA の断片化の分析を行った。本発表では、それらの結果を含めて報告する。

Boysenberry is known as a hybrid of some berries. The fruits of boysenberry have some interesting phytochemicals such as anthocyanins, ellagic acid, folic acid etc. We focused not only on the fruits of boysenberry, but also on the leaves which are usually discard. In previous study, we found that the leaf extracts reduced cell viability. We aimed to analyze the cytotoxicity mechanisms of boysenberry leaf extracts on colon cancer cells.

Two colon cancer cells (DLD-1 and SW480) ware used to analyze for cytotoxicity tests. We confirmed that the leaf extracts induced apoptosis in colon cancer cells by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. We measured caspase activity and DNA fragmentation to analyze apoptosis pathway in detail. We will discuss the effect of boysenberry leaf extracts on intracellular mechanisms of colon cancer cells in this presentation.

Leaf extract, Cancer cell, cytotoxicity

発表責任者：中村聡太（s39102200232@toyo.jp）

講演番号：2D1p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D1 会場

ボイセンベリー葉抽出液の抗菌作用について
Antibacterial activity of boysenberry leaf extract

○山口 ゆい[1]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大生命科学、[2]東洋大ライフイノベーション研究所)
○Yui YAMAGUCHI[1], TAKESHI MIURA[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]Institute of life innovation Studies, Toyo Univ.)

ボイセンベリーは、アントシアニンやエラグ酸などのポリフェノールが豊富に含まれる果実である。葉においては、果実の収穫後に大量廃棄されていることが現状である。しかし、葉においてはケルセチンやエラグ酸、ケンフェロールといったポリフェノールが含有されていることが明らかとなっている(1)。ポリフェノールは、高い抗酸化作用、抗菌作用、抗がん作用を有することが報告されるとともに、化粧品や機能性食品への応用についても研究が進められている。これまでに当研究室においては、葉抽出物において、抗がん作用や抗酸化作用を有することを報告している。本研究では、葉の有効利用を目指して、葉抽出物の抗菌作用の検出などを目的とした。

葉の凍結乾燥粉末を、エタノール濃度 0～60%で葉成分抽出液を取得した。その後、減圧乾燥を行い、抽出サンプルを調製した。各サンプルの抗菌作用をペーパーディスク法により測定したところ、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Candida albicans* には抗菌作用が検出されなかったが、*Staphylococcus aureus* に対して抗菌作用を検出した。また、最も抗菌作用が高かった抽出液は 60%エタノール抽出液であり、エタノール濃度が高くなるにつれ抗菌作用は高くなった。さらに、標準平板希釈法により生菌数を測定し、生存率を算出した結果、0.1 と 1 mg/mL において明らかな抗菌作用が検出された。現在、MIC と抗酸化作用などについて測定中である。当日は、葉の有効活用について発表を行う予定である。

(1)久保村喜代子 ボイセンベリー果実及び葉の化学と生理機能評価に関する研究 2006

Boysenberry is a plant native to northern California. The leaves are discarded in large quantities after the fruit is harvested. However, boysenberry leaves have been reported to contain polyphenols. In addition, leaf extracts have been shown to possess anticancer and antioxidant action properties. The aim of this study was to analyze the antimicrobial activity of boysenberry leaf extract.

The antibacterial activity of the samples extracted at different ethanol concentrations was determined by the paper disk method, and the results showed that the extract exhibited antibacterial activity against Staphylococcus aureus. Furthermore, the number of viable bacteria was determined by the standard plate dilution method, and the survival rate was calculated. The results showed clear antibacterial activity at concentrations of 0.1and 1 mg/mL. MIC and antioxidant activity are currently being measured. On the day of the presentation, the results of the analysis of the effective use of boysenberry leaves will be included.

boysenberry, antibacterial activity, antioxidant action

発表責任者：三浦健（t-3ura@toyo.jp）

講演番号：2D1p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D1 会場

パン酵母によるエクオール代謝に関する化学的研究
Equol metabolism by baker's yeast in vitro.
○丹羽 利夫[1]、加藤 陽二[2]、横山 慎一郎[3]、大澤 俊彦[4] ([1]修文大健康栄養、[2]兵庫県大環境人間、[3]岐阜県食品科学研究所、[4]愛知学院大学健康科学)
○Toshio Niwa[1], Yoji Kato[2], Shinichiro Yokoyama[3], Toshihiko Osawa[4] ([1]Shubun Univ.., [2]Univ. of Hyogo, [3]Gifu Prefectural Research Institute for Food Sciences, [4]Aichi Gakuin Univ.)

我々はヒト腸内細菌による *in vitro* での植物ポリフェノール代謝研究過程で、カルボニル基の立体選択的還元で知られるパン酵母によるクルクミン代謝の立体選択性を明らかにした (Niwa *et al*., 2023)。そこでクルクミン以外のポリフェノールがパン酵母による代謝を受けるかについて、これまでの微生物代謝研究による知見を有するダイズイソフラボノイドについて検討することとした。

ダイズにもともと含まれるダイゼイン、ゲニステインについては反応がみられなかった。その一方においてダイゼインの腸内細菌代謝産物として知られるエクオールでは TLC 上新たな生成物がみられた。そこでこれらの化学構造を明らかにするため 100 μM の市販ラセミエクオールを含む 2 L の 10%グルコース溶液に市販パン酵母 6 g を加え、30 ℃で 3 日間培養した後、酢酸エチル抽出、分取 TLC、分取 HPLC により精製・単離を行ない、TLC 上 $FeCl_3$ と反応性を示す物質を 5.0 mg 得た。この物質について化学構造解析を行ったところ tyrosol と推測され、現在確認を進めている。このことからパン酵母はエクオール C 環の開裂をひき起こすことが示唆された。

We reported *in vitro* biological formation of octahydrocurcumin stereoisomers by baker's yeast (Niwa *et al*., 2023). In this study, we tested the metabolism of soy isoflavonoids using commercially available baker's yeast. The yeast did not make any metabolite from daidzein and genistein in the three-day incubation. However, equol made new $FeCl_3$-positive spots on TLC. To elucidate the products, six-gram yeast was added to 2 L medium that contained 10% glucose and 100 μM raceme equol. The product was isolated by EtOAc extraction, preparative TLC and preparative HPLC. Then, 5.0-mg product was isolated. From structural analyses, this isolated compound was considered as tyrosol. This result suggested that baker's yeast cleaved the C-ring of equol.

Reference
Niwa T., Kato Y., Osawa T.: Chemical and *in vitro* biological formation of octahydrocurcumin stereoisomers, and *in vitro* activity of raceme and *meso*-octahydrocurcumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **87**, 303 (2023).

Equol, metabolite, yeast

発表責任者：丹羽利夫（niwa.to@shubun.ac.jp）

講演番号：2D1p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D1 会場

茶由来サポゲニン R_1-barrigenol は PC12 細胞において酸化ストレスに対する神経保護作用を示す
Neuroprotective effect of R_1-barrigenol against oxidative stress in PC12 cells

○林 遼太郎、福光 聡、間 和彦（（株）ニップン　中研　イノベーションセンター）
○ Ryotaro HAYASHI, Satoshi FUKUMITSU, Kazuhiko AIDA (Nippn Corporation, Central Laboratory, Innovation Center)

【背景・目的】
酸化ストレスは神経変性疾患と関連しており、神経細胞のアポトーシスにおいても重要な役割を果たすことが知られている。茶(*Camellia sinensis*)に含まれるカテキンやテアニンは神経保護作用を有することが報告されているが茶に含まれるその他の成分の神経保護作用についてはほとんど報告されていない。本研究では茶に含まれる主要サポゲニンの 1 種である R_1-barrigenol (R1B) の酸化ストレスに対する神経保護作用について検討を行った。
【方法】
ラット副腎褐色腫由来 PC12 細胞に過酸化水素(100-400μM)及び R1B(5-20μM)を添加した。24 時間培養後、細胞生存率、培地中の乳酸脱水素酵素 (LDH) を評価した。
【結果・考察】
過酸化水素による細胞生存率の低下は R1B の添加によって抑制された。また過酸化水素の添加による培地中 LDH の上昇は R1B の添加によって抑制された。これらの結果は R1B が酸化ストレスに対する神経保護作用を有していることを示唆している。さらに R1B がアポトーシスに与える影響についても報告する。

[Background] Oxidative stress is associated with neurodegenerative diseases and plays an important role in neuronal apoptosis. Catechins and theanine in tea (*Camellia sinensis*) are known to have neuroprotective effects, but there are no reports on the effects of sapogenins on brain function. In this study, we investigated the neuroprotective effects of R_1-barrigenol (R1B), one of the major sapogenins in tea, against oxidative stress.
[Method] We added Hydrogen peroxide (100-400 μM) and R1B (5-20 μM) to PC12 cells, and after 24 hours of incubation, evaluated cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium.
[Result] R1B suppressed the decrease of cell viability induced by hydrogen peroxide. R1B suppressed the increase of LDH by hydrogen peroxide. These results suggest that R1B has neuroprotective effects against oxidative stress. Furthermore, we report the effect of R1B on apoptosis.

Camellia sinensis, Oxidative stress, Neuroprotective effect

発表責任者：林遼太郎（r-hayashi@nippn.co.jp）

講演番号：2D1p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 D1 会場

甘茶イソクマリン類のウイルス感染阻害活性
Inhibitory activity of isocoumarins of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* against SARS-CoV-2 infection

○矢野 明[1]、大石 智一[2]、結城 彩花[1] ([1]岩手生工研、[2]微化研)
○Akira YANO[1], Tomokazu OHISHI[2], Sayaka YUKI[1] ([1]Iwate Biotech. Res. Center, [2]Inst. Microbial Chem.)

【背景・目的】これまで我々は、農林水産物の抽出物ライブラリーから、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質と受容体 ACE2 の結合阻害素材として甘茶（*Hydrangea macrophylla* var. thunbergii、アジサイの変種）を特定し、有効成分としてイソクマリン類（hydrangenol および phyllodulcin）を見出した。本研究は、ELISA およびシュードウイルスの培養細胞感染実験系を用いて、これら成分の活性評価を目的とする。
【結果・考察】スパイクと ACE2 との結合について、ELISA により各成分の 50%阻害活性(IC_{50})を算出した。その結果、両成分ともに主に ACE2 との相互作用によりスパイクの結合を阻害する傾向を示し、IC_{50} は 200 ～600 μM と比較的高い濃度であることが示された。一方、新型コロナウイルスのスパイクを表出するシュードレンチウイルスを用い、ACE2 を発現するヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 への感染系における評価を行ったところ、100 μM 以下の濃度で強い感染阻害活性を示すことが確認された。これらの結果から甘茶イソクマリン類は、新型コロナウイルスの感染リスクを低減する機能を有する可能性が示唆された。

Introduction: We have identified “Amacha” (*Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*) as a material that inhibits the binding of the spike protein of SARS-CoV-2 to its receptor ACE2 from our extract library (extracts from agricultural, forestry, and marine products). Isocoumarins (hydrangenol and phyllodulcin) were found as active ingredients. This study aims to evaluate the activity of these components using ELISA and the infection experiments with the pseudoviruses and cultured cells.
Results and Discussion: The 50% inhibitory activity (IC_{50}) of each component was determined by ELISA for the binding of the spike to ACE2. The IC_{50} values were 200 to 600 μM. Furthermore, the isocoumarins showed strong inhibition activities at 100 μM by the infection experiments using pseudo lentivirus, which expresses the spike proteins of SARS-CoV-2, and ACE2-expressing human colon cancer-derived Caco-2 cells. These results suggest that isocoumarins of Amacha may have the potential to reduce the risk of infection with SARS-CoV-2.

Hydrangenol, Phyllodulcin, SARS-CoV-2

発表責任者：矢野　明（akiray@ibrc.or.jp）

講演番号：2D1p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 D1 会場

ケルセチン添加によりヒト骨格筋細胞は遅筋様の表現型を示す

Quercetin exhibits a slow-muscle-like phenotype in human skeletal muscle cells

○永井 研迅[1,2]、金田 喜久[1]、出雲 貴幸[1]、中井 正晃[1]、本多 裕之[2]、清水 一憲[2]([1]サントリーウエルネス株式会社 生命科学研究所、[2]名古屋大学大学院 工学研究科)
○ Akitoshi NAGAI[1,2], Yoshihisa KANEDA[1], Takayuki IZUMO[1], Masaaki NAKAI[1], Hiroyuki HONDA[2], Kazunori SHIMIZU[2] ([1]Suntory Wellness Ltd., [2]Nagoya Univ.)

【背景と目的】多様な生理作用を示すケルセチンは、骨格筋の遅筋誘導作用を示すことがマウスやマウス株化筋芽細胞 C2C12 を用いて報告されているが、ヒトやヒト細胞に対する作用は未だ明らかになっていない。本研究では、ヒト骨格筋細胞の遅筋誘導作用に対するケルセチンの影響を明らかにすることを目的とした。特に、一般的な二次元培養系での評価だけでなく、筋収縮特性が定量評価可能な独自の三次元培養系を用いた評価も行うことで、ケルセチンがヒト骨格筋細胞の表現型に与える影響を明らかにすることを試みた。
【方法と結果】二次元培養したヒト骨格筋サテライト細胞（hSkMSC）に対し、ケルセチンを添加し、分化誘導を行った。免疫染色の結果、遅筋タイプ MyHC 陽性細胞の面積が増加した。さらに、遅筋誘導因子である *Ppargc1a* の遺伝子発現が有意に増加した。次に、hSkMSC を三次元培養したヒト骨格筋組織にケルセチンを添加し、筋収縮特性を評価した。その結果、コントロール（添加なし）と比べ、Time to peak tension と Half relaxation time、筋持久力が有意に増加し、三次元培養ヒト骨格筋組織が遅筋様の表現型を示すことが明らかとなった。

Quercetin, which exhibits diverse physiological effects, has been reported to induce slow muscle in mice and murine myoblasts C2C12, but its effects on humans and human cells remain unclear. The purpose of this study was to determine the effect of quercetin on slow muscle induction in human skeletal muscle cells. In particular, we attempted to clarify the effect of quercetin on the phenotype of human skeletal muscle cells by evaluating not only the usual two-dimensional culture system, but also by using the original three-dimensional culture system that enables quantitative evaluation of muscle contraction characteristics.
Quercetin was added to human skeletal muscle satellite cells (hSkMSC) in two-dimensional culture to induce differentiation. Immunostaining showed an increased area of slow muscle type MyHC positive cells. In addition, gene expression of *Ppargc1a*, a slow muscle inducer, was significantly increased. Then, quercetin was added to human skeletal muscle tissue cultured with hSkMSCs in three-dimensional culture, and muscle contractile properties were evaluated. The results showed that quercetin significantly increased time to peak tension, half relaxation time, and muscle endurance compared to the control group, and that three-dimensional cultured human skeletal muscle tissue exhibited a slow muscle-like phenotype.

Quercetin, Three-dimensional culture, Human skeletal muscle cell

講演番号：2D2a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D2 会場

食品加工条件および胃腸消化における食用藻類由来の DPP-4 阻害ペプチドの安定性

Stability of DPP-4 inhibitory peptides from edible algae under food processing conditions and gastrointestinal digestions

○繪鳩 康太、佐藤 菜央、飯島 陽子、杉山 健二郎（工学院大）
○Kota Ebato, Nao Sato, Yoko Iijima, Kenjiro Sugiyama (The Univ. of Kogakuin)

食品に含まれるタンパク質を分解することにより生成するペプチドには、様々な健康機能性があることが明らかにされている。私たちはこれまでに、食用藻類由来のタンパク質を、食品加工用プロテアーゼにより加水分解して得られたペプチドの中に、血糖値降下作用をもつジペプチジルペプチダーゼ 4（DPP-4）阻害ペプチドが含まれていることを明らかにしている。本研究では、その DPP-4 阻害ペプチドについて，食品加工条件（熱、pH）および生体内消化に対する安定性を DPP-4 阻害活性およびペプチド量の変化から検討した。

食用藻類由来 DPP-4 阻害ペプチドについて、加熱殺菌や調理などの食品加工を想定した熱や pH に対する安定性試験を行った。その結果、DPP-4 阻害活性やペプチド量の低下は見られず、本ペプチドが熱や pH に対する安定性に優れていることが示された。また、摂取後の生体内消化を想定した消化管酵素に対する安定性試験においても同様に、本ペプチドの DPP-4 阻害活性やペプチド量の低下は見られず、胃あるいは小腸に存在する消化管酵素に対する安定性に優れていることが示された。これより、本ペプチドは *in vivo* での有効性が期待される。

Bioactive compounds in foods could have beneficial effects on human health. We previously found that proteins derived from edible algae hydrolyzed with proteases contain peptides that inhibit dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), an enzyme known to deactivate incretins, hormones involved in insulin secretion. In this study, the stability of DPP-4 inhibitory peptides identified from edible algae was evaluated under food processing conditions and gastrointestinal digestion. The results showed that the peptides exhibited excellent tolerance to various thermal and pH treatments. Furthermore, the bioactivity of the peptide was maintained after simulated gastrointestinal digestion. These results suggest that the peptide is expected to be effective *in vivo*.

DPP-4 inhibitory peptide, hypoglycemia, bioactive peptide

発表責任者：飯島陽子（st13686@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2D2a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D2 会場

フルクトース飲水摂取による膵β細胞量減少を伴った耐糖能異常の誘発

Induction of glucose intolerance with decreased pancreatic beta-cell mass by fructose water intake

○新森 耀[1]、原田 直樹[1]、杉本 圭一郎[2,4]、北風 智也[1]、乾 博[1,3]、山地 亮一[1,4]([1]阪公大院農、[2]長岡香料、[3]大手前大健栄、[4]阪公大生資センター)
○Yoh SHIMMORI[1], Naoki HARADA[1], Keiichirou SUGIMOTO[2,4], Tomoya KITAKAZE[1], Hiroshi INUI[1,3], Ryouichi YAMAJI[1,4] ([1]Grad. Sch. Agric., Osaka Metrop. Univ., [2]NAGAOKA CO., Ltd., [3]The Univ. of Otemae, [4]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Metrop. Univ.)

【目的】アジア人型２型糖尿病の研究を進める上で、飲食に起因した非肥満性の膵β細胞機能低下モデルマウスは有用である。本研究では、清涼飲料水などに添加されているフルクトースに着目し、フルクトース摂取が耐糖能と膵β細胞機能に及ぼす影響を検証した。フルクトースは大部分が腸管で代謝されるため、フルクトース摂取による膵β細胞機能低下における腸管の関与も評価した。
【方法】（実験１）4 週齢の ICR 雄マウスに①コントロール食と水道水（Cont 群）、②63%フルクトース食と水道水（Fru 食群）または③コントロール食と 10%フルクトース溶液（Fru 水群）を自由摂取させた。（実験２）4 週齢の ICR 雄マウスに、2 か月間毎日、滅菌生理食塩水（Cont 群）または 4 g/kg フルクトース溶液（*i.p.*群）をそれぞれ腹腔内投与した。
【結果・考察】（実験１）3 群間で体重に有意差はなかった。糖負荷試験において、Cont 群と比較して、Fru 水群と Fru 食群で耐糖能の悪化が認められた。一方で、インスリン感受性は 3 群間で有意差はなかった。膵β細胞量は Fru 水群で有意に減少し、この時 Ki67 陽性膵β細胞の割合が減少していたことから、膵 β 細胞量の減少は細胞増殖能の低下に起因することが分かった。（実験２）糖負荷試験で 2 群間に差はなく、*i.p.*群でインスリン抵抗性が生じた。膵β細胞量および Ki67 陽性膵β細胞の割合は 2 群間で差はなかった。以上の結果から、フルクトースの飲水摂取は、膵β細胞量の減少を伴う耐糖能不全を誘発することが判明し、それが腸管を介して引き起こされることが示唆された。
【Objectives】A mouse model of non-obese pancreatic β-cell dysfunction induced by food or drink is useful for studying Asian type of type 2 diabetes. We examined the effects of fructose intake on glucose tolerance and pancreatic β-cell function in mice.
【Methods】 (Exp. 1) Four-week-old male ICR mice were fed (i) control diet and tap water (Cont), (ii) 63% fructose diet and tap water (FD), or (iii) control diet and 10% fructose water (FW) ad libitum for 2 months. (Exp. 2) Four-week-old male ICR mice were administered (I) sterile saline (Cont) or (II) 4 g/kg fructose (IP) intraperitoneally daily for 2 months.
【Results】(Exp. 1) Glucose intolerance was induced both in glucose tolerance. The pancreatic β-cell mass was decreased in FW group. (Exp. 2) There were no differences in glucose tolerance and pancreatic β-cell mass between the two groups. These results indicate that fructose water intake induced glucose intolerance with decreased pancreatic β-cell mass, which may be induced via gut.

fructose, pancreatic ß-cell, glucose intolerance

発表責任者：原田　直樹（naoki.harada@omu.ac.jp）

講演番号：2D2a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D2 会場

Apilactobacillus kosoi 死菌体の経口摂取による肥満抑制メカニズムについて
Mechanism of obesity suppression by oral intake of *Apilactobacillus kosoi* inactivated cells
○邱 泰瑛[1]、森山 五月[2]、松山 静香[2]、高橋 知也[2]([1]北見工大、[2]アルソア R&D)
○ Tai-Ying CHIOU[1], Satsuki MORIYAMA[2], Shizuka MATSUYAMA[2], Tomoya TAKAHASHI[2]
([1]Kitami Inst. of Tech., [2]ARSOA R&D Cent.)

野菜高糖発酵液（通称：酵素液）は日本の伝統発酵食品の一種であり、自然発酵により作られるため、原料に使用する多種の野菜等に由来する多様な細菌叢を有している。*Apilactobacillus kosoi*（*A. kosoi*）はその自然発酵条件下の最優勢菌種であり、死菌体（加熱殺菌菌体）が高い腸管免疫賦活作用を示すことが報告されている。先行研究において、高脂肪食摂取肥満マウスモデルを用いた肥満抑制効果の検証を行った結果、*A. kosoi* の死菌体摂取により肥満現象が緩和され、さらに、血清中性脂肪の低下傾向および臓器脂肪重量の低下傾向を認めた。本研究では、肝臓での脂質代謝に着目し、関連遺伝子の発現解析を行った。また、腸内細菌叢や糞便中の短鎖脂肪酸と肥満現象との関連性が報告されていることから、マウス糞便の細菌叢及び短鎖脂肪酸の解析を行った。脂質代謝関連遺伝子発現解析の結果、*A. kosoi* 死菌体の経口摂取により脂肪酸合成経路の抑制傾向が認められ、一方、分解経路への明確な作用は認められなかった。さらに、*A. kosoi* 死菌体の経口摂取による糞便中のギ酸、酪酸及びイソ酪酸濃度の有意な増加を確認した。*A. kosoi* 摂取は腸内細菌叢や短鎖脂肪酸濃度を変化させ、高脂肪食摂取により誘発される肥満を抑制する可能性が示唆された。

The high-sugar vegetable fermentation liquid, commonly known as “Kôso”, is a traditional fermented food in Japan produced through natural fermentation. It possesses a diverse microbial community derived from various vegetables and other raw materials. *Apilactobacillus kosoi* (*A. kosoi*) is the predominant bacterial species under the natural fermentation condition, and it has been reported that the ingestion of its inactivated cells (heat-killed bacterial cells) exhibits a potent intestinal immune-activating effect. In a previous study, the anti-obesity effects were examined using a high-fat diet-induced obese mouse model, revealing that the consumption of *A. kosoi* inactivated cells alleviated obesity symptoms. Furthermore, a tendency of decreased serum triglycerides and organ fat weight was observed. This current study focuses on lipid metabolism in the liver, conducting expression analysis of related genes. Considering the reported association between gut microbiota, short-chain fatty acids in feces, and obesity, analyses of mouse fecal microbiota and short-chain fatty acids were performed. The results of the expression analysis of lipid metabolism-related genes showed a tendency of inhibition in the fatty acid synthesis pathway with oral intake of *A. kosoi* inactivated cells. However, there was no clear effect observed on the degradation pathway. Furthermore, a significant increase in the concentrations of formic acid, butyric acid, and isobutyric acid in feces was confirmed through oral intake of *A. kosoi* inactivated cells. *A. kosoi* intake was found to alter the gut bacterial community and the concentration of short-chain fatty acids, suggesting the potential to suppress obesity induced by a high-fat diet.

Apilactobacillus kosoi, anti-obesity effects, short chain fatty acids

発表責任者：邱泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2D2a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D2 会場

バレレン酸とその類縁体が脂肪細胞と 2 型糖尿病モデルマウスに与える影響

Effect of valerenic acid and its analogs on adipocytes and type 2 diabetic mice

○信平 真奈、只石 幹、小西 良子、服部 一夫 (東農大応生)
○ Mana NOBUHIRA, Miki TADAISHI, Yoshiko SUGITA-KONISHI, Kazuo KOBAYASHI-HATTORI (Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

我々は以前に、セイヨウカノコソウ（*Valeriana officinalis*）根の抽出物に特徴的に含まれるバレレン酸 (VA) が 3T3-L1 細胞の分化を促進し、アディポネクチンの産生を高めたことを示した (Harada et al. Plant Foods Hum Nutr 2020, Takahashi et al, ACS Omega 2022)。本研究では、VA とその類縁体であるヒドロキシバレレン酸 (HVA) とアセトキシバレレン酸 (AVA) に着目し、これらが脂肪細胞に与える影響を調べた。さらに、2 型糖尿病モデルマウス (KK-A^y) を用いて、in vivo での抗糖尿病効果についても検討した。3T3-L1 細胞の分化誘導時に 1, 10, 100 μM の VA, HVA, AVA を 8 日間添加後、Oil red O 染色を行った。その結果、VA では 10 μM と 100 μM で、HVA と AVA では 100 μM において、分化の促進と有意な脂肪蓄積量の増加が認められた。次に、分化に関与する因子 (PPARγ, C/EBPα) とインスリン抵抗性の改善に関与するアディポネクチンの mRNA 発現量を qPCR により測定した。その結果、PPARγ と C/EBPα においてコントロールと 3 成分の間に有意差はなかったが、HVA, AVA と比べて VA は 100 μM においてこれらの mRNA レベルを増加する傾向であった。また、アディポネクチンの mRNA 発現量は、VA (100 μM) のみで有意に増加した。これらの結果から、類縁体と比較して VA が糖尿病に対して効果が期待できると考えた。現在、VA を経口投与した KK-A^y マウスを用いて、in vivo での抗糖尿病作用を調べているところである。

We previously showed that valerenic acid (VA), which is characteristically contained in extract of *Valeriana officinalis* root, promoted the differentiation and adiponectin production in 3T3-L1 cells (Harada et al. Plant Foods Hum Nutr 2020, Takahashi et al, ACS Omega 2022). In this study, we focused on VA and its analogs, hydroxyvalerenic acid (HVA) and acetoxyvalerenic acid (AVA), and examined the effects of the compounds on adipocytes and in vivo anti-diabetic effects using type 2 diabetic model KK-A^y mice. In 3T3-L1 cells, Oil red O staining showed VA (10 and 100 μM), HVA (100 μM), and AVA (100 μM) significantly increased fat accumulation. In the mRNA level of PPARγ and C/EBPα that relate to adipocyte differentiation, no significant difference was observed between the control and the three components, but VA tended to increase their mRNA levels more than HVA and AVA at 100 μM. In addition, only VA (100 μM) significantly increased the mRNA level of adiponectin that improves insulin resistance. These results suggest that VA may be the most effective component against diabetes compared to its analogs. Currently we are studying whether VA has anti-diabetic effects using type 2 diabetic model KK-A^y mice orally administered with VA.

Valerenic acid, Diabetes, Adipocytes

講演番号：2D2a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D2 会場

3T3-L1 細胞におけるポリメトキシフラボノイドによる脂質生成および脂質生成遺伝子発現の制御
Regulation of adipogenesis and key adipogenic gene expression by polymethoxyflavonoids in 3T3-L1 cells

○木本 幸伸[1]、杉山 実希[1]、河野 良平[2]、宇都宮 洋才[2]、奥野 祥治[1]([1]和歌山高専、[2]大阪川崎リハ大)
○Koshin KIMOTO[1], Miki Sugiyama[1], Ryohei KONO[2], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2], Yoshiharu OKUNO[1] ([1]Nat. Inst. Tecnol., wakayama college, [2]Osaka kawasaki Rihabilitation)

肥満は高血圧、動脈硬化、糖尿病を引き起こす最大の原因とされており、抗肥満効果を有する化合物について多くの研究がなされている。柑橘類の特徴的な成分であるポリメトキシフラボノイドは、抗肥満効果を持つ化合物として注目されており、それらをリード化合物とした機能性物質の生産報告もされている。我々の研究室では、新規機能性物質の生産を目的として、生体触媒を用いたポリメトキシフラボノイドの変換反応と変換生成物の機能性ついての研究を行っている。これまでに植物由来ポリメトキシフラボノイドの一種である 5,7,4′-trimethoxyflavone (**1**)、3,5,7,4′-tetramethoxyflavone (**2**)の糸状菌 *Aspergillus niger* による生物変換を行い、両化合物とも 4’位のメトキシ基に位置特異的 O-脱メチル化が進行しており、それぞれ 4′-hydoroxy-5,7-dimethoxyflavone (**1M**)および 4′-hydroxy-3,5,7-trimethoxyflavone (**2M**)へと変換されることを見出し、これらが 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制することを報告している。本研究では、これら 4 種のポリメトキシフラボノイドの 3T3-L1 脂肪細胞に対する抗肥満効果についてさらなる検討を進めた。

4 種のポリメトキシフラボノイドの 3T3-L1 脂肪細胞に対する脂肪分解試験を行った結果、**1** および **1M** が強い脂肪分解を示した。現在、脂肪蓄積の機構解明のため脂肪蓄積にかかわるグリセロール 3-リン酸脱水素酵素(GPDH)の活性測定および各種遺伝子の発現解析を進めている。

Obesity is considered the causes of hypertension, arteriosclerosis, and diabetes, and many studies of compound with anti-obesity activity have been conducted. Polymethoxyflavonoids (PMFs) which are known characteristic component included in citrus are focus on compounds with anti-obesity effect, and reported that produce of new functional compounds as lead compound on PMFs. In our laboratory, we research that biotransformation of PMFs with biocatalyst and these metabolites functionality. In our previous study, 5,7,4′-trimethoxyflavone (**1**) and 3,5,7,4′-tetramethoxyflavone (**2**) was regioselective transformed to 4′-hydoroxy-5,7-dimethoxyflavone (**1M**) and 4′-hydroxy-3,5,7-trimethoxyflavone (**2M**) by *Aspergillus niger*, and these compounds showed the lipid accumulation inhibitory activity on 3T3-L1 adipocytes. In this study, we will further investigate the anti-obesity effects of these compounds **1**-**2M** .

In the result of lipolysis assay with 3T3-L1 adipocytes, compounds **1** and **1M** is strongly enhance lipolysis. To elucidate the mechanism of lipid accumulation, effect of glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and key adipogenic genes expression will be investigate.

polymethoxyflavonoid, anti-obesity, adipogenesis

講演番号：2D2a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D2 会場

スルフォラファンの新規結合分子の探索とその機能解析
The exploration and functional analysis of new binding molecules of sulforaphane
小高 愛未[1]、○川平 浩太朗[2]、菊地 瑛登[2]、正路 健太[2]、石神 健[3]、鈴木 司[1,2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2] ([1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化、[3]東農大・生命)
Manami KODAKA[1], ○Kotaro KAWAHIRA[2], Akito KIKUCHI[2], Kenta SHOJI[2], Ken ISHIGAMI[3], Tsukasa SUZUKI[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric, [2]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric., [3]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】これまで私たちは、脂質代謝調節において中心的な役割を担っている転写因子である SREBP 活性を抑制する食品成分としてスルフォラファン (SFaN)を見出している。さらに、すでに明らかになっている SFaN の作用機序と異なり、SFaN が Keap1-Nrf2 経路を介さず SREBP の分解を亢進させることによりその活性を抑制することや肥満抑制効果を示すことを明らかにした。このことから、SFaN にはまだ明らかになっていない新たな標的因子が存在するのではと考え、本研究では SFaN と結合する新たな標的因子を見付け、SFaN がその因子へもたらす影響を解析することを目的とした。
【方法】まず SFaN のスルホキシド側にアルキン構造を持たせた SFaN 誘導体を有機合成した。合成した SFaN 誘導体のアルキンとアジドビーズのアジド基をクリックケミストリーにて結合させ、SFaN 誘導体ビーズを作製した。ヒト肝癌由来細胞 Huh-7 の細胞溶出液に SFaN 誘導体ビーズを加えて pull down し、SFaN 誘導体に結合したタンパク質を質量分析に供することで結合候補分子を探索した。
【結果】質量分析にて検出された多くの結合候補分子の中から、私たちは Acyl-Protein Thioesterase 2 (APT2)に注目した。変異体 APT2 発現プラスミドを作製し解析した結果、APT2 は 56 番目の Cys を介して SFaN と結合していることが示唆された。また、SFaN によって APT2 のパルミトイル化が減弱し、細胞膜の APT2 が減少することを示した。現在、SFaN が APT2 のパルミトイル化を変化させることによる生体への影響についてより詳細な解析を行っている。

We have found sulforaphane (SFaN) as a food ingredient that suppresses SREBP activity. Furthermore, we identified that SFaN degrades SREBP proteins without the Keap1-Nrf2 pathway. In this study, we searched for new molecules that bind to SFaN and analyzed the effect of SFaN on that molecule.
First, we synthesized an SFaN derivative having an alkyne structure on the sulfoxide side of SFaN. The SFaN derivative and the azide beads were bonded by click chemistry to prepare SFaN derivative beads. SFaN derivative beads were added to the cell lysate of Huh-7 cells and pulled down.
As a result, we focused on Acyl-Protein Thioesterase 2 (APT2). We suggested that APT2 binds to SFaN via the Cys 56. We also showed that SFaN attenuates the palmitoylation of APT2. Currently, we are analyzing in more detail the biological effects of SFaN altering the palmitoylation of APT2.

sulforaphane, SREBP, post translational modification

発表責任者：井上 順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：2D2a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D2 会場

スルフォラファンによる脂肪滴局在タンパク質 PLIN2 への作用の解析
Analysis of the effect of sulforaphane on the lipid droplet localization protein PLIN2
○藤枝 駿介[1]、小高 愛未[2]、正路 健太[1]、石神 健[3]、鈴木 司[2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]([1]東農大院・応生科・農化、[2]東農大・応生科・農化、[3]東農大・生命)
○ Shunsuke FUJIEDA[1], Manami KODAKA[2], Kenta SHOJI[1], Ken ISHIGAMI[3], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Chem. Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】我々はこれまでにスルフォラファン（SFaN）誘導体ビーズを作製し、SFaN に結合する候補因子の同定を行ってきた。本研究では、脂肪滴局在タンパク質 Perilipin 2(PLIN2)に注目した。PLIN2 は脂肪滴表面に局在し、脂肪滴を分解から保護する役割を持つ。SFaN と PLIN2 の結合様式および SFaN が PLIN2 へ及ぼす影響について解析することを本研究の目的とした。
【方法】HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した PLIN2 発現プラスミドをトランスフェクションした後 100μM SFaN で 3 時間処理し、イムノブロットにより発現レベルを検討した。次に SFaN による PLIN2 タンパク質レベルの変化が、プロテアソーム阻害剤である MG132 処理により影響を受けるか検討した。また、ユビキチン発現プラスミドを同時にトランスフェクションし、FLAG 抗体により免疫沈降を行い、PLIN２のポリユビキチン化レベルを測定した。さらに SFaN 処理によりそのレベルが変動するか検討した。最後に PLIN2 ポリユビキチン化において重要である N 末端を欠損させた PLIN2ΔN を作製し、SFaN および MG132 処理による発現レベルを検討した。
【結果】PLIN2 のタンパク質レベルは SFaN 添加によって低下し、その低下はプロテアソーム阻害剤 MG132 によって一部抑制された。また、SFaN 処理は PLIN2 のポリユビキチン化を促進させた。さらに、PLIN2 の N 末端を欠損させた変異体では、SFaN および MG132 による発現レベルの変化は見られなくなった。以上の結果から SFaN は PLIN2 のポリユビキチン化を促進させ、プロテアソーム経路によるタンパク質分解を促進させることが明らかになった。現在、PLIN2 発現レベルの低下が及ぼす脂肪滴への影響について解析を行っている。

We have previously prepared sulforaphane (SFaN) derivative beads and focused on a candidate factor, perilipin 2 (PLIN2), which binds to SFaN. The purpose of this study was to analyze the binding mode of SFaN to PLIN2 and the effect of SFaN on PLIN2. Protein levels of PLIN2 were reduced by SFaN addition, and the reduction was partially inhibited by the proteasome inhibitor MG132. SFaN treatment also promoted polyubiquitination of PLIN2. Furthermore, mutants lacking the N-terminus of PLIN2 showed no change in expression levels by SFaN and MG132. These results indicate that SFaN promotes polyubiquitination of PLIN2 and proteolysis by the proteasome pathway. We are currently analyzing the effects of reduced PLIN2 expression levels on lipid droplets.

Sulforaphane, Perilipin 2, Proteasomal degradation

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：2D2a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D2 会場

スルフォラファンによる腸内細菌叢の変化と抗肥満作用への影響
Sulforaphane-induced changes in gut microbiota and its influence on anti-obesity effects.
○和田 美沙希[1]、多田 しおり[2]、小高 愛未[1]、藤巻 貴宏[1]、鈴木 司[1]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2] ([1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化)
○Misaki WADA[1], Shiori TADA[2], Manami KODAKA[1], Takahiro FUJIMAKI[1], Tsukasa SUZUKI[1], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】スルフォラファン（SFaN）はブロッコリー由来の成分であり、抗がん作用や抗炎症作用などの様々な生理作用を持つことが知られている。我々はこれまでに、肥満モデルマウスへの SFaN 混餌が抗肥満作用を発揮することや、その時に腸内細菌叢が変化していることを明らかにしてきた。さらに、SFaN 混餌による抗肥満作用は、抗生剤投与により増強することを 2022 年度大会で発表した。本研究では、抗生剤による SFaN 抗肥満作用の増強メカニズムの解明を目指し、これらマウスの血中 SFaN レベルや腸内細菌叢の変化を解析した。
【方法】雄性 C57BL/6J マウス（6 週齢）に高脂肪食を約 7 週間与えた後に 6 群に分け、高脂肪食のみもしくは SFaN を 0.1% (w/w)含む高脂肪食、さらにそれぞれに抗生物質 Vancomycin もしくは PolymixinB のいずれかを 14 週間与えた。SFaN 混餌開始後 80 日目の糞を回収し、糞抽出物の 16S メタゲノム解析により菌叢の変化を検討した。また同糞便サンプルと飼育終了後の血液中の SFaN 量を LC/MS を用いて測定した。
【結果・考察】PolymixinB や Vancomycin 投与によって腸内細菌叢の変化が検出され、抗生剤が作用していることが確認された。また、SFaN 混餌による腸内細菌叢の変化は抗生剤投与群においても観察されたが、抗生剤の種類によって変化する菌種が異なっており、PolymixinB 投与群においては Bacillota/Bacteroidetes 比の減少をはじめとする菌叢変化が検出された。血中 SFaN 濃度は、最も抗肥満作用が増強された Vancomycin 投与群で顕著に低下した。糞中 SFaN 排泄量は抗生剤投与によって変化しなかった。以上の結果より抗生剤投与による SFaN の抗肥満作用の増強は体内への SFaN の吸収促進ではなく、腸内細菌叢の変化が寄与することが示唆された。
Sulforaphane (SFaN) is derived from broccoli and has physiological activities such as anticancer and anti-inflammatory effects. We have previously reported that dietary SFaN exhibits an anti-obesity effect and alters gut microbiota. In addition, the anti-obesity effect of dietary SFaN is enhanced by the administration of antibiotics. In this study, we analyzed changes gut microflora and circulating SFaN levels in these mice to elucidate the mechanism of enhancement of SFaN anti-obesity effects by antibiotics. Changes in gut microbiota due to dietary SFaN were also observed in the antibiotic-treated group. Blood SFaN levels were significantly lower in the Vancomycin-treated group, which had the most potent anti-obesity effect. The enhancement of the anti-obesity effect of SFaN by antibiotic treatment may be contributed by changes in gut microbiota.

sulforaphane, gut microbiota, anti-obesity

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：2D2a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D2 会場

小麦タンパク質による腸内細菌叢と代謝恒常性への影響に関する研究

Effect of wheat protein on the gut microbiota and metabolic homeostasis

○渡邉 沙耶、羽石 悠里、宮本 潤基（東農工大院農）
○Saya WATANABE, Yuri HANEISHI, Junki MIYAMOTO (Tokyo Univ Agr & Technol)

近年の腸内細菌研究の発展に伴い、様々な病態と腸内細菌の関連が科学的根拠に基づいて明らかにされている。様々な外的因子によって腸内細菌の構成に大きく影響するが、食事による栄養環境の変化は強力に腸内細菌叢の構成を変化させ、様々な病態の発症に関与することも明らかにされており、食事中のタンパク質においても腸内環境に影響を与えることが示されている。特に、小麦タンパクに含まれるグリアジンの過剰な摂取が消化関連疾患や肥満症状を憎悪する可能性が示唆されているが、その詳細な分子機序は明らかになっていない。そこで、本研究では、グリアジンの過剰摂取が腸内細菌と生体へ及ぼす影響に着目して検討した。その結果、グリアジン投与によって腸内細菌叢の構成の変化や消化管を起点とした炎症応答が惹起することが明らかになり、タンパク質の質的な違いが腸内細菌の構成の変化を促し、生体恒常性に関与する可能性が示唆された。今後、小麦タンパク質と腸内細菌の関連を詳細に解明することによって、腸内細菌を標的とした新しい機能性食品の開発に繋がることが期待される。

Gut microbiota has been proposed to be involved in the host homeostasis. Diet is the primary factor in host nutrition and metabolism; however, the intake of various diets results in changes in gut-microbial composition, as well as changes in microbial diversity and specific bacterial taxa. Although wheat is a common cereal in the Western diet and an important source of protein and fiber, the excess intake of gliadin, which is included in wheat protein, is considered the greatest risk factor in the development of intestinal inflammation by modulating gut microbiota. Here, we investigated the effects of gliadin intake on the gut microbiota and host homeostasis. The intake of excess gliadin induced changes in gut microbial compositions and diversity, and aggravated intestinal inflammation. These results suggested that the intake of different proteins in diets may promote changes in the gut microbial compositions and may play a role in host homeostasis. Our findings shed light on the regulation of host homeostasis and the development of novel functional foods by targeting the gut microbiota.

gliadin, gut microbiota, inflammation

発表責任者：宮本潤基（m-junki@go.tuat.ac.jp）

講演番号：2D2a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D2 会場

加齢に伴う栄養感受性変化と生体エネルギー代謝調節に関する研究

Nutritional signaling via GPCRs and energy homeostasis on aging

○長谷川 真由[1]、五十嵐 美樹[2]、宮本 潤基[1]、木村 郁夫[3]([1]東京農工大学農学府大学院、[2]脳神経疾患研究所、[3]京都大学生命科学研究科大学院)
○MAYU HASEGAWA[1], MIKI IGARASHI[2], JYUNKI MIYAMOTO[1], IKUO KIMURA[3] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Institute of Neurological Disorders, [3]Kyoto University)

生体の代謝恒常性維持に重要な栄養シグナルは、加齢に伴って減衰することが知られており、加齢を起因とする代謝性疾患の一因である可能性が考えられる。従って、栄養センシングやそのシグナル伝達経路を明らかにすることは加齢関連疾患の予防法や治療法の開発に必要不可欠である。特に G タンパク質共役受容体の一つである長鎖脂肪酸受容体の GPR40 と GPR120 は、食用油を構成する長鎖脂肪酸の感知に関わることが知られており、生体エネルギー恒常性維持に重要な役割を果たしている。そこで本研究では、加齢に伴う長鎖脂肪酸受容体の機能変化が代謝恒常性に与える影響を調べることを目的として、野生型あるいは長鎖脂肪酸受容体遺伝子欠損の若齢マウスと加齢マウスにおける食用油摂取時の代謝機能変化について検討を行った。結果、野生型マウスの加齢時特異的に観察された食用油摂取に対する応答性変化が、長鎖脂肪酸受容体遺伝子欠損マウスにおいても類似した傾向を確認した。従って、加齢に伴う栄養センシングの変化が長鎖脂肪酸受容体を介して、代謝恒常性に影響を及ぼすことが示唆された。今後、更なる研究によって、高齢者における食用油に対する感受性低下回復、そして健康増進や寿命延伸の実現に繋がる知見の提供が期待される。

Nutritional signaling plays an important role in maintaining energy homeostasis. However, the response, which is gradually attenuated along with aging, leads to various chronic diseases including metabolic disorders. Long-chain fatty acid (LCFA) receptors GPR40 and GPR120, as dietary lipid sensing receptors, maintain energy homeostasis. Here, we investigated the influence of dietary lipid and LCFA receptors on energy homeostasis with aging by using GPR40/120 double mutant (DKO) mice under high-fat diet (HFD) loading by comparison between young and aged mice. We found that GPR40/120DKO mice, not only aged but also young mice, under HFD loading exhibit metabolic phenotypes similar to wild-type aged mice. These results may provide novel insight for the further understanding of the molecular mechanism among diet, nutrition, and aging and contribute to preventive and preemptive medicine.

Aging, dietary lipid, GPCR

発表責任者：宮本潤基（m-junki@go.tuat.ac.jp）

講演番号：2D2a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 D2 会場

中鎖脂肪酸-GPR84 シグナルによる代謝恒常性維持機構の解明

The role of the medium-chain fatty acid receptor in metabolic homeostasis

○大植 隆司[1,2]、木村 郁夫[1,2,3] ([1]京大院生命、[2]京大院薬、[3]東農工大院農)
○Ryuji Ohue[1,2], Ikuo Kimura[1,2,3] ([1]Kyoto Univ., Grad. Sch. of Biostudies, [2]Kyoto Univ., Grad. Sch. of Pharm. Sci., [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

食事療法による代謝性疾患の予防・改善の観点から、機能性脂肪酸による代謝改善作用が注目され、食用油由来脂肪酸の重要性が指摘されている。実際に、食由来脂肪酸やそれらの生体内代謝物が、単にエネルギー基質として利用されるだけでなく、生体内の受容体を介して様々な細胞内プロセスに関与するシグナル分子として作用することが明らかになっている。近年、中鎖脂肪酸(MCFA)を構成脂肪酸とする中鎖脂肪酸油(MCT)が、抗肥満効果や代謝機能改善作用を示すことがわかってきた。一方、MCFA の生体内受容体として GPR84 が示唆されている。ところが、生理的条件下における内因性 MCFA の血中濃度はきわめて低値であり、GPR84 の機能発現に至らないと考えられていたことから、これまで生体内における GPR84 の生理的意義の詳細は明らかにされていなかった。本研究では GPR84 の機能解析を行う一環として、野生型及び *Gpr84* 遺伝子欠損マウスを対象に GPR84 が代謝表現型に及ぼす影響を評価した。その結果、高脂肪食摂取に伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の発症制御における内因性 MCFA-GPR84 シグナルの病態生理学的意義が明らかとなり、MCFA や MCT 摂取が NASH の予防・改善に寄与する可能性を示した。本研究成果は、GPR84 を標的とした新規代謝性疾患治療薬や機能性食品の開発、さらには食事介入を通じた NASH に対する予防医学への応用につながることが期待できる（Ohue-Kitano *et al.*, JCI Insight, 2023）。

Dietary interventions are expected to help prevent and improve metabolic disorders, highlighting the importance of functional fatty acids from edible oils. Medium-chain triglycerides (MCTs), composed of medium-chain fatty acids (MCFAs), are dietary fats with several health benefits. MCFAs have been suggested to have the potential to act as signaling molecules, thereby improving metabolism. GPR84 acts as a receptor for MCFAs. However, GPR84 is currently classified as an orphan receptor and the specific mechanisms involved in nutritional signaling of endogenous and dietary MCFAs by GPR84 remain unclear. Here, we have elucidated the pathophysiological significance of endogenous MCFA-GPR84 signaling in controlling high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and demonstrated the potential contribution of MCFA and MCT intake to the prevention and amelioration of NASH. These findings provide insights into the development of novel GPR84-targeted therapeutics for metabolic disorders, functional foods, and the application of preventive medicine against NASH through dietary intervention.

medium-chain triglycerides, GPR84, non-alcoholic steatohepatitis

講演番号：2D2a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 D2 会場

遺伝的メタボリック症候群モデル動物におけるビタミンＥ代謝変動

Metabolic kinetics of vitamin E in an animal model of genetic metabolic syndrome

○池田 彩子[1]、田路 莉子[2]、三澤 莉帆[2]、小林 美里[1]、阪野 朋子[3]、金 東浩[2]、佐伯 茂[2]([1]名古屋学芸大、[2]大阪公大、[3]名古屋女短大)
○Saiko IKEDA[1], Riko TOJI[2], Riho MISAWA[2], Misato KOBAYASHI[1], Tomoko BANNO[3], DongHo KIM[2], Shigeru SAEKI[2] ([1]Nagoya Univ Arts Sci, [2]Osaka Metropolitan Univ, [3]College Nagoya Women's Univ)

【目的】脂肪蓄積に伴う酸化ストレスは、脂質の過酸化や炎症を誘導し、メタボリック症候群(MetS)の進展を惹起する。脂質抗酸化能を有するビタミン E は、MetS の発症予防と改善に寄与すると期待されるが、MetS におけるビタミン E 動態の詳細は不明である。MetS モデル動物である OLETF ラットは、高週齢(25 週齢以降)で MetS を自然発症する。私たちは、MetS 発症の引き金となるビタミン E 代謝異常を捉えることを目的に、若週齢 OLETF のビタミン E の代謝動態を検討した。
【方法と結果】5 週齢の雄性 OLETF ラットと対照 LETO ラットを、*RRR*-α-トコフェロール(αT)をビタミン E 源とする AIN-93 準拠飼料で 2 週間飼育したところ、尿中 8-OHdG 排泄量は OLETF ラットで有意に増加し、肝臓αT 濃度は OLETF ラットで有意に低下した。小腸αT トランスポーターである NPC1L1 や ABCA1 の mRNA レベルはラット間に差がなかった。肝臓αT はα-TTP によって膜間輸送され、ABCA-1 を介して VLDL に取り込まれ肝外組織に輸送される。肝臓α-TTP と ABCA-1 mRNA 発現量は、OLETF ラットで有意に増加した。肝臓から放出されたαT は主に脂肪組織に蓄積するが、脂肪組織αT 濃度は OLETF ラットで低下した。また、肝臓αT は、肝臓 CYP4F サブファミリーによってαCEHC に代謝され尿中に排泄される。OLETF ラットでは CYP4F5 mRNA 発現量が有意に増加したが、尿中αCEHC 排泄量は低下した。また肝臓αT の一部は SR-BI を介して胆汁中に排泄されるが、肝臓 SR-BI mRNA レベルはラット間に差がなかった。
【結論】MetS 発症の遺伝的素因を有する OLETF ラットでは、酸化ストレスの亢進に伴い、MetS 発症前の若週齢時に既にαT 消費量が亢進し、体内貯蔵量が低下していると考えられた。

Metabolic syndrome (MetS) is associated with increased oxidative stress. Vitamin E has been expected to exert beneficial effects in MetS patients. The present study aimed to investigate the metabolic kinetics of vitamin E in young OLETF rats before the onset of MetS compared to LETO rats as a control strain. Urinary excretion of 8-OHdG, a biomarker of oxidative stress, was higher in OLETF rats than in LETO rats. Hepatic α-tocopherol concentration and urinary excretion of the metabolite of α-tocopherol, α-CEHC, were lower in OLETF rats than in LETO rats. Hepatic mRNA levels of α-TTP and ABCA1 involved in the transport of α-tocopherol from the liver to peripheral tissues were higher in OLETF rats than in LETO rats. These findings show that, in young OLETF rats with a genetic predisposition to MetS, the body stores of αT were decreased due to the increased requirements associated with increased oxidative stress.

vitamin E metabolism, metabolic syndrome, OLETF rat

講演番号：2D2a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 D2 会場

β-アドレナリン刺激に対する応答性を指標とする UCP1 発現調節遺伝子の探索および評価
Screening and evaluation of β-adrenergic stimulation inducible UCP1 expression regulatory genes

○川原崎 聡子[1]、瀬尾 茂人[2]、岡松 優子[3]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,4]、神戸 大朋[5]、木村 和弘[3]、斉藤 昌之[3]、松田 秀雄[2]、井上 和生[1,4]、後藤 剛[1,4]（[1]京大院農・食品生物、[2]阪大院情報・バイオ情報工学、[3]北大院・獣医、[4]京大・C-PIER・生理化学 U、[5]京大院生命・統合生命）
○Satoko KAWARASAKI[1], Shigeto SENOO[2], Yuko OKAMATSU[3], Haruya TAKAHASHI[1], Wataru NOMURA[1,4], Taihou KAMBE[5], Kazuhiro KIMURA[3], Masayuki SAITO[3], Hideo MATSUDA[2], Kazuo INOUE[1,4], Tsuyoshi GOTO[1,4] ([1]Kyoto Univ. Agriculture, [2]Osaka Univ. Information, [3]Hokkaido Univ. Veterinary, [4]Kyoto Univ. C-PIER, [5]Kyoto Univ. Biostudies)

【目的】脂肪組織のミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質 1 (UCP1) はエネルギー消費に寄与するため肥満治療の標的として注目されている一方、肥満によりβ-アドレナリン受容体 (β-AR) 刺激応答性の UCP1 発現誘導効果が減弱することが知られている。本研究ではβ-AR 刺激応答性 UCP1 発現誘導の調節に寄与する遺伝子の探索および評価を行った。
【方法・結果】分泌型ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とする UCP1 レポーター細胞株に対して CRISPR/Cas9 ノックアウトガイド RNA (gRNA) ライブラリーを導入し、β-AR アゴニスト isoproterenol (iso) 処理前後の培養上清のルシフェラーゼ活性を測定したところ、一部の細胞集団において iso への応答性が上昇した。その細胞集団に含まれる gRNA を次世代シーケンス解析により検出したところ、ヒドロキシカルボン酸受容体 1 (HCAR1) が候補遺伝子として見出された。褐色脂肪組織由来細胞株に対して HCAR1 アゴニスト 3,5-dihydroxybenzoic acid (DBA) と iso を共添加したところ、iso による *Ucp1* 発現誘導効果が減弱した。この時、細胞破砕液中の cAMP および転写因子 CREB のリン酸化が有意に減少した。また動物個体において、DBA を投与した C57BL/6 マウスではβ3-AR アゴニスト CL316,243 投与時の直腸温の上昇が有意に抑制された。
【結論】スクリーニングにより見出された *Hcar1* はβ-AR シグナル活性調節を介して *Ucp1* の転写および活性を調節することが示唆された。

Obesity suppresses the β-AR signal intensity and response to *Ucp1* inductive stimuli. In this study, we established a UCP1-reporter preadipocyte line using secreted NanoLuc (secNLuc) as a reporter gene. Using this UCP1-reporter preadipocyte line, we aimed at finding novel regulatory genes of β-AR activation-induced UCP1 expression induction. Among knockout gRNA library-induced reporter adipocyte populations, some adipocyte population contained gRNA targeted *Hcar1* showed higher response to β-AR agonist (isoproterenol, iso). An HCAR1 agonist, DBA significantly suppressed iso-induced *Ucp1* expression induction. DBA treatment also suppressed cAMP concentration in cell lysate and phosphorylation of CREB under iso treatment. In addition, DBA-injected mice showed lower rectal temperature after injection of a β3-AR agonist, CL316,243. These results indicate that HCAR1 regulates *Ucp1* transcription or activity through modulating β-adrenergic signal.

UCP1, HCAR1, β-adrenergic signal

発表責任者：川原崎　聡子（kawarasaki.satoko.4a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2D2p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 D2 会場

褐色脂肪細胞の生理活性物質産生に対する食品成分の作用評価

Evaluation of the effects of food components on the production of adipokines in brown adipocytes.

○佐々木 玲、増田 祥子、黒崎 文華、畠 恵司 (秋田県総食研)
○Akira SASAKI, Syoko MASUDA, Fumika KUROSAKI, Keishi HATA (Akita Res. Inst. Food & Brew.)

脂肪を分解し、熱を産生する褐色脂肪細胞は、肥満症に対する新たな治療標的として期待されている。褐色脂肪細胞は、抗炎症作用を持つ食品成分によって、その機能が亢進する一方、加齢や肥満による炎症化により、その機能が低下することが知られている。また褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞と同様に、多様な生理活性物質を産生し、自身の活性化や他の代謝臓器へ影響を与えることが報告されている。そこで本研究では、褐色脂肪細胞が産生する生理活性物質に注目し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞から遺伝子導入法を用いて樹立した褐色脂肪様細胞を用いて、褐色脂肪細胞の機能を亢進することが知らせている食品成分が、生理活性物質の産生に与える影響について検証した結果について報告する。

Brown adipocytes, which can produce heat by cleavages of fatty acid, are a potential new therapeutic target for obesity. Some studies revealed that inflammation in aging and obesity causes stagnation of functions of brown adipocytes and anti-inflammatory components in foods activate them. Similar to white adipocytes, brown adipocytes were found to produce some adipokines that control themselves or other organs, and we presently studied the effects of biologically active food components on adipokine secretions from brown adipocyte-like cells established by gene transfer techniques on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, UE7T-13.

brown adipocytes, adipokines, food components

発表責任者：佐々木　玲（asasaki@arif.pref.akita.jp）

講演番号：2D2p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 D2 会場

ベージュ脂肪細胞におけるアドレナリン感受性を増強する食品成分の機能解析
Analysis of the Function of Food Compounds that Enhance Adrenergic Sensitivity in Beige Adipocytes

○高橋 尚子[1]、沼崎 南[2]、井上 博文[1]、森本 洋武[1]、後藤 剛[3]、河田 照雄[3]、江口 文陽[2]、上原 万里子[1]、高橋 信之[1]([1]東京農大・応生科・食品安全健康、[2]東京農大・地域環境・森林、[3]京大・農・食品生科)
○ Hisako TAKAHASHI[1], Minami NUMASAKI[2], Hirofumi INOUE[1], Hiromu MORIMOTO[1], Tsuyoshi GOTO[3], Teruo KAWADA[3], Fumio EGUCHI[2], Mariko UEHARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture Faculty of Applied Biosciences, [2]Tokyo Univ. of Agriculture Faculty of Regional Environment Science, [3]Kyoto Univ.)

ベージュ脂肪細胞は、白色脂肪組織中に点在し、糖や脂質から取り出した得られたエネルギーを脱共役タンパク質 1（Uncoupling protein-1: UCP-1）により熱に変換する熱産生細胞であり、抗肥満の観点から注目されている。ベージュ脂肪細胞の活性化には寒冷刺激等によって分泌されるアドレナリンが必要であり、血中のアドレナリン濃度や、ベージュ脂肪細胞のアドレナリン感受性は UCP-1 の発現量及び活性を決める重要な要素である。実際に、動物レベルでは、末梢神経の活性化を介し、UCP-1 を活性化する食品成分が報告されている。しかし、その多くが基底レベルの UCP-1 の発現や活性に関するもので、アドレナリン感受性に関して検討を行なった報告は殆ど見られない。本研究では、細胞レベルの実験において、ベージュ脂肪細胞のアドレナリン感受性を増強することで、*UCP-1* の発現を増加させる食品成分を複数見出した。この結果は、これまで報告されてきた基底レベルの *UCP-1* に対する影響の一部が、ベージュ脂肪細胞のアドレナリン感受性の増強によって引き起こされた可能性を示している。ブラックジンジャー（*Kaempferia parviflora*）は動物レベルで UCP-1 の発現を増強し、抗肥満作用を有することが報告されている。しかし、ベージュ脂肪細胞に対する *in vitro* の実験ではその作用は見られなかった。一方で、アドレナリン感受性を増強する作用が確認された。このことから、動物レベルで見られるブラックジンジャーによる UCP-1 発現増加の一部が、アドレナリン感受性の増強を介している可能性がある。そこで、本研究ではブラックジンジャーによるベージュ脂肪細胞におけるアドレナリン感受性の増強メカニズムの解析を行なった。食品成分によるアドレナリン感受性の増強メカニズムを解析することで、今後の食品成分の抗肥満作用について新たな機能を見出す一助となることが期待される。

Beige adipocytes are heat-producing cells that convert energy into heat by means of Uncoupling protein-1 (UCP-1). The activation of beige adipocytes requires adrenaline, secreted by cold stimuli, and the adrenergic sensitivity of beige adipocytes is an important factor in determining the expression level and activity of UCP-1. Black ginger (Kaempferia parviflora) has been reported to enhance UCP-1 expression and have anti-obesity effects at the animal level. However, no such effect was observed in in vitro experiments on beige adipocytes. In contrast, it was found to enhance adrenergic sensitivity. This suggests that some of the increase in *UCP-1* expression by black ginger seen at the animal level may be via enhancement of adrenergic sensitivity.

Beige adipocyte, UCP-1, anti-obesity

講演番号：2D2p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 D2 会場

Induction of brown-like adipocyte formation by the food-derived factor is associated with an increase in sympathetic nerve density in the inguinal white adipose tissue of mice

○Sho NISHIKAWA[1], Takuya Shoda[1], Kyosuke Ashikawa[1], Daiki Onodera[1], Daiki Kato[1], Aru Konno[2], Takuya Kojima[3], Takuma Hyodo[3], Shiro Takei[3], Shigetoshi Okazaki[4], Takanori Tsuda[3]
([1]Teikyo Univ. of Sci, [2]Hamamatsu Univ. of Med, [3]Chubu Univ., [4]iPERC of Hamamatsu Univ. of Med.)

[Objective]
Activation of the sympathetic nervous system, such as cold stimulation, triggers the formation of brown-like adipocytes in white adipose tissue. Recently, the adipose tissue clearing technique has enabled the visualization of sympathetic nerve networks, revealing the promotion of sympathetic nerve development as a novel mechanism for inducing brown-like adipocyte formation. In this study, our goal is to elucidate the role of sympathetic nerve density in the induction of brown-like adipocyte formation in the inguinal white adipose tissue (iWAT) of mice administered a food-derived factor.

[Methods]
Following the administration of a food-derived factor to C57BL/6J mice, inguinal white adipose tissue (iWAT) was collected. The iWAT samples underwent treatment using the adipose tissue clearing method (adipo-clear) and were subsequently immunostained for uncoupling protein 1 (UCP1), a marker of brown adipocytes, and tyrosine hydroxylase (TH), a marker for sympathetic nerves. The samples were then observed under a confocal laser microscope for three-dimensional image analysis.

[Results]
The UCP1-positive area in iWAT increased in the group treated with the food-derived factor compared to the control group. Additionally, the signal intensity of sympathetic nerves, calculated from TH-positive signals, also increased. Notably, there was a significant correlation between the signal densities of UCP1-positive and TH-positive areas. These findings suggest the potential interaction between the induction of brown-like adipocyte formation and sympathetic nerve development triggered by the food-derived factor. We are currently conducting further detailed investigations to explore the possible role of sympathetic nerve development in the induction of brown-like adipocyte formation.

food-derived factor, sympathetic nerve density

発表責任者：西川　翔（sh-nishikawa@ntu.ac.jp）

講演番号：2D2p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 D2 会場

15N トレーサー分析による 1-Deoxynojirimycin の臓器蓄積評価
Evaluation of Accumulation of 1-Deoxynojirimycin using 15N tracer analysis
○高須 蒼生[1]、パリダ イザベラ スパルディ[2]、伊藤 隼哉[2]、山岸 賢治[3]、中島 泰弘[4]、木村 俊之[4]、仲川 清隆[2] ([1]岐阜薬科大、[2]東北大院農・食品機能分析学、[3]農研機構・食品研究部門、[4]農研機構・高度分析研究センター)
○Soo TAKASU[1], Isabella Supardi Parida[2], Junya Ito[2], Kenji Yamagishi[3], Yasuhiro Nakajima[4], Toshiyuki Kimura[4], Kiyotaka Nakagawa[2] ([1]Gifu Pharmaceutical University, [2]Laboratory of Food Function analysis, Tohoku University, [3]Food Research Institute, NARO, [4]Research Center for Advanced Analysis, NARO)

【背景】1-デオキシノジリマイシン（DNJ）は、桑や微生物により生産される糖と類似した構造を持つ化合物である。DNJ は強力な α-グルコシダーゼ阻害活性（α-GI）を有し、食品として食事から血糖値を制御し、糖尿病の予防に有効な機能性成分として期待されている。DNJ は、摂取後に消化管で α-GI として働き、そのうち一部が体内へ吸収され、臓器へ分布するが、長期的に摂取した際の臓器蓄積や代謝の研究は進んでいない。臓器への蓄積解明は、DNJ の安全性を担保し、食品利用のために必須である。我々は、微生物を用いて窒素原子を安定同位体（^{15}N）で標識した ^{15}N-DNJ の生産法を開発し、さらに、^{15}N-DNJ 単回投与後の吸収・排泄を ^{15}N トレーサー分析により解析することに成功した。本法は DNJ の吸収や臓器分布・蓄積の解明にも有効である。そこで、本研究では、ラットへ ^{15}N-DNJ を三ヶ月間投与し、DNJ の臓器中への蓄積の詳細を ^{15}N-トレーサー分析により評価した。
【方法と結果】SD ラットに ^{15}N-DNJ を溶解させた水を自由飲水させた。試験開始から 4、8、12 週間後に安楽死させ、臓器中の ^{15}N 量を分析した。結果、非投与群と比較し、^{15}N-DNJ 投与群で各臓器中の ^{15}N の割合が有意に増加していた。一方で、投与 8 週以降の ^{15}N 割合の増加はほとんど見られなかった。DNJ の臓器への蓄積量は安全性に影響しない量と考えられ、DNJ の長期継続的に摂取した際の安全性を体内動態の観点から示唆している。今後、臓器中の DNJ の存在量や代謝物の解析を進め、より詳細な DNJ の臓器分布・蓄積の解明、安全性の評価を進める予定である。
[Background] Mulberry leaves are rich in 1-deoxynojirimycin (DNJ), a potent α-glucosidase inhibitor. While DNJ is absorbed and distributed in the body, whether it accumulates within the body has remained uncertain. To resolve this problem, we devised an experimental method by which we administered rats with ^{15}N-labelled DNJ produced from microbial fermentation and determined its tissue uptake using ^{15}N tracer analysis. This method allows a relatively comprehensive assessment DNJ accumulation in the body after long-term intake.
[Results] Sprague-Dawley rats were given ad libitum access to water containing ^{15}N-DNJ. After 4, 8 and 12 weeks of administration, the rats were euthanized, and their organs were collected. Our analysis of ^{15}N contents revealed a significantly increase in the ^{15}N/^{14}N ratio in the group receiving ^{15}N-DNJ. These levels remain within the safety thresholds, suggesting the safety of long-term DNJ intake from a pharmacokinetic standpoint.

1-Deoxynojirimycin DNJ, Tracer analysis, Pharmacokinetics

講演番号：2D2p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 D2 会場

ゲニポシド酸経口投与による食事性負荷ラットの病態改善効果

The ameliorating effect of oral geniposidic acid on disease status in rats with dietary loading

○鈴木 ゆみ子[1]、後藤 和馬[1]、宮川 竜征[1]、小林 正和[2]、大河内 公一[2]、山口 翔平[1]、中村 浩蔵[1]
([1]信州大院農、[2]小林製薬株式会社)
○Yumiko SUZUKI[1], Kazuma GOTO[1], Ryusei MIYAGAWA[1], Masakazu KOBAYASHI[2], Koichi OKAWACHI[2], Shohei YAMAGUCHI[1], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kobayashi Pharmaceutical CO., Ltd.)

【目的】心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）は、降圧作用や抗肥満作用が知られているホルモンである。我々は、杜仲（*Eucommia ulmoides* Oliver）の葉に含まれるイリドイド化合物であるゲニポシド酸（GEA）の高血圧自然発症ラットへの経口投与が、ANP 分泌を促進し、降圧作用を引き起こすことを明らかにした[1)]。そこで、本研究では高塩高脂肪食とフルクトース水を組み合わせた食事性負荷により、後天的に高血圧などの病態を惹起させた Wistar Kyoto（WKY）ラットを用いて、GEA の反復経口投与による ANP 分泌促進作用と病態改善効果を評価した。
【方法】雄性 9 週齢 WKY ラットを通常食（陰性対照群）、食事性負荷（陽性対照群）、食事性負荷＋GEA50 mg/匹・日（被験群）の 3 群（各 n=7）に群分けし、14 週間の食事性負荷飼育下での GEA 経口投与試験を行った。試験期間中、体重、摂餌・摂水量の測定を毎週 1 回、血圧測定と尾静脈血中 ANP 濃度測定を 2 週間に 1 回実施した。試験終了後、採尿と剖検を行い、尿中 GEA 濃度測定、動脈血中 ANP 濃度測定、臓器脂肪重量測定を実施した。
【結果】陽性対照群は、陰性対照群と比較して血圧が有意に高く、肝臓重量が有意に増加しており、食事性負荷による病態の惹起が確認された。一方、被験群では陽性対照群と比較して、食事性負荷による収縮期血圧の上昇と体重の増加が有意に抑制され、血漿中 ANP 濃度の増加が確認された。以上の結果から、食事性負荷により高血圧などの病態の誘発が可能であること、GEA 反復経口投与による ANP 分泌促進が食事性負荷による病態を改善する効果があることが示唆された。

The oral administration of geniposidic acid (GEA) increased blood atrial natriuretic peptide (ANP) levels and lowered blood pressure in spontaneously hypertensive rats[1)]. In this study, we evaluated promoting ANP secretion and ameliorating disease status effects of repeated oral administration of GEA on Wistar Kyoto (WKY) rats with dietary loading. The dietary loading increased blood pressure and liver weight, and the repeated oral administration of GEA significantly increased plasma ANP level and suppressed the blood pressure elevation and body weight gain. These results indicated that the repeated oral GEA could promote ANP secretion and ameliorate the disease status caused by dietary loading.

1)Nakamura K., et al. J. Funct. Foods, 40, 634-638 (2018).

Geniposidic acid, Atrial natriuretic peptide, The dietary loading

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D2p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D2 会場

ヒトと齧歯類における腸管胆汁酸トランスポーターの比較

A comparison of bile acid transporter between human and rodent

○齋藤 佑太、黒部（髙島） 優季、小林 彰子（東大院農）
○Yuta SAITO, Yuki KUROBE-TAKASHIMA, Shoko KOBAYASHI (The Univ. of Tokyo)

胆管から小腸に分泌された胆汁酸の 95%は小腸下部で Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter（ASBT）により再吸収され、肝臓へと戻され再利用される（腸管循環）。ASBT の阻害は、肝臓におけるコレステロールからの胆汁酸合成を高めることにより血中コレステロールの低下に寄与するため、ASBT は脂質異常症などの創薬のターゲットとなる。*In vivo* での脂質異常症研究にはマウスが広く用いられるが、ASBT のアミノ酸相同性、また胆汁酸の主成分であるタウロコール酸（TC）とグリココール酸（GC）の組成比はヒトとマウスで異なるため、種差がある可能性が考えられた。そこで本研究では、ヒトとマウスの ASBT における胆汁酸輸送機作を比較することにより、胆汁酸再吸収機構における種差を明らかにすることを目的とした。

ヒト ASBT とマウス Asbt をそれぞれ過剰発現させた COS-7 細胞を作製し、[^{3}H]-TC 及び [^{3}H]-GC の取り込みを測定した。濃度依存性試験を行い、非線形最小二乗法により *Km* 及び *Vmax* 等のパラメーターを算出した。その結果、同種間では TC および GC 共に同様の輸送活性を示した。一方で、種差間では両胆汁酸の輸送機作が異なる可能性が示唆された。現在、タンパク質の発現量を比較するため、発現細胞の細胞膜画分を分離しウエスタンブロッティングにて評価を行っている。

Over 95% of intestinal bile acid is reabsorbed though the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) in the terminal ileum, and returned to the liver (enterohepatic circulation). ASBT inhibition reduces reuptake of bile acid and increases bile acid synthesis from cholesterol. Thus, ASBT is a target for diseases such as dyslipidemia, metabolic disease and diabetes. In dyslipidemia studies, mice are widely used for *in vivo* expreriments. However, there is a difference in composition of bile acid and amino acid sequence of ASBT between human and mice. Thus, we hypothesize that transport mechanism of bile acid is different between human and mice. Therefore, this study investigated the absorption mechanism of taurocholic acid (TC) and glycocholic acid (GC) using COS-7 overexpressing hASBT and mAsbt. Since high transport activity was confirmed in both TC and GC, our data indicate that there is a difference in transport activity of bile acid between human and mice.

transporter, ASBT, bile acid

発表責任者：小林 彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D2p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D2 会場

消化管における胆汁酸輸送機作の解析
Bile acid absorption mechanisms in the intestine
○黒部（高島） 優季[1]、齋藤 佑太[1]、宮脇 里奈[1]、三坂 巧[1]、柳澤 宏太[2]、宮内 栄治[2]、佐々木 伸雄[2]、荻原 琢男[3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]群大生調研、[3]高崎健康福祉大薬)
○ Yuki KUROBE-TAKASHIMA[1], Yuta SAITO[1], Rina MIYAWAKI[1], Takumi MISAKA[1], Kota YANAGISAWA[2], Eiji MIYAUCHI[2], Nobuo SASAKI[2], Takuo OGIHARA[3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Gunma Univ., [3]Takasaki Univ.)

【背景・目的】胆汁酸は食後に脂質成分の消化と吸収を補助した後、回腸末端で再吸収され、肝臓へと戻る。回腸における胆汁酸の再吸収は Apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) が担うとされているが、他臓器では ASBT 以外の SLC transporter family が胆汁酸を輸送することが知られており、小腸に発現するものもある。そこで本研究では ASBT 以外の、消化管に発現する胆汁酸トランスポーターを探索し、その輸送機作と消化管での分布を明らかにすることを目的とした。

【結果】ヒト腸管上皮吸収モデル Caco-2 細胞（ヒト結腸癌由来）における濃度依的な[^{3}H]-タウロコール酸（TC）取り込みを測定したところ、取り込み量は pH 7.4＜pH 6.0 であり、Eadie-Hofstte Plot では二相性を示した。Michaelis-Mentet 式を用いた解析では pH 依存性および非依存性のコンポーネントに分かれた。SLC transporter の中で pH 依存性を示すファミリーに着目して発現細胞によるスクリーニングを行ったところ、2 種のトランスポーターが胆汁酸を輸送することを見出した。ヒト消化管を用いた発現解析ではこれらのうち 1 種が大腸に発現しており、このトランスポーターが大腸での胆汁酸再吸収に寄与している可能性が考えられた。

The intestinal bile acid transport system is attracting more attention as a therapeutic target for metabolic syndromes. Bile acids are secreted to the intestine after a meal and most of them are reabsorbed by transport from the terminal ileum. This reabsorption is mediated by the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). On the other hand, some other members of SLC transporters also mediate bile acid transport in other organs: however, their role in the intestinal bile acid uptake is not clear. We used Caco-2 cells as an intestinal epithelium model and studied the bile acid uptake mechanism. Concentration-dependent bile acid (i.e., taurocholic acid; TC) uptake assays were performed in Caco-2 cells. We report the results of kinetic analysis and the identification of transporters other than ASBT that may be involved in bile acid uptake in the gastrointestinal tract.

bile acid, transporter, intestine

発表責任者：小林彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D2p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D2 会場

腸管オルガノイドの単層培養法の確立とその利用法の検討

The establishment of a monolayer culture system and to explore the possible utilization of the monolayer culture system using mouse intestinal organoids.

○神戸 理恵[1]、清水 誠[2]、岩槻 健[1]、小西 良子[1]、只石 幹[1]、服部 一夫[1] ([1]東農大応生、[2]東農大)
○ Rie GODO[1], Makoto SHIMIZU[2], Ken IWATSUKI[1], Yoshiko SUGITA-KONISHI[1], Miki TADAISHI[1], Kazuo KOBAYASHI-HATTORI[1] ([1]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

腸管オルガノイドは、構造的、機能的に生体内の腸管機能を再現した画期的な研究ツールである。しかし、内側が管腔側、外側が基底膜側の三次元構造を持つため、管腔側から腸管上皮細胞へ影響を与える食品因子などの成分を調べるスクリーニング研究等には適していない。そこで本研究では、管腔側からの影響評価に適した単層培養系の作製を目指し、培養条件とその利用法の検討を行った。単層培養系は、継代を２回以上行ったマウス空腸由来の腸管オルガノイドをシングルセル化し、マトリゲルでコーティングしたプレートに播種することで得られた。培養条件として、１％マトリゲル in D-PBS(-)でコートしたプレートを用意し、培地は Wnt3a-conditioned medium、CHIR99021、Valproic acid を添加したものを利用した。作製した単層培養系は、頂端面が上を向いた正常な位置関係と細胞接着構造を有しており、コンフルエント時にはパネート細胞、タフト細胞、内分泌細胞の存在が観察された。同単層培養系をリポ多糖（LPS）で刺激後、パネート細胞が分泌する顆粒内成分の mRNA 量をリアルタイム PCR にて測定した結果、パネート細胞の顆粒補充が評価できる可能性が示唆された。これらのことから本研究で作製した単層培養系は、内腔側から各種の腸管上皮細胞に影響を与える成分を、迅速かつ容易に探索するための新たな研究ツールになり得ると考える。

Organoids culture system is an innovative research tool that reproduces cell functions in body. However, because organoids form three-dimensional structure with the apical side inside and the basolateral outside, they are not suitable for screening of food factors that function through the apical side of intestine. Therefore, in this study, we aimed to investigate culture conditions to create a monolayer culture system of intestinal organoids that is suitable to evaluate the effects of food factors from the apical side of the cell and to explore the possible utilization of the monolayer culture system. We generated a monolayer culture by plating single cells derived from mouse jejunum organoids that had been passaged at least twice. The monolayer system showed normal positioning with the apical side facing up. In addition, tight junction was observed near the apical side. We observed Paneth cells, tuft cells, and endocrine cells in the monolayer system. mRNA levels of granular components of Paneth cells were measured by real-time PCR after stimulation of lipopolysaccharide to the monolayer system, suggesting that granule replenishment of Paneth cells may be evaluated. In summary, we believe that the monolayer culture system generated in this study will be a new tool to quickly and easily investigate functional substances that affect the intestine from the apical side.

organoid, monolayer, intestine

講演番号：2D2p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D2 会場

霊長類消化管オルガノイドを用いた消化管上皮センサー細胞研究
Intestinal epithelial cells studies using primate organoids
○松井 伸祐[1]、有永 理峰[1]、星 凛佳[1]、米谷 達哉[1]、篠原 満利恵[2]、稲葉 明彦[3]、今井 啓雄[3]、岩槻 健[1] ([1]東農大応生、[2]東大工、[3]京大ゲノム進化)
○SHINSUKE MATSUI[1], Ayane Arinaga[1], Rinka Hoshi[1], Tatsuya Kometani[1], Marie Shinohara[2], Akihiko Inaba[3], Hiroo Imai[3], Ken Iwatsuki[1] ([1]The Tokyo univ. Applied Biosciences, [2]The Univ. of Tokyo, [3]The Univ. of Kyoto)

消化管には、危険物を認識・排除し、栄養素を吸収するための化学センサー細胞が存在する。我々は、小腸上皮に存在する化学センサー細胞の機能解析を目的とし、オルガノイド培養法を導入している。オルガノイドは、自己増殖能と多分化能を有する幹細胞によって支えられており、体内組織細胞の特徴を *in vitro* で再現することができる。しかし、霊長類とげっ歯類では化学感覚受容が異なるため、我々はニホンザルとヒト消化管オルガノイドを実験に用いている。

今回、霊長類小腸オルガノイド培養系を用いて、食品因子や薬理アッセイ系の構築を目指し、消化管内腔側が露出したモデルとして単層培養系を構築した。本系においてもほとんどの消化管上皮系細胞の分化誘導が確認された。また、トランズウェルを用いた内腔側からの刺激に対する glucagon-like protein-1 (GLP-1)などのホルモン分泌も測定できている。

以上、本発表では、霊長類由来の消化管オルガノイドを用いた機能性因子の探索や薬剤スクリーニングまでの技術革新や将来展望について議論したい。

Recent advances in molecular biology have led us to generate 3D tissue substituents named “organoids”. These organoids contain stem cells that self-renew and differentiate into multiple cell types. Since organoids recapitulate cell characteristics in the body, we have been introducing organoids to study chemosensory cells in the endoderm. We are currently interested in chemoreception in the oral cavity as well as in the gut.

Because primates have different sense of taste when compared with rodents, we initially generated organoid culture system of the monkey intestine. We next set up two-dimensional (2D) system to utilize for pharmacological assay. As a result, we observed release of glucagon-like protein-1 (GLP-1) when glucose was added to the medium. We have also introduced human intestinal organoids and demonstrated that our 2D system was also functional. Tips toward primate organoid culture and future strategies to analyze intestinal epithelial cells will be discussed.

organoid, small intestine, chemosensory cells

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：2D2p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D2 会場

寒天由来オリゴ糖が線虫の腸管透過性に及ぼす影響の検証
Effect of oligosaccharides from agar on intestinal permeability of *Caenorhabditis elegans*
○出坂 夏美[1]、東村 泰希[2] ([1]石川県大院、[2]石川県大)
○Natsumi DESAKA[1], Yasuki HIGASHIMURA[2] ([1]Grad. Sch. Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

アガロオリゴ糖(AGO)はアガロースから生成されるオリゴ糖である。これまでの研究において我々は、AGO が線虫の腸上皮細胞間の接着に関連する遺伝子の発現を促進することを明らかにした。腸の上皮細胞同士の接着は、有害な異物などの侵入を防ぐための物理的バリアである。この接着の脆弱化（腸管透過性の亢進）は、多くの炎症性疾患などの病態に関与する。現在、腸管透過性の評価は、培養細胞を用いた *in vitro* 系での評価が一般的である。本研究では、腸管構造のシンプルな線虫を用いた新たな腸管透過性の評価法を開発し、AGO が腸管透過性の亢進に及ぼす影響について検証した。

線虫は *Escherichia coli* OP50（OP50）を標準餌として 20℃で飼育した。成虫期まで AGO を 0%または 5%含む寒天培地上で飼育後、AGO と酸化ストレス誘発剤であるパラコート（PQ）を含む寒天培地上で 48 時間飼育した。腸管透過性を評価するため、線虫に FITC-dextran（FITC）を内包したリポソームを投与し、腸管内腔を FITC で満たした。その後、OP50 を投与することで、腸管内腔の FITC を排泄させ、腸上皮細胞の間隙より漏出した FITC のみが残留する状態とした。50 匹の線虫から破砕液を調製し、その蛍光強度を測定することで腸管透過性を定量した。実験の結果、0% AGO + PQ 群は、0% AGO 群と比較して破砕液の FITC 濃度が高く、PQ によって腸管透過性が亢進したことが示唆された。また、5% AGO + PQ 群は、0% AGO + PQ 群と比較して FITC 濃度が低かった。以上より、AGO は PQ によって誘発された腸管透過性の亢進を抑制することが示唆された。

In our previous study, we showed that agaro-oligosaccharides (AGO), oligosaccharides produced from agarose, promotes the expression of genes related to adhesion between intestinal epithelial cells in nematodes. In this study, we developed a new method for assessing intestinal permeability using nematodes and used the method to evaluate the effect of AGO on intestinal permeability. Nematodes were maintained on agar medium with or without 5% AGO until the adult stage and then reared on agar medium containing AGO and paraquat (PQ) for 48 h. The nematodes were then administered the liposomes containing FITC-dextran (FITC) followed by OP50 so that only the FITC that leaked out of the intestinal tract remained in the body. Intestinal permeability was quantified by preparing homogenate from 50 nematodes and measuring its fluorescence intensity. 5% AGO + PQ group had lower FITC concentrations than 0% AGO + PQ group, suggesting that AGO inhibits the increase in intestinal permeability induced by PQ.

Caenorhabditis elegans, Intestinal permeability, Agaro-Oligosaccharides

発表責任者：東村泰希（yasuki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2D2p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D2 会場

ヒシエキスをラットに経口投与後の加水分解性タンニンの血中動態および尿中排泄
Metabolic fate of hydrolyzable tannins after oral administration of *Trapa bispinosa* extracts to rats

○池田 千秋[1]、森 彩夏[1]、細川 夏菜乃[1]、岩岡 裕二[1]、上村 知広[2]、伊東 秀之[1]([1]岡山県大院、[2]林兼産業株式会社)
○Chiaki Ikeda[1], Ayaka Mori[1], Kanano Hosokawa[1], Yuji Iwaoka[1], Tomohiro Uemura[2], Hideyuki Ito[1] ([1]Grad. Sch. of Okayama Pref. Univ., [2]Hayashikane Sangyo Co., Ltd.)

エラジタンニンやガロタンニンを含む加水分解性タンニンは、抗酸化作用や抗炎症作用をはじめとする様々な機能性を有することが知られている。しかし、その生体内挙動については不明な点が多い。そこで、本研究では加水分解性タンニンを豊富に含むトウビシエキスをラットに経口投与後の代謝物の生体内挙動に関する評価を行った。

SD 雄性ラットにトウビシエキスを経口投与後，経時的に血漿および尿を採取し、各サンプルを脱抱合後、酢酸エチルにより抽出し、分析用サンプルを調製した。調製したサンプルについて、エラジタンニンおよびガロタンニン関連代謝物を分析対象として、HPLC-ESI-MS/MS により定量を行った。トウビシエキスを投与したラットの血漿および尿中にはエラジタンニン関連代謝物やガロタンニン関連代謝物が、それぞれ異なる吸収、排泄パターンと示して検出され、エラジタンニン関連代謝物は吸収、排泄に時間を要するが、ガロタンニン代謝物は速やかに吸収・排泄されることが示された。以上の結果、加水分解性タンニンの各代謝物の機能性を反映した投与設計の検討につながる科学的基礎データを提供することができた。

Hydrolyzable tannins such as ellagitannin and gallotannin have been shown to have various biological activities including antioxidant and anti-inflammatory effects. However, there are many unclear points about bioavailability after hydrolyzable tannins ingestion. In the present study, we investigated the metabolic fate of metabolites of hydrolyzable tannins after administration of polyphenol-rich *Trapa bispinosa* pericarp extract (TBPE) to rats.

After oral administration of TBPE to SD male rats, the collected plasma and urine samples were deconjugated and then extracted with ethyl acetate to prepare samples for quantitative analysis. Ellagitannins and gallotannins related metabolites were quantified by HPLC-ESI-MS/MS. The metabolites of ellagitannins and gallotannins showed different absorption and excretion patterns, respectively. Ellagitannin related metabolites take time for absorption and excretion, while gallotannin metabolites were rapidly absorbed and excreted in the body. Our findings provide basic data on the pharmacokinetics of hydrolyzable tannins, which is expected to lead to the demonstration of the functionality of tannins.

Trapa bispinosa, Urolithin, Metabolite

発表責任者：伊東 秀之（hito@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：2D2p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D2 会場

吸収経路の異なるケルセチン関連化合物の摂取が腸間膜リンパ節の免疫応答に及ぼす影響
Effect of quercetin derivatives absorbed via different pathways on the immune response in the mesenteric lymph nodes

○室田 佳恵子[1,2]、四之宮 紗菜[2]、柳 利咲[3]、早坂 晴子[3,4,5]（[1]島根大生物資源、[2]島根大院自然科学、[3]近大院総合理工、[4]近大理工、[5]近大理工総研）
○Kaeko MUROTA[1,2], Sana SHINOMIYA[2], Risa YANAGI[3], Haruko HAYASAKA[3,4,5] ([1]Fac. Agric. Life Sci., Shimane Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Kindai Univ., [4]Fac. Sci. Eng., Kindai Univ., [5]Sci. Technol. Res. Inst., Kindai Univ.)

【目的】ケルセチンは免疫調節を含む様々な機能性を示すフラボノイドであるが、機能性発現と吸収代謝動態の関係は十分に解明されたとは言い難い。本研究では、ケルセチンおよびその配糖体であるルチンの摂取が、小腸腸間膜リンパ節（MLN）の免疫応答に及ぼす影響を検討した。【方法】ラットおよびマウスに標準食、0.1%ケルセチン添加食、0.1%ルチン添加食を 2 週間自由摂取させた後、血漿、尿のケルセチン代謝物を分析した。また MLN を採取し組織学的解析を実施した。【結果・考察】ケルセチン添加食群ではルチン添加食群に比べて血漿、尿のいずれでも高いケルセチン代謝物濃度を示した。またケルセチン添加食群では、標準食群、ルチン添加食群に比べて MLN における胚中心をもつ二次リンパ濾胞の減少傾向がみられた。加えて、ケルセチン代謝物であるケルセチン-3-グルクロニドはマウス骨髄細胞由来樹状細胞の活性化抑制作用を示した。ケルセチンは摂取後小腸で吸収された後に生じる代謝物の一部が門脈だけでなくリンパ系にも輸送されるのに対し、ルチンは腸内細菌による糖鎖加水分解を経た後に大腸から吸収されるため、生じたケルセチン代謝物のリンパ系輸送効率はケルセチン投与時よりも低かった。以上のことから、食事由来ケルセチン代謝物は MLN における免疫応答を抑制的に調節することが示唆され、その作用は吸収経路に依存する可能性が考えられた。

In this study, the effects of quercetin and rutin on the immune response of the small intestine mesenteric lymph nodes (MLNs) were investigated. Rats and mice were fed with a standard diet (SD), a diet supplemented with 0.1% quercetin (QD), and with 0.1% rutin (RD) for 2 weeks, and quercetin metabolites in the plasma and the urine were determined. In addition, the histological analyses of MLNs were performed. QD-fed rodents showed higher levels of quercetin metabolites in the plasma and the urine than the RD-fed rodents, and the decrease of the number of secondary lymphoid follicles with germinal centers in the MLNs were observed in QD-fed rodents compared to other rodents. In addition, quercetin-3-glucuronide inhibited the activation of dendritic cells derived from mouse bone marrow. Quercetin is absorbed in the small intestine and its metabolites are partially transported the lymphatic system. Rutin is absorbed from the large intestine after microbial hydrolysis of its sugar moiety, resulting in the relatively low lymphatic transport efficiency of quercetin metabolites. These results suggest that quercetin metabolites suppressively regulated the immune response in MLN, and the effect may depend on the absorption pathway of quercetin derivatives.

quercetin, absorption pathway, mesenteric lymph node

発表責任者：室田佳恵子（murota@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2D2p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 D2 会場

マルトビオン酸はコラーゲンの吸収を促進する
Maltobionic acid promotes collagen absorption
○池田 奈未[1]、末廣 大樹[2]、深見 健[2]、大西 素子[1,3] ([1]中部大院応生、[2]サンエイ糖化（株）、[3]中部大応生)
○Nami IKEDA[1], Daiki SUEHIRO[2], Ken FUKAMI[2], Motoko OHNISHI[1,3] ([1]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]San-ei Sucrochemical Co., Ltd, [3]Biological Chemistry, Chubu Univ.)

マルトビオン酸は、グルコースにグルコン酸がα-1,4 結合したマイナス電荷を持つ難消化性の二糖類である。これまでに我々は、マルトビオン酸摂取によるミネラル吸収促進効果、閉経後女性における骨代謝改善効果や、骨量減少抑制効果を明らかにしてきた。そこで本研究では骨の主要な構成成分であるコラーゲンの吸収促進効果とそのメカニズムについて検証した。健常成人男女 29 人を対象として、単回摂取後のコラーゲン吸収に関するプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験を実施した。試験当日の朝、マルトース水飴（プラセボ食品群）またはマルトビオン酸含有水飴（試験食品群）を豚由来コラーゲンを含む朝食と同時に摂取した。試験開始後 180 分までに計 5 回採血を行い、コラーゲンに特異的なアミノ酸である血中ヒドロキシプロリン（Hyp）量を測定した。血中 Hyp 量の上昇曲線下面積（IAUC）は、試験食品群ではプラセボ食品群と比べて 20%以上の有意な上昇を示した。この結果は、マルトビオン酸がコラーゲンの吸収を促進する可能性を示唆している。そこでコラーゲンの等電点に対するマルトビオン酸の影響を検証するとともに、Caco-2 細胞単層膜を用いたタイトジャンクションに対するマルトビオン酸の影響について解析したので、合わせて報告する。

Maltobionic acid is a negatively charged non-digestible disaccharide consisting of glucose and gluconic acid linked by alpha 1,4 bonds. We have previously shown that maltobionic acid promotes mineral absorption, improves bone metabolism in postmenopausal women and suppresses bone loss. In this study, we examined the absorbing effect of maltobionic acid on collagen, a major component of bone. A placebo-controlled, double-blind crossover study on collagen absorption was carried out in 29 healthy adults. On the day of the study, either maltose or maltobionic acid was consumed with breakfast containing porcine collagen peptides. A total of 5 blood samples were taken for 180 minutes after a single intake of the test food to measure the concentration of hydroxyproline（Hyp）, an amino acid specific to collagen. The IAUC of Hip concentration after maltobionic acid ingestion was significantly higher than that after maltose ingestion. This result suggests that maltobionic acid may promote collagen absorption. In addition to verifying the effect of maltobionic acid on the isoelectric point of collagen, we also examined the effects of maltobionic acid on tight junction using Caco-2 cell monolayers.

Oligosaccharide, Collagen, Gastrointestinal absorption

発表責任者：大西素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2D2p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 D2 会場

黒糖・芋焼酎由来成分のグレリン様摂食促進作用の生体での検証

In vivo ghrelin-like appetite stimulating effect of the ingredient from brown sugar- and sweet potato-shochu

○千葉 殖幹[1]、緒方 美咲[1]、吉崎 由美子[2]、乾 明夫[2]、高峰 和則[3]、上園 保仁[4]、横川 由起子[5]、高橋 隆二[1] ([1]クラシエ(株)漢方研、[2]鹿大農 附焼酎・発酵学セ、[3]鹿大医 漢方薬理学、[4]慈恵医科大 疼痛制御、[5]鹿大理 有機化学)

○Shigeki Chiba[1], Misaki Ogata[1], Yumiko Yoshizaki[2], Akio Inui[2], Kazunori Takamine[3], Yasuhito Uezono[4], Yukiko Yokogawa[5], Ryuji Takahashi[1] ([1]Kracie co., Kampo Res., [2]The Univ. of Kagoshima, ERCFS, [3]The Univ. of Kagoshima, Pharm. herbal med., [4]Jikei Univ. Medicine, Pain Control Res., [5]The Univ. of Kagoshima, organic chemistry)

奄美群島は、全国的に見ても長寿者の多いことで知られ、近年の健康寿命を重視する流れの中で、その独自の食生活に注目が集まっている。奄美黒糖焼酎は、サトウキビ栽培が盛んな奄美のみで造られている、黒砂糖と米麹を原料に醸造される単式蒸留の本格焼酎で、長年地域で愛されている。またグレリンは、空腹を感じさせる役割を持つ摂食促進ホルモンであり、近年、食欲不振の改善だけでなく、組織の修復を担う成長ホルモンとしての役割や、老化動物の寿命を延伸させる効果が報告されている。我々は以前に、この黒糖焼酎からグレリン受容体を活性化する成分を細胞培養系で探索し、9-オキソノナン酸エチル(以下 9-ONAE)を見出しており、同じく鹿児島の芋焼酎にも含まれていた。そこで本研究では、摂食促進を指標に実際の生体でも 9-ONAE が効果を示すのか検証し、また安全性に関する検討も行った。その結果、6 週齢の C57BL/6J マウスに 9-ONAE 300 mg/kg を経口投与し摂餌量を評価したところ、3 時間毎の累積摂餌量が 24 時間まで全て有意に増加し、継続投与で体重の増加傾向を認めた。また、ICR マウスに同じく 300 mg/kg を 2 週間連日投与したが、体温、活動性、体重、肝・腎障害マーカー、臓器所見に異常は認めなかった。本検討の結果、9-ONAE は生体においてグレリン様の食欲増進効果を示す可能性が示された。今後、アンタゴニストで生体内の標的を確認するとともに、老化に対する影響も評価する予定。

The Amami region has a large population of long-lived people, and their unique diet is attracting attention to find out what makes it tick. Amami brown sugar shochu, made from sugarcane brown sugar and rice malt, is very popular in the region. Recently, attention has focused on the life-extending effects of the appetite-stimulating hormone ghrelin, and we had previously found that ethyl 9-oxononanoate (9-ONAE) in this shochu had ghrelin-like effects in vitro. In this study, we tested whether 9-ONAE exerts ghrelin-like appetite enhancing effects in vivo and also assessed its safety. As a result, oral administration of 9-ONAE 50 or 300 mg/kg to 6-week-old C57BL/6J (male) mice and assessment of food intake showed a significant increase in cumulative food intake every 3 hours. Also, 9-ONAE 300 mg/kg was administered daily for 2 weeks to ICR (male and female) without any abnormalities in body temperature, activity, body weight, markers of liver and kidney damage, In this study, we show that 9-ONAE has ghrelin-like appetite-stimulating effects, also in vivo. A future study will investigate the effects of 9-ONAE on ageing.

Brown sugar shochu, Ghrelin-like compound, appetite-stimulating

講演番号：2D3a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D3 会場

植物有用成分の高生産を目指した共培養系の応用
Application of co-culture system for high production of valuable plant metabolites
○士反 伸和[1]、潤井 みや[1]、山田 泰之[1]、中川 明[2]、佐藤 文彦[3,4]、南 博道[2] ([1]神戸薬大、[2]石川県大、[3]京大院生命、[4]サントリー生命科学財団・生有研)
○ Nobukazu Shitan[1], Miya Urui[1], Yasuyuki Yamada[1], Akira Nakagawa[2], Fumihiko Sato[3,4], Hiromichi Minami[2] ([1]Kobe Pharm. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Suntory Foundation for Life Sci.)

植物が生産する特化代謝（二次代謝）産物は多様な化学構造と生物活性を有し、香料や医薬品原料などとして用いられるものも多い。一方、植物中での含量の低さなどから、多くの代謝物について安定供給系の開発が求められる。代謝工学（合成生物学）により、大腸菌や出芽酵母などで有用産物の生産も可能となったが、1 細胞内での全経路の構築には多大な労力がかかり、生産性にも課題がある。そこで我々は、生合成経路を分割して複数の微生物に導入し、それらを共培養することで目的産物を生産する「共培養系」に着目して研究を進めてきた。特に、アミノ酸由来の代謝物生産に適した大腸菌と、タンパク質の高発現特性や効率的な P450 発現から代謝修飾に適したホストとして注目されるピキア酵母に着目した。これまでに、炭素源からアルカロイド中間体レチクリンを生産する大腸菌と、レチクリンからスチロピンを生産するピキア酵母の共培養系として、ピキア酵母の BMMY 培地を用いた生産系を報告してきた[1)]。さらに本系の改良として、それぞれの菌株の BMMY 培地での前培養、定期的なメタノールの添加により、生産性を 80 倍も高めることに成功した[2)]。また、実用的な高生産には、微生物間の代謝産物の効率的な受け渡しが求められる。我々はそのための輸送工学研究も進めており[3,4)]、それらを組み合わせた複合微生物培養系と実用生産系についても議論する。

Plants produce various valuable metabolites. Recent progress in metabolic engineering (synthetic biology) enabled the production of such metabolites using microorganisms, e.g., *Escherichia coli* and yeast cells. However, constructing the whole biosynthetic pathway in a single cell is still a laborious task, and efficient production is hindered by negative feedback in some cases. The co-culture system is one possible way for higher and more efficient production. We established a co-culture system using *E. coli* and *Pichia pastoris* and produced stylopine alkaloid from glycerol[1)]. To improve this co-culture system, we introduced the pre-culture of *E. coli* and *P. pastoris* cells before co-culture. Further, methanol addition during co-culture was tested. These experiments allowed us to improve the *E. coli-P. pastoris* co-culture system, resulting in an 80-fold improvement in stylopine production in the medium over the previously used method[2)]. This enhanced system holds great potential for the rapid and large-scale production of various valuable metabolites. Transport engineering[3,4)] for higher production will also be discussed.

[1)] Urui et al., MCF 2021, [2)] Urui et al., BPB 2023, [3)] Yamada et al., MEC 2021, [4)] Yamada et al., BBB 2022

Co-culture, Transport engineering, Synthetic biology

発表責任者：士反伸和（shitan@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：2D3a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D3 会場

三環性クマリン生合成における環化制御機構の解析
Analysis of the cyclization mechanism in biosynthesis of tricyclic coumarins
○新屋 和花[1]、韓 俊文[1]、三浦 謙治[2]、棟方 涼介[1,3]、矢﨑 一史[1]([1]京大生存研、[2]筑波大生命環境、[3]JST さきがけ)
○Nodoka SHINYA[1], Junwen HAN[1], Kenji MIURA[2], Ryosuke MUNAKATA[1,3], Kazufumi YAZAKI[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]JST-PRESTO)

植物において、クマリン骨格にフラン環が付加したフラノクマリン（FC）類やピラン環が付加したピラノクマリン（PC）類は、外敵に対する化学防御に寄与していると考えられている。これらの三環性クマリンの生合成において osthenol の環化反応を担うシトクロム P450 酵素がセリ科植物 *Peucedanum praeruptorum* で最近報告され、この酵素は FC 類の前駆体となる（+）-columbianetin と PC 前駆体 (+)-lomatin を同程度の効率で生成する。しかし、アシタバ（*Angelica keiskei*）には FC 類と PC 類をそれぞれ特異的に蓄積する 2 つの系統があることから、未解明のフラン環／ピラン環の形成制御機構が存在すると考えられた（Figure 1）。我々はこの触媒機構の解明を目的とし、アシタバのトランスクリプトーム解析に基づく環化酵素遺伝子の単離や酵素機能解析を進めた。

Furanocoumarins (FCs) and pyranocoumarins (PCs) are plant specialized metabolites possessing the furan-ring and the pyran-ring attached to the coumarin skeleton, respectively. These tricyclic coumarins contribute to the chemical defense against biotic stresses. A recent study reported that a single cytochrome P450 enzyme from an Apiaceae plant forms both (+)-columbianetin and (+)-lomatin, which are intermediates of FCs and PCs, respectively, at a similar efficiency. In contrast, 'ashitaba' (*Angelica keiskei*), an Apiaceae herb, has two chemotypes on these coumarin groups, one specifically accumulates FCs and the other is specific to PCs. This variation suggests an unknown mechanism to regulate the cyclization pattern of osthenol (Figure 1). In order to elucidate the cyclization mechanism, we performed transcriptomic analysis of 'ashitaba' to isolate osthenol cyclase genes and their biochemical characterization.

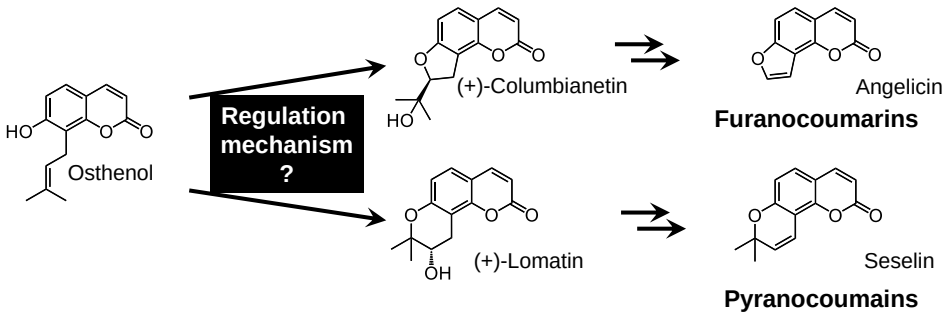


Figure 1 本研究のターゲットとするフラン環化とピラン環化の制御機構

tricyclic coumarins, chemical defense, cyclization

講演番号：2D3a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D3 会場

植物培養細胞におけるエピゲノム改変を介した新たな休眠二次代謝覚醒法と新規クロロゲン酸類生合成酵素の発見

Activation of cryptic secondary metabolite biosynthesis in cultured plant cells through the epigenome modification: discovery of a novel biosynthetic enzyme for rare chlorogenic acids

○野村 泰治[1,2]、加藤 康夫[1,2] ([1]富山県大・工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Taiji NOMURA[1,2], Yasuo KATO[1,2] ([1]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

植物培養細胞においては、元の植物体でみられていた二次代謝が休眠する現象が頻繁に起こる。この現象は、植物培養細胞を利用した物質生産の実用化を妨げる最大の要因の一つである。最近我々は、エピジェネティック修飾剤（EM 剤）の投与が、植物培養細胞における休眠二次代謝の覚醒に有効であることを発見した。タケの一種、ホウライチク（*Bambusa multiplex*）Bm 細胞に、EM 剤としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一種である suberoyl *bis*-hydroxamic acid（SBHA）を投与したところ、顕著な二次代謝の覚醒誘導がみられた。誘導物質の単離・構造解析の結果、それらは希少クロロゲン酸類である 3-*O*-*p*-クマロイルキナ酸および 3-*O*-フェルロイルキナ酸であることが分かった。そこで次に、ヒドロキシ桂皮酸-CoA とキナ酸 3 位水酸基の縮合によるエステル形成反応を触媒する新規アシル基転移酵素（BmHQT1）を SBHA 投与細胞から同定した。*BmHQT1* 遺伝子の発現レベルは、SBHA 投与によって顕著に上昇しており、さらに、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた ChIP-qPCR 解析の結果、SBHA 投与による *BmHQT1* 遺伝子の転写レベルの上昇は、同遺伝子領域のヒストンアセチル化レベルの上昇によるものであることが確認された。これは、EM 剤の投与によるエピゲノムの変化が、植物培養細胞の休眠二次代謝を覚醒に導くことを示した世界初の例である。

Utilization of plant cell cultures for high-value secondary metabolite production has received considerable attention for several decades. Undifferentiated plant cells, however, often exhibit severe decrease in the biosynthetic levels of the target compounds. We recently discovered that the treatment of plant cells with an inhibitor of histone deacetylase (HDAC), one of the epigenetic modifiers, can activate cryptic secondary metabolite biosynthesis using cultured cells of bamboo (*Bambusa multiplex*; Bm) as a model system. Treatment of Bm cells with an HDAC inhibitor, suberoyl *bis*-hydroxamic acid (SBHA), strongly induced the biosynthesis of rare chlorogenic acids, 3-*O*-*p*-coumaroyl- and 3-*O*-feruloylquinic acids. Through the native enzyme purification from the SBHA-treated Bm cells, we identified the novel acyltransferase (BmHQT1) that catalyzes the regio-specific 3-*O*-acylation of quinic acid using hydroxycinnamoyl-CoAs as acyl-donors. Transcript levels of *BmHQT1* markedly increased in Bm cells cultured in the presence of SBHA. Moreover, elevated acetylation levels of histone H3 were observed in the coding region of *BmHQT1*. The results first demonstrate the utility of HDAC inhibitors for activation of cryptic secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures.

cryptic secondary metabolite, epigenetic modifier, plant cell culture

発表責任者：野村泰治（tnomura@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2D3a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D3 会場

オオムギにおけるホルダチン合成酵素の同定

Molecular identification of hordatine-forming enzyme in barley

○宇部 尚樹[1,2]、石原 亨[3]、藪田 行哲[3]、武田 真[4]、加藤 康夫[1,2]、野村 泰治[1,2]（[1]富山県大・工、[2]富山県大・生医工研セ、[3]鳥取大・農、[4]岡山大・植物研）
○Naoki Ube[1,2], Atsushi Ishihara[3], Yukinori Yabuta[3], Shin Taketa[4], Yasuo Kato[1,2], Taiji Nomura[1,2] ([1]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [3]Fac. Agric., Tottori Univ., [4]IPSR, Okayama Univ.)

ホルダチン A（HA）に代表されるホルダチン類は、オオムギ（*Hordeum vulgare*）特有の防御物質である。HA は、桂皮酸アミドの *p*-クマロイルアグマチン（pCA）が二量体化した化合物であり、強い抗菌活性を示す。ホルダチン類は不斉中心を 2 カ所もつ光学活性物質であるが、オオムギにおいては特定のエナンチオマーのみが生合成される。しかしながら、その立体特異的な生合成機構は永く不明のままとなっていた。そこで本研究では、pCA の立体特異的な二量体化反応を触媒するホルダチン合成酵素の探索および機能解析を行った。

ホルダチン類を生合成しないパンコムギに対してオオムギの染色体断片が添加された異数体系統におけるホルダチン類の分析から、オオムギ第 2 染色体短腕の末端領域が添加されたパンコムギは、ホルダチン類を蓄積することを見いだした。この染色体領域には、pCA の酸化的二量体化反応を触媒すると推定される「ラッカーゼ」をコードする 2 つの遺伝子（*HvLAC1/2*）が座乗していた。ベンサミアナタバコおよびタケ培養細胞において HvLAC1/2 を異種発現したところ、いずれにおいても立体特異的なホルダチン合成酵素活性が確認された。このことから、オオムギにおける立体特異的なホルダチン類の生合成は，植物においてこれまで知られていなかった「生成物の立体制御能を有するラッカーゼ」（HvLAC1/2）によって行われていることが明らかとなった。

Hordatine A (HA), a dehydrodimer of *p*-coumaroylagmatine (pCA), is an antifungal compound accumulated at high levels in young barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. The enzyme responsible for the oxidative dimerization of pCA has not been identified. To identify hordatine-forming enzyme in barley, we first screened the dissection lines of wheat (*Triticum aestivum*) carrying aberrant barley chromosomes, which resulted in the detection of HA in the wheat lines carrying the distal part of the short arm of barley 2H chromosome. This chromosomal region contained two laccase genes (*HvLAC1/2*) that may encode enzymes catalyzing the oxidative coupling of pCA. *HvLAC* genes were heterologously expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves and in bamboo (*Phyllostachys nigra*) suspension cells, and HA biosynthetic activities were detected in the crude extracts of the transformants. HA formed by the enzyme reaction had the same stereo-configuration as the naturally occurring HA. These results demonstrate that HvLAC enzymes mediate the oxidative coupling of pCA in a stereo-specific manner during HA biosynthesis.

barley, hordatines, laccase

講演番号：2D3a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D3 会場

青パパイヤ果実の形状における機能性の検討
Investigation of functionality in the shape of unripe papaya fruits
○解良 康太、浅田 遥香、菊地 駿介、齊藤 翔真、飯嶋 益巳、中山 勉（東農大応生）
○ Kota KERA, Haruka Asada, Shunsuke Kikuchi, Shoma Saito, Masumi Iijima, Tsutomu Nakayama (Tokyo Univ. of Agriculture)

パパイヤ（*Carica papaya L.*）はアブラナ目パパイヤ科に属する草本植物であり、日本国内では F1 両性品種が多くの地域で栽培されている。これら栽培品種では雄株が胚性致死となるため、両全株と雌株の二種類の性別が存在する。両全株由来の果実は縦長である一方、雌株由来の果実は丸みを帯びた形状となる。フルーツとして知られている完熟パパイヤであるが、東南アジアを中心として未成熟果実（青パパイヤ）を野菜として食べる文化も存在する。青パパイヤは、完熟パパイヤにはない機能性を有することから近年益々注目されている。本発表では、青パパイヤに特徴的な機能性成分であるカルパイン誘導体に着目し、性別（形状）の関係について比較解析した結果について報告する。やぎぬま農園（茨城県那珂市）より両全株由来の果実と雌株由来の果実を各 4 個体入手し、果皮、果実、種子に分けて分析を行った。LC/MS を用いたメタボローム解析に加え、総ポリフェノール量、プロテアーゼ活性についても評価した。その結果、カルパイン誘導体の量に違いがあったことから、パパイヤ果実の性別間で機能性に違いがあることが示唆された。

Papaya (*Carica papaya L.*) is a herbaceous plant belonging to the family Caricaceae in the order Brassicales. F1 hybrid papaya, which has two sex types, female and hermaphrodite, is grown in many areas in Japan. Fruit shape is a sex-linked character, and fruits from females have a pyriform shape, while those from hermaphrodites have a round shape. Although ripe papaya is used as a dessert, unripe papaya, also known as green papaya, is used as a vegetable in Southeast Asian countries. Unripe papaya has been attracting more and more attention in recent years because of their functional properties not found in ripe papaya. In this presentation, we focus on carpaine derivatives and other functionalities of unripe papaya, and report the results of a comparative analysis of the relationship between sexes. Four individuals each of fruits from female and hermaphrodite plants were obtained from Yaginuma Farm (Naka City, Ibaraki Prefecture) and analyzed separately for peel, pulp, and seeds. In addition to metabolome analysis using LC/MS, total polyphenol content and protease activity were also analyzed. The results showed differences in the amount of calpain derivatives, suggesting that there are functional differences between the sex types.

Unripe papaya, Metabolome analysis, Carpaine

発表責任者：解良康太（kk207431@nodai.ac.jp）

講演番号：2D3a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D3 会場

植物病原細菌誘引活性物質 Ethyl-β-D-glucopyranoside は，根圏のエタノールに対するストレス応答産物である
Ethyl-β-D-glucopyranoside, a phytopathogenic bacterial chemo-attractant, is a stress response product to ethanol in the rhizosphere
○白戸 梓美[1]、前木場 直輝[2]、夏目 雅裕[2]、野口 恵一[3]、宮崎 翔[4]、川出 洋[1,2]([1]東農工大農、[2]東農工大院農、[3]東農工大院工、[4]東農工大 GIR)
○ Azumi SHIRATO[1], Naoki MAEKOBA[2], Masahiro NTSUME[2], Keiichi NOGUCHI[3], Sho MIYAZAKI[4], Hiroshi KAWAIDE[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Inst. Technol., Tokyo Univ. Agric. Technol., [4]GIR, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

植物は根圏が嫌気的な環境に置かれた際に好気呼吸を抑制し、アルコール発酵によるエネルギー産生を促進するが、その最終産物であるエタノールは植物にとって毒性を有する。我々は、水はけの悪い土壌で病害が発生しやすいトマト青枯病病原菌の *Ralstonia solanacearum* 走化性誘引物質として、エタノールがβ-Glucose と結合した Ethyl-β-D-glucopyranoside (EBG) をトマト根浸出液から単離同定した。我々は植物が走化性誘因のためではなく，アルコール発酵により生じるエタノールを消去するために EBG を合成するとの仮説を立て，嫌気条件の代わりに ^{13}C 安定同位体標識されたエタノールをトマトの水耕栽培系に添加し EBG 合成能を調べた。処理後のトマト根抽出物を LC-MS で分析したところ、^{13}C 標識 EBG の合成が確認され、EBG はグルコースを用いてエタノールを配糖体化することで合成されることが明らかになった。さらにエタノールを消去する機構が植物間で広く保存されていることを確かめるため、トマト以外の 7 種類の作物についてエタノール添加栽培による EBG 合成能を LC-MS 分析によりを調べたところ、すべての試験作物から EBG の生産が確認できた。現在、我々は EBG 生合成に関与する糖転位酵素の同定を行っている。植物根圏での嫌気代謝は特に作物における耐湿性と関連するので，今後は EBG 生合成と生理的役割を明らかにしたい。
Plants promote energy production through alcohol fermentation and suppress aerobic respiration when plants sense hypoxia in the rhizosphere. Ethanol is the end product of alcohol fermentation and the toxic to plants. We have identified the Ethyl-β-D-glucopyranoside (EBG) from tomato root exudates as a chemotactic attractant of *Ralstonia solanacearum*, which is the pathogen of tomato bacterial wilt disease. Hence, we investigated whether EBG synthesis was not due to the chemotaxis-induction but to the elimination of ethanol produced by anaerobic alcohol fermentation. When tomatoes were cultured in the presence of ethanol labeled with ^{13}C stable isotope, ^{13}C-labeled EBG extracted from the root was determined by LC-MS.
Here, we investigated that EBG synthesis may be widely present in plants in order to detoxify ethanol produced by alcohol fermentation. After incubation of seven crops in hydroponic solution containing 0.5% ethanol, the production of EBG was confirmed from root extracts of all tested crops. The screening of enzymes regarding EBG biosynthesis is in progress. Our studies may reveal EBG biosynthetic pathway and provide new insights into plant hypoxic tolerance.

ethanol metabolism, hypoxia, rhizosphere

発表責任者：川出洋（hkawaide@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2D3a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D3 会場

生きた化石植物におけるジテルペンの分析と生合成に関する研究
Analysis and biosynthesis of diterpenes produced by a living fossil plant
○藤澤 里奈[1]、湊 康将[1]、新井 さくら[3]、宮崎 翔[2]、川出 洋[1,3] ([1]東農工大院農、[2]東農工大 GIR、[3]東農工大農)
○Rina FUJISAWA[1], Yasumasa MINATO[1], Sakura ARAI[3], Sho MIYAZAKI[2], Hiroshi KAWAIDE[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Tokyo Univ. Agric. Technol. GIR, [3]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

ジテルペンは病害虫に対する防御物質として樹木の樹脂酸に含まれる主要な化合物群であり、植物種や系統に特徴的な組成で構成されている。本発表では"生きた化石植物"とも呼ばれるオーストラリア原産のナンヨウスギ科植物 ウォレマイパイン（*Wollemia nobilis*)から見出されたジテルペンのプロファイルと、その生合成に関与するジテルペン合成酵素 (diTPS)に関して報告する。我々はウォレマイパインの若葉を用いて水蒸気蒸留抽出を行い、抽出物から立体異性体を含む多種類の炭化水素ジテルペンを検出し、その代謝産物であるジテルペン酸も確認した。さらにはウォレマイパインの若葉を用いて mRNA の次世代シークエンス解析を行い、データ解析を通して diTPS の候補遺伝子を複数見出した。これらをクローニングして機能解析を行った結果、いくつかの diTPS に関して機能の同定に成功し、ジテルペンの共通前駆体である geranylgeranyl diphosphate から樹脂酸へ至る生合成の概観を明らかにした。これらの結果から、ウォレマイパインにおいて先行研究では報告のないものも含め、様々な構造をもつジテルペンが生合成されていることが示唆され、この植物が 1~2 億年も前から生息し続けることが可能であった理由を垣間見ることができる。

Diterpene acids are large group of resin acids whose composition is specific to each of the tree families or genera, playing important roles against diseases and pests. We report here the diterpenes and diterpene synthases (diTPS) in *Wollemia nobilis*, an *Araucaria* plant called "living fossil". When we extracted diterpenes from the plant young leaves by steam distillation, multiple hydrocarbon diterpenes and diterpene acids, derivatives of the hydrocarbon diterpene, were detected. For some diterpenes, the presence of stereoisomers was confirmed. Furthermore, a comprehensive analysis of mRNA expressed in young leaves of *W. nobilis* was performed, resulting in the successful cDNA cloning of several diterpene synthase genes. We analyzed the function of these diTPSs genes and revealed the overview of the pathway from geranylgeranyl diphosphate, diterpene precursor, to resin acids. These results suggest that *W. nobilis* synthesizes diverse diterpenes which include some unreported compounds, helping us to understand why this plant has been able to survive for more than 100~200 million years.

Biosynthesis, Diterpene, Resin acid

発表責任者：川出洋（hkawaide@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2D3a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D3 会場

生きた化石植物における単機能型ジテルペン環化酵素の機能
Function of a monofunctional diterpene cyclase in a living fossil plant
○新井 さくら[1]、藤澤 里奈[2]、湊 康将[2]、宮崎 翔[3]、川出 洋[1,2]([1]東農工大農、[2]東農工大院農、[3]東農工大 GIR)
○Sakura ARAI[1], Rina FUJISAWA[2], Yasumasa MINATO[2], Sho MIYAZAKI[3], Hiroshi KAWAIDE[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]GIR, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

生きた化石植物とも称されるナンヨウスギ科針葉樹の一種であるウォレマイ・パイン葉部で発現するジテルペン環化酵素 cDNA の中から，WnKSL3 と名付けた環化酵素がアビエタジエン類を合成する単機能型環化酵素であることを見いだした。アビエタジエン類を合成するジテルペン環化酵素はこれまで多機能型酵素としてのみ知られており，アメリカオオモミ由来のアビエタジエン合成酵素（AgAS）は Class II と Class I の環化機構を併せ持つ。今回見いだした WnKSL3 は単機能型ジテルペン環化酵素で Class I の環化機構のみを有し，normal-コパリル二リン酸（normal-CDP）を基質として AgAS と同じアビエタジエン類を合成することを AgAS 生成物との直接比較で同定した。驚くべきことに，WnKSL3 は normal-CDP の鏡像異性体である *ent*-コパリル二リン酸（*ent*-CDP）も基質として認識し，その環化反応生成物は normal-CDP から合成されるアビエタジエン類の鏡像異性体であることをキラルカラムを用いた GC-MS 分析から明らかにした。一方、多機能型の AgAS は *ent*-CDP を基質として認識しなかった。単機能型 AS の分子進化や WnKSL3 の基質認識と鏡像異性体合成のメカニズムに関して，今後研究を展開していく。

A monofunctional cyclase, WnKSL3, which synthesizes abietadienes from normal-copalyl diphosphate (normal-CDP), was found from the cDNA expressed in the leaves of Wollemi pine. It is known that the abietadiene synthase of *Abies grandis* (AgAS) is a multifunctional diterpene cyclase catalyzing cyclization reaction from geranylgeranyl diphosphate via normal-CDP. Such multifunctional diterpene cyclase has both Class II and Class I cyclization mechanisms. The WnKSL3, a Class I diterpene cyclase, recognized normal-CDP as a substrate and produced abietadienes, which were identified by direct comparison with AgAS products. Surprisingly, WnKSL3 also recognized *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP) as a substrate, and its cyclization reaction products were enantiomers of abietadienes synthesized from normal-CDP. On the other hand, AgAS did not recognized *ent*-CDP as a substrate and produced no diterpenes. Now we are investigating molecular evolution and the substrate recognition of WnKSL3.

Biosynthesis, Diterpene, Cyclase

発表責任者：川出洋（hkawaide@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2D3a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D3 会場

ヒガンバナ科アルカロイド生合成に関わるメチル基転移酵素の解析

Characterization of methyltransferase involved in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis

○水野 紗英、海老澤 さくら、藤巻 貴宏、松島 芳隆、須恵 雅之（東農大・農化）
○Sae MIZUNO, Sakura EBISAWA, Takahiro FUJIMAKI, Yoshitaka MATSUSHIMA, Masayuki SUE (Tokyo Univ. Agric.)

スノードロップやスイセンなどのヒガンバナ科植物は、球根や葉にヒガンバナ科特有のアルカロイド（AAs）を蓄積している。AAs の中には、アルツハイマー症候群治療薬となるガランタミンなど有用な生理活性を持つ化合物もあるが、それらの生合成については不明な点も多い。AAs は、共通の前駆体である 4'-*O*-methylnorbelladine（4MeNB）が、環化反応による基本骨格形成とそれに続く複数の修飾を経て生合成されると考えられている。4MeNB は前駆体 norbelladine にある 3 つの-OH 基のうち、4'-位がメチル化された化合物である。そのため、AAs の効率的生合成には norbelladine の 4'-位を特異的にメチル化することが重要であるが、生合成酵素の 4'-*O*-methyltransferase（N4OMT）が、norbelladine の複数-OH 基をどのように認識しているかは不明である。そこで本件研究では、N4OMT の機能解析を行うことを目的とした。

スノードロップ(*Galanthus elwesii*)の根より GeN4OMT 遺伝子を単離し、pET28a を用いて N-His tag 融合タンパク質として大腸菌 BL21CodonPlus(DE3)RP 内でタンパク質を発現させた。タンパク質の精製後、種々のフェノール化合物に対する反応性を検討した結果、GeN4OMT はカテコール構造を持つ化合物を認識し、その-OH 基の片方のみをメチル化することが示された。また、基質によっては 3-位および 4-位への選択性が異なることが示された。さらに、2 価の陽イオンが活性発現に必須であることが明らかとなった。現在、基質結合部位の予測などを引き続き解析を進めている。

Amaryllidaceae alkaloids（AAs）such as galantamine are known for pharmaceutical usefulness. On the other hand, their biosynthetic enzymes have not been fully elucidated, and, even for the already identified enzymes, their molecular properties have not been completely characterized. In AAs synthesis, 4MeNB, the last common intermediate, is generated by 4'-*O*-methyltransferase (N4OMT) which methylates one of three hydroxy groups (4'-OH) in norbelladine. Since the mechanisms of the -OH recognition and efficient catalysis have not been elucidated, in this study, we aimed to characterize N4OMT. The recombinant GeN4OMT from *Galanthus elwesii* roots was expressed in *E. coli*, and the activity of various phenolic compounds was evaluated. It was shown that GeN4OMT acts on the compounds with a catechol structure and methylates only one of their -OH groups although the selectivity between the 3- and 4-positions varied depending on the substrates. Furthermore, divalent cations were essential for its activity.

methyltransferase, Amaryllidaceae alkaroid, biosynthesis

講演番号：2D3a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D3 会場

オオムギ病害抵抗性に関わる *N*-アシルトランスフェラーゼの解析

Molecular characterization of *N*-acyltransferase in barley

○勝田 瑞皐[1]、竹野谷 美穂子[2]、矢嶋 俊介[2]、須恵 雅之[1] ([1]東農大・農化、[2]東農大・バイオ)
○Mizusa KATSUTA[1], MIHOKO TAKENOYA[2], SHUNSUKE YAJIMA[2], MASAYUKI SUE[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. Agricultural Chemistry, [2]Tokyo Univ. Agric. Bioscience)

桂皮酸類アミド(HCAA)は植物の病害抵抗に関与する化合物の一つであり、一般的にストレスに応じて植物内の蓄積量が増加する。一方で、オオムギはストレスのない環境でも、恒常的に高濃度で蓄積している。オオムギとコムギの HCAA 生合成に関わるアシル基転移酵素(ACT)については、一次構造により ACT1 および ACT2 の 2 種に分けることができ、両者で基質に対する親和性が大きく異なる。また、両植物の *ACT* オルソログ、パラログのうち、オオムギの *ACT1* (*HvACT1*)のみが高レベルで発現している。このような各 ACT 間の酵素活性や転写量の差異が、オオムギとコムギにおける HCAA 蓄積の違いの要因となっていると考えられるが、その差異が生じる分子メカニズムは不明である。

そこで、①*ACT* の転写調節機構の解析を行うとともに、②ACT の立体構造解析により構造と触媒機能の関係を明らかにすることをめざした。本研究では、①*ACT* 上流配列をレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）に連結したものを、プロトプラスト内で一過的に発現させることで、プロモーター活性の評価を行った。また、同様に GUS をレポーターとしてイネの形質転換体を作成し、解析を行った。また、②大腸菌内で発現させた HvACT1 を精製後に結晶化し、基質である *p*-coumaroyl-CoA と agamatine の溶液にソーキングした。その結果、*p*-coumaroyl-CoA のみとの複合体構造が得られ、結合に関与するアミノ酸残基を推定することができた。現在、もう一方の基質である agmatine との複合体についても取得を目指している。

A group of plant secondary metabolites called HCAAs has a role in the defense against pathogens. Barley constitutively accumulates HCAAs at high concentration while other plants such as wheat generally produce them in response to stresses. In barley and wheat, the major HCAAs are synthesized by a member of BAHD acyltransferase, agmatine coumaroyltransferase (ACT), catalyzing condensation between agmatine and hydroxycinnamoyl-CoA. Among ACT isozymes, HvACT1 has the highest transcription level and enzyme activity. To elucidate the molecular bases for the control of HCAAs biosynthesis, we characterized the biosynthetic enzyme, ACT, in terms of its transcriptional regulation and enzyme structure. The promoter activity was evaluated *in vitro* by transiently expressing *ACTpro*::*Luc* in protoplasts and *in vivo* using recombinant rice possessing *ACTpro*::*GUS*. Furthermore, the crystal structure of HvACT1, one of the barley ACT isozymes, conjugated to *p*-coumaroyl-CoA was obtained, and the amino acid residues that are involved in the binding of the Co-A ester were identified.

Acyltransferase, Hydroxycinnamic acid amide, barley

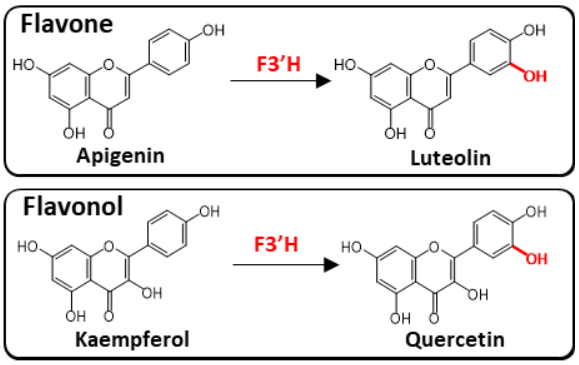
講演番号：2D3a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 D3 会場

ダイズ根におけるフラボンおよびフラボノールの蓄積と根細菌叢への影響

Accumulation of flavones and flavonols in soybean roots and their effects on the root microbiome

○松村 広志郎[1]、松田 陽菜子[1]、高松 恭子[1]、山﨑 真一[2,3]、高瀬 尚文[4]、藤井 義晴[5]、青木 裕一[2]、櫻井 望[6,7]、矢﨑 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京大生存研、[2]東北大 ToMMo、[3]理研 BRC、[4]京都先端科学大バイオ環境、[5]東京農工大農、[6]遺伝研、[7]かずさ DNA 研)
○Koshiro MATSUMURA[1], Hinako MATSUDA[1], Kyoko TAKAMATSU[1], Shinichi YAMAZAKI[2,3], Hisabumi TAKASE[4], Yoshiharu FUJII[5], Yuichi AOKI[2], Nozomu SAKURAI[6,7], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]ToMMo , Tohoku Univ., [3]RIKEN BRC, [4]Fac. Bioenviron. Sci., KUAS, [5]Fac. Agric. , Tokyo Univ. Agric. and Tech., [6]NIG, [7]KAZUSA DNA Res. Inst)

植物は根から根圏へ様々な二次代謝産物を分泌し、これらの代謝物はストレスに対する防御や、他の生物との相互作用に関与する。ダイズの根から分泌されるフラボノイド類の内、イソフラボンは根粒共生や根圏微生物叢形成に関与するが、フラボンやフラボノールのダイズ根圏での機能は不明である。世界のダイズコアコレクション 79 品種を圃場で栽培し、葉のメタボローム解析を行った。代謝物とゲノムとの関連を明らかにする metabolome-genome wide association study (mGWAS)を行ったところ、B 環 3’位の水酸基に関してフラボンおよびフラボノールの蓄積の異なる二つの品種群が見出された。その原因遺伝子として *flavonoid 3'-hydroxylase* (*F3'H*) 遺伝子が推定され、ALT 型品種のコード領域内には塩基の欠失が見出された。フラボンやフラボノールの B 環 3’位の水酸化が根圏での相互作用に影響するかを解析するために、REF 型および ALT 型品種を圃場で栽培し、葉と根におけるフラボンおよびフラボノールの定量と根における微生物叢の解析を行った。現在、REF 型および ALT 型、計 20 品種の代謝物解析と F3’H 活性の測定に取り組んでいる。



Among flavonoids secreted by soybean roots, isoflavones are involved in nodulation process and shaping rhizosphere microbiota. However, the functions of flavones and flavonols in the soybean rhizosphere remain unknown. A metabolome-genome wide association study (mGWAS) of 79 cultivars from the World Soybean Core Collections grown in the field revealed two groups of cultivars with different flavone and flavonol accumulation in leaves. *Flavonoid 3'-hydroxylase* (*F3'H*) gene was suggested to be a causative gene, and a base deletion was found in the coding region of the ALT-type cultivars. To analyze the effects of hydroxylation of flavones and flavonols at the 3' position of the B ring to their interaction in the rhizosphere, REF- and ALT-type cultivars were grown in the field, and quantification of flavones and flavonols in leaves and roots, and analysis of root microbiota were conducted. We are currently working on metabolite analysis and measurement of F3'H activity in a total of 20 REF- and ALT-type cultivars.

flavonoid, rhizosphere, microbiota

講演番号：2D3a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 D3 会場

柑橘クマリン生産機構の解明に向けたトランスクリプトーム解析

Transcriptomic analysis of the molecular mechanism of citrus coumarin production

○市川 公康[1]、松下 修平[1]、新屋 和花[1]、松川 哲也[3,4]、棟方 涼介[1,2]、矢崎 一史[1]([1]京都大・生存研、[2]JST さきがけ、[3]近大・附属農場、[4]近大・生物理工)
○Kimiyasu ICHIKAWA[1], Shuhei MATSUSHITA[1], Nodoka SHINYA[1], Tetsuya MATSUKAWA[3,4], Ryosuke MUNAKATA[1,2], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]JST-PRESTO, [3]The Experimental Farm, Kindai Univ., [4]BOST, Kindai Univ.)

クマリン類は植物が生産するフェノール系二次代謝産物の一種であり、捕食者への化学防御や、鉄欠乏に対する適応といった役割などが報告されている。柑橘類は、おもに外果皮の分泌腔にクマリン類を高蓄積し、それらはヒトの健康に有益または有害な生理活性をもつことから育種上のターゲットとして注目されている。例えば、オーラプテンは認知機能維持効果が報告されており、一方でフラノクマリン類と呼ばれるサブグループは光毒性や薬物代謝かく乱作用を示す。柑橘類におけるクマリン類の代謝経路については、生合成酵素遺伝子の一部が同定されているのみで、未だ多くの反応段階が明らかになっていない(Fig. 1)。また、輸送や転写制御のメカニズムも不明である。そこで本研究では、クマリン生産を担う分子機構の解明を目的とし、クマリン高蓄積種グレープフルーツのトランスクリプトーム解析を通じて、クマリン代謝関連遺伝子群の網羅的探索および機能解析を進めた。

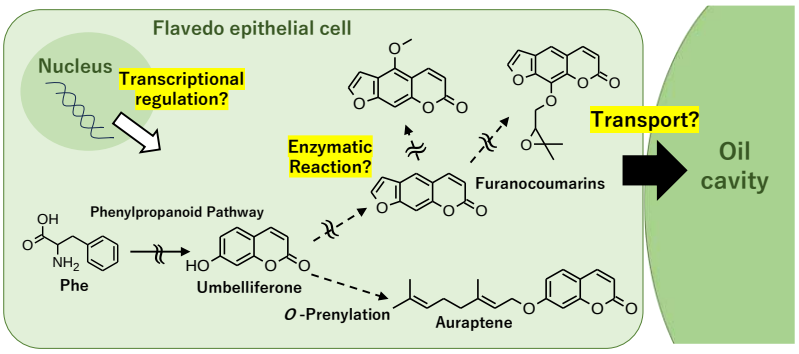


Fig. 1 クマリン代謝の概略図。柑橘類果実において、クマリンは外果皮上皮細胞（Flavedo epithelial cell）において生合成・分泌され、細胞間隙である分泌腔（oil cavity）に蓄積する。破線、未知の生合成反応。波線、複数の反応。

Coumarins are one of the phenolic secondary metabolites produced by plants and play roles in chemical defense against herbivores and in iron deficiency. Citrus plants accumulate a variety of coumarins mainly in the extracellular oil cavity. Citrus coumarins have drawn attention as breeding targets because of their physiological activity either beneficial or detrimental to human health. For example, auraptene is reported to maintain cognitive function, while furanocoumarins exhibit phototoxicity and disturb pharmacokinetics of oral medicines. However, the molecular mechanisms underlying coumarin production, *i.e.*, biosynthesis, transport, and transcriptional regulation, are unrevealed except for a few biosynthetic genes of some representative coumarins. To elucidate the molecular machinery of the coumarin production, we performed in this study transcriptomic analysis of grapefruit RNA-seq data and screened for candidates of coumarin metabolic genes.

coumarin metabolism, citrus, transcriptomic analysis

発表責任者：市川公康（ichikawa.kimiyasu.58r@st.kyoto-u.ac.jp）

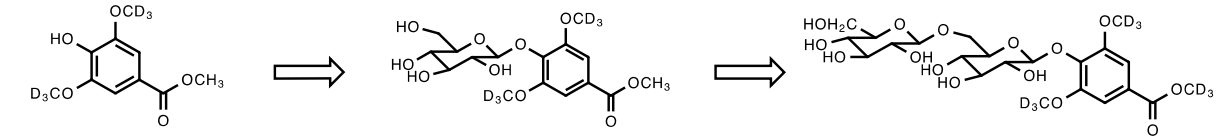
講演番号：2D3a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 D3 会場

マヌカハニーに特徴的に含まれるレプトスペリン生合成経路の化学的解明

Chemical elucidation of the biosynthetic pathway of leptosperin, a characteristic component of manuka honey

○加藤 陽二[1,2]、古谷 優夏[1]、中井 逸斗[1]、高岡 瑛未[1]、村田 芳行[3]、丹羽 利夫[4]([1]兵庫県大環境人間、[2]兵庫県大先端食セ、[3]岡山大院環境生命、[4]修文大学)
○Yoji Kato[1,2], Yuka Furutani[1], Hayato Nakai[1], Emi Takaoka[1], Yoshiyuki Murata[3], Toshio Niwa[4] ([1]Univ. of Hyogo, SHSE, [2]Univ. of Hyogo, RIFNS, [3]Univ. of Okayama, [4]Shubun Univ.)

レプトスペリン（メチルシリンゲート二糖配糖体：methyl syringate (MSYR)- β-*O*-gentiobioside）はマヌカハニー及びマヌカ植物（*Leptospermum scoparium*）の花蜜に特徴的・特異的に存在する。UMF 協会によるマヌカハニー認証にも利用されているが、植物体での生合成機序は不明である。本研究では MSYR からレプトスペリン生合成に至る経路を化学的に解明することとした。マヌカ花蜜から単糖配糖体 MSYR- β-*O*-glucoside（MSYR-glucose）が検出され、レプトスペリン前駆体であることが予想された。二つのメトキシ基に重水素を導入した安定同位体標識 MSYR-d_6 体を開花しているマヌカ植物に与えると、花から MSYR-d_6-glucose 及びレプトスペリン-d_6 体が検出された。合成 MSYR-d_6-glucose を植物に投与しても花からレプトスペリン-d_6 体が見出されたことから、単糖が MSYR に１分子ずつ結合していることが考えられた。媒介する酵素の同定については今後の課題である。



Leptosperin (methyl syringate (MSYR)-β-*O*-gentiobioside) is specifically found in manuka honey and the nectar of manuka plant (*Leptospermum scoparium*). Leptosperin is applied to the certification of manuka honey by UMFHA, but there is no report on how the chemical is synthesized in the plant. Then, this research focuses on the chemical pathway of leptosperin biosynthesis from MSYR aglycone. MSYR-glucose was found in the nectar of manuka. From the structural point of view, MSYR-glucose is a possible precursor of leptosperin. When stable isotopic MSYR-d_6 was supplemented to the flowering branch of manuka, both MSYR-d_6-glucose and leptosperin-d_6 were identified from the flower homogenate. Leptosperin-d_6 was also formed by supplementation of synthetic MSYR-d_6-glucose, suggesting that leptosperin was synthesized by two serial glucose conjugations from MSYR. The identification of the enzyme that mediates the conjugation is the remaining task.

manuka, leptosperin, biosynthesis

発表責任者：加藤陽二（yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：2D3a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 D3 会場

GC/MS メタボローム解析を用いたショウガの品種差比較
Comparison of Ginger Cultivar Differences Using GC/MS Metabolome Analysis
○石井 寿成[1]、西殿 悠人[2,3]、田中 謙[1]、坂本 雄紀[2] ([1]島津製作所、[2]立命館大薬、[3]立命館大総研)
○TOSHINARI ISHII[1], YUTO NISHIDONO[2,3], KEN TANAKA[1], YUKI SAKAMOTO[2] ([1]Shimadzu Corporation, [2]Ritsumeikan Univ., [3]Ritsumeikan Research Org.)

ショウガはショウガ科ショウガ属の多年草植物であり、古来より、食品、生薬、香辛料として使用されてきた。現在、様々な品種のショウガが流通しており、根茎のサイズが小さい品種（金時ショウガなど）は薬用に優れており、根茎のサイズが大きい種（土佐ショウガなど）は食用に優れているとされている。このようなショウガの特性は含有成分の相違に由来するものと考えられるが、各ショウガ品種の詳細な化学的特性については、ほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、一次代謝産物と二次代謝産物の統合メタボローム解析を用い、金時ショウガと土佐ショウガの品種差比較を行ったので報告する。

Bligh & Dyer 法を応用した抽出操作により、一次代謝産物と二次代謝産物の両方を分画抽出し、GC-MS を用いて分析した。同定した一次代謝産物 150 成分および二次代謝産物 30 成分について、統計解析を行った結果、金時ショウガではジテルペンやフェノール性化合物などの二次代謝産物が相対的に多く含まれており、土佐ショウガでは、糖類やアミノ酸などの一次代謝産物が相対的に多く含まれることが分かった。すなわち、一般的に知られているショウガの使い分けが、化学的にも妥当であることが示唆された。

Ginger has been used as a crude drug, functional food, and spice. Various cultivars are distributed depending on their uses. Traditionally, cultivar with small rhizomes (such as Kintoki ginger) is considered to be suitable for medicinal use, and large one (such as Tosa ginger) is used as food ingredients. However, there has been no scientific evaluation by comprehensive compound comparison. In this study, we compared the differences between Kintoki and Tosa ginger using an integrated metabolome analysis of primary and secondary metabolites.
Both primary and secondary metabolites were extracted by a modified Bligh & Dyer extraction procedure, and both metabolites were analyzed by GC-MS.
From this analysis, 150 primary and 30 secondary metabolites were identified. As a result of statistical analysis, it was found that secondary metabolites such as diterpenes were relatively high in Kintoki ginger, and primary metabolites such as saccharides were high in Tosa ginger. It was suggested that the commonly known use of ginger is chemically appropriate.

terpene, metabolite, ginger

発表責任者：石井寿成（ishii.toshinari.i9t@shimadzu.co.jp）

講演番号：2D3p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 D3 会場

マメ科植物におけるストリゴラクトンの構造多様化に関わる酵素の同定

Identification of enzymes responsible for diversification of strigolactones in Fabaceae

○本間 大翔[1]、内田 聖乃[2]、若林 孝俊[1,2]、滝川 浩郷[2]、水谷 正治[1]、杉本 幸裕[1] ([1]神戸大院農、[2]東大院農)
○Masato HOMMA[1], Kiyono UCHIDA[2], Takatoshi WAKABAYASHI[1,2], Hirosato TAKIKAWA[2], Masaharu MIZUTANI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1] ([1]Kobe University, [2]The Univ. of Tokyo)

ストリゴラクトン (SL)は根圏情報伝達物質として根寄生雑草種子の発芽刺激活性やアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導活性を有するとともに、植物ホルモンとして植物の形態を制御する。多くのマメ科植物は SL として orobanchol を根から分泌し、さらに orobanchol を推定前駆体とする様々な SL を生産する。具体的には orobanchyl acetate、medicaol および fabacyl acetate がササゲ、タルウマゴヤシおよびエンドウの根滲出液から単離された。これら多様な SL の生合成経路およびその構造多様性に関する生物的意義は明らかになっていない。本研究ではマメ科植物の orobanchol の構造多様化に関わる酵素の同定を目指した。

CYP の阻害剤である unicolazole-P または DOX の阻害剤である prohexadione を orobanchol とともに水耕液に加え、植物体による代謝を解析した。その結果、タルウマゴヤシでは orobanchol から medicaol への変換に DOX が関与していることが示唆された。エンドウでは DOX により orobanchol から生合成された fabacol がアセチル化され fabacyl acetate が生成することが示唆された。続いて、トランスクリプトーム解析および共発現解析により候補遺伝子を絞り込み、大腸菌発現系で調製した組み換え酵素を用いて酵素アッセイを行った。その結果、orobanchol を基質とする DOX である medicaol synthase (MOS)と fabacol synthase (FOS)を、タルウマゴヤシおよびエンドウからそれぞれ同定した。また、同様の解析により fabacol acetyltransferae (FAT)をエンドウから同定した。

In Fabaceae plants, several SLs which are presumed to be biosynthesized from orobanchol have been isolated. Orobanchyl acetate, medicaol and fabacyl acetate were isolated from the root exudates of cowpea, barrel medic and pea, respectively. Although the biosynthetic pathway to orobanhol has been revealed, enzymes responsible for the biosynthesis of these orobanchol derivatives remain to be unknown. In this study, we report the identification of enzyme converting orobanchol to these SLs. By feeding plants with the substrates and the CYP or DOX inhibitors, metabolic pathways were analyzed. Subsequently, candidate genes were selected by transcriptome analysis and co-expression analysis. The recombinant proteins of candidate genes were expressed in E. coli and the enzyme activity was investigated, resulting in the identification of DOX enzymes, MOS and FOS converting orobanchol to medicaol or fabacol, respectively. We also identified fabacol acetyltransferase (FAT).

strigolactone, biosynthesis, fabaceae

講演番号：2D3p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 D3 会場

バラ科イチゴのテルペン系香気成分の放出を担う候補遺伝子の解析

Analysis of candidate genes for the emission of volatile terpenes in Rosaceae strawberry

○後藤 桃佳[1]、段 奈々子[1]、上岡 颯人[1]、李 豪[1]、橘 頼之[1]、市野 琢爾[1,2]、杉山 暁史[1]、棟方 涼介[1]、矢﨑 一史[1] ([1]京都大・生存研、[2]神戸薬科大)
○Momoka GOTO[1], Nanako DAN[1], Hayato UEOKA[1], Hao LI[1], Yoriyuki TACHIBANA[1], Takuji ICHINO[1,2], Akifumi SUGIYAMA[1], Ryosuke MUNAKATA[1], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]RISH Kyoto Univ., [2]Kobe Pharma. Univ.)

植物の放出する揮発性有機化合物（Volatile Organic Compounds：VOCs）は、花粉媒介者の誘引や害虫忌避といった植物と他生物間のコミュニケーション、また熱保護などの非生物的ストレス応答に貢献する。VOC はこれまで受動拡散によって細胞外に放出されると考えられてきたが、近年、輸送体や lipid transfer protein を介した能動的な分泌機構が報告された。しかしながら依然報告例は少なく、VOC 細胞外分泌機構の理解は乏しいままである。特に、植物 VOC の中で量・種類が最も多いテルペン類についての知見は少ない。そこで我々は、成熟に伴って果実から多量のテルペン系 VOC を放出するバラ科の草本オランダイチゴ（*Fragaria* × *ananassa*）を実験材料とし、イチゴのテルペン系香気成分分泌を担う分子機構の解明を目的とした（Fig. 1）。イチゴ果実は成熟とともにテルペン放出量が増加することから、成熟過程を追ったトランスクリプトーム解析により候補遺伝子を取得し、ベンサミアナタバコを用いた一過的発現系によるテルペン分泌能の評価、及び細胞内局在解析を行った。また、イチゴの様々な組織を用いた遺伝子発現解析も進めた。

Plants produce a variety of volatile organic compounds (VOCs), which contribute to the attraction of pollinators, avoidance of enemies, protection against heat, and so on. It has been thought that VOCs are emitted by passive diffusion, but recently active secretion of VOCs by a transporter and a lipid transfer protein has been revealed. However, the knowledge about the active secretion mechanism of VOCs especially for terpenes is still very limited. Therefore, we aimed to elucidate the molecular mechanism of terpene secretion in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*, Rosaceae) (Fig. 1), which emits large amounts of mono- and sesquiterpenes from mature fruits. In this study, we performed *in silico* screening for candidate genes in transcriptomes of strawberry fruits, tissue-specific expression analysis, and subcellular localization analysis and characterization of terpenoid secretion function of the candidate proteins.

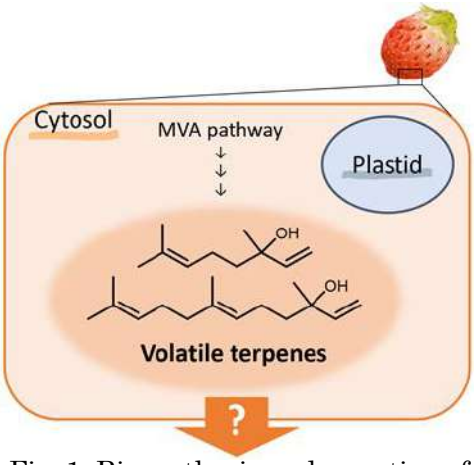


Fig. 1. Biosynthesis and secretion of volatile terpenes in strawberry

transport, volatile terpene, strawberry

講演番号：2D3p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 D3 会場

トマト由来 UDP-xylose 4-epimerase の酵素学的解析
Enzymatical characterization of tomato UDP-xylose 4-epimerase
○服部 悠太[1]、稲葉 環[1]、太田 信吾[1]、大西 利幸[2]([1]静大院・総科技・農、[2]静大・グリーン研)
○Yuta HATTORI[1], Tamaki INABA[1], Shingo OHTA[1], Ohnishi OHNISHI[2] ([1]Grad. Sch. Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

UDP-xylose epimerase (UXE) は，植物の様々な糖鎖および配糖体の合成に不可欠なヌクレオチド糖である UDP-arabinose の生合成に関与する酵素である。UDP-arabinose は，フラボノイド配糖体や香気配糖体など特化代謝産物の合成に寄与している。トマトは大気中の揮発性有機化合物である(*Z*)-3-hexenol を取り込み，(*Z*)-3-hexenyl β-viciaonoside (HexVic) を生成する。HexVic は，トマトの害虫であるハスモンヨトウ（*Spodoptera litura*）に対して成長抑制活性を示す化学防御物質であり，我々は糖転移酵素 UGT91R1 が UDP-arabinose を糖供与体として HexVic を生合成することを明らかにした（*Nature communications*, 2023)。トマトは二糖部分に xylose を有する(*Z*)-3-hexenyl β-primeveroside (HexPri) も生合成することが知られており，HexVic と HexPri の生合成の制御や生理学的機能について知見は不十分である。そこで我々は，トマトにおける UDP-arabinose と UDP-xylose の内生量を制御すると考えられる UXE の同定と機能解明を行った。植物体内において UXE は UDP-xylose の C-4 位の水酸基を異性化して UDP-arabinose を生成するため，植物由来 UXE 遺伝子の進化系統樹解析から *SlUXE1* を候補遺伝子として選抜した。大腸菌異種発現系を用いて酵素機能解析を行った結果，SlUXE1 が UDP-xylose を基質として UDP-arabinose を生成することを見出した。また(*Z*)-3-hexenol を曝露したトマトの遺伝子発現量を調査した結果，SlUXE1 の発現量は暴露時間 30 分で有意に増加した。以上より，選抜した候補遺伝子はトマト生体内に UDP-arabinose を供給する UDP-xylose 異性化酵素であることを明らかにした。

UDP-xylose epimerase (UXE) is an enzyme involved in the biosynthesis of UDP-arabinose. Tomatoes take up (Z)-3-hexenol to produce (*Z*)-3-hexenyl ß-viciaonoside (HexVic), a chemical defense compound with growth inhibitory activity against *Spodoptera litura*. We have shown that the glycosyltransferase UGT91R1 biosynthesizes HexVic using UDP-arabinose as a sugar donor (*Nature communications*, 2023). In this study, we identified and elucidated the function of Tomato UXE (SlUXE1) , which is thought to regulate the endogenous amounts of UDP-arabinose and UDP-xylose in tomato.

UDP-xylose epimerase, specialized metabolism, tomato

講演番号：2D3p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 D3 会場

微細藻ユーグレナのゲノム編集によるカロテノイド生合成経路の解明

Elucidation of carotenoid biosynthetic pathway using genome editing in microalga *Euglena gracilis*

○玉木 峻[1]、腰塚 悠貴[2]、野村 俊尚[1,3]、石川 まるみ[4,5]、山田 康嗣[4,5]、鈴木 健吾[4,5]、篠村 知子[2]、持田 恵一[1,5,6,7]（[1]理研・CSRS、[2]帝京大・理工・バイオ、[3]山形大・農、[4]（株）ユーグレナ、[5]理研・BZP、[6]横浜市大、[7]長崎大）

○Shun TAMAKI[1], Yuki KOSHITSUKA[2], Toshihisa NOMURA[1,3], Marumi ISHIKAWA[4,5], Koji YAMADA[4,5], Kengo SUZUKI[4,5], Tomoko SHINOMURA[2], Keiichi MOCHIDA[1,5,6,7] ([1]RIKEN CSRS, [2]Dep. Biosci., Fac. Sci. Eng., Teikyo Univ., [3]Fac. Agric., Yamagata Univ., [4]euglena Co., Ltd., [5]RIKEN BZP, [6]Yokohama City Univ., [7]Nagasaki Univ.)

カロテノイドは植物、藻類において生合成され、ヒトでは高い抗酸化能を持つ有用物質である。二次共生藻類であるユーグレナは、植物や緑藻には存在しないジアジノキサンチンなどのユニークなカロテノイド分子を有しており、当研究グループはユーグレナのカロテノイド合成経路の解明を進めてきた。これまでの大腸菌発現系を用いた解析により、リコペン環化酵素 *EgLCY*、β-カロテン水酸化酵素 *EgCYP97H1*、*EgCYP97F2* 遺伝子を同定した。本研究では、ゲノム編集法により各遺伝子欠損株を作出することで、これらの遺伝子のカロテノイド生合成への寄与を明らかにすることを目指した。

lcy および *cyp97h1* 変異株の培養液はそれぞれピンクおよびオレンジ色であった。カロテノイド合成阻害剤（ノルフルラゾン）実験の結果を踏まえると [1]、顕著なカロテノイド欠乏に伴い葉緑体発達能を失ったことが示唆された。これらの変異株のカロテノイド組成を分析したところ、*lcy* 変異株はリコペンのみを蓄積し、*cyp97h1* 変異株は β-カロテンに加えて、その水酸化カロテノイドを微量に蓄積した。そこで、*cyp97h1 cyp97f2* 二重変異株を作出したところ、水酸化カロテノイドは検出されなかった。これらの結果から、EgLCY はユーグレナで唯一のリコペン環化酵素であり、EgCYP97H1 および EgCYP97F2 は冗長的に機能する β-カロテン水酸化酵素であることが明らかになった [2]。

Carotenoids are synthesized in plants and algae. Microalga *Euglena gracilis* possesses unique carotenoids such as diadinoxanthin, which are not found in plants or green algae. Using the *Escherichia coli* expression system, we identified the lycopene cyclase (*EgLCY*) and β-carotene hydroxylase (*EgCYP97H1* and *EgCYP97F2*) genes in *E. gracilis*. In this study, we aimed to clarify the contribution of these genes to carotenoid biosynthesis by generating knockout mutants for each gene using CRISPR-Cas9 genome editing.

The culture of the *lcy* and *cyp97h1* mutants were pink and orange, respectively. Considering the results of experiments using norflurazon, carotenoid synthesis inhibitor [1], their chloroplast undevelopment suggested to be caused by marked deficiency in carotenoids. The carotenoid analysis in these mutants showed that the *lcy* mutants accumulated only lycopene, while the *cyp97h1* mutants accumulated β-carotene and trace amounts of hydroxylated carotenoids. We then generated the *cyp97h1 cyp97f2* double mutants, and they had no hydroxylated carotenoid. These results demonstrated that EgLCY is the sole lycopene cyclase, and EgCYP97H1 and EgCYP97F2 redundantly function as β-carotene hydroxylases in *E. gracilis* [2].

[1] Tamaki et al. (2023) BBB 87: 491-500.; [2] Tamaki et al. (2023) Plant Physiol. 191: 2414-2426.

carotenoid, *Euglena*, genome editing

発表責任者：玉木峻（tamaki.shun61@gmail.com）

講演番号：2D3p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 D3 会場

コーヒー由来テルペン類配糖化酵素遺伝子の単離同定および基質選択性に係る領域の探索
Isolation of terpene glycosyltransferase genes from coffee and exploration of regions related to substrate specificity.
○井田 美帆、佐々木 香織、川上 寛子、水野 幸一（秋田県大生物資源）
○Miho IDA, Kaori SASAKI, Hiroko KAWAKAMI, Kouichi MIZUNO (Akita Pref. Univ.)

コーヒー豆の優劣を決める重要なファクターの一つである特有の芳香の主成分として、テルペン類が挙げられる。これらテルペン類は、植物体内での生合成後は揮発性であるため速やかに大気中へ放出されるが、一部は配糖化を受け、チャでは二糖配糖体として蓄積していることが報告されている。この配糖化は、第一段階目は UGT（UDP-glucose glycosyltransferase : UGT）が、第二段階目は GGT（Glycoside-specific glycosyltransferase : GGT）が触媒している。本研究では *Coffea arabica* におけるテルペン類の配糖化を担う酵素遺伝子の網羅的解析を進め、それら揮発性物質の植物体内における蓄積のメカニズムを明らかにする。まず配糖化酵素群の遺伝子を単離し、大腸菌発現系により組換え型酵素を生産し、その反応産物を TLC および LC-MS/MS により確認した。その結果、CaUGT4 がリナロールの一配糖化に関わり、その K_m 値は 39.07 μM であった。さらに CaGGT3 および CaGGT7 がリナロールの二配糖化に関わる配糖化酵素であると示唆された。一方、リナロールに対する基質選択性に寄与する酵素領域探索のために、基質選択性の異なる CaUGT4 および CaUGT20 を用いて 6 種のキメラ酵素（Chi_1–6）を作製した。これをもとに生産した組換え型酵素活性試験の結果から、CaUGT4 の *N* 末端配列を持つか否かで活性に違いが見られた。現在はドッキングシミュレーションによる基質ポケット近傍のアミノ酸残基に着目した部位特異的変異体の作製を試みている。

The aroma is important to decide the value of coffee beans. Linalool, which is one of the volatile terpene compounds, is dominant in the coffee aroma. Since terpenoids are generally accumulated as glycosides, the glycosylation is catalyzed by the UDP-glucose glycosyltransferases (UGTs) and the Glycoside-specific glycosyltransferases (GGTs). In this study, we identified *UGT* and *GGT* genes from *C. arabica* and analyzed them with recombinant enzymes. In TLC analysis, CaUGT4, CaGGT3 and CaGGT7 catalyzed linalool glycosylation. To conclude the reaction products of them, those glycosylated products were analyzed by LC-MS and LC-MS/MS. As a result, they were clear that the product was linalool glycosides. Now, to explain the substrate specificity, we are analyzing chimeric enzymes created between CaUGT4 and CaUGT20.

Secondary metabolite, Terpene, Glycosylation

発表責任者：井田美帆（d24g001@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2D3p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D3 会場

食品の超硫黄オミクス解析
Supersulfidomics analysis of foods
○笠松 真吾[1]、金野 文香[1]、三浦 千春[1]、大脇 拓真[1]、久龍 茉尋[1]、菱山 純一[2]、福井 健介[3]、久礼 昭二[3]、津村 和伸[3]、井田 智章[4]、居原 秀[1]([1]大公大院理、[2]大府大院理、[3]不二製油株式会社、[4]大公大研究推進機構)
○SHINGO KASAMATSU[1], Ayaka Kinno[1], Chiharu Miura[1], Takuma Owaki[1], Mahiro Kuryu[1], Junichi Hishiyama[2], Kensuke Fukui[3], Shoji Kure[3], Kazunobu Tsumura[3], Tomoaki Ida[4], Hideshi Ihara[1] ([1]Okasa Metro. Univ., [2]Osaka Pref. Univ., [3]Fuji Oil Co., Ltd., [4]Okasa Metro. Univ. Org. Res. Prom.)

硫黄は全ての生物の必須元素である。近年、システイン残基のチオール基にイオウ原子が過剰に付加された、システインパースルフィドやグルタチオンパースルフィドなどの“**超硫黄分子**”と総称されるポリスルフィド類が、生体内で酵素的に産生され、細胞内レドックスシグナルの重要な制御因子として機能することが明らかにされてきている。超硫黄分子の生合成には食事から取り込まれる外因性の硫黄含有化合物が必須であるが、食品中の超硫黄分子の含有量と組成はよく分かっていない。本研究では、超硫黄分子総量（total supersulfide content）および硫黄総量（total sulfur content）の定量系を用いて、食品の超硫黄分子オミクス解析（Supersulfidomics）を試みた。その結果、解析した全種類の食品から超硫黄分子が検出され、植物性食品では特にネギ属やアブラナ属の生鮮野菜に、動物性食品では鶏レバーに超硫黄分子が豊富に含まれていることが分かった。また、野菜スプラウトや納豆は、関連食品と比較してより豊富に超硫黄分子を含むことを見出した。これらの結果から、食品に含まれる超硫黄分子に着目したさらなる研究を行うことにより、新たな機能性食品の開発が可能であると期待される。

Sulfur is an essential element for all living organisms. It has been recently demonstrated that supersulfide, which is a collective term of polysulfides, such as cysteine persulfide and glutathione persulfide, is produced enzymatically *in vivo* and functions as an important regulator of redox signaling. Exogenous sulfur-containing compounds from foods are essential for the biosynthesis of supersulfides, but the content and composition of supersulfides in foods are not well understood. In this study, we attempted an omics analysis of supersulfides (Supersulfidomics) of foods by quantitative analysis of total supersulfide content and total sulfur content. As a result, supersulfides were detected in all types of foods analyzed, and among plant-based foods, supersulfides are especially abundant in *Allium* and *Brassica* families, and among animal-based foods, chicken liver is the richest in supersulfides. In addition, vegetable sprouts and natto contain higher amounts of supersulfides than related foods. Based on these results, it is expected that new functional foods can be developed by conducting further research focusing on supersulfides contained in foods.

Supersulfide, Sulfur, Omics

発表責任者：居原秀（hihara@omu.ac.jp）

講演番号：2D3p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D3 会場

ゼニゴケにおけるビスビベンジル化合物であるマルカンチン類の生合成の解析
Elucidation of bisbibenzyl marchantins biosynthesis in *Marchantia polymorpha*
○井上 珠緒[1]、水田 珠希[1]、石崎 公庸[2]、高梨 功次郎[3]、水谷 正治[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大院理、[3]信州大院総合理工)
○ Tamao INOUE[1], Miki MIZUTA[1], Kimitsune ISHIZAKI[2], Kojiro TAKANASHI[3], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Univ. Kobe, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Kobe, [3]Grad. Sch. Sci. and Tech., Univ. Shinshu)

コケ植物に属する苔類は、葉状体に油体と呼ばれる特徴的なオルガネラを有している。苔類ゼニゴケの油体細胞ではセスキテルペンやビスビベンジル等の二次代謝産物を高濃度に蓄積しており、これらは動物からの食害防御等の生理活性を持つ。ゼニゴケの油体に含有される代表的なビスビベンジルである marchantin 類は、p-クマル酸を経由して lunularic acid から生合成されること、シトクロム P450 が関与することが 20 年以上前に報告されているが、lunularic acid のカップリング機構および各種 marchantin への詳細な生合成経路は明らかになっていない。本研究では、marchantin 類の生合成経路に関わる酵素遺伝子を明らかにすることを目的とした。先行研究において marchantin 類の生合成を促進させる転写因子（MpMYB02 と MpMYB14）が同定されており、過剰発現株で発現が上昇する CYP を marchantin 生合成候補遺伝子として選抜した。現在、これらの生合成候補遺伝子を *Nicotiana benthamiana* の一過的発現系により in planta で基質と共に反応させる実験に取り組んでいる。

Marchantiophyta belonging to the moss family have characteristic organelles called oil bodies in their thalli. The oil body cells of the *Marchantia polimorpha* accumulate high concentrations of secondary metabolites such as sesquiterpenes and bisbibenzyls, which have physiological activities such as protection against feeding damage from animals. Marchantins, typical bisbibenzyls contained in the oil body of *Marchantia polimorpha*, has been reported to be biosynthesized from lunularic acid via cytochrome P450-dependent oxygenation. However, the coupling mechanism of lunularic acid and the detailed biosynthetic pathway to various marchantins have not been clarified. In this study, we aimed to identify the enzyme genes involved in the biosynthetic pathway of marchantins. In previous studies, transcription factors (MpMYB02 and MpMYB14) that promote the biosynthesis of marchantins have been identified, and CYPs whose expression is elevated in the overexpressing strains were selected as candidate genes for marchantin biosynthesis. We are currently working on experiments in which these biosynthesis candidate genes are reacted with substrates in planta using a transient expression system in *Nicotiana benthamiana*.

marchantin, CYP, oil body

講演番号：2D3p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D3 会場

シロイヌナズナにおける ビスマスによる酸化ストレスの誘発と DNA 損傷
Bismuth-induced oxidative stress and DNA damage in Arabidopsis thaliana

○長田 武、西村 信人、浦 直哉、小林 良（摂南大理工）
○ Takeshi NAGATA, Makoto NISHIMURA, Naoya URA, Tsukasa KOBAYASHI (Setsunan University)

ビスマス（Bi）は化粧品、半導体、鉛の代替品としても利用されている。しかし、殆どの土壌中の濃度は不明であり、植物への影響も不明である。そこで、我々はシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて、Bi による植物への影響の解明を目的としている。これまでに、Bi 処理によって細胞死が生じていることを明らかにしている。一般に、重金属イオンによって酸化ストレスが誘発されることが知られている。そこで、Bi が酸化ストレスの誘発および DNA 損傷を生じているか検討を試みた。
種々の Bi 濃度を含む寒天培地上にシロイヌナズナを播種し、2 週間後以下の解析を行った。なお、酸化ストレスの軽減試験では還元剤ヨウ化カリウムを用いた。地上部および根からトータル RNA を抽出し、逆転写後、ミトコンドリアに局在する MnSOD に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、Bi 濃度の増加に伴い発現量が減少した。また、根の生育が還元剤によって一部回復した。これらの結果から、ミトコンドリアにおいて Bi による酸化ストレスが生じていると考えられる。次に、地上部および根からゲノム DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、DNA の断片化は観察されなかった。一方、細胞周期は Bi によって阻害された。これらのことから、Bi はプログラム細胞死を誘発せず、細胞周期を阻害することで、生育阻害を惹起すると考えられる。
Bismuth (Bi) is used in semiconductors and water pipes as a substitute for lead. Until now, the Bi concentration in the soil has not been investigate. We have shown that 2 μM Bi treatment may cause cell death. We attempted to investigate whether oxidative stress induction and DNA damage occur in *Arabidopsis thaliana*.
Arabidopsis was incubated on the agar including various concentration of Bi and was harvested. Total RNA was extracted from shoots and roots, and real-time PCR was performed using primers specific for MnSOD. The shoot and root levels decreased with increasing Bi concentration. In addition, root growth was partially restored by the reducing agent KI. These results suggest that Bi-induced oxidative stress occurs in mitochondria. Next, genomic DNA was extracted from shoots and roots and applyed to agarose gel electrophoresis. No DNA fragmentation was observed. On the other hand, the cell cycle was inhibited by Bi. These results suggest that Bi does not induce programmed cell death, but induces growth inhibition by inhibiting the cell cycle.

Arabidopsis thaliana, Oxidative stress, Cell cycle

発表責任者：長田武（t-nagata@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：2D3p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D3 会場

イネの低温順化処理により誘導される高度な低温耐性の分子機構

Molecular mechanisms of advanced chilling tolerance induced by chilling acclimation treatment in rice

○提箸 祥幸[1]、岡崎 圭毅[2]、北條 優子[3]、松浦 恭和[3]、森 泉[3]([1]農研機構・生物研、[2]農研機構・農環研、[3]岡山大・資源植物)
○Yoshiyuki SAGEHASHI[1], Keiki OKAZAKI[2], Yuko HOJO[3], Takakazu MATSUURA[3], Izumi C. MORI[3] ([1]Institute of Agrobiological Sciences, NARO, [2]Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO, [3]Institute of Plant Science and Resources, Okayama University)

寒地における水稲の直播栽培では、幼苗期の低温の影響で収量が不安定となる問題がある。直播栽培を安定的な栽培技術とするためには、幼苗期の低温耐性を理解し、強化することが必須である。

我々は、様々な北海道のイネを用いて、低温遭遇前の緩やかな低温処理（低温順化処理）が、低温耐性のポテンシャルを最大にすることを確認した。そこで、イネの代謝産物、遺伝子転写産物、植物ホルモンを解析することにより、低温順化処理により誘導される低温耐性の分子機構に迫った。

北海道のイネ品種「おぼろづき」を低温順化処理したところ、低温条件下で未処理のものと比べて生存期間が 2 倍に延びた。メタボローム解析では、低温順化処理によりラフィノースとガラクチノール等の糖類、および多くの種類のアミノ酸が高蓄積することが示された。遺伝子転写産物の解析から、低温順化処理により熱ショックタンパク質遺伝子や活性酸素消去系関連遺伝子を含む多くのストレス応答遺伝子の発現が増加することが示された。また、低温順化処理によりアブシシン酸含量が未処理のものと比べて 10 倍に高まった。我々の研究から、低温順化処理により誘導されるイネの高度な低温耐性は、複数のストレス応答機構が同時に活性化することに起因することが明らかになった。

今後は低温耐性を効果的に誘導する方法を検討し、水稲の直播栽培に生かすことを目指す。

To make direct seeding of rice in cold regions a stable cultivation technology, it is essential to enhance chilling tolerance of rice plants at the seedling stage. We confirmed that the maximum potential for chilling tolerance of Hokkaido rice cultivars is achieved by acclimation. Therefore, we investigated the molecular alterations associated with chilling tolerance in rice by analyzing metabolites, gene transcripts, and phytohormones. The Hokkaido rice cultivar “Oboroduki,” when subjected to chilling acclimation, could survive two-fold longer in chilling conditions than did untreated plants. The metabolome analysis showed accumulation of saccharides as well as many types of amino acids, after chilling acclimation. The microarray analysis showed that the expression of many stress response genes increased after chilling acclimation. The abscisic acid content was about 10-fold higher in chilling-acclimated plants than in untreated plants. Our study revealed that the high degree of chilling tolerance in rice induced by chilling acclimation treatment is due to the simultaneous activation of multiple stress response mechanisms.

rice, chilling acclimation, chilling tolerance

発表責任者：提箸祥幸（sagehasi@affrc.go.jp）

講演番号：2D3p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D3 会場

シロイヌナズナ FYVE1/FREE1 はグルタミンに応答した TORC1 の活性化に関与する
FYVE1/FREE1 is involved in glutamine-responsive TORC1 activation in Arabidopsis thaliana.

○谷川 美頼[1,2]、磯野 江利香[2]、前田 達哉[1] ([1]浜松医大、[2]コンスタンツ大学)
○Mirai TANIGAWA[1,2], Erika ISONO[2], Tatsuya MAEDA[1] ([1]Hamamatsu Univ. Sch. of Med., [2]Univ. of Konstanz)

TORC1 は進化的に高度に保存されたプロテインキナーゼ複合体で、栄養やストレスに応答して代謝をグローバルに制御している。TORC1 はアミノ酸によってヘテロ二量体の低分子 GTPase 複合体である Rag 複合体を介して活性化されることがよく知られている。この Rag を介する経路は酵母から哺乳類に至るまで保存されている。しかしながら、植物の TORC1 もアミノ酸によってよく活性化されるのにも関わらず、植物には Rag を介する経路は保存されていない。よって植物 TORC1 がアミノ酸に応答してどのように活性化されるのかについては、ほとんどわかっていない。

最近我々は、酵母においてグルタミンが Rag 複合体に依存せずに TORC1 を活性化すること、および液胞膜タンパク質 Pib2 がグルタミンを検知するセンサーであり、グルタミンに応答して TORC1 を直接活性化することを報告した。今回、*Arabidopsis thaliana* における *PIB2* の相同遺伝子 *FYVE1/FREE1* を見出し、FYVE1 がグルタミンに応答した TORC1 の活性化に関与することを報告する。

TORC1 is a highly conserved protein kinase complex, which globally regulates cellular metabolism in response to the nutrient environment. From yeast to mammals, it is well known that TORC1 is activated by amino acids via the Rag complex, a heterodimeric small GTPase complex. However, plant TORC1 is also well activated by amino acids, the Rag complex and its upstream components are not conserved in plants. Therefore, little is known about how plant TORC1 is activated in response to amino acids.
We recently reported that glutamine activates TORC1 in yeast in a Rag complex–independent manner and that Pib2 is a glutamine sensor and directly activates TORC1 in that pathway. Here we found that *Arabidopsis thaliana* has a gene homologous to *PIB2* called *FYVE1/FREE1*, and revealed that FYVE1 is involved in the glutamine–responsive activation of plant TORC1.

TORC1, amino acid, rapamycin

講演番号：2D3p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D3 会場

苔類ゼニゴケにおけるアスコルビン酸生合成経路の同定と機能解析

Identification and functional analysis of ascorbate biosynthesis pathway in the liverwort *Marchantia polymorpha*

石田 哲也[1]、田中 泰裕[2]、小川 貴央[1,2]、丸田 隆典[1,2]、重岡 成[3]、○石川 孝博[1,2]（[1]島根大院・自然科学、[2]鳥取連大・生命資源、[3]近畿大・付属農場）

Tetsuya ISHIDA[1], Yasuhiro TANAKA[2], Takahisa OGAWA[1,2], Takanori MARUTA[1,2], Shigeru SHIGEOKA[3], ○Takahiro ISHIKAWA[1,2] ([1]Grad. Sci. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ.,, [2]Uni. Grad. Sch. Agricul. Sci., Tottori Univ.,, [3]Exp. Farm, Kindai Univ.,)

植物のアスコルビン酸（ASC）は、D-マンノース（D-Man）および L-ガラクトース（L-Gal）の誘導体を代謝中間体とする D-Man/L-Gal 経路により生合成される。GDP-L-Gal phosphorylase は同経路の律速酵素であり、その遺伝子 *VTC2* は、光合成電子伝達系を介して光により発現調節を受けることが、維管束植物シロイヌナズナや鮮類ヒメツリガネゴケを用いた研究から明らかになっている。一方、緑藻クラミドモナスの *VTC2* 遺伝子は光による発現調節を受けず、酸化ストレスにより制御されている。この事実は、陸上植物で観察される ASC 生合成の光調節機構が、進化の過程でどのように獲得に至ったのか興味が持たれる。そこで今回、陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケを対象にして、ASC 生合成経路とその調節機構について検討した。

相同性検索の結果、ゼニゴケゲノムには、既知の植物同様に D-Man/L-Gal 経路を構成する全ての酵素遺伝子が保存されていた。L-Gal 外部添加により葉状体 ASC 量が有意に増加すること、また *VTC2* 遺伝子破壊株は生育に L-Gal 要求性であることから、ゼニゴケ ASC 生合成は D-Man/L-Gal 経路が機能していることを証明した。D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子の光応答性について定量的 PCR により検討した。暗適後のゼニゴケに対し 50 μmol/m^2/s 光照射を行った結果、ASC 量は光照射時間に応じて有意に増加したが、*VTC2* 遺伝子を含め D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子の発現レベルは上昇しなかった。過酸化水素処理による酸化ストレスに対する影響についても調べた結果、*VTC2* 遺伝子発現レベルの上昇は認められなかった。以上の結果より、ゼニゴケの D-Man/L-Gal 経路構成酵素の発現制御機構は、既知植物とは異なることが強く示唆された。

In plants and green algae, ascorbate (ASC) is biosynthesized in the D-Mannose/L-Galactose (D-Man/L-Gal) pathway. GDP-L-Gal phosphorylase encoded by *VTC2* is the rate-limiting enzyme in the pathway. In higher plants and *Physcomitrella patens*, *VTC2* expression is facilitated by light in a photosynthesis-dependent manner, resulting in increased ASC contents. In contrast, in *Chlamydomonas reinhardtii*, the light-induced expression of *VTC2* is mediated by ROS, but not photosynthesis. These facts suggest that the photosynthesis-dependent regulation mechanism of ASC biosynthesis was developed in land plants. Here we focused on the most basal land plant, *Marchantia polymorpha*, and compared the regulation of ASC biosynthesis. M. polymorpha genome possessed orthologs encoding all enzymes in the D-Man/L-Gal pathway. The *VTC2*-knockout mutants showed a lethal phenomenon without an exogenous supply of L-Gal, indicating the functional D-Man/L-Gal pathway in liverwort. Unlike know plants, expression of the *VTC2* gene showed neither light nor oxidative stress responsiveness. In ASC biosynthesis, *M. polymorpha* was shown to be a primitive land plant before the acquisition of light regulation mechanisms.

ascorbate biosynthesis, liverwort, light regulation

発表責任者：石川孝博（ishikawa@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2D3p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D3 会場

転写因子ファミリー内での比較解析から根粒共生獲得の軌跡を探る

Exploring the trajectory of the acquisition of nodule symbiosis by comparative analysis within the transcription factor family

○野崎 翔平[1]、野田 桃菜[1]、小野田 浩宜[2]、三浦 謙治[1]、壽崎 拓哉[1] ([1]筑波大生命環境/T-PIRC、[2]名古屋大 NUSR)
○Shohei NOSAKI[1], Momona NODA[1], Hiroki ONODA[2], Kenji MIURA[1], Takuya SUZAKI[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Nagoya Univ.)

マメ科植物を代表とする根粒共生植物は根粒菌と共生する能力をもち、根に共生器官である根粒を形成することで大気中の窒素を栄養源として利用できる。この根粒形成に必要な遺伝子の発現を促進するのが NIN 転写因子である。NIN は窒素栄養応答の鍵転写因子 NLP から根粒共生植物特異的に派生し、根粒共生の獲得および維持において不可欠であった鍵因子と考えられている。我々はこれまでにマメ科植物ミヤコグサ由来の NIN が典型的な NLP に比べて広範な塩基認識選択性をもつことを明らかにし、この NIN 特有の DNA 結合選択性が根粒形成制御に重要であることを提唱してきた（Nishida, Nosaki et al, 2021, Plant Cell）。しかし、NIN がどのような仕組みで NLP とは異なる DNA 結合選択性を有することができたのかは不明であった。そこで本研究では、NIN の広範な DNA 結合選択性に寄与するアミノ酸残基の同定、その背景にある分子構造基盤の解明、さらに根粒共生獲得の軌跡を探ることを目指した。本大会では、代表的な NIN/NLP ファミリー転写因子群の生化学的特徴および予測構造に基づく構造生物学的考察を中心とした成果を報告する。

Legume and a few plant species live symbiotically with rhizobia to use atmospheric nitrogen as a nutrient source by forming nodules. NIN is a legume-specific transcription factor (TF) that prompts the nodulation. NIN is derived from NLPs, the key TFs of nitrogen nutrition response, which derivation has been suggested to be essential for the acquisition and continuation of nodule symbiosis. We have previously elucidated that *Lotus japonicus*-derived NIN has the DNA-binding selectivity distinct from a typical NLP, which underlies the regulation of nodulation-related genes so far. However, the molecular basis for the NIN-specific DNA-binding selectivity remains unknown. Therefore, in this study, we aimed to identify the amino acid residues that contribute to the broad DNA-binding selectivity of NIN, elucidate its molecular and structural basis, and explore the trajectory of the acquisition of nodule symbiosis. At this conference, we will show the results that focus on biochemical properties using the representative NIN/NLP family TFs and the structural insights based on predicted structures.

transcription factor, root nodule symbiosis, molecular and structural analyses

発表責任者：野崎 翔平（nosaki.shohei.ff@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2D3p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 D3 会場

地上部の光環境は根端の細胞分裂制御を介して主根の伸長を調節する

The above-ground light environment regulates the primary root elongation through the control of cell division in root tip.

○市川 晴雪、陽川 憲（北見工大院）
○Haruki Ichikawa, Ken Yokawa (Kitami Inst. Technol.)

自然環境における植物の地上部には光が必要であるが，根は通常光に晒されない。根は光に晒されることで，形態を変化させることだけでなく，地上部の光受容による根の形態変化も報告されている[1-2]。しかし，地上部の光による根の形態制御メカニズムは明らかになっていない。この研究では，根を光から保護する装置（Shaded-Root System）を作製し，地上部のみ光照射を与えたモデル植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* L.）の根の形態の観察と，主根の伸長制御に関わる因子の検証を行った。地上部のみの光照射（Shaded-Root: 以下 SR）は，植物体全体（Light）の光照射と比較して，主根長，主根径が有意に減少したが，側根原基数には有意な差が見られなかった。また，植物体全体が暗所で生育した場合（Dark）と比較すると，主根径と側根原基数は有意に増加したが，主根長には有意な差が見られなかった。また，細胞周期レポーターCYCLIN B1::GUS を用いた観察では，Light ＞ SR ＞ Dark の順に染色範囲と濃度が変化していることから，細胞分裂速度が主根の伸長速度に影響を及ぼす可能性が示唆された。以上より，地上部の光照射が何らかの因子を用いて根端の細胞分裂速度を制御し，主根の伸長を制御していることが考えられる。

The aboveground parts of plants in natural environments require light, while the roots remain in darkness. The morphological changes in roots occur under conditions of direct or indirect illumination [1-2]. However, the detailed mechanism to morphological changes remains unknown. In this study, we observed the root morphology of *Arabidopsis thaliana*, cultivated that different light environment altered the speed of cell division in root meristem. using a self-made device (Shaded-Root System), which enables only root part to grow darkness. The results of this study are summarized as follows: Shaded-root (SR) irradiation significantly reduced both primary root length and diameter, compared to the illumination of the whole plant (Light). In comparison to growth of the whole plant in darkness (Dark), there was a substantial increase in primary root diameter of lateral root primordia, while no significant difference was observed in primary root length. Additionally, of the cell cycle reporter, CYCLIN B1::GUS, revealed (Light ＞ SR ＞ Dark). This suggests that the cell division rate may influence the primary root elongation.

[1] K. Yokawa et al. *Plant Signal Behav.* 2011.　　[2] W. Xu et al. *Sci Rep.* 2013.

Arabidopsis thaliana, root, photomorphogenesis

発表責任者：陽川憲（yokawaken@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2D3p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 D3 会場

植物の根部への脂肪酸処理による地上部の二次代謝物の増加
Increase of secondary metabolites in plant leaves by the treatment of exogenous fatty acids to plant root
○小野 萌花、陽川 憲（北見工大院）
○Moeka ONO, Ken YOKAWA (Kitami Inst. Technol.)

脂肪酸は生体内においてエネルギー源、炭素源として普遍的に存在している。特に細胞膜の構成成分としての脂肪酸と、その存在様態は環境に適応するために重要な役割を果たす。例えば、低温環境下では細胞膜の流動性が低下するため脂肪酸の不飽和度を上げることで膜の流動性を保つことが知られている。また、外因性の脂肪酸分子自体が細胞レベルで様々な生理活性を持つことが知られている。しかしながら、植物組織や細胞における脂肪酸への応答はまだ不明な点が多い。本研究では外界物質との接触が多い根部での脂肪酸の応答を調べた。

実験にはシソ科のニホンハッカ、セリ科のイタリアンパセリ、イネ科のレモングラス、アブラナ科のルッコラを使用した。ポット栽培した各植物の根部のみに 0.1%(v/v)オレイン酸、リノール酸、ステアリン酸、パルミチン酸懸濁液をそれぞれ 3 時間処理し水洗した後、18 時間静置し、葉の揮発性精油成分をヘッドスペース固相マイクロ抽出法によりガスクロマトグラフィー質量分析計で測定した。結果として、根部のみに脂肪酸処理を行った際に、地上部葉の気孔の閉鎖が起こり、テルペノイド類をはじめとする二次代謝物生合成量の増加が見られた。ニホンハッカにおいてはメントールの変化は見られなかったがメントールの前駆物質であるリモネンが 180%増加することを確認した。他の植物でも二次代謝物の増加が認められた。これらの結果より、本研究で実施に使用した植物以外にも本応答の普遍性が考えられ、根への脂肪酸処理による二次代謝物増加の可能性が示唆される。

Fatty acids are abundantly present as major component of cell membrane, energy source and carbon source. Especially fatty acids constructing cell membrane are important to adapt changing circumstances. For example, cell membrane keeps its fluidity by increasing the amount of unsaturated fatty acids in cold. In addition, fatty acids are known to show various physiological activities. However, little is known the effect of free fatty acids on plant tissues and cells. In this report, we analyzed the response of plant root to fatty acids.

As a result, the treatment of fatty acids to root part of mint plants increased the amount of monoterpenes in leaves.

Fatty acids, Secondary metabolites, Plant root

発表責任者：陽川　憲（yokawaken@mail.kitami-it.ac.jp）

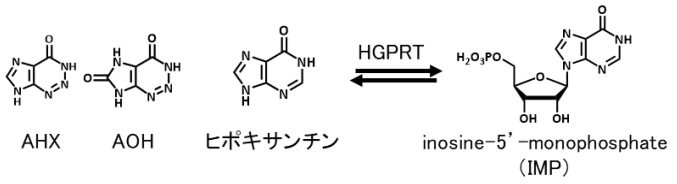
講演番号：2D4a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D4 会場

HGPRT によるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究

Chemical studies on the metabolism of fairy chemicals by HGPRT

○安井 熙[1]、崔 宰熏[1,2,3,4,5]、近藤 満[4]、呉 静[3,5]、平井 浩文[1,2,3,4,5]、河岸 洋和[3,5] ([1]静大総科技、[2]静大共創、[3]静大農、[4]静大グリーン研、[5]静大キノコ科研)
○hiromu YASUI[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4,5], mitsuru KONDOU[4], Jing WU[3,5], hirohumi HIRAI[1,2,3,4,5], hirokazu KAWAGISHI[3,5] ([1]Grad. Sch. of Integr., Shisuoka Univ, [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ, [3]Fac. Agr., Shizuoka Univ, [4]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ, [5]Res. Inst. Mushroom Sci. Tech., Shizuoka Univ)

【目的】フェアリーリングは芝草がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコの子実体が発生する現象である。当研究室では、コムラサキシメジ及びイネを用いてフェアリーリング惹起物質として、2-azahypoxanthine（AHX）、imidazole-4-carboxamide（ICA）及び 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）を発見した。これら 3 つの化合物は植物とキノコの成長を調節することが明らかになり、フェアリー化合物（fairy chemicals：FCs）と称している[1]。当研究室では hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) によってリボチド体を中間体とした新たな FCs 生合成経路の存在を推定した[2,3]。本研究では、この酵素の基質特異性と生成物の構造決定を目的とした。
【方法・結果】イネ及びコムラサキシメジ由来の HGPRT (OsHGPRT、LsHGPRT) を異種発現し、AOH のホスホリボシル化を行ったところ、２つの酵素で生成物が異なることが明らかになった。現在、二つのリボヌクレオチドを大量に酵素合成し、単離・構造決定を試みている。また、ヒポキサンチンのホスホリボシル化を行い、IMP とは異なるリボヌクレオチドが合成されるかを検証している。



2-Azahypoxanthine (AHX), imidazole-4-carboxamide (ICA), and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) were found as the fairy-ring inducing compounds and named as fairy chemicals (FCs). We hypothesized that FCs are biosynthesized via their ribonucleotides formed by hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). In this study, we aimed to determine the substrate specificity of the enzyme and the structure of the product. We heterogeneously expressed HGPRTs (OsHGPRT and LsHGPRT) from *Oryza sativa* and *Lepista sordida* and examined their phosphoribosylation activity against AOH. As a result, the two enzymes gave different ribonucleotides of AOH each other. Larger scale productions of the products are currently being enzymatically synthesized for determination of their structures. In addition, we are now examining phosphoribosylation of various substrates including hypoxanthine with the two enzymes to see whether different ribonucleotides are synthesized.

1）Kawagishi, H., *Proc. Japan Acad. Ser. B.* **95**, 29–38 (2019). 2）M. Kotajima, *J. Nat. Prod.* **86**, 710-718 (2023). 3）H. Takemura, *Org. Biomol. Chem.* **21**, 2556-2561 (2023).

fairy chemicals, HGPRT, *Oryza sativa*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

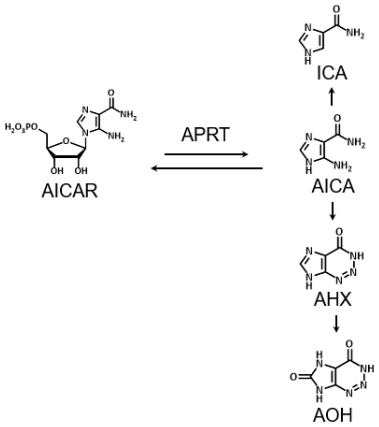
講演番号：2D4a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D4 会場

植物におけるフェアリー化合物の生合成に関する研究
Biochemical studies on biosynthesis of fairy chemicals in plants

○鳥越 満梨香[1]、崔 宰熏[1,2,3,4,5,6]、道羅 英夫[4,5,6]、呉 静[1,6]、平井 浩文[1,2,3,4,5,6]、河岸 洋和[1,6] ([1]静大・農、[2]静大・共創、[3]静大院・総合農、[4]静大院・総科技、[5]静大・グリーン研、[6]静大・キノコ科研)

○ Marika TORIGOE[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4,5,6], Hideo DOHRA[4,5,6], Jing WU[1,6], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4,5,6], Hirokazu KAWAGISHI[1,6] ([1]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Integr., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [6]Res. Inst. Mushroom Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】当研究室では、フェアリーリング病原因物質として 2-azahypoxanthine (AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA)、2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH)を発見し、フェアリー化合物 (Fairy Chemicals: FCs)と称している。これら FCs は 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)から生合成されることが明らかになっている[1]。



また、AICA は AICA ribonucleotide (AICAR)から生合成され、この反応は adenine phosphoribosyltransferase (APRT)が触媒している[2]。APRT はリン酸基の付加と脱離の両反応に関与しているが、付加反応に比べて脱離反応の活性は非常に低い。そこで、AICAR からリン酸基を脱離する反応は別の酵素が担っているのではないかと考え、APRT 以外の新たな酵素の探索に着手した。

【方法・結果】イネの培養細胞由来の粗酵素液を限外ろ過およびイオン交換クロマトグラフィーによる分画の後、AICAR を基質とした *in vitro* 酵素アッセイを行ったところ、活性が強い画分が見つかった。現在、活性が強い画分のさらなる精製を試みている。

【Purpose】 We discovered AHX, ICA and AOH as causative principles of fairy ring disease and named them fairy chemicals (FCs). FCs are biosynthesized from AICA[1].

AICA is biosynthesized from AICAR and this reaction is catalyzed by APRT. APRT is involved in both the addition and the elimination reactions of phosphate groups[2]. However, the activity of the desorption reaction is very low. Therefore, we hypothesized that another enzyme would remove the phosphate group from AICAR and searched for it.

【Methods・Results】Crude enzyme solution was extracted from rice culture cells, fractionated by ultrafiltration and ion-exchange chromatography. We did an *in vitro* enzyme assay using the obtained fractions and AICAR as a substrate and found a fraction with strong activity. Further fractionation of the fraction is now in progress.

1. Kawagishi, H. *Proc. Japan Acad. Ser. B,* **95**, 29-38 (2019).
2. Ito, A. et al, *J. Nat. Prod.*, **83**, 2469−2476 (2020).

fairy chemicals, AICA, biosynthesis

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2D4a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D4 会場

フェアリー化合物由来 SAM と SAH アナログとメチル化機構の関係
Relationship between SAM and SAH analogs derived from fairy chemicals and methylation mechanisms

○久米 こころ[1]、崔 宰熏[1,2,3,4]、道羅 英夫[1,3,4]、謝 肖男[4,5]、大内 仁志[6]、稲井 誠[6]、滝田 良[6]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,4]([1]静大院・総科技、[2]静大院・共創、[3]静大・グリーン研、[4]静大・キノコ科研、[5]宇都宮大・バイオ、[6]静県大・薬)
○Kokoro KUME[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4], Hideo DOHRA[1,3,4], Xiaonan Xie[4,5], Hitoshi OUCHI[6], Makoto INAI[6], Ryo TAKITA[6], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,4] ([1]Grad. Sch. Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Mushroom Sci., Shizuoka Univ., [5]Cent. Bio. Res. and Edu., Utsunomiya Univ., [6]Dep. Phar. Sci., Univ. Shizuoka)

【背景・目的】当研究室では、芝草の病気の一種であるフェアリーリングの原因物質として、植物成長調節活性を持つ 2-azahypoxanthine (AHX)と imidazole-4-carboxamide (ICA)を見出し、フェアリー化合物（fairy chemicals; FCs）と称している。その後の研究で、イネにおける ICA 代謝産物として、S-ICA riboside-L-Met（S-ICAr-M）と S-ICA riboside-L-Hcy（S-ICAr-H）を発見した。これらの構造は生物のメチル化機構に関与する S-adenosyl-L-Met（SAM）と S-adenosyl-L-Hcy（SAH）の構造と非常に類似しているため、ICA 代謝産物がメチル化機構に関与する可能性が示唆された。昨年度の本大会では、ICA 処理時に高発現したハロゲンメチルトランスフェラーゼ（HMT）によって、FCs 由来 SAH アナログとヨウ化メチルから対応する SAM アナログが生成されることを明らかにした。今年度本大会では、組換え HMT が SAM アナログから SAH アナログへの反応を触媒するのか検討した。
【方法・結果】イネ由来の HMT を大腸菌で異種発現し、化学合成した FCs 由来 SAM・SAH アナログを用いて活性試験を行った。FCs 由来 SAM アナログとヨウ化カリウムから対応する SAH アナログが生成されることを明らかにした。さらに FCs を処理したイネから SAM アナログの検出に成功した。無処理のイネに SAM アナログが内生しているかどうかについては検討中である。
【Purpose・Background】We found AHX and ICA from a fairy-ring forming fungus previously, and named FCs. Subsequent studies led to the discovery of S-ICAr-M and S-ICAr-H as ICA metabolites in rice. These structures are very similar to those of SAM and SAH, which are involved in the methylation of living organisms, suggesting that ICA metabolites may also be involved in the methylation. We already showed that halogen methyltransferase (HMT), which is highly expressed during ICA treatment, generated the corresponding SAM analog from FCs-derived SAH analog and methyl iodide. In this study, we examined whether recombinant HMT catalyzed the reverse reaction from the SAM analogs to the SAH analogs.
【Methods・Results】We found that FCs-derived SAM analogs and potassium iodide produced the corresponding SAH analogs. Furthermore, the SAM analogs were successfully detected in rice treated with FCs. The endogenous production of SAM analogs in untreated rice is under investigation.

fairy chemicals, methyltransferase, S-adenosylmethionine

発表責任者：久米こころ（kokoro2000618@outlook.jp）

講演番号：2D4a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D4 会場

エンドウヒゲナガアブラムシを用いた昆虫におけるサイトカイニン水酸化酵素の探索

Study on cytokinin hydroxylase in insects using pea aphids

○佐藤 渓、鈴木 義人（茨大・食生科）
○Kei SATO, Yoshihito SUZUKI (Ibaraki University)

昆虫のゴール形成には昆虫が生産するサイトカイニン（CK）の関与が示唆され、幅広い昆虫種の系統的内生 CK 量の分析によって、CK 側鎖が水酸化された形の CK である *trans*-zeatin（*tZ*）型 CK と昆虫のゴール形成能の間には有意な相関が示されている。また、ゴール形成昆虫を含む目の昆虫は *tZ* 型 CK を内生しているのに対して、ゴール形成昆虫が含まれない目の昆虫は *tZ* 型 CK を内生していないことから、ゴール形成昆虫と非形成昆虫では進化的に共通した水酸化酵素を起源としていると推測される（Tokuda *et al.* 2022）。エンドウヒゲナガアブラムシ（*Acyrthosiphon pisum*）はゴール形成昆虫が多数属するアブラムシ科に属しており、*tZ* 型 CK を有している。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において CK 側鎖の水酸化を担う酵素は CYP735A であることから *A. pisum* においても CK 側鎖の水酸化を CYP が担う可能性について、阻害剤を用いて検討した。その結果 *tZ* 型及び *cZ* 型 CK の有意な減少、水酸化を受ける前の iP 型 CK の増加が見られた。そこで *A. pisum* の CYP 配列から候補となる配列を選抜し、酵母での発現系により活性を検出した。その結果、これまでに解析した CYP に微弱ではあるが *trans* 位及び *cis* 位の水酸化活性を検出した。現在残りの CYP について活性検定を継続中である。

The involvement of insect-producing cytokinins (CKs) in insect gall induction has been suggested. A systematic analysis of endogenous CKs in a wide range of insect species has revealed a significant correlation between hydroxylated *trans*-zeatin (*tZ*)-type CKs and gall induction, suggesting that galling insects and non-galling insects share evolutionarily common hydroxylases (Tokuda *et al.* 2022). The pea aphid (*A. pisum*) belongs to the Aphidoidea superfamily, which includes many gall-inducing insects. Since CYP735A is the enzyme responsible for hydroxylation at the *trans* position in *Arabidopsis thaliana*, we investigated the possibility of CYPs being responsible for CK side-chain hydroxylation in *A. pisum* using CYP inhibitors. A significant decrease in both *tZ*-type and *cZ*-type CKs and an increase in non-hydroxylated iP-type CKs were observed. Subsequently, we compiled the sequences of CYPs in *A. pisum*, and detected their activity using a yeast expression system, resulting in the detection of weak hydroxylation activity at both the *trans* and *cis* positions in one of the CYPs analyzed so far. Currently, we are continuing activity testing for the remaining CYPs.

insect gall, cytokinin side-chain hydroxylation, *trans*-zeatin

講演番号：2D4a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D4 会場

昆虫におけるインドール-3-酢酸生合成酵素に関する研究

Studies on indole-3-acetic acid biosynthetic enzymes in insects

市川 輝[1]、國岡 祐里[1]、宮田 海[1]、日裏 雄史[6]、浅見 忠男[2]、土田 努[3]、中村 周吾[4]、藤本 瑞[5]、○鈴木 義人[1,6]（[1]茨大農、[2]東大院農、[3]富山大理、[4]東洋大情報連携、[5]農研機構本部、[6]農工大院連合農）

Hikaru Ichikawa[1], Yuri Kunioka[1], Umi Miyata[1], Takeshi Hiura[6], Tadao Asami[2], Tutomu Tuchida[3], Shugo Nakamura[4], Zui Fujimoto[5], ○Yoshihito Suzuki[1,6] ([1]Ibaraki Univ., [2]The Univ. of Tokyo, [3]Univ. of Toyama, [4]Toyo Univ., [5]NARO, [6]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

我々は従来より昆虫のゴール形成における植物ホルモン類の関与について検討してきた。主な研究対象であるシバヤナギにゴール形成を行うハバチ（*Pontania* sp.）は高濃度のインドール酢酸（IAA）を内生している。IAA の生合成経路として Trp→インドールアセトアルデヒド（IAAld）→IAA を見出し、律速段階である Trp→IAAld を触媒する酵素として芳香族アルデヒド合成酵素（AAS）PonAAS2 を同定している。化合物ライブラリーから見出した本酵素の阻害剤は、ハバチから調製した粗酵素液における Trp→IAA の変換能を抑えることから，ハバチにおける IAA 生産の主要経路が Trp→IAAld →IAA であることが確認された。これまでに調べられたショウジョウバエ，カなどの AAS は DOPA を主な基質とし，Trp 変換能は無い。内生 IAA 量が高い昆虫も含めていくつかの昆虫の AAS 活性を調べたところ，いずれも DOPA 等の芳香族アミノ酸に対する変換活性を示すのみで，Trp を基質とはしなかった。ゴール形成タマバチの AAS（DjAAS2）と PonAAS2 は基質と相互作用する基質ポケットのアミノ酸が完全に一致しているにもかかわらず，基質特異性が異なることから，アミノ酸置換実験により基質認識の違いに関する原因を追及したところ，ダイマー形成に関与するアミノ酸が基質認識の違いを生じさせていると考えられる結果が得られた。

We have been investigating the role of phytohormones in insect gall induction. The gall-inducing sawfly (*Pontania* sp.), which induces galls on the willow (Salix), produces high levels of indole-3-acetic acid (IAA). The synthetic pathway was determined to be as Trp→indole-3-acetaldehyde (IAAld)→IAA, and an aromatic aldehyde synthase (AAS) PonAAS2 was identified for the rate-limiting step Trp→IAAld. An inhibitor of this enzyme was discovered in a compound library, It inhibited the conversion of Trp to IAA in crude enzyme extracts from the galling sawfly, demonstrating that the primary biosynthesis pathway of IAA is Trp→IAAld→IAA. AAS enzymes in previously studied insects, such as fruit flies and mosquitoes, primarily utilize DOPA as a substrate and lack Trp conversion ability. Examining AAS activities in various insects, including those with high endogenous IAA, revealed that they only showed conversion activity towards aromatic amino acids such as DOPA, but not Trp. Despite the complete conservation of amino acids in the substrate pocket interacting with substrates between the AAS of a gall wasp (DjAAS2) and PonAAS2, their substrate specificities differ. Amino acid substitution experiments inferred that amino acids involved in dimer formation contribute to the differences in substrate recognition.

insect gall, indole-3-acetic acid, biosynthesis

発表責任者：鈴木義人（yoshihito.suzuki.chemeco@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：2D4a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D4 会場

コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）における 2-azahypoxanthine の生合成研究
Biosynthetic studies on 2-azahypoxanthine in *Lepista sordida*

○杉山 弥優[1]、崔 宰熏[1,2,3,4]、鈴木 智大[5]、道羅 英夫[3,4]、呉 静[1,4]、平井 浩文[1,3,4]、河岸 洋和[1,4]（[1]静大・農、[2]静大・共創、[3]静大・グリーン研、[4]静大・キノコ科研、[5]宇都宮大・バイオ）
○Miyuu SUGIYAMA[1], Jea-Hoon CHOI[1,2,3,4], Tomohiro SUZUKI[5], Hideo DOHRA[3,4], Jing WU[1,4], Hirofumi HIRAI[1,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,4] ([1]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Mushroom Sci. Tech., Shizuoka Univ., [5]Ctr. Biosci. Res. Educ., Utsunomiya Univ.)

芝草を輪状に繁茂もしくは枯死した後にキノコが発生するフェアリーリング現象の惹起物質として発見され、コムラサキシメジ菌糸体培養濾液から単離された 2-azahypoxanthin（AHX）は分類学上の科に無関係に試験したすべての植物に対して成長調節活性を示した[1)]。AHX は天然物として前例が無い六員環に窒素原子が 3 個連続した 1,2,3-トリアジン基を有しており、その唯一無二な骨格の形成機構の完全解明を目的として、コムラサキシメジを用いた AHX 生合成研究を行った。

コムラサキシメジに 8 個存在する NO synthase（NOS）の中で高発現していた組換え LsNOS2（rLsNOS2）、及び組換え LsNOS8（rLsNOS8）が産生する NO が 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) に非酵素的に取り込まれ、AHX が生成することを既に報告している[2)]。

本研究では L-Arg 処理時に高発現する NOS 遺伝子をリアルタイム PCR により探索した結果、最も高発現していた LsNOS5 遺伝子、及び哺乳類と類似したドメイン構造をもつ LsNOS4 遺伝子を大腸菌に異種発現させ *in vitro* 酵素活性試験を行い、rLsNOS5 及び rLsNOS4 が産生する NO が rLsNOS2、rLsNOS8 と同様に AHX の窒素源となることを明らかにした。

2-Azahypoxanthine (AHX) was isolated from the culture broth of a fairy ring-forming fungus, *Lepista sordida* and showed growth regulating activity against all the plants tested, independent of taxonomic family[1)]. AHX has a 1,2,3-triazine group with three consecutive nitrogen atoms in a six-membered ring, which is unprecedented as a natural product. We are conducting biosynthetic studies to elucidate the skeletal formation mechanism of AHX. We have reported that at least eight NO synthases (NOS) genes were expressed in the fungus and NO produced by two heterologously expressed NOS (rLsNOS2 and rLsNOS8) in *Escherichia coli* among the eight NOS was incorporated nonenzymatically into 5-aminimidazole-4-carboxamide (AICA) to produce AHX[2)]. In this study, we expressed LsNOS5 gene, which was the most highly expressed NOS gene during L-Arg treatment in real-time PCR, and LsNOS4 gene, which has a domain structure similar to that of mammals, in *E. coli,* and tested their enzymatic activity *in vitro*. As a result, it was proved that NO produced by the two recombinant enzymes were the nitrogen source for AHX skeleton.

1) Kawagishi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **82**, 752–758 (2018).
2) Ito, A. *Org. Biomol. Chem*. **20**, 2636-2642 (2022).

fairy chemicals, nitric oxide synthase, *Lepista sordida*

発表責任者：河岸洋和（kawaishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2D4a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D4 会場

AOH の高生産微生物の探索とその機能に関する化学的研究

Chemical studies on high-producing microorganisms of AOH and their functions

○児玉 彩乃[1]、崔 宰熏[1,2,3,4]、マングリリ ラチミタ[1]、森 智夫[1,4]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,4]([1]静大・農、[2]静大・共創、[3]静大・グリーン研、[4]静大・キノコ科研)
○ Ayano KODAMA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4], Laxmita MANGLILI[1], Toshio MORI[1,4], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,4] ([1]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [2]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Mushroom Sci., Shizuoka Univ.)

フェアリーリング惹起物質として植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX)、 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）が単離されており、これらを FCs と称する。[1,2] FCs の中で AOH は化粧品に利用されるほど安全である。しかし、AOH は化学合成が難しく、AHX から AOH への変換は xanthine oxidase によって行われるが、市販の XOD は酵素が高価である。また低濃度の AHX で酵素反応を行う必要があることから、AOH の大量合成には最適とは言えない。以前に AHX から AOH を効率的に変換する *Burkholderia contaminans* CH-1 株[3]と *Buttiauxella* sp. A111 株を発見した。本研究では、これらの菌よりも活性の高い菌の探索を目的とした。芝生の土などをサンプリングし、土から 47 種の微生物を単離した。それらの微生物を HYM 培地（hipolypeptone 10 g, yeast extract 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L, pH 7.0）で前培養した。その後 FCs、AICA（終 160 μM）を含む培地に菌を投与（終 OD=0.2）し、8 日間培養した後にそれらの培養液を HPLC で分析したところ、29 種で AHX から AOH への変換活性のみが見られた。その 29 種の微生物を用い様々な条件で CH-1 株、A111 株よりも活性の強い菌の探索を行っている。また、その微生物の種同定や生体触媒を用いて工業的に利用できるかを検討している。

We have discovered fairy chemicals (AHX and AOH) involved in the formation of fairy rings. Among FCs, AOH is safe enough to be used in cosmetics. However, chemical synthesis of AOH has not been achieved yet, and the only way to synthesize AOH is to enzymatically convert AHX with xanthine oxidase. However, commercially available xanthine oxidase is very expensive, and the enzymatic reaction must be performed at low concentrations of AHX, making it unsuitable for synthesis. We previously found two bacteria (*Burkholderia contaminans* CH-1 and *Buttiauxella* sp. A111) that efficiently convert AHX to AOH. We aimed to find bacteria more active than them. Grassland soil was collected and bacteria in the soil were isolated. We found some strains with activity equal to or greater than that of CH-1 and A111. Species identification is currently underway. The possibility of them as biocatalysts for industrial application is also being investigated.

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373 (2010) , 2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553 (2014)
3) J.-H. Choi et al., *Biosci Biotechnol Biochem*. 80, 2045 (2016)

AHX, AOH, conversion

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2D4a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D4 会場

フェアリー化合物の生合成・代謝に関する研究
Biochemical studies on biosynthesis and metabolism of fairy chemicals
○徳岡 佑[1]、崔 宰熏[1,2,3,4,5]、中原 諒太[1]、ペレリ ピエール[1]、道羅 英夫[1,2,4]、山下 起三子[2]、呉 静[2,5]、平井 浩文[1,2,3,4,5]、河岸 洋和[2,5]([1]静大院総科技、[2]静大農、[3]静大院創造、[4]静大グリーン研、[5]静大キノコ科研)
○ Yu TOKUOKA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4,5], Ryota NAKAHARA[1], Pierre PERELLI[1], Hideo DOHRA[1,2,4], Kimiko YAMASHITA[2], Jing WU[2,5], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4,5], Hirokazu KAWAGISHI[2,5] ([1]Grad. Sch. of Integr. Sci. and Tech., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., [3]Fac. of Agric., [4]RIGST and, [5]Res. Inst. Mushroom Sci.)

フェアリーリングの原因物質として発見された 2-azahypoxanthine（AHX）、imidazole-4-carboxamide（ICA）、2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）は、フェアリー化合物（Fairy Chemicals; FCs）と称されている。FCs は植物の成長を調節し、作物の収量増加やストレス耐性の付与に関与する化合物であり、農業への応用が期待される。我々は、FCs の中でも化粧品原料として利用される安全性の高い AOH の内生量を高めるために FCs の生合成・代謝経路の解明を目的とした。

これまでに、イネにおいて FCs が 5-aminoimidazole-4-carboxamide（AICA）から生合成されることを報告した[1]。しかし、イネ培養細胞由来の粗抽出液を用いて AICA から FCs への変換活性を検討すると、FCs は生成されないにも関わらず、AICA が完全に消失した。現在、AICA 代謝酵素の精製を進めると共に、FCs ではない AICA 代謝産物の同定を試みている。また、AHX の酸化によって AOH が生合成される。この酸化反応は xanthine dehydrogenase（XDH）が担う可能性があり、イネ培養細胞由来の粗抽出液を用いて活性試験を行ったところ、AOH の生合成に XDH の関与が示唆された。

2-azahypoxanthine (AHX), imidazole-4-carboxamide (ICA), and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), which were discovered as causal principles of fairy ring, are called Fairy Chemicals (FCs). FCs are compounds that are involved in regulating plant growth, increasing crop yields, and imparting stress tolerance to plants, and are expected to be applied to agriculture. We aimed to elucidate the biosynthetic and metabolic pathways of FCs in order to increase the endogenous production of AOH, which is the safest among FCs used as a cosmetic ingredient.

We previously reported that FCs are biosynthesized from 5-aminimidazole-4-carboxamide (AICA) in rice.[1] However, when the conversion activity of AICA to FCs was examined using crude extracts derived from rice cultured cells, AICA completely disappeared even though FCs were not produced. AICA was completely lost. We are now attempting to purify AICA metabolizing enzymes and to identify AICA metabolites that are not FCs. AOH is biosynthesized by oxidation of AHX. This oxidation reaction may be carried out by xanthine dehydrogenase (XDH), and the activity test using crude extracts derived from rice cultured cells suggested the involvement of XDH in the biosynthesis of AOH.

1. Kawagishi, H. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 95, 29–38 (2019).

fairy chemicals, metabolism, AICA

発表責任者：徳岡佑（tokuoka.yu.19@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2D4a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D4 会場

ベントグラスにおける AOH 代謝産物及び担子菌成長調節物質の探索

Search for AOH metabolites and basidiomycete growth regulators from bentgrass

○猪野 蒼太[1]、崔 宰熏[1,2,3,4,5]、平井 浩文[1,2,3,4,5]、河岸 洋和[3,5] ([1]静大院・総科技、[2]静大・グリーン研、[3]静大・農、[4]静大・共創、[5]静大・キノコ科研)
○Sota INO[1], Jee-Hoon CHOI[1,2,3,4,5], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4,5], Hirokazu KAWAGISHI[3,5] ([1]Grad. Sch. Tech., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Dept. Appl. Life Sci., Shizuoka Univ., [4]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. Mushroom Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

フェアリーリングとは、シバが環状に繁茂、枯死した後キノコが発生する現象である。当研究室では、本現象の惹起物質としてコムラサキシメジから 2-azahypoxanthine（AHX）と imidazole-4-carboxamide（ICA）を、イネから 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）を見出し、フェアリー化合物（fairy chemicals：FCs）と称している。また、FCs は植物成長調節活性を示し、普遍的内生が確認されたことから、新たな植物ホルモン候補として研究を行っている[1)]。

前回本大会で単離を報告したベントグラス由来の AOH 代謝産物の構造決定を目指し、再度培養を行ったが所望の代謝産物は得られなかった[2)]。しかし、新たな AOH 代謝産物を発見し、構造決定を行なっている。また、ベントグラスの根の酢酸エチル抽出物にコムラサキシメジ菌糸体成長促進活性を見出し、活性物質の単離・構造決定を行なっている。

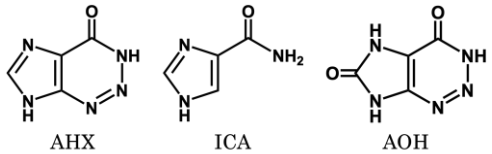


Fig. 1 fairy chemicals

これらの結果は、フェアリーリングでのシバとキノコの化学コミュニケーションの解明の手立てとなることが期待される。

2-Azahypoxanthine (AHX), imidazole-4-carboxamide (ICA) and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) were found as causative principles of “fairy rings”. They are referred to as fairy chemicals (FCs). Since FCs show plant growth regulating activity and their universal endogenous production has been proved, they are being studied as new plant hormone candidates. We reported an AOH metabolite from bentgrass at the previous conference. Bentgrass was cultured again to determine its structure, but the desired metabolite was not obtained. However, a new AOH metabolite was discovered and its structure is being determined. In addition, we found that ethyl acetate extracts of bentgrass roots had mycelial growth-promoting activity against *Lepista sordida*, and we are now trying to isolate the active substance(s) and determine the structure of it. These results are expected to provide a clue to the chemical communication between grasses and mushrooms in the “fairy ring”.

1. Kawagishi, H. *Proc. Japan Acad. Ser. B*， 95, 29–38 (2019).
2. 猪野蒼太ら，2023 年度農芸化学会大会講演要旨集，452 (2023)

AOH, metabolism, fairy chemicals

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2D4a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D4 会場

チャノキにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究

Chemical studies on metabolism of fairy chemicals in *Camellia sinensis*

○阿部 孝宏[1]、猪野 蒼太[2]、崔 宰熏[1,2,3,4,5]、呉 静[1,5]、天池 一真[6]、伊丹 健一郎[6,7]、平井 浩文[1,2,3,4,5]、河岸 洋和[1,5] ([1]静大・農、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研、[4]静大・共創、[5]静大・キノコ科研、[6]名大院理、[7]名大 ITbM)

○Takahiro ABE[1], Souta INO[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4,5], Jing WU[1,5], Kazuma AMAIKE[6], Kenichiro ITAMI[6,7], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4,5], Hirokazu KAWAGISHI[1,5] ([1]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [4]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. Mushroom Sci. Tech., Shizuoka Univ., [6]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., [7]Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM))

【背景・目的】 私達がコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から発見したフェアリー化合物（fairy chemicals, FCs）は検証した全ての植物に対して成長調節活性を示し[1,2)]、新たな植物ホルモンとして期待されている。しかしながら生理活性を示すメカニズムに関しては依然不明な点が多い。私達は FCs が植物生体内で代謝され、様々な誘導体が生合成されているのではと予想した。既に私達はメチル化 FCs の化学合成を行い、AHX 処理したチャ細胞において AHX が予想通りにメチル化されることを前回の本大会で報告している[3)]。そこで本研究は、FCs で処理されていない生チャ葉におけるメチル FCs の内生の有無を検討すること、および新たな FCs の代謝産物の単離と構造決定を目的とした。

【方法・結果】 先ず採取した生チャ葉をブレンダーで破砕した。エタノールで抽出・減圧濃縮し、ジクロロメタンで液-液分配、エタノールで固-液分配し減圧乾固して各可溶部を得た。次にエタノール可溶部を HPLC で分取した。各画分は合成した化合物を指標として LC-MS/MS 分析を行った。その結果、エタノール可溶部にメチル化 AHX 誘導体の存在を確認し、チャノキにおいて AHX のメチル化誘導体が内生していることを発見した。現在、他植物での内生も確認している。次に AOH 処理したチャ細胞のエタノール可溶性画分より、各種クロマトグラフィーで精製を進めた結果いくつかのメチル化 AOH 誘導体の精製と構造決定に成功した。現在さらなる化合物の探索を進めている。

【Purpose】Fairy chemicals (FCs) discovered from *Lepista sordida* by us show growth regulating activity in all plants tested[1,2)] and are expected to be a new family of plant hormones. However, the mechanism of their physiological activity has not been fully elucidated yet. We predicted the existence of various derivatives of FCs as metabolites in plants. Last year at this conference, we reported chemical synthesis of methyl-FCs and detection of one of methyl-FCs in tea cells treated with AHX. The aim of this study was to examine endogenous biosynthesis of methyl-FCs in intact *Camellia sinensis* and to isolate novel methyl-FCs.

【Methods and Results】The ethanol extracts of fresh tea leaves were fractionated by sequential liquid-liquid and solid-liquid partitioning. The ethanol-soluble portion was then separated by HPLC. LC-MS/MS analysis of the fractions was done by using the synthetic derivatives as authentic compounds. As a result, we found that methyl-AHX were endogenously produced in *C. sinensis*. Now, we are examining endogeneity of methyl-FCs in other plants. In addition, we succeeded in isolating some methyl-AOH derivatives from the ethanol-soluble fraction of AOH-treated tea cells. Further search for other compounds is now underway.

1) Choi, J.-H. *et al. ChemBioChem* 11, 1373-1377 (2010)
2) Choi, J.-H. *et al. J. Agric. Food Chem*. 58, 9956-9959 (2010)
3) Abe, T. *et al.* 日本農芸化学会 2023 年度大会、口頭発表 (2023)

AHX, *Camellia sinensis*, fairy chemicals

講演番号：2D4a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 D4 会場

飢餓を無くし、地球温暖化を止め、緑の地球を回復する解決法の提案

Proposing a unique solution to eliminate hunger, stop global warming, and restore a green planet

○染井 正徳[1]、染井 秀[2]、染井 和子[2] ([1]金沢大名誉教授、[2]ソメイヤッコ研究所)
○ Masanori SOMEI[1], Hiizu SOMEI[2], Kazuko SOMEI[2] ([1]Kanazawa Univ., [2]SOMEIYAKKO Kenkyusho)

地球の陸地面積の四分の一が不毛の砂漠になっている。海洋も含め、砂漠化は急速に拡大して、緑の環境が消失し、地球が破壊されつつある。我々は、飢餓を無くし、地球温暖化を止め、緑の地球を回復する唯一の解決法として、「ソムレ」浸漬種子を飛行機（ドローン）から陸地、海洋に散布する技術、**Figure 1** を提案している。世界各国で本法を採用すれば、砂漠化を止め、砂漠を緑化し、砂漠を食糧生産基地に変貌させ得る。飢餓を救い気候変動を止め、平和な地球を回復できる。低分子量有機化合物「ソムレ」の、安価かつ大量合成法の確立、安全性、ほぼ全ての穀物・野菜の食料増産、ゴビ砂漠の一部緑化実績、インドでの食料増産等、本法の科学的根拠及び実績結果を、公開します。

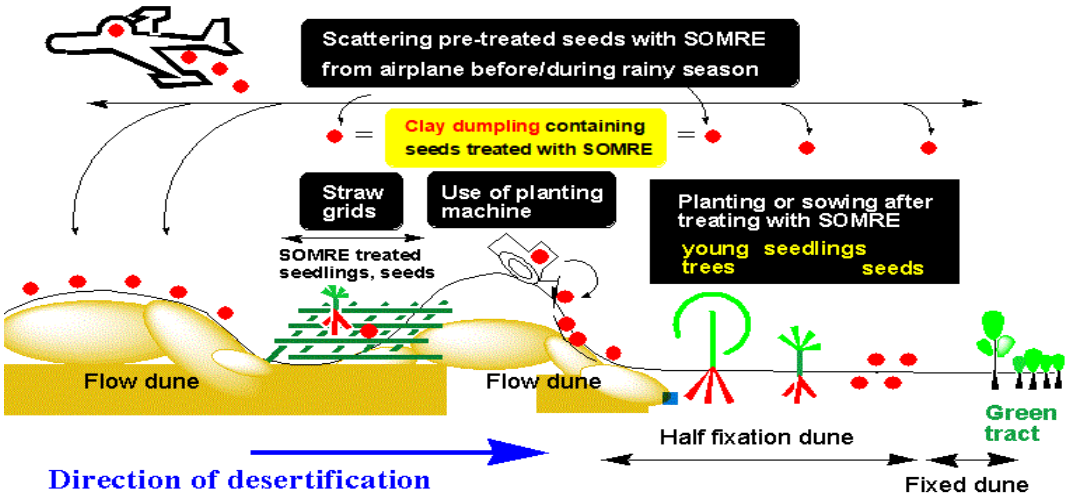


Figure 1

Desertification is rapidly expanding. The earth is being destroyed. As the only way to eliminate hunger, stop global warming, and restore a green planet, we have proposed the solution technique shown in Fig. 1, involving dispersing “SOMRE” soaked seeds from an airplane (drone) over land and sea. If countries around the world adopt this technique, we can stop desertification, and transform them into food production bases, alleviate hunger, stop climate change, and restore peace to our planet. The "SOMRE" has sufficient scientific basis such as building cheap synthesis method, safety, production of grains and vegetables, greening the Gobi desert, increased food production in India. It will be made public at the venue.

Stop global warming, Greening desert, Increasing food production

発表責任者：染井正徳（someiyakko@smail.plala.or.jp）

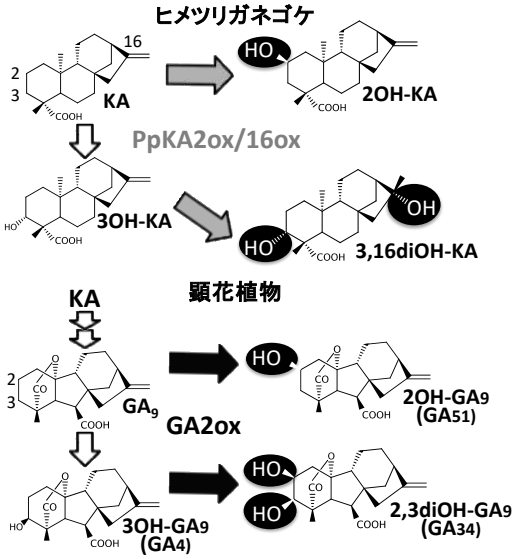
講演番号：2D4a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 D4 会場

ジベレリン不活性化とは異なるジベレリン起源物質の不活性化機構の解明

Elucidation of inactivation mechanism of ancestral gibberellin in a moss

○宮崎 翔[1]、川出 洋[2]、中嶋 正敏[3]（[1]農工大院 GIR、[2]農工大院農、[3]東大院農）
○Sho MIYAZAKI[1], Hiroshi KAWAIDE[2], Masatoshi NAKAJIMA[3] ([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]The Univ. of Tokyo)

ジベレリン(GA)は種子発芽や草丈の制御を担うジテルペノイドである。コケ植物(蘚類)のヒメツリガネゴケは GA を合成しないが，GA 生合成中間体である *ent*-カウレン酸(KA)までの代謝経路が認められていた状況において， KA を水酸化することにより 3OH-KA を原糸体細胞分化の成長制御物質として利用することを明らかとした(Miyazaki et al., *Mol Plant*, 2018)。さらに KA の 2 位水酸化酵素(PpKA2ox)を同定し，その代謝物(2OH-KA)は細胞分化活性を保有しない不活性化物であることを見出し，KA の 2 位／3 位を用いる活性制御機構の存在を明らかにした。本研究では GA 起源物質とも換言できる 3OH-KA の不活性化を検証した。顕花植物の GA 代謝経路と同様に，PpKA2ox によって 3OH-KA の 2 位水酸化物(2,3diOH-KA)の生成を想定したが検出されず，異なる化合物へと変換された。酵素変換生成物の NMR による構造解析から 16 位に水酸基が付与された新規化合物 3,16diOH-KA と同定した。3,16diOH-KA はコケ植物体からも検出され，原糸体の細胞分化活性を保有しないことから 3OH-KA の主要な不活性化物と考えられる。こうした PpKA2ox 改め PpKA2ox/16ox の基質認識能は，GA 不活性化酵素の原始的な祖先の姿であると示唆される。今後は植物が GA を生合成・代謝する能力を進化の過程でいつ獲得したのか明らかにしていきたい。



Gibberellins (GAs) play a role in many aspects of growth and development, including seed germination and stem elongation. The moss *Physcomitrium patens* possesses a partial GA biosynthetic pathway from geranylgeranyl diphosphate to *ent*-kaurenoic acid (KA). Recently, we have identified 3OH-KA as a biologically active metabolite of KA to control the protonemal cell differentiation. In addition, 2OH-KA, a KA with the other hydroxy group at C-2, catalyzed by KA 2-oxidase (PpKA2ox) was also identified in *P. patens*. Although the activation and inactivation pathways from KA have been identified, the inactivation pathway of 3OH-KA remains to be elucidated. In this study, we showed that the inactivation reaction of C-16 oxidation proceeds by PpKA2ox *in vitro* to synthesize a new compound 3,16diOH-KA from 3OH-KA.

gibberellin, biosynthesis, moss

発表責任者：宮崎翔（sho0707mpgr@gmail.com）

講演番号：2D4a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 D4 会場

Involvement of gibberellin in the rapid germination of Chloris virgata

○Tingyi YAO[1], Ikuo TAKAHASHI[1], Takeshi NAKANO[2], Masatoshi NAKAJIMA[1], Tadao ASAMI[1]
([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto. Univ)

Livestock-based agriculture has served as a cornerstone in Mongolia. However, with the accelerating industrialization of livestock sector, the degradation of Mongolian grasslands is worsening. In addition, the arid environmental conditions has made the restoration of grasslands challenging. Therefore, developing effective grass specie that can resist harsh climate is of great significance.

Chloris virgata, an annual grass, known for its tolerance to adverse environmental conditions, high growth and reproductive potential as well as high nutritional values, makes it an ideal candidate for grassland restoration in Mongolia. Typically, *Chloris virgata* stands out for its fast germination potential, which is conducive to the successful germination, thus growth in Mongolia. However, the mechanisms behind are still unclear.

Here, we considered that plant hormone gibberellins (GAs) play an active role in the rapid germination of *Chloris virgata*. We first conducted germination assay, and have confirmed the positive contribution of GA in the rapid germination process. Interestingly, with the treatment of active various concentrations of GA and GA biosynthesis inhibitors, both germination and shoot elongation in *Chloris virgata* showed recovery, particularly at low concentrations of active GA. Consequently, we hypothesized that the gibberellin receptor of *Chloris virgata* (CvGID1) may be very sensitive to GA. In this context, present research has focused on the exploration of the function of CvGID1.

Chloris virgata, germination, gibberellin

講演番号：2D4p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 D4 会場

フェアリー化合物非感受性変異株の作出と解析
Isolation and characterization of fairy compound-insensitive mutants in *Arabidopsis Arabidopsis thalian*

○三ッ國 佳祐[1]、田中 裕基[1]、鈴木 智大[1,4]、崔 宰熏[2,3,4]、謝 肖男[1,4]、野村 崇人[1]、岡本 昌憲[1,5]、道羅 英夫[2,4]、河岸 洋和[3,4]([1]宇都宮大・バイオ、[2]静大・グリーン研、[3]静大・農、[4]静大・キノコ科研、[5]理研)
○Keisuke MITSUKUNI[1], Yuki TANAKA[1], Tomohiro SUZUKI[1,4], Jae-Hoon CHOI[2,3,4], Xiaonan XIE[1,4], Takahito NONOMURA[1], Masanori OKAMOTO[1,5], Hideo DOHRA[2,4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4] ([1]C-bio, Utsunomiya Univ., [2]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Fac. of Agr., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. for Mushr. Sci., Shizuoka Univ., [5]Riken)

フェアリーリングとは、コムラサキシメジなどの真菌類が原因で引き起こされる、芝が環状に繁茂または枯死した後に子実体が発生する現象のことである。この現象を引き起こす物質として、芝の成長を促進する 2-アザヒポキサンチン（AHX）と芝の成長を阻害するイミダゾール-4-カルボキサミド（ICA）がコムラサキシメジの培養上清から単離されている。また、AHX を取り込ませたイネの抽出物から AHX の代謝産物である 2-アザ-8-オキソヒポキサンチン（AOH）が発見され、AHX 同様に植物の成長を促進することが明らかになっており、これら化合物は総称してフェアリー化合物（FCs）と呼ばれている[1-4]。我々はこれまでに、FCs の受容体の同定とその作用機序の解明を目的とし、AHX 非感受性変異体の作出を行った。本研究ではそれら表現型の確認と次世代シーケンサーを用いた変異部位の同定を試みた。AHX 非感受性変異体の表現型を解析した結果、ABA 欠損変異株と似た表現型を示す変異株と E185 系統野生株と似た形質を有する変異株が確認された。野生株と類似した変異株に関しては、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行い mutmap 法を用いて SNPs を探索した。その結果、β-glucosidase 遺伝子など数種の遺伝子にスプライシングに関わる変異が確認された。現在、上記変異部位が与える転写レベルへの影響など詳細な解析を行っている。

“Fairy rings” is a disease symptom in lawn; rapidly growing, lush green circular bands of grass and/or circles of mushrooms are observed. *Lepista sordida* is a fungus belonging to the family *Tricholomataceae* and forms fairy ring. In the previous study, 2-azahypoxanthine (AHX), 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), and imidazole-4-carboxamide (ICA), named fairy compounds (FCs), were discovered as the compounds that induce fairy rings[1-4]. We have succeeded in the construction of AHX-insensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*, and thus performed genomic analysis of these mutants to identify mutation sites. The genomic sequences of AHX-insensitive mutants showed similar phenotypes to those of wild-type strains were analyzed to search for SNPs using the mutmap method. As a result, splicing-related mutations were identified in some genes. A more detailed analysis of the effects of these mutations on transcription levels is now in progress.

1) Choi, J.-H. et al. ChemBioChem 11, 1373-1377 (2010), 2) Choi, J.-H. et al. J. Agric. Food Chem. 58, 9956-9959 (2010), 3) Choi, J.-H. et al. Angew. Chemie. Int. Ed. 53, 1552-1555 (2014), 4) Kawagishi, H. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95, 29-38 (2019).

fairy ring, *Arabidopsis thaliana*, insesnsitive mutants

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2D4p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 D4 会場

ミヤコグサ内生 KAI2 リガンドの検出と部分精製
Detection and partial purification of KAI2 ligands from *Lotus japonicus*

○秋山 康紀[1,2]、鍋嶋 武郁[2] ([1]阪公大院農、[2]阪府大院生命環境)
○Kohki Akiyama[1,2], Takefumi Nabeshima[2] ([1]OMU, [2]OPU)

【背景・目的】カリキン（karrikin, KAR）は山火事などで植物が燃えることにより生成する非天然の発芽刺激物質であり，植物ホルモンであるストリゴラクトン（strigolactone, SL）と同じブテノライド化合物である。KAR シグナル経路は受容体タンパク質 KAI2 と F-box タンパク質 MAX2, その抑制タンパク質 SMAX1 から構成されている。SL 経路は KAI2 のパラログである受容体 D14 と MAX2，SMXL6/7/8 から構成されている。植物はカリキンを生合成しない。それにも関わらず KAI2 が変異すると植物には発芽遅延やアーバスキュラー菌根菌との共生不全など種々の表現型の異常が現れる。このことから KAI2 に受容される新規の内生植物ホルモンの存在が示唆され，それは KAI2 リガンド(KAI2 ligand, KL)と呼ばれている。KAI2 タンパク質の構造解析や受容機構の研究から，KL は SL と共通のブテノライド構造を持つと推定されている。しかし，世界の複数のグループが 10 年以上にわたり同定を試みているが，KL はこれまでに単離されておらず、その化学的性状についても分かっていない。そこで今回，我々はミヤコグサ(*Lotus japonicus*)からの KL の検出と部分精製を行ったので報告する。
【方法・結果】KL 経路の活性化の評価は，ミヤコグサ発芽種子における KAR 誘導性の *D14LIKE2(DLK2)*遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて測定することにより行った。本来的に微量成分である植物ホルモンをできるだけ多くの量を単離するために，負のフィードバック異常で KL を過剰生産することが期待されるマメ科モデル植物であるミヤコグサの *kai2a* 変異体を用いた。KL 活性は成植物体メタノール抽出物，発芽種子浸出液，根分泌物の酢酸エチル抽出画分で検出できた。種々条件を検討し，精製を進めた結果，発芽種子浸出液と根分泌物のそれぞれの酢酸エチル抽出画分から HPLC 分取において 2 つのピークを KL 候補として特定した。

Karrikins (KARs) and strigolactones (SLs) are two classes of butenolide compounds that regulate diverse aspects of plant growth. KARs are bioactive components of smoke that stimulate germination of many species after fire. SLs are a class of phytohormones that also act as rhizosphere signals for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasitic plants. The α/ß-hydrolases KAI2 and D14 are paralogous receptors for KARs and SLs. A large number of studies have led to the hypothesis that KAI2 may perceive an unknown endogenous signal, termed KAI2 ligand (KL), that is not derived from the SL biosynthetic pathway. To uncover the identity of KL, we herein developed a qRT-PCR-based assay for up-regulation of KAR-responsive transcripts, D14-LIKE 2 (DLK2), in germinating seeds of *Lotus japonicus*. By using this assay, we examined *Lotus japonicus kai2a* mutant extracts for KL activity and attempted to purify the KL-active molecules from the extracts.

KAI2 ligand, strigolactone, phytohormone

発表責任者：秋山　康紀（akiyama@omu.ac.jp）

講演番号：2D4p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 D4 会場

Leafy gall 形成を引き起こす植物病原菌における FAS1 の役割
The role of FAS1 in leafy gall forming phytopathogens
○宮田 和輝[1]、Alicia Surjana[1]、小嶋 美紀子[2]、幸木 謙典[1]、西川 俊夫[1]、榊原 均[1,2]([1]名大院生命農、[2]理研 CSRS)
○Kazuki Miyata[1], Alicia Surjana[1], Mikiko Kojima[2], Kensuke Kouki[1], Toshio Nishikawa[1], Hitoshi Sakakibara[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN CSRS)

植物病原菌 *Rhodococcus fascians* と *Streptomyces turgidiscabies* は植物に感染すると leafy gall と呼ばれる奇形腫瘍を形成する。腫瘍形成の原因遺伝子座は両病原菌がもつ *fas* オペロンであることが知られており、植物ホルモンであるサイトカイニン（CK）の生合成や代謝に関わる既知の酵素に相同性のある遺伝子やメチル基転移酵素遺伝子がコードされている。これまでに、本研究グループは *fas* オペロンによって植物由来の CK とは異なる側鎖修飾を持った複数の新奇サイトカイニン様化合物（NC）が連続的に合成されることを明らかにしている。しかし、腫瘍形成の原因化合物および腫瘍形成メカニズムは未解明である。そこで本研究は、NC 合成の最終段階で働くと考えられている cytochrome P450 monooxygenase である FAS1 に着目し、腫瘍形成における重要性や、その産物を明らかにすることを目標とした。まず、*S. turgidiscabies* において *fas1* 欠損株の作製を行い、タバコへの感染実験を行った。その結果、腫瘍形成能の著しい低下が観察され、病徴形成における FAS1 の重要性が明らかになった。また、FAS1 を用いた *in vitro* アッセイの結果、未知の NC が合成されていることが明らかになった。以上の結果より、leafy gall 形成において FAS1 産物である NC が重要な働きを持つ可能性が示唆された。

Phytopathogens *Rhodococcus fascians* and *Streptomyces turgidiscabies* infect plants and form a green tumor called leafy gall. The causal gene locus is the *fas* operon of both pathogens which encodes genes including those homologous to plant hormone cytokinin (CK) biosynthesis and metabolism as well as methyltransferases. Our previous study revealed that *fas* operon synthesizes novel cytokinins (NCs) with multiple side chain modifications that are distinct from plant-derived CKs. However, the causative agent and mechanism of leafy gall formation remain unknown. In this study, we focused on FAS1 (cytochrome P450 monooxygenase), which catalyzes the final step of NCs production, and aimed to elucidate the importance in leafy gall formation and its products. We generated fas1 gene deletion mutant in *S. turgidiscabies* and evaluated leafy gall formation ability. As a result, the gall formation was severely reduced in the mutant. Furthermore, *in vitro* assay suggested that unknown NCs are synthesized by FAS1. These results suggest that NCs synthesized by FAS1 may play an important role in leafy gal formation.

cytokinin, plant pathogen, leafy gall

発表責任者：榊原　均（sakaki@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2D4p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 D4 会場

棒状樹形を呈するリンゴ突然変異体原因酵素の選択的阻害剤創製研究
Development of specific inhibitors for the enzyme responsible for apple columnar tree-shape
○井上 太喜[1]、北島 裕大[1]、岡本 啓佑[1]、長野 玄知[1]、高橋 郁夫[1]、川田 紘次郎[1]、宮崎 翔[2]、岡田 憲典[1]、浅見 忠男[1]、岡田 和馬[3]、中嶋 正敏[1] ([1]東大院農、[2]東京農工大・GIR、[3]農研機構)
○ Taiki INOUE[1], Yuta KITAJIMA[1], Keisuke OKAMOTO[1], Tsunesato NAGANO[1], Ikuo TAKAHASHI[1], Kojiro KAWADA[1], Sho MIYAZAKI[2], Kazunori OKADA[1], Tadao ASAMI[1], Kazuma OKADA[3], Masatoshi NAKAJIMA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech., [3]National Agriculture and Food Research Organization)

リンゴのカラムナー変異体は、枝が横に拡がらず棒状の特異的な樹形を呈する。この形質は、剪定や収穫の負担軽減に繋がり高密植も可能にするため、生産の現場において有用とされる。樹形変化の原因は、レトロポゾンの挿入に伴う原因遺伝子 *MdDOX-Co* の茎頂異所発現に由来し、産物 MdDOX-Co が示す酵素活性により内生ジベレリンが欠乏すると判明した(Watanabe *et al.*, 2021)。これを受け我々は、酵素 MdDOX-Co の活性制御に基づく野生型樹へのカラムナー樹形の化学的導入を目指している。本発表では化合物ライブラリーからの MdDOX-Co 阻害化合物の選抜と有望化合物の構造展開を通じて、阻害作用の増強および選択性の向上を図っており、それらの現状について報告する。

初めに、各化合物の選抜系として GC-MS を用いた酵素活性測定系の転用を図り、一度に 160 種の化合物評価を可能とする系を構築した。この系を用いて、定めた基準以上に MdDOX-Co の酵素活性を阻害する化合物を選抜し、既知ジベレリン代謝酵素に対する活性阻害状況を調べて作用の選択性を評価した。さらに、シロイヌナズナ *MdDOX-Co* 過剰発現変異体を含む植物体への投与試験を行い、さらなる有望化合物の絞り込みを行った。うち 1 種に着目して構造展開を図り、得られた構造類縁体について評価を行ったところ、元の化合物と比べてより選択性が向上したものを見出した。報告ではそれらの構造活性相関や応用の可能性についても論じたい。

The distinctive columnar shape of apple trees might play a crucial role in agricultural production in future. This characteristic trait is primarily influenced by the ectopic expression of a gene called *MdDOX-Co*, which belongs to the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family. *MdDOX-Co*'s gene product possesses the ability to facilitate gibberellin hydroxylation, which leads to the short of endogenous active gibberellins.

Consequently, there inhibitors that target MdDOX-Co have the potential to control the shape of columnar tree. This report outlines our efforts to develop specific inhibitors for MdDOX-Co. To achieve this, we established an evaluation system using GC-MS, allowing us to simultaneously assess 160 compounds. Through the utilization of this evaluation system and in planta evaluation with Arabidopsis, and the integrated approach involving organic chemistry, we successfully identified compounds that selectively inhibit MdDOX-Co.

gibberellin, apple, enzyme

発表責任者：井上太喜（taiki111211@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D4p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 D4 会場

ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索および受容体選択性の評価

Research of a novel chemical as strigolactone receptor inhibitors

○川田 紘次郎[1]、高橋 郁夫[1]、呉 雅珊[1]、伊藤 晋作[2]、姜 凱[1]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院農、[2]東農大)
○Kojiro KAWADA[1], Ikuo TAKAHASHI[1], Yashan WU[1], Shinsaku ITO[2], Kai JIANG[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agr.)

我々はストリゴラクトン (SL) の多様な生理作用のうち、枝分かれを制御する植物ホルモン作用と農業に多大な被害を与える根寄生雑草の発芽誘導というアレロケミカルとしての作用に着目している。植物ホルモンシグナルはα/β-加水分解酵素に属する D14 に SL が受容された後、D14 が SL シグナル伝達因子である D53/SMXL や F-box タンパク質の D3/MAX2 との複合体を形成することにより伝達される。一方、根寄生雑草の SL 依存的な発芽においては D14 ホモログの HTL/KAI2 に属する KAI2d clade が受容体として作用する。近年、SL は構造の違いにより作用が異なることが示唆され、SL 受容に関する研究が益々注目を浴びている。当研究室は SL 受容機構の解明及び根寄生雑草の防除を目指し、SL 受容体に作用する化合物探索に着手してきた。本研究は SL 受容機構解明の強力なツールの開発を目的とし yeast two hybrid assay (Y2H) を用いたランダムスクリーニングを行い SL 受容体阻害剤の探索を行なった。

まず D14 と SL 依存的に相互作用する D53 または DELLA タンパク質として知られる SLR1 の Y2H を用い、約 1 万種類の化合物の D14 阻害活性を評価した。Y2H の結果、16 種類の化合物が D14-D53 または D14-SLR1 間の SL 依存的相互作用を阻害することを見出した。さらに 16 種類のうち 2 種類の化合物がイネ D14 に対し比較的良好な阻害活性を示す事を見出した。特に XM204 はイネの SL 生合成変異体である過分げつ形態を示す *d17* の第二分げつの長さを指標とした生理活性試験においても、SL の外部投与による効果を抑制するという D14 阻害傾向を示した。一方、根寄生雑草の *Striga hermonthica* (*Striga*) の SL 誘導性発芽は阻害せず、*Striga* の高感受性 SL 受容体である ShHTL7 を用いた yeast three hybrid assay (Y3H) でも SL の阻害活性は確認されなかった。以上のことから XM204 は KAI2d clade は阻害しないが D14 は阻害する選択的 SL 受容体阻害剤であることが示唆された。今後、XM204 の利用は非寄生植物と根寄生雑草の SL 受容機構の解明に貢献し得る。

Strigolactones (SLs) are one of plant hormones that controls shoot branching. Additionally, they are known as germination-inducing substances for seeds of parasitic plants, which are harmful to crops. In this study, we explored SL receptor inhibitors with the potential to manipulate the recognition and signal transduction of SLs. Evaluation of SL receptor inhibitory activity for approximately 10,000 chemical substances revealed that XM204 inhibits D14. XM204 could be a valuable tool for understanding SL perception.

Strigolactone, Receptor, Inhibitor

講演番号：2D4p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D4 会場

エチレンによるイネ種子の発芽促進機構の解析

Analysis of an enhancing mechanism of ethylene in seed gemination in rice

○森田 重人[1,2]、髙畠 彩夏[1]、増村 威宏[1,2]（[1]京府大院生命環境、[2]京都府農技セ生資セ）
○Shigeto MORITA[1,2], Ayaka TAKABATAKE[1], Takehiro MASUMURA[1,2]（[1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Agr., Forest. Fish. Technol. Center）

植物の発芽は、アブシシン酸（ABA）、ジベレリン（GA）、エチレンなどの様々な植物ホルモンによって調節されている。エチレンは気体状のホルモンであり、植物の様々な発達・生長の調節に関与している。エチレンは多くの双子葉植物で発芽促進に働くことが知られているが、イネの発芽におけるその役割は不明な点が多い。これまでに我々は、イネ発芽種子においてエチレンが生成されていることと、内在性エチレンがイネ種子の発芽を促進することを明らかにした。そこで本研究ではエチレンによる発芽促進機構の解明を試みた。

エチレンによる発芽促進に GA が関与しているかを調べるために、エチレン阻害剤処理を行った吸水種子において、GA 生合成系遺伝子の発現解析を行った。その結果、エチレン阻害剤によって発現の低下が見られたことから、エチレンは GA 生合成を促進することで発芽を調節していることが示唆された。また細胞伸長に関与するエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素（XTH）遺伝子についても、エチレン阻害剤による発現低下が見られた。このことからエチレンは細胞伸長の促進を通して、発芽やシュートの伸長を促進していることが示唆された。

Seed germination is regulated by multiple phytohormone including abscisic acid, gibberellin (GA), and ethylene. Ethylene is a gaseous hormone and involved in the regulation of various aspects of growth and development. Ethylene is known to promote seed germination in many dicotyledonous species, but its role in germination of rice seeds has not been fully characterized. We previously revealed that ethylene plays a role in enhancement of germination in rice. In this study, we tried to elucidate a mechanism by which ethylene promotes seed germination in rice.

We examined expression level of GA biosynthesis genes in imbibed rice seeds treated with ethylene inhibitors in order to investigate whether GA is involved in the promotion of germination by ethylene. We observed that their expression was decreased by ethylene inhibitors, suggesting that ethylene promotes germination by enhancing GA biosynthesis. We also examined expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) genes which is involved in cell expansion and found that a *XTH* gene was down-regulated by ethylene inhibitors. This result suggests that ethylene promotes germination and shoot elongation through enhancing cell expansion.

gemination, ethylene, rice

発表責任者：森田重人（s_morita@kpu.ac.jp）

講演番号：2D4p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D4 会場

構造解析から明らかとなった植物成長調整剤によるイネジベレリン生合成・代謝酵素の選択的阻害機構

Selective Inhibition of Rice Gibberellin Biosynthetic and Metabolic Enzymes by Plant Growth Regulators Revealed by Structural Analysis.

○竹原 清日[1]、尾原 寛之[1]、三上 文三[2]、芦苅 基行[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能センター、[2]京大・生存圏)
○Sayaka TAKEHARA[1], Hiroyuki OBARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Motoyuki ASHIKARI[1], Miyako UEGUCHI (TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

ジベレリン (GA) は草丈の伸長促進や発芽促進など様々な生理作用を持つ植物ホルモンである。GA の生合成酵素 GA3-oxidase (GA3ox) 及び代謝酵素 GA2-oxidase (GA2ox) は 2-オキソグルタル酸 (2OG) 要求性酸化酵素（2ODDs）に属する酵素である。これら酵素の阻害剤として植物成長調整剤であるプロヘキサジオン(PHX) カルシウム塩が知られているが、*in vitro* での実験報告は少なく、その作用機構は解明されていない。そこで本研究では、PHX との共結晶構造解析および活性測定により PHX に対する親和性を決定する要因を解明することとした。発展的には 2ODD と阻害剤の親和性を操作することにより、2ODD の活性を制御することを目的とした。

まず酵素の違いによるプロヘキサジオンの阻害能を調べるため、GA2ox 及び GA3ox を用いて阻害定数を求めた結果、GA3ox をより強く阻害し、PHX に対する親和性が高いことが明らかとなった。さらに、PHX との共結晶構造解析により阻害様式の違いを決めているアミノ酸を同定し、*in vivo* においてもこのアミノ酸の重要性が示されたことから、PHX との親和性を制御することで植物の形質をも制御することができる可能性が示唆された。また、PHX に対してイネとは逆の反応を示すストック植物を用いた解析についても報告する。

本研究は、基盤研究(C)の助成を受けた。

Gibberellins (GAs) are plant hormones that play a key role in plant growth and development, including seed germination, stem and root growth, flower induction and fruit set. GA biosynthetic enzyme GA3-oxidase (GA3ox) and metabolic enzyme GA2-oxidase (GA2ox) belongs to the 2-oxoglutarate–dependent dioxygenase family group. The prohexadione-calcium (PHX), a plant growth regulator, is known as an inhibitor of these enzymes. However, there are few reports of experiments *in vitro*, and the inhibition mechanism has not been clarified. Therefore, the purpose of this study was to elucidate the factors determining the affinity for PHX by analyzing the co-crystal structure with PHX.

First, the inhibition constants of rice OsGA3ox2 and OsGA2ox3 were measured, and as expected, GA3ox showed a lower value, indicating a higher affinity for PHX. Furthermore, we identified the amino acid that determines the difference in inhibition pattern by co-crystal structure analysis of GA3ox with PHX, suggesting that regulating the affinity with PHX may also be able to control plant. We will also report the identification of amino acids involved in the different pattern of inhibition and the analysis using stock plants (*Malcolmia maritima*) that show the opposite response to PHX as rice.

gibberellin, plant hormone, plant growth regulator

講演番号：2D4p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D4 会場

褐藻類サガラメにおける仮根伸長促進因子の探索
Survey of rhizoid elongation factors in brown algae Eisenia nipponica
○齋藤 禎一[1]、島貫 郁[1]、後藤 康丞[1]、岡本 一利[1]、吉川 康夫[2]、清水 一輝[2]、今井 基文[2]、鈴木 進二[2]、萩原 快次[2]、峯田 克彦[1,3]、五條堀 孝[1,4] ([1]一般財団法人マリンオープンイノベーション機構、[2]静岡県水産・海洋技術研究所、[3]早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構、[4]アブドラ国王科学技術大学)
○Yoshimoto SAITO[1], Kaori Shimanuki[1], Kosuke Goto[1], Kazutoshi Okamoto[1], Yasuo Yoshikawa[2], Kazuki Shimizu[2], Motofumi Imai[2], Shinji Suzuki[2], Yoshitsugu Hagiwara[2], Katsuhiko Mineta[1,3], Takashi Gojobori[1,4] ([1]Marine Open Innovation institute, [2]Shizuoka Prefectural Research Institute of Fishery and Ocean, [3]Waseda Univ., [4]KAUST)

サガラメはコンブ目に属する褐藻であり、かつては静岡県榛南地方沿岸において 8,000ha を超える藻場を形成していた。しかし、この藻場は 1990 年代に磯焼けにより喪失し、これによりサガラメは静岡県において絶滅したと考えられている。近年では人工培養したサガラメ種苗を移植することによる榛南地方の藻場回復も試みられている。しかし、サガラメ種苗は移植後三ヶ月程度でほとんど流出してしまっており、藻場の回復には至っていない。原因の一つとして、移植したサガラメ種苗では仮根が十分に発達しておらず、藻体を岩盤に固定できていないことが考えられた。そこで本研究では、移植種苗の生育向上をめざし、メタボローム解析によりサガラメ仮根に伸長促進作用をもつ化合物を探索した。その結果、数種類の生理活性物質が伸長促進因子の候補化合物として見出された。候補化合物の中にはオーキシンなど植物ホルモンとして知られる化合物も含まれていた。また、遺伝子情報解析の結果から、陸上植物において植物ホルモンの反応経路に関わる遺伝子のホモログと考えられる遺伝子群がサガラメより見出された。以上のことからサガラメにおいても、植物に見られるような特定の生理活性化合物によって仮根の伸長・発達を促進する分子メカニズムの存在することが示唆された。

E. nipponica is the Laminariales species that used to form huge seaweed forests over than 8,000 ha in Hainan area, Shizuoka, Japan. Due to severe sea desertification, i.e., “Isoyake” occurred in 1990s, however, *E. nipponica* has vanished from this area. To restore the forests of this species, the transplantation has been undertaken using *E. nipponica* seedlings artificially cultivated. In many cases, most of the seedlings had been flown away from the transplanted sites in three months. The seedlings apparently failed to develop rhizoids and could not fix the bodies on the rocks of the seafloor. To discover bioactive compounds which enhance the rhizoid development, we conducted metabolome analysis of *E. nipponica*. The results revealed the presence of candidate compounds including plant hormones such as auxin and jasmonic acid accumulated during rhizoid development. The gene information analysis also revealed the presence of land plant gene homologues related to hormone-induced reactions in *E. nipponica*. These results suggest that like land plants, the molecular mechanisms which are triggered with certain bioactive compounds and work to enhance the development of rhizoids exist in *E. nipponica*.

Laminariales, brown algae, metabolome

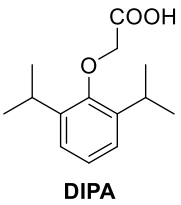
発表責任者：齋藤禎一（y-saito@maoi-i.jp）

講演番号：2D4p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D4 会場

ジベレリン様活性を有する化合物 DIPA の合成類縁体活性

Synthetic analogues activity of the compound DIPA with gibberellin-like activity

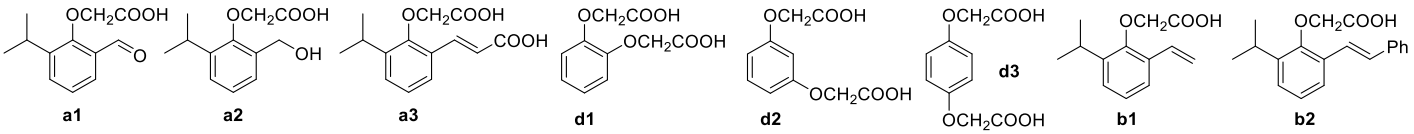
○佐藤 謙太、前田 紗希、王 建文、高橋 郁夫、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院農）
○Kenta SATO, Saki MAEDA, Jianwen WANG, Ikuo TAKAHASHI, Masatoshi NAKAJIMA, Tadao ASAMI (The Univ. of Tokyo)



DIPA

フェノキシ酢酸類一つである 2,6-diisopropylphenoxyacetic acid(DIPA)はウリカワに対し、ジベレリン様活性を示すことが報告されている。本研究ではジベレリン様活性の高いフェノキシ酢酸類の探索と構造活性相関の調査のために DIPA の類縁体を合成し、ジベレリン受容体 GID1 に対する活性発現機構の追究と並行してシロイヌナズナを対象に生物試験を行った。

DIPA の一方のイソプロピル基をケトンや水酸基に置換した a1~a3、二酢酸 d1~d3、二重結合を含む b1~b2 を合成した。これらの類縁体に対して、シロイヌナズナを用いた生物検定系ならびに酵母 2-ハイブリッドアッセイ系（Y2H）を用いた GA 受容体 GID1 とその制御因子である DELLA タンパク質間の結合性を指標として活性評価を行った。Y2H の結果から、DIPA と b1 が一部の GID1 と DELLA の結合性の促進をしている可能性が示された。生物試験ではシロイヌナズナを用いてジベレリン生合成阻害剤パクロブトラゾールを同時に添加した条件での胚軸の伸長回復を GA_4 と比較して調べた。胚軸伸長では DIPA 10 μM で有意な胚軸伸長が見られたが、DIPA、a1 及び b2 において 100 μM で胚軸長の減少が確認された。



a1 a2 a3 d1 d2 d3 b1 b2

2,6-Diisopropylphenoxyacetic acid (DIPA) is a phenoxyacetic acid that has been found to exhibit gibberellin-like activity against *Saggitaria pygmaea*. In this study, we focused on the effects of DIPA and synthesized analogues (**a1-a3, d1-d3, b1-b2**) on the gibberellin receptor GID1. First, their physiological activities were evaluated in a bioassay system using *Arabidopsis thaliana*, then their agonistic activities were evaluated in a yeast two-hybrid assay system (Y2H) between the GA receptor GID1s and its regulator DELLA proteins. Y2H results showed that DIPA and **b1** have the intermolecular binding between some GID1s and DELLAs. In hypocotyl elongation test, 10 μM DIPA promoted significant hypocotyl elongation, and however, 100 μM DIPA and **a1, b2** inhibit hypocotyl elongation.

gibberellin, synthetic compounds, yeast two hybrid

発表責任者：佐藤　謙太（sato-kenta921@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D4p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D4 会場

天然変性領域のケミカルリデザインによるジャスモン酸関連転写因子 MYC ファミリー選択的阻害剤の開発

Development of a selective inhibitor for jasmonate-related transcription factor MYCs based on the chemically redesigned intrinsically disordered region peptide

○高岡 洋輔[1]、劉 瑞琦[1]、李 奇[1]、上田 実[1,2] ([1]東北大院理、[2]東北大院生命科学)
○Yousuke TAKAOKA[1], Ruiqi LIU[1], Qi LI[1], Minoru UEDA[1,2] ([1]Grad. Sci., Tohoku Univ, [2]Grad. Life Sciences, Tohoku Univ)

植物ホルモンは、一つの分子で複数の転写因子を同時に制御することで、植物の生長、分化、防御等の様々な応答を調節している。これら転写因子の多くは、その機能が重要であるが故に遺伝的冗長性が高い上に、植物ホルモン間クロストークにも密接に関わっていることから、解析や制御が困難である。このような植物ホルモン関連転写因子を包括的かつ選択的に制御する化学ツールは、植物ホルモンシグナル伝達の解析において極めて有効であると期待される。

多くの植物ホルモン関連転写因子や転写調節因子が、複数の相互作用相手に形を変えながら結合する天然変性領域（IDR）であることが明らかになりつつある。本発表では、植物ホルモンの一つであるジャスモン酸に関連する主要転写因子 MYC を標的とし、IDR の構造をケミカルリデザインした MYC ファミリーに選択的かつ包括的な阻害剤を開発したので、報告する。

Plant hormones regulate various responses such as plant growth, differentiation or defense by simultaneously controlling multiple transcription factors with a single molecule. In many cases, these transcription factors are genetically redundant because of their important functions, and are also closely involved in crosstalk between plant hormones, making them difficult to analyze or control. Chemical tools that comprehensively and selectively control such plant homone-related transcription factors are expected to be extremely effective in analyzing plant hormone signal transduction.

Recent reports suggested that many plant hormone-related transcription factors and its regulatly factors includes intrinsically disordered regions (IDR), which can interact with multiple interacting partners while changing their conformation. In this research, jasmonate-related master transcription factors MYC family were selected as the molecular target. In detail, we chemically redesigned IDR peptides and developed a selective and comprehensive inhibitor of the MYC family.

Jasmonate, Transcription factors, Chemical tools

発表責任者：高岡洋輔（ytakaoka@tohoku.ac.jp）

講演番号：2D4p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D4 会場

DELLA 分解誘導剤 A1 とその生理活性
DELLA proteolysis inducer A1 and its bioactivity
○澁谷 純太郎、高橋 郁夫、太田 鋼、中嶋 中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院農）
○Juntaro SHIBUYA, Ikuo TAKAHASHI, Tsuyoshi OHTA, Masatoshi NAKAJIMA, Tadao ASAMI (The Univ. of Tokyo)

植物ホルモンのシグナル伝達においてはタンパク質分解系が重要な役割をしている。我々は DELLA タンパク質分解を促進する植物成長促進化合物 A1（Sukiran *et al.*, Plant Direct, 2021）に着目し、この化合物の DELLA 分解機構の追究を目指した。報告では野生型シロイヌナズナをこの化合物で処理することにより胚軸伸長が促進された一方で、*della*、*ga1-5*、*gid1a1b*、*gid1a1c*、*gid1b1c* 変異体への処理では伸長に有意な差は認められなかった。また、RGA-GFP 発現株へ処理すると、GA_4 処理と同様に蛍光強度が低下していた。GID1 が A1 をアゴニストとして認識すると考えると、*ga1-5* に対して伸長促進活性を示さないことは説明できない。そこで、私達はシロイヌナズナにおいて化合物 A1 が示す他の作用や作用機序について検討を加えることにした。本発表ではその現状を報告する。

まず、野生株を A1 処理して胚軸長を測定したところ、A1 処理の有無で有意な差は示さなかった。次に、野生株の種子を GA 生合成阻害剤 Paclobutrazol と A1 を共処理して発芽率を測定すると、A1 濃度を上げるとわずかに発芽率が回復した。しかし、RGA-GFP 発現株を A1 で処理して根の蛍光像を観察した場合でも、DMSO で処理したときと比べて蛍光像に明確な違いはなかった。さらに、酵母ツーハイブリッド系を用いた試験では A1 は GID1 と DELLA の結合を誘導しなかった。これらのことから A1 は受容体近傍シグナル系において何らかの作用を示している可能性があると考え、A1 処理した野生株において GA 生合成酵素である GA3ox と GA20ox、活性型 GA 代謝酵素の GA2ox の発現を調べたところ、A1 処理によって発現量が変化していた。この結果は、A1 が内生 GA に遺伝子発現レベルで作用している可能性を示唆した。

The proteolytic system plays an important role in plant hormone signaling. We focused on a plant growth-promoting compound A1 (Sukiran *et al.*, Plant Direct, 2021), which promotes the degradation of DELLA. It has been reported that A1 treatment of wild-type Arabidopsis promoted hypocotyl elongation like gibberellin treatment, while the A1 treatment of *della*, *ga1-5*, *gid1a1b*, *gid1a1c*, and *gid1b1c* mutants showed no significant effects. It was also reported that treatment of the RGA-GFP-expressing strain with A1 also resulted in a decrease in fluorescence intensity as like as treatment with GA_4. If GID1 recognizes A1 as an agonist of gibberellins and induces the degradation of DELLA, the elongation-promoting activity should be shown even in *ga1-5* mutant. In this context, we investigated other effects and mechanisms of action of A1.

proteolysis, signaling, DELLA

発表責任者：澁谷純太郎（shibuya-juntaro330@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D4p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D4 会場

ホルモン制御剤 NJ15 の植物表層に与える影響の解析

Analysis of the effects of the phytohormone signal transduction inhibitor NJ15 on plant surface layers

○坂上 奈々帆、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院・農生科）
○Nanaho SAKAUE, Masatoshi NAKAJIMA, Tadao ASAMI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】　植物に生じる生理現象の多くは、複数の植物ホルモンの相互作用を介して制御されている。各ホルモンの信号伝達経路においては形態変化や生理現象等の作用発現過程に近づく下流になるほど統合や分岐が発生するため、分子レベルでの過程解明は容易でない。NJ15 はブラシノステロイド・オーキシン双方の信号伝達を共に制御する化学ツールであり、NJ15 に低感受性を示すシロイヌナズナ変異体としてクチクラ生合成酵素 DCR の機能欠損体が見つかっている。これを受けてクチクラ層と隣接の細胞壁に着目して、主に化学的制御の観点から NJ15 の機能解析を進めており、本発表ではその現状を報告する。
【方法・結果】　クチクラ層の構成成分・超長鎖脂肪酸の生合成阻害剤 Cafenstrole (Caf) の投与に伴い、酸性多糖類等の染色に用いられる toluidine blue O 試薬で胚軸表面が染色される一方、NJ15 を共投与するとその染色強度が低下することを既に報告した。そこで、細胞壁構成成分セルロースの生合成阻害剤 Isoxaben (IXB)を用いたところ、Caf 投与時と同様に、IXB 投与で胚軸表面が染色されたのに対し、NJ15 共投与では染色強度の低下が生じた。よって、NJ15 は　胚軸表面に影響を与え、結果としてクチクラ層あるいは細胞壁の異常に伴う染色試薬の浸透を抑制する効果を持つと考えられた。NJ15 には幼胚軸中の脂肪酸量を増加させる効果も認められたことから、脂肪酸組成分析を実施し、各薬剤投与による影響を調べた。また、LC-MSMS を用いて胚軸表面に存在する撥水性物質の定量を行い、NJ15 共投与時の染色強度低下との関連性を調査した。

Phytohormones are synthesized in plants to regulate their growth and development in response to various environmental changes. Among them, both auxin and brassinosteroid positively function on cell elongation and plant growth. Therefore, several crossing points at their signal transductions have been evoked, however the common signal component(s) required for the so-called crosstalk is little uncovered. NJ15 inhibits both auxin and brassinosteroid signaling. In this report, to identify the target of NJ15, we used the chemicals, which affect the biosynthesis of cuticle or cell wall, and we evaluated the relation between chemical treatments and water-repellent substances composition on plant surface layer.

inhibitor, cell wall, cuticule layer

講演番号：2D4p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 D4 会場

トマト毛状根による活性型ビタミン D3 生合成

Bioproduction of active vitamin D3 in transgenic tomato hairy roots

○水田 珠希[1]、山岸 萌子[1]、中川 真太郎[1]、秋山 遼太[1]、村中 俊哉[2]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神大院農、[2]阪大院工)
○Miki Mizuta[1], Moeko Yamagishi[1], Shintaro Nakagawa[1], Ryota Akiyama[1], Toshiya Muranaka[2], Yukihiro Sugimoto[1], Masaharu Mizutani[1] ([1]The Univ. of Kobe, [2]The Univ. of Osaka)

人間は皮膚への紫外線（UV-B）照射により 7-デヒドロコレステロール（7-DHC）からビタミン D3（VD3）を生合成し、VD3 は CYP2R1 による 25 位水酸化、CYP27B1 により 1α位水酸化を受けて活性型 VD3 となる。活性型ビタミン D3（VD3）は、血中のリン・カルシウム濃度を一定に保つ役割を担い、骨粗鬆症等の治療薬の有効成分として用いられるが、化学合成された活性型 VD3 は非常に高価である。本研究では、トマト代謝工学により活性型 VD3 を安価に生産することを目的とした。

先行研究において、2 つのステロール 7 位還元酵素遺伝子 *SlDWF5, SlDWF5H* をノックアウトしたトマト毛状根(*Sl7dr-dko* HR)で 7-DHC が蓄積し、*Sl7dr-dko* HR への UV-B 照射により VD3 が生産された。しかし *DWF5*/*DWF5H* 二重破壊トマト植物体（*Sl7dr-dko* plant）は 1 個体しか得られず、強い矮性と不稔を示した。そこで、*Sl7dr-dko* plant をカルス化および再分化することで形質転換用の宿主として *Sl7dr-dko* plant を量産し、*CYP2R1* と *CYP27B1* を過剰発現する毛状根（*Sl7dr-dko*/*CYP2R1-ox*/*CYP27B-ox* HR）の作出に使用した。得られた *Sl7dr-dko*/*CYP2R1-ox*/*CYP27B-ox* HR は UV-B 照射後、水酸化反応に最適な温度条件および培養時間で培養すると、活性型 VD3 の蓄積が確認された。

Humans biosynthesize vitamin D3 (VD3) from 7-dehydrocholesterol (7-DHC) by exposing the skin to sunlight. VD3 is hydroxylated at C25 by CYP2R1 and C1α by CYP27B1. Active VD3 regulates calcium and phosphorus and is a therapeutic drug for osteoporosis, but chemically synthesized active VD3 is expensive. The purpose of this study is to produce active VD3 at low cost by using transgenic tomatoes.

Accumulation of 7-DHC was confirmed in a tomato plant (*Sl7dr-dko* plant) and tomato hairy roots (*Sl7dr-dko* HR) in which two genes *DWF5* and *DWF5H* encoding sterol Δ7-reductase were disrupted by genome editing. However, the *Sl7dr-dko* plant showed a severe dwarf phenotype, and therefore, the *Sl7dr-dko* plant were propagated by culturing the axillary bud and regeneration from *Sl7dr-dko* callus. The transgenic hairy roots constitutively expressing CYP2R1 and CYP27B1 (*Sl7dr-dko*/*CYP2R1-ox*/*CYP27B-ox* HR) were generated by using the *Sl7dr-dko* plants as a host. By incubating the hairy root under the optimized conditions for hydroxylation reactions after irradiating with UV, we succeeded to produce active VD3 in the hairy roots.

active vitamin D3, transgenic tomato, bioproduction

講演番号：2D5a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D5 会場

A mitochondrial membrane bound *O*-acyltransferase is involved in the biosynthesis of Nitrogen Signaling Factors (NSFs) in *Schizosaccharomyces pombe*

○ KANRIN RI[1,2], Yoko Yashiroda[2], Go Hirai[3], Masaya Usui[4], Minoru Yoshida[1,2,5] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [3]Fac. Pharm. Sci., Kyushu Univ, [4]BMA, RIKEN CBS, [5]CRIIM, Univ. Tokyo)

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Eca39 functions as a branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase, which catalyzes the final step of the synthesis of BCAAs: isoleucine, leucine, and valine. In this case, the *S. pombe* auxotrophic mutant *eca39Δ* requires uptake of the BCAAs from the environment to grow. The *eca39Δ* mutant is still unable to grow when the minimal medium contains an excess amount of glutamate (Glu) even if enough amounts of BCAAs are supplemented. This is because of a phenomenon called nitrogen catabolite repression, a metabolic control system that ensures repression of the uptake of poor nitrogen sources such as BCAAs in the presence of high-quality nitrogen sources such as Glu by restraining the cells' ability of synthesizing enzymes and permeases required for using poor nitrogen sources.

However, we discovered a phenomenon that the growth of the *eca39Δ* mutant on the minimal medium could be restored when it was spotted adjacent to the prototrophic fission yeast cells. This phenomenon indicates that some molecules were secreted from the prototrophic cells and allowed the mutant to circumvent the nitrogen catabolite repression. Then two secreted oxylipins, 10(*R*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid (Ac8Z) and 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid (Hy8Z), responsible for the intercellular communication phenomenon were identified from the culture supernatant of the prototrophic *S. pombe* cells and named Nitrogen Signaling Factors (NSFs).

To further understand this NSF-mediated cell-cell communication, we conducted genetic screening to identify the genes involved in the biosynthesis of NSFs. We screened 3,226 single gene deletion strains to identify mutants that showed decreased production levels of NSFs by bioassay, thin-layer chromatography (TLC)-based, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based methods. From the results, we found that in both the culture supernatant and cells of *SPBC3H7.05cΔ* mutant, the production of Ac8Z and Hy8Z was significantly reduced and increased, respectively, compared with that in the prototrophic *S. pombe* cells. The gene product of *SPBC3H7.05c* belongs to the membrane bound *O*-acyltransferase (MBOAT) family. These suggest that gene *SPBC3H7.05c* may be involved in the biosynthesis of Ac8Z from Hy8Z through its *O*-acyltransferase function. We thus named *SPBC3H7.05c acn1* (acetylation of Hy8Z (NSF)).

Yeast, Cell-cell communication, Fatty acids

講演番号：2D5a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D5 会場

Phosphorylation-mediated cofactor specificity switch in glutamate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*

○ YIFAN WANG[1], Takeo TOMITA[1,2], Ayako YOSHIDA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

Most dehydrogenases are nicotinamide cofactor ($NADP^+$ or NAD^+)-dependent oxidoreductases. The $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4) from yeast *Schizosaccharomyces pombe* (SpGdh1) is a pivotal enzyme in ammonium assimilation. SpGdh1 catalyzes the conversion of α-ketoglutarate and ammonium to glutamate using NADPH as a coenzyme. Previous phosphoproteomics study suggested that the kinase Pom1 may phosphorylate four serine residues (Ser252, Ser281, Ser285, and Ser287) and Tyr175 of SpGdh1. However, the impact of this phosphorylation on the enzyme activity and the underlying molecular mechanisms remains unclear. This study aimed to elucidate the regulatory mechanism of SpGdh1 through structural analysis and characterization of phosphorylation-mimic mutants.

We determined the crystal structure of SpGdh1 binding $NADP^+$ and α-iminoglutarate at 1.45 Å resolution. SpGdh1 takes a typical hexameric structure. The four serine residues, which are known to be phosphorylated, are located near the active site, suggesting a change in the local structure and/or environment of the active site by the phosphorylation. In particular, Ser252 directly interacts with the 2′-phosphate group of $NADP^+$. This implies that phosphorylation of Ser252 may interfere with $NADP^+$ binding by causing steric hindrance and charge repulsion with the 2′-phosphate group of $NADP^+$ and this phosphorylation possibly causes a shift of the coenzyme preference for NAD^+ to $NADP^+$. To verify this hypothesis, we prepared recombinant SpGdh1 phosphorylation mimic (Ser to Glu) variants at these four Ser residues. The activity assays revealed that the coenzyme specificity of the S252E and SE4 (S252E/S281E/S285E/S287E) mutants shifted to NADH from NADPH by 4.9- and 7.1-fold, respectively. Kinetic parameters for the mutants demonstrated that replacing the four Ser residues with Glu resulted in a lowered affinity of SpGdh1 for NADPH and decreased catalytic efficiency. Conversely, substitutions enhanced the affinity for NADH and catalytic efficiency. These findings suggest that phosphorylation of SpGdh1 would play an important role in the regulation of the GDH activity through a cofactor specificity switch. Our study revealed both the phosphorylation-mediated cofactor specificity switch in glutamate dehydrogenase and the structural basis for this switch.

glutamate dehydrogenase, phosphorylation, cofactor specificity switch

発表責任者：Makoto Nishiyama（umanis@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D5a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D5 会場

Crystal structure of the LysJ-LysW complex from *Thermus thermophilus*

○Wenyuan SHI[1], Ayako YOSHIDA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci. UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

Lysine biosynthetic pathway is unique among all other amino acid biosynthetic pathways in that it has two distinct routes, the diaminopimelate (DAP) route and the α-aminoadipate (AAA) route, to lysine. It has long been thought that all bacteria synthesize lysine through the DAP pathway. We found that a bacterium, *Thermus thermophilus*, synthesizes lysine through AAA. However, this AAA pathway in *T. thermophilus* differs from the previously known AAA pathway and contains enzymes similar to those in the arginine biosynthetic pathway. An additional unique feature of the AAA biosynthesis in *T. thermophilus* is that it uses an amino-group carrier protein LysW. To clarify this unique biosynthetic system using LysW, we have been working on structural analysis for the complexes of lysine biosynthetic enzymes and LysW. Our previous studies have elucidated the recognition mechanism of LysW by LysX, LysZ, LysY, and LysK by the structural analysis with mutational analysis; however, until present, how LysJ recognizes LysW remains unknown. Therefore, in this study, we determined the crystal structure of LysJ from *T. thermophilus*, an aminotransferase that catalyzes the second last step, in a complex with LysW.

We prepared the product of the LysJ reaction, LysW-γ-lysine, using *E. coli* co-producing lysine biosynthetic enzymes (LysW, LysX, LysZ, LysY, and LysJ) for the co-crystallization with LysJ, and determined the crystal structure of LysJ・LysW complex at 2.4 Å resolution. In the LysJ・LysW complex structure, an asymmetric unit contains two LysJ dimers, each interacting with only a single LysW. The negatively charged residues on the globular domain of LysW were recognized by positively charged residues of LysJ. The result further confirmed structural evidence for LysW acting as a carrier protein to interact with lysine biosynthetic enzymes by electrostatic forces to facilitate efficient lysine biosynthesis. However, the C-terminal arm region containing 8 amino acid residues of LysW, Glu47-Glu54, and the attached lysine residue of the derivative were not visible in the structure. Based on the crystal structure, we modeled the structure showing how the C-terminal arm region with the attached lysine molecule was bound to LysJ. Mutational analysis of LysJ to verify the the mechanism to recognize LysW, especially the C-terminal arm region, is undergoing and the result will be reported in this presentation.

lysine biosynthesis, crystal structure, protein interaction

発表責任者：Makoto Nishiyama（umanis@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D5a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D5 会場

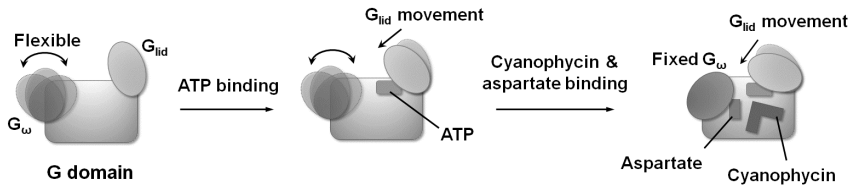
シアノフィシン生合成におけるアスパラギン酸縮合反応とその制御の分子機構

Molecular mechanism of aspartate condensation reaction and its regulation in cyanophycin biosynthesis

○宮川 拓也[1,2]、楊 健[2,3]、川崎 政人[4,5]、安達 成彦[4]、藤井 歩[2]、宮内 裕美子[2]、村松 知成[2]、守屋 俊夫[4]、千田 俊哉[4,5]、田之倉 優[2]([1]京大院・生命、[2]東大院・農生科、[3]中科院・南海海洋研、[4]高エネ機構・物構研・構造生物、[5]総研大・先端学術院)

○Takuya MIYAKAWA[1,2], Jiang YANG[2,3], Masato KAWASAKI[4,5], Naruhiko ADACHI[4], Ayumu FUJII[2], Yumiko MIYAUCHI[2], Tomonari MURAMATSU[2], Toshio MORIYA[4], Toshiya SENDA[4,5], Masaru TANOKURA[2] ([1]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]South China Sea Inst. Oceanol., Chinese Acad. Sci., [4]SBRC, IMSS, KEK, [5]Grad. Sch. Adv. Stud., SOKENDAI)

シアノバクテリアは固定した窒素をシアノフィシンと呼ばれる顆粒状物質として貯蔵する。シアノフィシンは、骨格となるポリペプチド鎖を形成するアスパラギン酸の側鎖にアルギニンがイソペプチド結合で縮合した化学構造をもち、シアノフィシン合成酵素（CphA1）という単一の酵素によって合成される。CphA1 は、グルタチオン合成酵素様ドメイン（G ドメイン）と MurE 様ムラミルリガーゼドメイン（M ドメイン）の 2 つの異なる活性部位を統合し、シアノフィシンへのアスパラギン酸とアルギニンの縮合反応を交互に触媒することが示されているが、各ドメインにおける反応がどのような機構で進行し制御されているのかについては十分に理解されていない。そこで我々は、*Trichodesmium erythraeum* IMS101 由来 CphA1（*Te*CphA1）のアポ型、ATPγS 結合型、ATPγS 及び基質結合型の構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により決定した。これらの構造から、ATP 依存的にシアノフィシンの C 末端カルボキシ基にアスパラギン酸が付加する反応の初期状態が可視化され、G ドメインにおけるアスパラギン酸の認識と反応の進行に必要な 2 つの構造モジュール（G_{ω} 及び G_{lid}）の配向が基質の結合によって調節されることが明らかになった。



Cyanobacteria accumulate a granule-like substance called cyanophycin as a fixed nitrogen reservoir. Cyanophycin is a polypeptide consisting of aspartate and arginine as the backbone and branched sidechain, respectively, and is synthesized by a single enzyme, cyanophycin synthetase (CphA1). This enzyme integrates two distinct active sites, a glutathione synthase-like domain (G domain) and a MurE-like muramyl ligase domain (M domain), to alternately catalyze the condensation of aspartate and arginine into cyanophycin. However, the mechanism by which the reactions in each domain proceed and are regulated is not fully understood. In this study, we determined the structures of apo-, ATPγS-bound, and ATPγS/substrates-bound states of CphA1 from *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (*Te*CphA1) by cryo-EM single particle analysis. These structures revealed the initial state of the ATP-dependent addition of aspartate to the C-terminal carboxy group of cyanophycin and that the substrate binding regulated the orientation of the two structural modules (G_{ω} and G_{lid}) required for aspartate recognition and reaction progression in the G domain.

cyanobacteria, nitrogen fixation, biopolymer

講演番号：2D5a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D5 会場

Tyrosine phenol-lyase 阻害剤 3,5-dihydroxybenzoic acid 経口摂取はマウス糞便フェノール量を減少させる

Oral administration of a tyrosine phenol-lyase inhibitor, 3,5-dihydroxybenzoic acid, reduces the level of fecal phenol in mice

○小林 琢磨[1,2]、大石 栞[1]、原 幸大[3]、橋本 博[3]、渡辺 賢二[3]、吉岡 泰淳[1]、三好 規之[1] ([1]静県大院・薬食、[2]日本学術振興会、[3]静県大・薬)
○ Takuma KOBAYASHI[1,2], Shiori OHISHI[1], Kodai HARA[3], Hiroshi HASHIMOTO[3], Kenji WATANABE[3], Yasukiyo YOSHIOKA[1], Noriyuki MIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Pharm. and Nutr. Sci. Univ. Shizuoka, [2]JSPS, [3]Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

ある種の腸内細菌が発現する酵素 tyrosine phenol-lyase (TPL) は、ビタミン B6（ピリドキサールリン酸）を補酵素とし、基質 L-Tyr からのフェノールの産生（脱離反応）を触媒する。フェノールは非常に強力な変性作用を有するため、消化管内で産生されるフェノールが生体を障害し、様々な疾患の要因となる可能性が指摘されている。本研究では、TPL 活性を阻害しフェノール産生を抑制する食品成分の探索を行った。まず、TPL 組換え体を用いた TPL 阻害活性評価系を構築し、17 種のポリフェノール類の TPL 阻害活性評価を行った。その結果、3, 5-dihydroxybenzoic acid (3,5DHBA) が最も強い TPL 阻害活性（*K*i = 13.0 μM）を示し、その阻害様式は競合阻害であることを明らかにした。さらに X 線結晶構造解析により、3,5DHBA を添加することで、TPL の活性中心を形作るヘリックスがディスオーダーし、活性阻害を引き起こす可能性が示唆された。また、 TPL を発現するフェノール産生菌 *Morganella morganii* subsp. *Morganii*（JCM 1672）および *Citrobacter koseri*（JCM 1658）への 3,5DHBA 曝露により、フェノール産生は曝露濃度依存的に減少した（$p < 0.05$）。さらに、高 L-Tyr 食（5%、14 日間）により糞便中フェノール量を対照群と比較して 4.0±0.4 倍に増加させた C57BL/6J マウスへ、0.2% 3,5DHBA を含有する高 L-Tyr 食を 2 日間自由摂食させたところ、糞便中フェノール量は有意に低下した（56.8±4.4%、$p < 0.05$）。以上より、TPL 阻害剤である 3,5DHBA の経口摂取は、腸内細菌 TPL を阻害し、フェノール産生を低下させることが示唆された。

Tyrosine phenol-lyase (TPL) is an enzyme, that uses pyridoxal 5'-phosphate (a vitamin B_6) as a cofactor, expressed by some intestinal bacteria. This enzyme catalyzes the elimination reaction of the substrate L-Tyr to produce phenol. A potent denaturing property of phenol produced in the intestinal tract can induce cellular/tissue damage that can trigger various chronic diseases. Therefore, we screened polyphenols that inhibit TPL activity and found that 3,5-dihydroxybenzoic acid (3,5DHBA), one of the intestinal bacterial metabolites of gallic acid, showed the strongest inhibitory activity (*K*i = 13.0 μM), and its inhibition type was competitive inhibition. Furthermore, X-ray crystallography suggested that the addition of 3,5DHBA may disorder the helix forming the active center of TPL and cause TPL inhibition. Additionally, 3,5DHBA dose-dependently and significantly reduced phenol level in TPL-expressing bacterial culture of *Morganella morganii* subsp. *Morganii* (JCM 1672) and Citrobacter *koseri* (JCM 1658) ($p < 0.05$). Moreover, oral administration of 3,5DHBA significantly reduced fecal phenol levels induced by L-Tyr-rich diet feeding in C57BL/6J mice (56.8 ± 4.4%, n = 8, $p < 0.05$). These results suggest that 3,5DHBA is a promising TPL inhibitor that inhibits phenol production in the intestinal tract.

Inhibitor of tyrosine phenol-lyase, Microbiota, Phenol

講演番号：2D5a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D5 会場

超好熱菌由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素変異体の酵素活性向上に関与するアミノ酸残基の同定
Identification of amino acid residues involved in the enhancement of enzyme activity of PQQ-dependent aldose dehydrogenase mutant from hyperthermophile
○伊藤 一樹[1]、前野 美久[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、末 信一朗[4]、里村 武範[4,5]([1]福井大院・工、[2]香川大、[3]大阪工大、[4]福井大学・工、[5]福井大ライフ)
○Kazuki ITO[1], Miku MAENO[1], Haruhiko SAKURABA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Shin-ichiro SUYE[4], Takenori SATOMURA[4,5] ([1]Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Inst. Technol., [4]Eng., Fukui Univ., [5]Life Univ. Fukui)

【背景・目的】超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来ピロロキノリンキノン依存性アルドース脱水素酵素(PQQ-ASD)は 2, 6-ジクロロインドフェノールのような電子伝達物質を介して酵素反応によって抽出した電子を電極へ伝達する酵素である。本酵素は 80℃で 10 分間の熱処理を行っても変性しない高い安定性を有しており、グルコースをはじめとする様々な単糖、二糖類を基質とすることが可能なため糖類を燃料としたバイオ燃料電池用素子としての応用が期待されている。しかし、本酵素は常温での酵素活性が低く、バイオ燃料電池として十分な出力が出せないことが応用への課題となっている。そこで、分子進化工学的手法を用いて本酵素の酵素活性が向上した変異体の創製を行った。その結果、野生型酵素よりも 4.4 倍酵素活性が向上した PQQ-ASD S24 変異体を作成することに成功した。本研究では PQQ-ASD S24 変異体の酵素活性向上機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】分子進化工学的手法により酵素活性が大幅に向上した PQQ-ASD S24 変異体には 6 つのアミノ酸置換が導入されていることが判明している。これら変異と酵素活性との関係性を明らかにするために単一変異体の作成を行った。その結果、２つの単一アミノ酸変異体において酵素活性が向上したことが明らかとなった。しかしながら、それぞれの単一アミノ酸変異体では PQQ-ASD S24 変異体ほど酵素活性の向上が認められなかったため、PQQ-ASD S24 の酵素活性向上は複数のアミノ酸変異によるものであることが示唆された。

PQQ-ASD from *P. aerophilum* is an enzyme that transfers electrons extracted through enzyme reaction via electron mediators such as 2,6-dichloroindophenol to an electrode. This enzyme does not lose enzyme activity even at 80°C for 10 minutes. In addition, due to its ability to utilize various monosaccharides and disaccharides, including glucose and maltose, as substrates, it is expected to be applied as an element for biofuel cells using sugars as fuel. However, the practical application in biofuel cells has been limited because the enzyme activity at room temperature is low.
Therefore, we employed directed evolutional techniques to create a mutant with improved enzyme activity. As a result, we successfully generated the PQQ-ASD S24 mutant, which exhibited 4.4 times higher enzyme activity compared to the wild-type enzyme. This study aims to elucidate the mechanism behind the improved enzyme activity of the PQQ-ASD S24 mutant.

Aldose dehydrogenase, Molecular evolution engineering, Biodevice

発表責任者：里村 武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：2D5a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D5 会場

超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素を基盤とした直接電子移動型酵素の開発

Construction of direct electron transfer type enzyme based on PQQ-dependent aldose dehydrogenase from the archaeon, *Pyrobaculum aerophilum*

○前野 美久[1]、伊藤 一樹[1]、末 信一朗[2]、里村 武範[2,3]([1]福井大院・工、[2]福井大学・工、[3]福井大ライフ)
○Miku MAENO[1], Kazuki ITO[1], Shin-ichiro SUYE[2], Takenori SATOMURA[2,3] ([1]Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Eng., Fukui Univ., [3]Life Univ. Fukui)

【背景】超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 PQQ 依存性アルドース脱水素酵素(PQQ-ASD)はグルコースやマルトースなど幅広い糖類の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は高い安定性を有しており、また人工の電子受容体をメディエーターとすることで基質から抽出した電子を電極へ伝達することが可能である。このことから、本酵素はバイオ電池やバイオセンサーのようなバイオデバイス用素子としての応用が期待されている。しかし、バイオデバイス用素子として本酵素を利用するには酵素反応と電極間で電子授受を行うために人工の電子伝達メディエーターを用いなければならない。人工電子伝達メディエーターは、生体内では毒性を示すものもあるため生体内において遊離状態で使用することが困難である。そこで本研究では耐熱性 PQQ-ASD に対して直接、電子伝達メディエーターを修飾した酵素を創製し生体内でも使用可能なバイオデバイス用素子の開発を目的に研究を行った。
【方法・結果】大腸菌由来シトクローム b_{562} (Cyt b_{562})を電子伝達メディエーターとして遺伝子工学的に PQQ-ASD と融合した Cyt b_{562}-PQQ-ASD を作成し、分光学的解析、電極へ酵素を修飾した際の電気化学的性質を解析した。その結果、作成した Cyt b_{562}-PQQ-ASD は基質の添加により酵素反応によって抽出された基質電子が Cyt b_{562} に伝達されることが確認できた。

PQQ-dependent aldose dehydrogenase (PQQ-ASD) from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum,* catalyzes the oxidation of various sugars such as glucose and maltose. The enzyme has high stability and can transfer electrons extracted from substrates to electrodes by using artificial electron acceptors as mediators. Therefore, this enzyme is expected to be applied as a device for biodevices such as biofuel cells and biosensors. However, to utilize this enzyme as an element for biodevice, Artificial electron mediators are required for electron transfer between enzyme reaction and electrode. Ordinary, artificial electron transfer mediators are toxic in vivo, making it difficult to use them free in vivo. In this study, we prepared thermostable PQQ-ASD enzymes directly modified with electron transfer mediators and developed biodevice element capable of uses in vivo.

Aldose dehydrogenase, Biodevice, Cytochrome

発表責任者：里村 武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：2D5a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D5 会場

GABA 資化性好熱性真菌の単離と GABA オキシダーゼの探索
Isolation of GABA-assmilating thermophilic fungi and search for GABA oxidase gene

阿部 一樹、○高橋 祥司（長岡技科大）
Kazuki Abe, ○Shouji Takahashi (Nagaoka Univ. of Tech.)

γ-アミノ酪酸(GABA)はヒトに対して抗高血圧作用など多くの有益な生理活性を示すことから、GABA を豊富に含む機能性食品が求められている。一般的な食品の GABA 濃度は低いことから、高い GABA 生産能を有する食品微生物の取得が重要視されている。そこで本研究では、GABA 高生産食品微生物の簡便かつ迅速な単離を可能とする酵素学的微生物スクリーニング法を開発するため、好熱性真菌の GABA オキシダーゼ（GABAO）の取得を検討した。

GABA を単一窒素源とした培地に様々な発酵堆肥を接種して 45℃で集積培養することで、形態学的に異なる 2 種類の真菌 I2 株と H4 株を単離した。ITS 領域の塩基配列から、I2 株と H4 株はそれぞれ好熱性真菌 *Thermomyces lanuginosus* と *Kluyveromyces marxianus* と考えられた。ゲノム配列が明らかな *T. lanuginosus* SSBP 株と *K. marxianus* NRRL Y-1190 株において GABA 代謝酵素遺伝子を探索したところ、SSBP 株では 5 つの一級アミンオキシダーゼ（*PrAO*）遺伝子が NRRL Y-1190 株では *PrAO* 遺伝子と GABA アミノトランスフェラーゼ遺伝子がそれぞれ 1 つ見いだされた。SSBP 株の *PrAO* 遺伝子配列をもとに I2 株の *PrAO* 遺伝子を単離して大腸菌発現ベクターを作成し、大腸菌で発現させたところ、1 つの *PrAO* 遺伝子発現産物に GABAO 活性が確認できた。

Since γ-aminobutyric acid (GABA) has many beneficial physiological activities in humans, there is a need for functional foods rich in GABA. Because GABA content in foods is very low, it is important to obtain fermentative microorganisms with a high GABA production ability. In this study, we aimed to obtain a GABA oxidase (GABAO) from thermophilic fungi to develop an rapid enzymatic screening method for the isolation of high-GABA-producing microorganisms.

We isolated two fungal strains I2 and H4 by cultivating composts in a medium containing GABA as the sole nitrogen source at 45°C. Based on their ITS regions, I2 and H4 were identified as *Thermomyces lanuginosus* and *Kluyveromyces marxianus*, respectively. We searched the genome sequences of *T. lanuginosus* SSBP and *K. marxianus* NRRL Y-1190 for enzyme genes capable of metabolizing GABA and found five primary amine oxidase (*PrAO*) genes in SSBP, and one *PrAO* gene and one GABA aminotransferase gene in NRRL Y-1190. Based on the gene sequences, the *PrAO* genes of I2 were obtained, and GABAO activity was confirmed in a product of *PrAO* genes.

GABA, oxidase, thermophilic fungi

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2D5a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D5 会場

セレノシステイン含有マルチヘムシトクロムは細菌ドメインに広く保存されたポリスルフィド還元酵素である
A selenocysteine-containing multiheme cytochrome is an evolutionarily conserved polysulfide reductase in bacteria
○井上 真男[1,2]、伊豆 由記子[1]、青野 陸[1]、越智 杏奈[1]、三原 久明[1] ([1]立命大・生命、[2]立命大・R-GIRO)
○Masao INOUE[1,2], Yukiko IZU[1], Riku AONO[1], Anna OCHI[1], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

マルチヘムシトクロム（MHC）は細菌において細胞外での電子伝達を司る。近年我々は、活性中心にセレノシステイン（Sec）を含む前代未聞の MHC（SeMHC）を発見し、*Geobacter sulfurreducens* の元素状硫黄呼吸においてポリスルフィド（S_n^{2-}）還元酵素として機能することを見出した。本研究では、SeMHC が細菌ドメインに広く分布する新奇 S_n^{2-}還元酵素ファミリーであると仮説を立て、全原核生物ゲノムを対象とした大規模配列解析と SeMHC ホモログの活性比較を行った。

まず、SeMHC ホモログの配列多様性とゲノム分布を調べた。SeMHC ホモログはいずれも 5 つのヘムをもち、その多くが活性中心に Sec または Cys を含むことが示唆された。SeMHC ホモログの分子系統は複数の系統群からなり、異なる系統群で Cys 型の出現が見られた。SeMHC ホモログは多くの硫黄還元菌や硫黄不均化菌が属する Desulfobacterota 門や Nitrospirota 門など、未培養分類群を含む 10 の幅広い細菌門に分布することが分かった。次に、異なる系統群由来の 3 つの SeMHC ホモログを発現・精製して活性比較を行ったところ、基質特異性の違いはあったものの、いずれも S_n^{2-}に対する高い活性を示した。興味深いことに、Sec は *G. sulfurreducens* SeMHC の活性に必須であるにもかかわらず、他系統の Cys 型 SeMHC ホモログは高い S_n^{2-}還元活性を有することが分かった。以上の結果から、SeMHC ホモログは、これまで見過ごされていた S_n^{2-}還元酵素ファミリーであり、細菌ドメインにおいて進化的に広く保存され、環境中の硫黄循環に寄与することが示唆された。

Multiheme cytochromes (MHCs) control extracellular electron transport in bacteria. Recently, we discovered a novel MHC (SeMHC) containing Sec in the active site as a S_n^{2-} reductase in the elemental sulfur respiration of *Geobacter sulfurreducens*. Here, we performed bioinformatics analysis using genomic data and compared the activity of SeMHC homologs. First, we examined the sequence diversity and genomic distribution of SeMHCs. All predicted SeMHCs had five hemes, with many of these proteins containing Sec or Cys in their active sites. SeMHCs were found to be distributed in ten bacterial phyla, including many uncultured taxa. Next, we expressed and purified three SeMHCs from different phylogenetic groups and compared their activities. Although there were differences in substrate specificity, all of them showed high S_n^{2-} reductase activity. Our results suggest that SeMHCs are a previously overlooked S_n^{2-} reductase family that is evolutionarily conserved in bacteria and contributes to environmental sulfur cycling.

selenocysteine, heme, sulfur

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2D5a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D5 会場

ロダネーゼ様タンパク質 ExtH の硫黄転移活性に関わる Cys 残基の同定
Identification of Cys residues involved in the sulfurtransferase activity of the rhodanese-like protein ExtH

○工藤 碧斗[1]、藤田 大樹[1]、井上 真男[1,2]、青野 陸[1]、越智 杏奈[1]、三原 久明[1]（[1]立命大・生命、[2]立命大・R-GIRO）
○Aoto KUDO[1], Daiki FUJITA[1], Masao INOUE[1,2], Riku AONO[1], Anna OCHI[1], Hisaaki MIHARA[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

Geobacter sulfurreducens PCA 株は元素状硫黄を硫化物イオンに還元することで呼吸を行う代表的な異化的硫黄還元細菌であるが、硫黄呼吸のメカニズムは長らく不明であった。我々はごく最近、本菌の硫黄呼吸に必要な硫黄転移活性を有するロダネーゼ様タンパク質 ExtH を同定した。ExtH は一般的な硫黄ドナーであるチオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）に比べ、ポリスルフィド（S_n^{2-}）に対して 22,000 倍の触媒効率を示す。このことは ExtH が元素状硫黄に由来する S_n^{2-}をペリプラズムに局在する S_n^{2-}還元系に受け渡す可能性を示唆する。一般的に、硫黄転移活性には Cys 残基が関与するが、ExtH のどの Cys 残基が働くのか明らかになっていない。そこで本研究では、ExtH の硫黄転移活性に関与する Cys 残基の同定を試みた。

ExtH は 3 つの Cys 残基を有しており、ExtH に存在する 2 つのロダネーゼドメインそれぞれに 1 つずつ（Cys129 および Cys330）、また C 末端に 1 つ（Cys468）存在する。これらの変異体（C129A、C330A、C468A）を作製して硫黄転移活性を解析した。C129A は $S_2O_3^{2-}$と S_n^{2-}の両方に対して、野生型と同程度の触媒効率を示した。一方、C330A はいずれの硫黄ドナーに対しても活性は示さず、Cys330 が硫黄転移活性に必須であることが分かった。C468A では S_n^{2-}に対して野生型の 0.8 倍の触媒効率を示したが、$S_2O_3^{2-}$に対しては野生型の 1.7 倍の触媒効率を示した。Cys468 は、*Geobacter* 属で高度に保存されており、Gly に富んだ天然変性領域とともに例外なく C 末端に存在していた。このことから Cys468 は ExtH の活性に影響を与えうることが示唆された。

Geobacter sulfurreducens PCA is an anaerobic gram-negative bacterium that conducts dissimilatory reduction of elemental sulfur to sulfide. However, the underlying mechanism has remained unknown. We have recently identified a rhodanese-like protein ExtH, which has the sulfurtransferase activity required for sulfur respiration in the bacterium. Here, we attempted to identify Cys residues involved in the sulfurtransferase activity of ExtH with three Cys residues. We constructed the mutants C129A, C330A, and C468A, and analyzed their sulfurtransferase activity. We found that Cys330 was essential for the activity, and Cys468 might affect the activity of ExtH.

cysteine, sulfur, rhodanese

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2D5p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 D5 会場

選択的白色腐朽菌の溶解性多糖モノオキシゲナーゼを用いたサトウキビ収穫廃棄物パルプの分解
Decomposition of sugarcane trash pulp using lytic polysaccharide monooxygenase of selective white-rot fungus

○八木 勇成[1,2]、大賀 恵利[1,2]、近藤 敬子[1,3,4]、岡野 啓志[4,5]、渡辺 隆司[4,5]、永田 崇[1,2,3,4]、片平 正人[1,2,3,4] ([1]京大エネ研、[2]京大院エネ科、[3]京大エネ研カーボンネガティブ、[4]京大バイオマスプロダクトツリー、[5]京大生存研)
○Yusei YAGI[1,2], Eri OGA[1,2], Keiko KONDO[1,3,4], Hiroyuki OKANO[4,5], Takashi WATANABE[4,5], Takashi NAGATA[1,2,3,4], Masato KATAHIRA[1,2,3,4] ([1]IAE, Kyoto Univ., [2]Grad. Energy, Kyoto Univ., [3]ICaNS, IAE, Kyoto Univ., [4]BPT, Kyoto Univ., [5]RISH, Kyoto Univ.)

植物バイオマスの主成分であるセルロースは、石油代替資源として期待されている。伝統的なセルロース分解では加水分解酵素セルラーゼが用いられてきた。しかし、結晶性セルロースは難分解性であるため、多量のセルラーゼを要する。そのため、セルロース分解における酵素使用量のコストパフォーマンスのバランスが重要視されている。酸化還元酵素 AA9 ファミリー溶解性多糖モノオキシゲナーゼ（LPMO9）は結晶性セルロールを酸化的に開裂し、セルラーゼの反応開始点を導入することで、セルラーゼの作用を促進する。この LPMO9 の酸化的開裂反応を介したセルラーゼの反応促進効果は、酵素使用量の削減をもたらすと期待されている。

我々は選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 由来 LPMO9 (*Cs*LPMO9) の大量発現系の確立に成功した。さらに、我々はサトウキビ収穫廃棄物由来パルプに対する *Cs*LPMO9 の酵素使用量削減効果を検証した。その結果、*Cs*LPMO9 をセルラーゼと共にパルプに添加した際の酵素使用量は、セルラーゼを単独で添加した系と比較して 48%削減されることを明らかにした。この *Cs*LPMO9 がもたらす酵素使用量の削減は、植物バイオマス由来セルロースの効率的な分解に有用と期待される。

Cellulose, the major component of plant biomass, presents an attractive energy and chemical resource as a substitute for fossil fuels. Traditional cellulose decomposition relies on hydrolase, specifically cellulase. However, the recalcitrance of crystalline cellulose necessitates a substantial amount of cellulase, posing a significant challenge in balancing cost and performance. The AA9 family lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO9) enhances cellulase activity by oxidatively cleaving crystalline cellulose, serving as the catalyst for cellulase action. This oxidative cleavage introduces the starting point for cellulases, with the anticipated outcome of reducing enzyme consumption during cellulose decomposition.

We expressed an LPMO9 of *Ceriporiopsis subvermispora*, a selective white-rot fungus (*Cs*LPMO9). We examined the impact of *Cs*LPMO9 on reducing enzyme consumption when applied to pulp from sugarcane trash. As a result, upon simultaneous addition of *Cs*LPMO9 and cellulases to the pulp, enzyme usage decreased by 48% compared to the scenario where only cellulases were added. The reduction in enzyme usage demonstrated by *Cs*LPMO9 suggests its potential as a beneficial enzyme for the efficient decomposition of cellulose derived from plant biomass.

Lytic polysaccharide monooxygenase, cellulase, grass biomass

講演番号：2D5p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 D5 会場

ラミナリビオース合成酵素に変換したβ-1,3 グルカンホスホリラーゼ変異酵素の性質と利用
Properties and utilization of β-1,3 glucan phosphorylase mutant enzyme converted to laminaribiose synthase
○鬼塚 怜音、藤野 早瑛、川口 剛司、炭谷 順一（大阪公立大院農）
○REON ONIZUKA, SAE FUJINO, TAKASHI KAWAGUCHI, JUN-ICHI SUMITANI (Osaka Metropolitan University)

グルコース（Glc）がβ-1,3結合したラミナリオリゴ糖（LO）は機能性食品や医薬品などの分野での応用が期待されているが、安価な供給法が確立されておらず非常に高価である。そこで、LOを合成するツールとして、安価なGlcから様々な重合度のLOを合成できる*Spirochaeta thermophila*由来のβ-1,3オリゴグルカンホスホリラーゼ（StLOP）に着目した。しかし、生成するオリゴ糖の重合度を制御することは難しく、特定重合度のオリゴ糖を効率よく合成するまでには至っていない。そこで、StLOPのサブサイト+2付近にあるL190を側鎖の長いArgに置換することで、サブサイト+2を塞ぎ三糖以上のLOが合成不能となる可能性が考えられた。本研究ではStLOP-L190Rのラミナリビオース（Lam2）合成酵素としての有用性を評価するとともに、Lam2の大量合成を試みた。その結果、StLOP-L190Rを用いてGlcを糖受容体としたときの脱リン酸合成反応がLam2で止まっていることをTLCで確認した。脱リン酸合成反応において、Glcに対するK_m値はそれぞれ野生型：2.01 mM、StLOP-L190R：162 mMとなり、野生型と比較して約80.6倍と高い値を示したものの、安価なGlcを高濃度用いることでStLOP-L190RでLam2を効率的に合成できる可能性が考えられた。そこで、StLOP-L190Rを用いてLam2の大量合成を行ったところ、G1Pに対する収率が93.7%と高い結果が得られた。

Laminarioligosaccharides (LO) are expected to be applied in the fields of functional foods and pharmaceuticals, but they are expensive because inexpensive supply methods have not been established. Therefore, we focused on β-1,3 oligoglucan phosphorylase from *Spirochaeta thermophila* (StLOP), which can synthesize LO with various degrees of polymerization from Glc. However, it is difficult to control the degree of polymerization of the oligosaccharides produced. In this study, we designed StLOP-L190R, which was replaced L190 close to subsite +2 with Arg, resulting that subsite +2 was blocked, making to synthesize laminaribiose (Lam2). As a result, TLC analysis showed that the dephosphorylation reaction stopped at Lam2. Determination of kinetic parameters in the dephosphorylation synthesis reaction showed that the K_m values of StLOP-L190R and wild type for Glc were 80.6 times higher than those of the wild type. Thus, StLOP-L190R can efficiently synthesize Lam2 by using high concentrations of Glc. We performed mass synthesis of Lam2 using StLOP-L190R and obtained a high yield of 93.7% based on G1P.

β-1,3 oligoglucan phosphorylase, Laminaribiose, Mutat enzyme

講演番号：2D5p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 D5 会場

Bacillus halosaccharovorans 由来 β-amylase の高温反応性の増強

The enhancement of high temperature reaction of β-amylase from *Bacillus halosaccharovorans*

○前田 泰輝、田中 真奈、川口 剛司、炭谷 順一（大阪公立大院農）
○ Taiki MAEDA, Mana TANAKA, Takashi KAWAGUCHI, Jun-ichi SUMITANI (Osaka Metropolitan Universit)

β-アミラーゼはデンプン鎖をマルトース単位に分解する酵素であり、食品産業における餅菓子中のデンプンの老化を防止する。β-アミラーゼは穀物由来のものが多用されているが食料・飼料用の穀物需要が高まり、原料価格は高騰している。また、マルトース製造では耐熱性の高い酵素が望まれる。以上から、安定供給可能で高温反応性を有する微生物由来 β-アミラーゼの獲得が求められている。

当研究室で土壌から単離された *B. halosacchalovorans* 由来 β-アミラーゼは既製品中で最も熱安定性が高いダイズ由来酵素より優れた熱安定性を示した。先行研究で部位特異的変異導入により熱安定性が向上した 2 種類の変異酵素（T4P, S180E）が獲得された。本研究では熱安定性をさらに向上させる変異部位を探索し、それらを組み合わせることで高温における反応性が増強された変異酵素の獲得を目指した。Fireplot により 36 種類の変異酵素を設計した。それらの熱安定性について評価したところ、野生型酵素より熱安定性が向上した 4 種類の変異酵素（S118N, S175G, A367P, T383I）が得られた。特に T383I の熱安定性と高温反応性が高まったため、相加的な高温反応性の増強を期待して先行研究で獲得された有用な変異部位と T383I を組み合わせ、二重変異酵素の作製と評価を行った。

β-Amylase is the enzyme that hydrolyzes starch chains to produce maltose, and is used in the food industry to prevent the aging of starch contained in rice cakes. β-Amylase is often from grains, whose prices become more expensive. Since thermostable enzymes are suitable for maltose production, there is a need to obtain microbial β-amylase that can be stably supplied and exhibits high reactivity under high temperature conditions. The β-amylase from B. halosacchalovorans isolated from soil, showed better thermostability than the enzyme from soybean, which is the most thermostable enzyme among commercially available products. In previous studies, we successfully obtained two mutant enzymes (T4P, S180E) with higher thermostability. In this study, we aimed to obtain mutant enzymes with better stability and reactivity under high temperature condition. Thirty six mutation sites were determined by FireProt program. It was revealed that four mutant enzymes, S118N, S175G, A367P, and T383I have higher thermostability than the wild-type enzyme using purified preparations. Since T383I had the highest thermostability and reactivity under high temperature conditions, we are trying to combine useful mutation sites with T383I to construct better enzymes for industrial applications.

Carbohydrorase, β-amylase, Thermostability

講演番号：2D5p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 D5 会場

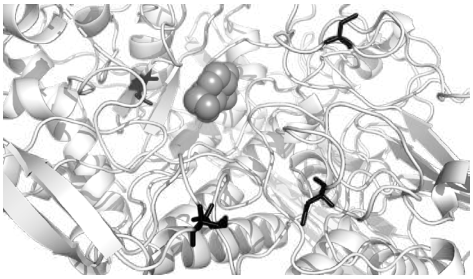
ランダム変異および部位特異的サチュレーション変異による糸状菌由来 GH3 β-グルコシダーゼの高耐熱化

A mutant fungal GH3 ß-glucosidase with a T_m value of 80°C, generated by random and saturation mutagenesis

○松崎 千秋[1]、日高 將文[2]、中島 由香里[1]、本多 裕司[3]、小柳 喬[3]、石川 一彦[4]、加藤 紀彦[5]、熊谷 英彦[1]、片山 高嶺[5] ([1]石川県大資源研、[2]東北大院農、[3]石川県大生資環、[4]松谷化学工業株、[5]京大院生命)

○Chiaki Matsuzaki[1], Masafumi Hidaka[2], Yukari Nakashima[1], Yuji Honda[3], Takashi Koyanagi[3], Kazuhiko Ishikawa[4], Toshihiko Katoh[5], Hidehiko Kumagai[1], Takane Katayama[5] ([1]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ., [4]Matsutani Chemical Ind. Co., Ltd., [5]Kyoto Univ.)

セルロース系バイオマスからの効率的物質生産において、セルロース分解を司る酵素活性の低さが大きな障害となっている。これを打破するため、反応速度の高い高温でセルロース分解反応を行うことが出来るよう、高温でも変性しない耐熱性酵素の創製を目的とした。本研究ではセルロース分解反応の最終段階を担うβ-グルコシダーゼの耐熱化を行い、バイオエタノール生産の効率化を行った。糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* 由来、糖質加水分解酵素ファミリー3 に属するβ-グルコシダーゼを用い、ランダム変異および部位特異的サチュレーション変異により、5 か所の耐熱化アミノ酸変異を有する耐熱化酵素を作製した。得られた 5 重変異型 (M5) 酵素の熱変性曲線の中点温度 (T_m) は 9.5℃上昇した。野生型および M5 酵素の X 線結晶構造解析を行ったところ、いずれの変異も活性中心の周囲に位置していた。さらに本酵素を耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* に発現させて得られた糖鎖付加 M5 酵素は T_m 値 80℃であった。糖鎖付加 M5 酵素を用いることにより、エンドグルカナーゼとの相乗効果による膨潤セルロースからのエタノール収率は 13%向上した。



One of the most promising strategies for developing an efficient process for cellulosic biomass bioconversion is to confer a high thermostability to the relevant enzymes. In the process, ß-glucosidases play an important role to produce glucose, which is the most versatile intermediate material. Here, using random and saturation mutagenesis, we identified 5 amino acid substitutions that increase the thermostability of a glycoside hydrolase family 3 ß-glucosidase from *Thermoascus aurantiacus*. CD thermal unfolding analysis revealed that accumulation of the five mutations (M5 mutant) led to the increase in the T_m value from 60.5°C (for wild-type, WT) to 70°C. Comparison of the crystal structures solved at 2.15 and 2.3 Å resolutions for WT and M5 mutant enzymes, respectively, showed that the substitutions occurred at the peripheral of the catalytic pocket. When the mutant was expressed in a thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, its apparent T_m value further increased to 80°C probably due to *N*-glycosylation. When combined with endoglucanase, the mutant enzyme showed 13% higher ethanol productively than the WT enzyme in simultaneous saccharification and fermentation system using *K. marxianus*.

β-glucosidase, Thermostabilization, *Thermoascus aurantiacus*

講演番号：2D5p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D5 会場

高濃度 EDTA 耐性を持つα-アミラーゼの獲得

Discovery of a highly EDTA-tolerant α-amylase

○森本 晃帆[1]、依田 卓也[1]、細川 正人[1,2]、津田 宗一郎[1] ([1]bitBiome 株式会社、[2]早大院・先進理工)
○Akiho MORIMOTO[1], Takuya YODA[1], Masahito HOSOKAWA[1,2], Soichiro TSUDA[1] ([1]bitBiome, Inc., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

我々は微生物ゲノムの自社独自のデータベース bit-GEM を有する。さらに、その情報を活用すべく、配列相同性並びに三次元構造の特徴により *in-silico* で目的酵素探索を行う技術 bit-QED を開発した。これらの技術を用いることにより、新奇な性質を持つ酵素を見出すことが期待される。本発表では、糖質加水分解酵素ファミリー13 (GH13) α-アミラーゼの例を紹介する。

GH13 サブファミリー5 に属する α-アミラーゼのアミノ酸配列をもとにした bit-GEM 内での検索により、74 種の α-アミラーゼ配列を候補として絞り込み、大腸菌に異種発現させた。破砕液を用いた α-アミラーゼ活性のスクリーニングにより、これらのうち 26 種が活性有と判断された。

α-アミラーゼはその多くが分子内にカルシウム等の金属を保持しているため、EDTA などのキレート剤の存在下では活性が低下することが知られている。興味深いことに、今回のスクリーニングで得られたアミラーゼの 1 つは、EDTA 非添加時と比較して 1 mM EDTA 存在下での活性が増加した。EDTA を段階的に添加した実験を行ったところ、非添加時と比較して 100 mM EDTA の添加時の活性が 22 倍にまで増加した。

We developed an *in-silico* enzyme screening method bit-QED to utilize our own proprietary microbial genome database, bit-GEM. The method combines conventional bioinformatics sequence analysis with 3D structural feature analysis to identify unique enzymes with novel properties. In this presentation, we will show an example of search targeting carbohydrate hydrolase family 13 (GH13).

Using homology search based on amino acid sequences of α-amylases belonging to GH13 subfamily 5, we selected 74 sequences from our own database as candidates and expressed them in *E. coli*. Screening of the activity using cell free lysate revealed that 26 sequences were found to be active.

It is known that α-amylase activity is often inhibited by chelating reagents, such as EDTA. Interestingly, one of our α-amylases increased activity in presence of EDTA. It showed a 22 times activity upon addition of 100 mM EDTA compared to absence of EDTA.

Glycoside hydrolase, α-amylase, GH13

発表責任者：森本晃帆（akiho.morimoto@bitbiome.co.jp）

講演番号：2D5p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D5 会場

アスガルドアーキアにおける fructose-1,6-bisphosphatase の探索
Identification of fructose-1,6-bisphosphatase in Asgard archaea

○佐藤 喬章[1,2]、中川 裕介[1]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大院工、[2]京大カーボンネガティブ・エネ研)
○Takaaki SATO[1,2], Yusuke NAKAGAWA[1], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]Integrated Res. Center for Carbon Negative Sci., Kyoto Univ.)

アスガルドアーキアは、進化系統樹上で原核生物の中では真核生物の最も近くに位置することや、真核生物特有とされてきたタンパク質を複数有することなどから、真核生物の起源に関する知見を与える研究対象として注目されている。2020 年にアスガルドアーキア上門に属するロキアーキオータ門に分類される *Candidatus* Prometheoarchaeum syntrophicum（以下 Prometheoarchaeum）がアスガルドアーキアとしては初めて共集積培養され、完全長のゲノム情報が利用可能となった。この集積培養でカザミノ酸やアミノ酸などを栄養源にしていることなどから、本菌は糖新生を行えることが予測される。しかしゲノム情報を検討したところ、糖新生の鍵酵素である fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)の既知タンパク質と相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子が存在しないことが明らかとなった。そこで本研究では、アスガルドアーキア Prometheoarchaeum における FBPase の同定を目的とした。ゲノム情報を基に候補遺伝子を選抜し、その候補遺伝子について組換え型タンパク質の生化学的な *in vitro* 解析および大腸菌の FBPase 遺伝子欠損株の糖新生条件における増殖相補実験を行うことにより、本遺伝子が FBPase として機能し得ることを明らかにできた。

Asgard archaea are located closest to eukaryotes among prokaryotes on the phylogenetic tree and they possess many eukaryotic signature proteins that have been considered unique to eukaryotes. Therefore, the organisms are attractive research subject to gain insight into origin of eukaryotes. In 2020, *Candidatus* Prometheoarchaeum syntrophicum (Prometheoarchaeum), which is classified into Lokiarchaeota phylum in Asgard archaea superphylum, was co-cultured for the first time among Asgard archaeal species. Information of its full-length genome then became available. Since casamino acids and amino acids were utilized as a nutrition in the enrichment culture, the archaeon is predicted to be able to operate gluconeogenesis. However, genomic analysis could not find a gene encoding classical fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), a key enzyme in gluconeogenesis. Therefore, in this study, we aimed to identify FBPase in the Asgard archaeon Prometheoarchaeum. Utilizing genomic information, a candidate gene encoding FBPase was selected. We then carried out *in vitro* analysis of its recombinant protein and examined whether the gene from Prometheoarchaeum can complement the gluconeogenic growth of *Escherichia coli* in which physiological FBPase gene is disrupted. As a result, we could identify that this gene can be involved in gluconeogenesis instead of classical FBPases.

fructose-1,6-bisphosphatase, gluconeogenesis, Asgard archaea

発表責任者：佐藤喬章（takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2D5p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D5 会場

Biochemical analyses on phosphoenolpyruvate carboxykinases from brown algae
○Jianqiang JIN, Yuusuke Yokooji, Haruyuki Atomi (Kyoto Univ.)

In C4 plants, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) is a key enzyme involved in the C4 cycle of photosynthesis. It is responsible for the carboxylation of phosphoenolpyruvate (PEP) and decarboxylation of oxaloacetate (OAA) in a reversible manner. Brown algae are supposed to harbor C4-related enzymes and utilize a C4-like pathway for efficient carbon fixation, but few studies have been reported. Here we examined PEPCKs from five brown macroalgae: *Ectocarpus siliculosus* (*Es*-PEPCK), *Ishige okamurae* (*Io*-PEPCK), *Sargassum horneri* (*Sh*-PEPCK), *Saccharina japonica* (*Sj*-PEPCK), and *Scytosiphon lomentaria* (*Sl*-PEPCK). Based on sequences available in the databases, the 5 genes were synthesized and expressed in *Escherichia coli*. In all cases, soluble proteins were obtained, and the His-tagged recombinant proteins were purified. The specific activities of the five PEPCKs in carboxylation and decarboxylation were measured. All proteins displayed activity, and among the five proteins, *Io*-PEPCK displayed the highest specific activities in both directions. We also investigated the kinetic parameters of these PEPCKs by measuring activity with varying concentrations of each substrate. Our study provides biochemical evidence suggesting that PEPCK functions in brown algae and advances our understanding of C4-like pathways in these organisms.

phosphoenolpyruvate carboxykinase, brown algae, carbon fixation

講演番号：2D5p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D5 会場

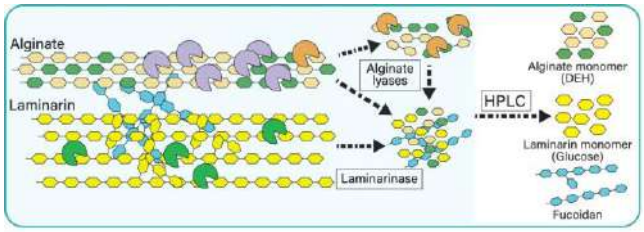
複数の褐藻分解酵素を利用した藻類バイオマスから有用単糖及び天然フコイダン抽出法の確立

Establishment of useful monosaccharides and natural fucoidan extraction method from brown algae using multiple brown algae degrading enzymes

○福井 望天[1]、高須賀 太一[1,2] ([1]北大院農、[2]北大院国際食資源)
○Sora Fukui[1], Taichi Takasuka[1,2] ([1]Hokkaido Univ. Agr., [2]Hokkaido Univ. GFR)

現在、バイオ燃料生産の原料として広く認識されているバイオ燃料作物は、人々の食糧や家畜の飼料としても利用されているため持続可能でない事が問題である。また、難分解性である木材などの未利用バイオマスの利用については、効率的な分解法が確立していないため、依然コストがかかり、実用化が困難である。そこで、植物バイオマスの代わりとなる海洋バイオマス資源での代替を検討した。海洋最大資源である褐藻は主要構成多糖成分としてラミナランやアルギン酸、フコイダンが挙げられる。これらを分解することでグルコースや DEH と呼ばれる希少糖が得られる。また、フコイダンは健康食品成分として注目されているが、未だ天然の不純物を取り除いたフコイダン抽出方法は確立されていない。

本研究では、主要構成多糖であるラミナランとアルギン酸を最小の酵素組み合わせにより低コストかつ高効率的に分解すること（右の図参照）で、バイオマス燃料資源となるグルコースや DEH 及び不純物の無い天然フコイダン抽出方法の確立について紹介したい。



There are ever-increasing demands to produce energy and valuable bioproducts in clean and sustainable ways from renewable plant biomass. The sea contains substantial amounts of various kelps renewal substrate for biorefinery operations alternative to the current terrestrial plant biomass-based refinery concept. These kelps contain three types of non-crystalline polysaccharides, laminarin, alginate, and fucoidan. Laminarin can be converted into D-glucose, and alginate can be hydrolyzed into 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate (DEH), and these simple sugars can be used for biofuels production. In addition, fucoidan is a type of beneficial bioactive polysaccharide found in kelp that may function as an antioxidant and anti-inflammatory substances for human activity.

Therefore, efficient, and low-cost depolymerization of kelps with a minimum number of enzymes is a potential route for biorefinery. In this study, we tried to determine the minimum enzyme set for efficient kelp depolymerization and the candidates of several enzymes have been determined.

kelp degradation, alginate lyase, DEH

発表責任者：福井　望天（fukui.sora.b0@elms.hokudai.ac.jp）

講演番号：2D5p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D5 会場

異なる 2 種の菌株から見出されたアカモクフコイダン低分子化酵素
Studies of enzymes from two different bacterial strains lowering molecular weight of fucoidan from *Sargassum horneri*

○藤田 太洋[1]、川口 紗季[2]、八木 寿梓[2]、鈴木 宏和[2]、大城 隆[2]([1]鳥取大院・持続創生、[2]鳥取大・工)
○Taiyo FUJITA[1], Saki KAWAGUCHI[2], Hisashi YAGI[2], Hirokazu SUZUKI[2], Takashi OHSHIRO[2]
([1]Tottori univ. Grd. Sus. Sci., [2]Tottori univ Dept. Eng.)

当研究室では、種々のフコイダンを分解する酵素に関する研究を行っており、オキナワモズクフコイダン資化性菌として単離された *Luteolibacter algae* H18 からオキナワモズクフコイダン脱硫酸化酵素 Fsut107 を明らかにしている。また H18 株はアカモクフコイダンを単一炭素源で生育可能であり、生育する際フコイダンの脱硫酸化が認められるが、Fsut107 はアカモクフコイダンに対する活性を示さないため、その他の脱硫酸化酵素を持つことが示唆された。そこでアカモクフコイダンを単一炭素源として培養し、無細胞抽出液からアカモクフコイダン脱硫酸化酵素を精製し、2 つの候補タンパク質を得た。このうちの 1 つは脱硫酸化酵素であったが、片方はフコイダンの脱硫酸化に必要な低分子化を担う酵素であることが確認された。一方、H18 株とは異なるオキナワモズクフコイダン資化性菌 *Flavobacterium* sp. SW のゲノム中に、フコイダン低分子化に関わると想定される GH107 に属する酵素遺伝子が見出され、大腸菌で異種生産させたところ、アカモクフコイダンの低分子化活性を有していた。本発表では、異なる 2 種の菌株由来のフコイダン低分子化酵素について発表する。

We have been studying the enzymes that degrade various fucoidans, and revealed that *Luteolibacter algae* H18, which was isolated as a *Cladosiphon okamuranus* fucoidan-utilizing bacterium, has fucoidan sulfatase, Fsut107 acting on the fucoidan of *C. okamuranus*. On the other hand, the strain H18 is capable of growing *Sargassum horneri* fucoidan on a single carbon source, but Fsut107 does not have the activity against *S. hornri* fucoidan. Therefore, we cultured the strain H18 using the fucoidan of *S. horneri* as a single carbon source, purified fucoidan sulfatases from the cell-free extract of the strain H18 and obtained two candidates. One of these enzymes was a sulfatase, while the other was confirmed to be an enzyme responsible for fucoidan degradation, which is necessary for fucoidan desulfonation. In addition, genomic analysis of *Flavobacterium* sp. SW, which was also isolated as a *C. okamuranus* fucoidan-utilizing bacterium, found out that the strain SW has a gene encoding the enzyme belonging to GH107, which may be involved in lowering the molecular weight of fucoidan. The enzyme produced heterogeneously in *Escherichia coli* showed the activity for the fucoidan from *S. horneri.* In this presentation, we will present the fucoidan degradation enzymes obtained from two different strains.

fucoidan, *Sargassum horneri*, fucoidanase

発表責任者：大城隆（ohshiro@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2D5p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D5 会場

ゲノムマイニングで取得した麹菌由来のエンドグルカナーゼに新たに見出されたマンナナーゼ活性について

Mannanase activity newly found in endoglucanases from *Aspergillus oryzae* obtained by genome mining

○渡部 昭[1]、松沢 智彦[2]、氏家 成隆[1]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大院農、[2]香川大農)
○Akira WATANABE[1], Tomohiko MATSUZAWA[2], Seiryu UJIIE[1], Takahiro SHINTANI[1], Katsuya GOMI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kagawa Univ.)

【目的】麹菌は産業上重要な酵素を多数生産することが知られ、酵素資源の宝庫と言われている。しかし、本菌のゲノム上にはセルラーゼをコードすると推定される遺伝子が多数確認されるものの、その発現や遺伝子産物の未解析なものが多く存在している。そこで、我々はこれまでゲノムマイニングの手法でこうした遺伝子の解析を行ってきた。今回は、麹菌発現系で発現させエンドグルカナーゼ活性を保持した酵素であることを以前報告した[1)、2)]EglA が、あらたにマンナナーゼ活性をも有することを見出したので報告する。
【結果】麹菌発現系で発現させた EglA は、カルボキシメチルセルロース、リケナンを分解するβ-1,4-エンドグルカナーゼであることを既に報告した[1)、2)]。さらに本酵素の基質について解析したところ、本酵素はグルコマンナン、ローカストビーンガムにも分解活性を保持していることが新たに判明し、マンナナーゼ活性をも有する酵素であった。その他、新たに解析した本酵素の諸性質を報告する。
１）氏家ら、日本生物工学会 2008 年度大会、２）氏家ら、日本農芸化学会 2009 年度大会

【Purpose】*Aspergillus oryzae* is known to produce a number of industrially important enzymes and is considered to be a reservoir of enzyme resources. However, although many genes encoding cellulases have been identified in the genome of this fungus, their expression and gene products have not yet been analyzed. Therefore, we have been analyzing these genes by using genome mining methods. In this study, we report our new findings that EglA, which we previously reported as an enzyme with endoglucanase activity when expressed in *A. oryzae* [1), 2)], also has mannanase activity.
【Results】We previously reported that EglA expressed in *A. oryzae* is a β-1,4-endoglucanase that degrades carboxymethylcellulose and lichenan[1), 2)]. Further analysis of the substrates of this enzyme revealed that this enzyme also has degrading activity for glucomannan and locust bean gum, suggesting that this enzyme also possesses mannanase activity. Other properties of this enzyme that were newly analyzed are reported.
(1) Ujiie et al., 2008 Annual Meeting of the Japanese Society for Biotechnology
(2) Ujiie et al., 2009 Annual Meeting of the Japanese Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

endoglucanase, *Aspergillus oryzae*, mannanase

講演番号：2D5p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D5 会場

Burkholderia contaminans LK2dm 由来の D-マンノースイソメラーゼの特性評価と *o*-アミノジフェニル酢酸法を用いたイソメラーゼアッセイ

Characterization of D-mannose isomerase derived from *Burkholderia contaminans* LK2dm and isomerase assay using *o*-amino diphenyl-acetic acid method

○篠田 小雪[1]、森本 兼司[1,2] ([1]香川大院農、[2]香川大国際希少糖研究教育機構)
○KOYUKI SHINODA[1], KENJI MORIMOTO[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Kagawa University, [2]International institute of Rare Sugar Research and Education, Kagawa University)

異性化酵素の D-マンノースイソメラーゼ（DMI）は希少糖生産で広く用いられる。これは D-マンノースから D-フルクトースといったアルドース-ケトース間の異性化を触媒する。本研究では、土壌から単離した菌体 *Burkholderia contaminans* LK2dm 株から産出する DMI を特徴付けした。LK2dm 由来 DMI は D-マンノース、D-リキソースに対して反応性を示し、その至適温度、至適pHはそれぞれ 45℃、pH 8.0 であった。
当研究室では、アルドースイソメラーゼの活性測定としてアルドースからケトースへの生産性を測定するシステイン-カルバゾール法を従来用いていた。本研究ではこれに替わり、*o*-アミノジフェニル酢酸法（ADA 法）が活性評価法として適していることを新たに見出したので報告する。ADA 法は、D-フルクトースなどのケトースに比べ、D-マンノースなどのアルドースに対して 2 桁高い検出感度を示した。先の DMI と ADA 法を用いて活性を評価し D-マンノース生産した結果、文献値に近しい酵素活性が得られた。この ADA 法は、希少糖生産のためのアルドースイソメラーゼ活性評価法として適切であると考えられる。

One of the isomerization enzymes for monosaccharide, D-mannose isomerase (DMI), is widely used in rare sugar production. It catalyzes the isomerization between aldose and ketose, such as D-mannose to D-fructose. In this study, we characterized DMI from a soil bacterium, *Burkholderia contaminans* LK2dm. The DMI from LK2dm was active on D-mannose and D-lyxose, and its optimum temperature and pH were 45°C and pH 8.0, respectively. Furthermore, for D-mannose production from D-fructose using DMI, the cysteine-carbazole method, which is generally used to measure aldose to ketose reactivity in aldose isomerase assays, was changed to the *o*-amino diphenyl-acetic acid method (ADA method). ADA method showed two digits higher detection sensitivity for aldoses such as D-mannose, compared with ketoses such as D-fructose. The ADA method was used to evaluate the activity and D-mannose production, resulting the enzyme activity was close to the literature value. This ADA method is considered appropriate as an aldose isomerase activity for evaluation method on rare sugar production.

D-mannose isomerase, *o*-amino diphenyl-acetic acid method, sugar production

発表責任者：森本兼司（morimoto.kenji@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2D5p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 D5 会場

Investigation of region critical for the physical interaction of the yeast dolichyl-phosphate glucosyltransferase Alg5p

○Samantha SAMANTHA, Tetsuo TAKAHASHI (Tokai University)

In the dolichol cycle, the yeast dolichyl-phosphate (Dol-P) beta-glucosyltransferase (Alg5p) plays a role in supplying glucose residues to the three glucosyltransferases within the lumen of the rough endoplasmic reticulum (rER) by synthesizing dolichyl-phosphate beta-D-glucose (DPG) from Dol-P and UDP-alpha-D-glucose (UDP-Glc). The previous study using the yeast split-ubiquitin system revealed the interactions of the full length Alg5p with each of the four enzymes related in the cycle: Dol-P beta-mannosyltransferase (Dpm1p), dolichol kinase (Sec59p), dolichyldiphosphatase (Cwh8p), and Dol-P *N*-acetylglucosaminylphosphotransferase (Alg7p).

In this study, we further investigated the interactions of Alg5p with Dpm1p, Sec59p, Cwh8p, or Alg7p, each of which was tagged on the head or tail end as a prey construct. Truncated bait constructs of *C*-terminally tagged Alg5p, pBT-C-Alg5HR3 and pBT-C-Alg5LR3, were used to determine whether they would interact with these four prey enzymes. The co-transformants with the bait and each prey obtained on the synthetic dextrose (SD) medium lacking leucine and tryptophan (SD-LW) were then subject to the growth examination on SD medium lacking leucine, tryptophan, and histidine (SD-LWH) and SD medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine (SD-LWHA).

In the growth examination on selective media, there was no growth of co-transformants with the pBT-C-Alg5HR3 or pBT-C-Alg5LR3 bait and *N*-terminally tagged pPR-N-ALG7 prey. This result suggested that *N*-terminus of Alg7p specifically interacts with *C*-terminus of full-length Alg5p, and that the *C*-terminal loop region (LR4) of Alg5p is important for the interaction with Alg7p. To confirm this result, a similar analysis using *C*-terminally tagged pPR-STE-ALG7 prey is under investigation.

Meanwhile, the growth of co-transformants with pBT-C-Alg5HR3 or pBT-C-Alg5LR3 bait and *C*-terminally tagged prey (pPR-C-CWH8 and pPR-C-SEC59) was absent. In contrast, the growth of co-transformants with each of the other *N*-terminally tagged preys (pPR-N-DPM1, pPR-N-SEC59 and pPR-N-CWH8) was maintained. These observations respectively suggested that the *C*-termini of Cwh8p and Sec59p specifically interact with *C*-terminus of full-length Alg5p and that *C*-terminus of Alg5p is not necessary to interact with the *N*-termini of Dpm1p, Cwh8p and Sec59p.

Consequently, we are refining the interaction regions within Alg5p using a more truncated bait construct of Alg5p, pBT-C-Alg5HR2. Results of this analysis will also be presented and discussed in this lecture.

dolichol-P-glucose synthase, membrane topology, physical interaction

講演番号：2D5p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 D5 会場

酵母ドリコールキナーゼ Sec59p に関する物理的相互作用の解析

Analyses of the physical interactions of the yeast dolichol kinase Sec59p

○高橋 哲夫、栗原 航希（東海大工生物工学）
○Tetsuo Takahashi, Koki Kurihara (Tokai Univ.)

真核細胞の *N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)の生合成経路において、酵母ドリコールキナーゼ Sec59p は、粗面小胞体膜の細胞質側でドリコールの CTP 依存的リン酸化を触媒し、ドリコールリン酸(Dol-P)を産生する。本酵素により生合成された Dol-P は、当経路において GlcNAc-1-P 転移酵素 Alg7p・Dol-P-Man 合成酵素 Dpm1p・Dol-P-Glc 合成酵素 Alg5p に基質として直接利用されている。我々は、酵母 *SEC59* 遺伝子を酵母 split-ubiquitin システム用ベクターにクローニングし、Sec59p の物理的相互作用について解析を行っている。これまでの結果では、本酵素の両末端の細胞質側への配向と本酵素同士の物理的相互作用が検出された。現在は解析をさらに進め、Alg7p・Dpm1p・Alg5p との物理的相互作用の検証や、本酵素同士の物理的相互作用に重要な領域の限定を試みている。

酵母 Sec59p のオーソログであるヒトドリコールキナーゼ(hDK)を対象とした酵母 split-ubiquitin システムによる物理的相互作用の解析から、我々は hDK 同士の相互作用には、hDK の第 4 疎水性領域(HR4)付近が重要であることを見出した(日本農芸化学会 2015 年度大会)。そこで、Sec59p の *C* 末端から第 5 ループ領域(LR5)までを欠失した pBT-N-SEC59/HR4 と *C* 末端から HR4 までを欠失した pBT-N-SEC59/LR4 の 2 つのベイトコンストラクトを調製し、Sec59p 全長のプレイコンストラクト pPR-N-SCE59 と組み合わせて酵母形質転換を行った。そして得られたベイト/プレイ共発現株について、相互作用検出用の SD-LHWSD-LWHA 培地および SD-LWHA 培地での増殖性試験を行った。今回はその結果を中心に報告する予定である。

In the biosynthetic pathway of the dolichol-linked oligosaccharide (DLO) in the eukaryotic cell, the *Saccharomyces cerevisiae* Sec59p catalyzes the CTP-mediated phosphorylation of the dolichol, yielding the dolichol-phosphate (Dol-P), which is in turn utilized by Alg7p (GlcNac-1-P transferase), Dpm1p (Dol-P-mannose synthase) and Alg5p (Dol-P-glucose synthase) as a substrate. We cloned yeast *SEC59* gene into the vectors for the yeast split-ubiquitin system, and have been investigating the physical interaction of Sec59p. Our recent results indicated that Both *N*- and *C*- termini of Sec59p is oriented toward the cytoplasmic side on the rough ER membrane and that it physically interacts with itself. In this study, we tried to refine the region critical for the self-interaction of Sec59p. The two truncated version of the bait constructs, pBT-N-SEC59/HR4 and pBT-N-SEC59/LR4 were combined with the full-length prey construct pPR-N-SEC59, and the yeast NMY51 cells were co-transformed. Co-transformants were then subjected to the growth examination on the selective media. Results of the analysis will be presented and discussed in this lecture.

split-ubiquitin system, dolichol kinase, physical interaction

講演番号：2D6a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D6 会場

オスマウスの尿中のフェロモンとその受容体および神経回路に関する研究

Studies on pheromones in urine of male mice and their receptors and neural circuits

○村田 健[1]、板倉 拓海[2]、東原 和成[1] ([1]東大院農、[2]カリフォルニア工科大学)
○Ken MURATA[1], Takumi ITAKURA[2], Kazushige TOUHARA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Caltech)

多くの動物において、個体間の化学シグナル（フェロモン）による行動や生理の制御が見られる。マウスにおいて、オスの尿に含まれるフェロモンが、オス間の攻撃行動や、メスの繁殖機能を促進する現象は古くから知られているが、そのフェロモンのリガンドと受容体のペアは不明であった。そこで、系統に関係なくオスが特異的に分泌するフェロモンとその受容体の同定を試みた。ヒト以外の多くの動物は鋤鼻系と呼ばれる嗅覚系を有しており、GPCR ファミリーに属する鋤鼻受容体がフェロモンを受容すると考えられていた。そこで、組織化学的手法を用いて、オス尿に特異的に応答する鋤鼻受容体を同定した。その受容体活性のあるオス尿の精製画分は、オス間の攻撃行動を促進し、メスの生殖中枢を刺激する効果が認められた。さらに、その受容体のノックアウトマウスでは、それらの効果が認められなくなった。このリガンド分子は新奇成分であることが示唆され、現在同定を進めている。

Pheromones are chemical signals that regulate behavior and physiology in many animals. In mice, male urine contains pheromones that trigger aggression among males and induce reproductive readiness in females, but the exact molecules and their corresponding receptors responsible for these effects have remained unidentified. It has been thought that many animals, except humans, possess an olfactory system called the vomeronasal system, and that vomeronasal receptors (VRs), which belong to the GPCR family, are responsible for detecting pheromones. Using histochemical methods, a VR that specifically responds to male urine was identified. Purified fraction of male urine, which activated the VR, was found to enhance inter-male aggression, and stimulate the reproductive center in females. Furthermore, these effects were not observed in knockout mice of the VR. The ligand of the VR appears to be a previously unknown compound, and efforts to identify it are ongoing.

phermone, vomeronasal receptor, mouse

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D6 会場

子マウス尿に応答する鋤鼻受容体の同定と子殺し行動における機能解析
Identification of vomeronasal receptors responsive to mouse pup urine and analysis of their function in infanticide

○神戸 朱琉[1]、村田 健[1]、板倉 拓海[2]、東原 和成[1] ([1]東大院農、[2]カリフォルニア工科大学)
○Akari KAMBE[1], Ken MURATA[1], Takumi ITAKURA[2], Kazushige TOUHARA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Caltech)

【背景・目的】マウスを含む多くの動物は、同種の他個体から発せられる化学物質を嗅覚系により受容することで、相手の性別や成長段階を識別し、適切な社会行動をする。マウスの嗅覚系は主嗅覚系と鋤鼻系の 2 種類が存在し、これまで性行動や攻撃行動の制御に関わる鋤鼻受容体が複数同定されてきた。しかし、子マウス由来の物質を受容し、子に対する行動の制御に関わる鋤鼻受容体の機能解析は進んでいない。本研究では、子マウス尿に応答する鋤鼻受容体を同定し、それらの受容体を介した感覚入力が性経験のない雄の子殺し行動を制御するメカニズムを解析した。
【方法】子マウス尿に応答する鋤鼻受容体を、神経活動マーカーの免疫染色と鋤鼻受容体 mRNA の *in situ* Hybridization により探索した。子マウス尿への応答がみられた鋤鼻受容体の遺伝子を欠損させたマウスの行動解析により、子殺し行動における当該受容体群の機能を検証した。さらに、子マウス尿より精製した当該受容体群を活性化させる画分により、子殺し行動が誘起されるかを検証した。
【結果】複数系統の子マウス尿に応答する鋤鼻受容体群が同定された。さらに、ノックアウトマウスの解析により、当該受容体群を介した感覚入力が子殺し行動を制御することが示唆された。また、当該受容体を活性化する精製画分により、性経験のない雄の子殺し行動が誘起されることが示唆された。

Many animals detect chemicals released by other conspecifics via the olfactory system, which is essential for mediating appropriate social behavior. In mice, there are two types of the olfactory system, the main olfactory system and the vomeronasal system. Several vomeronasal receptors (VRs) involved in the regulation of sexual behavior and intermale aggression were identified. However, functional analysis of the VRs, which are involved in the regulation of behavior toward pups by detecting pup-derived chemicals, has not progressed. In this study, we identified VRs that respond to pup urine and analyzed the mechanism by which sensory input via these VRs regulates infanticide in virgin males.

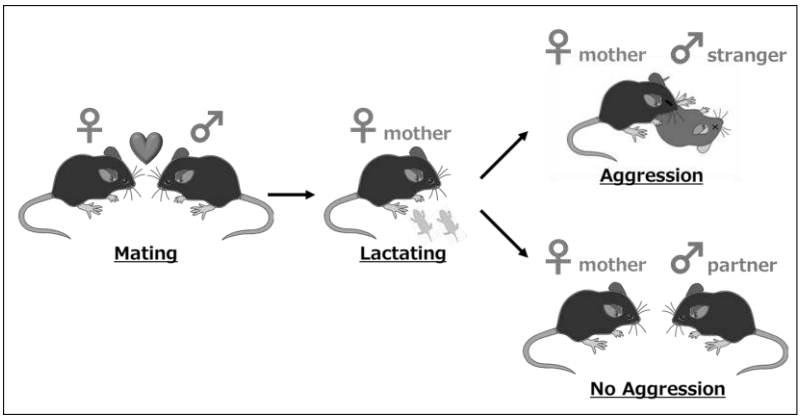
Firstly, we identified several VRs that respond to pup urine of several strains. Behavioral analysis of knockout mice of these VRs suggested that sensory input via these VRs regulates infanticide. Furthermore, we prepared a purified fraction of pup urine that exclusively activates these VRs and examined whether the active fraction induced infanticide. Consequently, it is also suggested that the urinary fraction activating these VRs induces infanticide in virgin males.

Social behavior, Infanticide, Vomeronasal system

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D6 会場

パートナー系統に着目した母マウスの攻撃行動の研究
Memory of mating partner strain and maternal aggression in mice
○齊藤 航介[1]、板倉 拓海[1]、村田 健[1]、金子 武人[2]、東原 和成[1] ([1]東大院農、[2]岩手大院理工)
○ Kosuke SAITO[1], Takumi ITAKURA[1], Ken MURATA[1], Takehito KANEKO[2], Kazushige TOUHARA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Iwate Univ.)



社会性動物において、「夫婦」は社会を構成する重要な関係性の１つである。特に父母がともに養育を行う動物において夫婦の結びつきは強く、効率的に子孫を残すためにパートナーを他個体と区別して記憶し、識別していると考えられる。マウスは社会行動研究における代表的なモデル動物の１種で、夫婦で養育を行う。しかし、夫婦間で明確にパートナーを識別する現象がマウスでは報告されていなかったため、夫婦間の社会行動に関する研究は進んでこなかった。

そこで我々は、母マウスが子を守るために、縄張りへの侵入者であるオスへ行う攻撃行動に着目し、「どの系統のオスをパートナーにしても、パートナー系統のオスに対しては攻撃が生じない」という現象を発見した。現在我々は、このパートナー系統のオスに対する母マウスの記憶が、「いつ」「どうやって」形成されるのかについて研究を進めている。

The pair is one of the social relationships that play an important role in community organization. The pair bond is particularly important in biparental animals because it allows for efficient care of offspring. It is thought that biparental animals memorize characteristics of their mating partners in order to distinguish them from others. Among the biparental species, mice have long been the focus of social behavior research, but no study has shown clear evidence for the existence of partner discrimination in mice.

To determine whether partner discrimination exists in mice, we focused on the social behavior known as maternal aggression, in which mother mice attack male intruders to protect their pups. We found that mother mice behaviorally discriminate between males of their partner strain and males of other strains. Now we are studying “when” and “how” the memories of the mother mice about males of their partner strain are formed.

mice, mother, aggression

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D6 会場

必須アミノ酸トリプトファンによる記憶増強効果とそのメカニズムの解析

Understanding mechanisms underlying the enhancement of memory formation and retrieval by essential amino acid tryptophan.

○杉山 奏美、川嶋 珠生、谷水 俊之、喜田 聡（東京大学大学院　農学生命科学研究科　応用生命化学専攻）
○Kanami Sugiyama, Tamau Kawashima, Toshiyuki Tanimizu, Satoshi Kida (Division of Applied Biological Chemistry , Graduate School of Agricultural and Life Sciences , The University of Tokyo)

トリプトファン（Trp）は脳において睡眠、摂食、情動、学習・記憶などの認知機能等を制御する神経伝達物質セロトニンに変換される。一方、記憶は神経細胞における転写因子 CREB を介する新規遺伝子発現により固定化されて安定な長期記憶形成となり、必要に応じて想起される。我々を含めて長期的な Trp 摂取制限や欠乏は学習と記憶に障害をもたらすことが報告されているが、Trp 単回投与が記憶制御プロセス群に与える効果は不明であった。我々は Trp 投与による記憶増強効果を解析し、さらに、その効果のメカニズムを解明することを目指している。昨年度の本大会において社会認知記憶課題を用いた解析から、この課題における学習（トレーニング）前および想起（テスト）前の Trp（150mg/kg）腹腔内投与が記憶形成および想起の向上を導くことを報告した。本年度は、Trp の記憶増強効果とそのメカニズムについてさらに解析を進めた結果を報告する。社会認知記憶課題における想起テストの１、２、４時間前の Trp（150mg/kg）腹腔内投与により記憶想起の向上が観察された。また、トレーニング２．５時間前の飲水による Trp 経口投与によっても、記憶形成の向上が観察された。さらに、Trp による記憶増強機構を解析するため、免疫組織化学染色法を用いて CREB の標的遺伝子であり神経活動依存的に発現誘導される c-Fos 発現を測定し、Trp 投与後に神経活動遺伝子発現が増加する脳領域を網羅的に同定した。その結果、扁桃体 BLA 領域、前頭前野 PL 領域、前頭前野 IL 領域、前帯状皮質 ACC 領域において、Trp 投与後の社会記憶形成時に神経活動依存的な遺伝子発現が誘導されることが示され、Trp はこれらの脳領域に作用して記憶形成を向上させることが示唆された。

Tryptophan (Trp), an essential amino acid, is converted in the brain to serotonin, a neurotransmitter that controls sleep, eating, emotions, and cognitive functions. The purpose of our study is to understand the effect of Trp on memory function and its mechanism. We found that (1) systemic administration of Trp improves the formation and retrieval of social recognition memory, (2) Trp administration induces c-fos expression, the maker of activity-dependent transcription activation, in the basolateral amygdala, medial prefrontal cortex (mPFC), and the anterior cingulate cortex when social recognition memory is formed. Our findings suggest that tryptophan administration improves memory formation by targeting multiple brain regions.

tryptophan, social memory, serotonin

講演番号：2D6a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D6 会場

マウス食傷モデルの開発

Development of a mouse model of being sick and tired of eating palatable food

○平 裕太郎、喜田 聡（東大院農）
○YUTARO TAIRA, SATOSI KIDA (The Univ. of Tokyo)

嗜好性が高くとも同じ食物を長期間摂食すると食傷する。この過程で、その食物に対する嗜好性、すなわち、食物価値が低下するものと考えられるが、食傷の生物学的メカニズムは明らかになっていない。本研究では、食物価値の高い食物に対するマウス食傷モデルを開発し、食傷する神経メカニズムを解明することを目的とした。当研究室の解析からマウスにおいて食物価値が高い食物と判定されたスイートチョコレートをマウスに長期間(2 日間)あるいは短期間（２時間）摂食させた後のスイートチョコレートの摂食量を測定して食傷様行動が認められるかを解析した。チョコレートを自由摂食させた馴化後にチョコレートと通常餌（CA-1）を 50 時間（長期群）あるいは２時間（短期群）与えた群、一方、馴化期間を設けずにチョコレートを 2 時間与えた無馴化短期群を設け、チョコレートの摂食量を測定した（テスト１; 長期群の場合、最後の２時間の摂食量を測定した)。その後２時間絶食させた後に、再び 30 分間チョコレートと通常食を与え（テスト 2)、摂食量を比較した。その結果、テスト１では、無馴化短期群と短期群の間で通常食摂取量に差は観察されなかったが、無馴化短期群のチョコレートの摂食量が短期群よりも有意に低く、馴化期間により短期群ではチョコレートに対する新奇性恐怖が減弱していることが示唆された。興味深いことに、テスト 2 では、長期群と短期群の間で通常食では差は観察されなかったが、長期群では短期群よりもチョコレートの摂食量が有意に低く、長期群には食傷様行動が生じることが示唆された。以上より、馴化により新奇性恐怖を減弱させた条件下において、長期摂食により、マウスが高い嗜好性を示すチョコレートであろうとも、食傷が起こる可能性が示された。

The purpose of the study was to develop a mouse model in which mice exhibit being sick and tired of eating palatable food and the preferred food is devaluated following long-term feeding, using chocolate that mice prefer compared to normal chow. We found that mice that habituated to feeding chocolate and then fed chocolate longer fed significantly less chocolate compared to feeding chocolate shorter. Our observations suggest that being tired of eating chocolate was observed following long-term feeding of chocolate even though chocolate is preferred.

being sick and tired of eating palatable food, mouse model, habituated to feeding

発表責任者：平　裕太郎（ta6tamyou315@icloud.com）

講演番号：2D6a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D6 会場

排卵期女性の匂いは男性に対してポジティブな心理生理効果を有する

Human ovulatory phase-predominant odors cause positive psychological and physiological effects in males

○白須 未香[1]、大木 望[1]、小倉 由資[1]、平澤 佑啓[1]、岡本 雅子[1]、川村 理恵子[1]、滝川 浩郷[1]、東原 和成[1,2] ([1]東大院農、[2]東大 WPI-IRCN)
○Mika SHIRASU[1], Nozomi OHGI[1], Yusuke OGURA[1], Yukei HIRASAWA[1], Masako OKAMOTO[1], Rieko KAWAMURA[1], Hirosato TAKIKAWA[1], Kazushige TOUHARA[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]The Univ. of Tokyo WPI-IRCN)

多くの動物種において、嗅覚シグナルは種内間コミュニケーションにおける重要な役割を果たしており、個体が同種の動物を識別し、性別、親族関係、繁殖状態を認識することを可能にしている。ヒトにおいても、受胎の可能性が最も高い排卵期の女性の腋臭に男性が快さを感じるという研究が複数報告され、排卵期女性の匂いが男性にとって魅力的なシグナルとして機能している可能性が示されている。しかし、その分子的・生理的基盤は未だ解明されていない。本研究では、官能評価とガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）を用いた化学分析を組み合わせ、月経周期の各時期で増加する揮発性化合物（匂い成分）を同定した。さらに、排卵期に有意に増加する 3 種類の匂い成分が、男性にとって心地よい匂いであると共に、不快な匂いと評されるモデル腋臭に混ぜることでその不快さが軽減することも示された。これらの結果は、排卵期女性の腋臭が男性にとって快いものであるという過去の漠然とした知見に確かな物質レベルのエビデンスを与えるものであり、かつ、ヒトの異性間コミュニケーションにおける嗅覚の役割の重要性を支持するものといえる。

In many animals, olfactory cues play an important role in intra-species communication, allowing individuals to distinguish between conspecifics and to recognize their sex, kinship, and reproductive status. In humans, it has been suggested that males feel attractive to female body odors during the ovulatory phase of the menstrual cycle when fertility is high. However, the molecular and physiological bases for the attractiveness have not yet been elucidated. In this study, we combined sensory evaluation with chemical analysis using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and identified the volatile compounds that were predominant in each phase of the menstrual cycle. We identified three ovulatory phase-predominant compounds that appeared to suppress the malodor caused by the basal unpleasant axillary odor, resulting in ovulatory-phase body odor quality being the most pleasant for males during the female menstrual cycle. The ovulatory-phase predominant body odors appear to cause positive psychological and physiological effects and might enhance male-female interaction, shedding light on a previously unappreciated role of olfaction in human intersexual communication.

odor, GC/MS, ovulation

発表責任者：東原和成（ktouhara @g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D6 会場

言葉ラベルが香り知覚と一次嗅覚野の活動に及ぼす影響
Influence of word labels on odor perception and activation patterns in the primary olfactory cortex
○岡本 雅子[1]、奥村 俊樹[2]、黄田 育宏[2,3]、横井 惇[2,3]、中井 智也[2]、西本 伸志[2,3]、東原 和成[1] ([1]東大院農、[2]情報通信研究機構、[3]大阪大学)
○Masako OKAMOTO[1], Toshiki Okumura[2], Ikuhiro Kida[2,3], Atsushi Yokoi[2,3], Tomoya Nakai[2], Shinji Nishimoto[2,3], Kazushige Touhara[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]NICT, [3]The Univ. of Osaka)

香りは食品や各種ケア用品など、日常接する物の嗜好性を決める重要な要素である。香りの知覚は、脳の一次嗅覚野、特に梨状皮質においてコードされると考えられている。一方、香りの感じ方は、香り源の見た目や、その香りを何と思って嗅ぐかなど、香気物質以外の付加情報にも影響を受ける。しかし、そうした付加情報が、梨状皮質における香りの情報表現に影響するのかどうかは検証されていなかった。そこで、本研究では、同一の香気物質を異なる言葉を見ながら嗅いだ際に、梨状皮質の活動が異なるかを検証した。4 種類の香気物質を、各 2 種類の言葉と同時に呈示し、主観評定値を得たところ、言語が同一の香気物質に対する知覚を変化させることが確認された（N＝20)。次に、 言葉を見ながら香りを嗅いでいる際の梨状皮質の活動を、7 テスラ超高磁場装置による機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いて計測し、機械学習を用いて解析した。その結果、同一の香気物質に対する梨状皮質の活動パターンから、言葉の違いをチャンスレベルよりも有意に高い精度で判別できた (N=25)。また機能結合の解析から、梨状皮質が側頭極、海馬、言語野などの領域と相関して活動していることが明らかになった。これらの結果から、同一の香気物質に対する梨状皮質の脳活動パターンが、意味や記憶に関連する領域からのフィードバックにより変化することが示唆された。

The current study investigated influence of word labels on the neural representation of odors within the piriform cortex, a part of the primary olfactory cortex. Using ultra-high field (7T) functional magnetic resonance imaging (fMRI), the activity of the piriform cortex was measured while participants sniffed four distinct odors, each paired with two different words. Sensory evaluation of these odors revealed that the perception of identical odors varied depending on the accompanying words (N=20). The analysis of fMRI data (N=25) showed that piriform responses to identical odors paired with different words can be classified using machine learning techniques, indicating that the neural representation of odors in the piriform cortex is influenced by words. Furthermore, functional connectivity analysis revealed correlation between the activities of piriform cortex and regions associated with semantic and memory processing, suggesting that feedback from these regions may contribute to moderation of piriform activity for identical odors.

human olfaction, ultra-high field fMRI, piriform cortex

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D6 会場

脳波を用いた、ヒトの脳における匂い情報処理の時空間ダイナミクスの解明

Spatiotemporal dynamics of odor representations in the human brain revealed by EEG decoding

○加藤 麦彦、東原 和成、岡本 雅子（東大院農）
○Mugihiko KATO, Kazushige Touhara, Masako Okamoto (The Univ. of Tokyo)

ヒトは日常生活において多様な匂いを知覚するが、脳内でその匂い知覚の神経表象が生じる時空間ダイナミクスには不明な点が多い。そこで本研究では、10 種類の多様な匂いに対する脳波を計測し、知覚との関連を検証した。まず、脳波から呈示されていた匂いを予測するデコーディング解析を行ったところ、匂い呈示後 100 ミリ秒という早い潜時において、すでに脳に個々の匂いの違いがコードされていることが示唆された。表象類似度解析により、脳における匂いの表象と知覚の関係を検証したところ、匂いの不快さの表象が、快さや質（果物らしい、花らしい、など）の表象に比べて早い潜時で生じており、最も知覚と類似した神経表象が生じるのは匂い呈示後約 600 ミリ秒であることが分かった。また、信号源推定を行ったところ、早い潜時では匂いの情報は一次嗅覚野付近の限局した領域で表象されている一方、遅い潜時では感情、意味処理、記憶などに関わるとされる広範な脳領域がその表象に関わっていることが示唆された。これらの結果により、一次嗅覚野で表象される初期の匂い情報が、その後数百ミリ秒の間に広範な脳領域に広がり、知覚の表象が生じる過程を明らかにすることができた。

Humans can perceive various odors, from pleasurable floral ones to sickening ones. While involvement of multiple brain regions in such perceptual representations has been suggested, their spatiotemporal dynamics are still poorly understood. Here we studied how olfactory perception unfolds over time by recording EEG responses for 10 odors with diverse perceptual qualities. EEG signal allowed the prediction of the presented odor from 100 ms after odor onset. Representational similarity analysis revealed that neural representation underlying unpleasantness started earlier than that underlying pleasantness and perceived quality and evolved into a structure closest to the perception around 600 ms after odor onset. A source estimation showed that brain regions representing odor information started with localized areas in the primary olfactory area at 100 ms, and then spread to larger areas associated with emotional, semantic, and memory processing (≥600 ms). These findings indicate that, at the early latencies, initial odor information is coded in the primary olfactory area, and then, it evolves into their perceptual realizations through dynamic computations in widely distributed cortical regions.

olfaction, perception, electroencephalography

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D6 会場

食物価値の社会伝達による食物新奇性恐怖の減弱と空腹感の誘導

Decreased food neophobia and induced hunger by the social transmission of food valence

○岡山 龍人、喜田 聡（東大院農）
○Ryuto OKAYAMA, Satoshi KIDA (The Univ. of Tokyo)

摂食はエネルギーと栄養成分の生理的必要性に応じて代謝制御を受けるが、食品に対する嗜好性、すなわち、食物価値に応じた認知制御も受けている。重要な点として、食物価値は摂食経験依存的に柔軟に変化し得る。現在、摂食行動の代謝制御機構の解明は著しく進展しているが、食物価値による認知食行動制御機構の解明は進んでいない。マウスからヒトに至る高等動物は他個体との社会行動や社会観察を通して行動変容する能力を有していることに着目し、本研究では、マウスにおいて社会行動や社会観察を介して食物価値を伝達する摂食行動変容課題の確立を試みた。チーズの摂食経験があり、絶食させたマウスにチーズあるいは通常餌を 30 分間摂食させた（Demonstrator)。また、この間食物を与えなかった群も設けた。その後、チーズの摂食経験がないものの、絶食させたマウス（Observer）と 3 群の Demonstrator をそれぞれ 30 分間同じケージに入れ(Social interaction)、その後、Observer にチーズを 10 分間提示してその摂食量を計測した(Test; Cheese 群、Normal food 群、No food 群)。その結果、Cheese 群では他の 2 群と比べて Test 中のチーズ摂食量とチーズを噛んだ回数が有意に多かった。また、Social interaction 中に Cheese 群では他の 2 群より、Observer が鼻先を Demonstrator の口付近に接触する時間（息を嗅ぐ時間）が長かった。重要な点として、Demonstrator と Observer のチーズ摂食量は正に相関した。以上の結果から、チーズを摂食したマウスと社会行動したマウスでは初経験であるもののチーズの摂食量が増加すること、すなわち、社会伝達によってチーズに対する食物新奇性恐怖が減衰することが示唆された。次に、チーズ摂食を経験済みのマウスに、他のマウスがチーズを摂食する様子（摂食観察群)あるいはチーズ(餌観察群)を 10 分間観察させて、その後チーズを 1 分間提示し、摂食量を計測した(Test)。一方、対照群には空き部屋を 10 分間観察させた。その結果、摂食観察群と餌観察群では対照群より Test におけるチーズ摂食量が増加した。従って、他個体がチーズを摂食する様子、あるいは、チーズを観察することでチーズに対する空腹感が生じることが示唆された。

Food valence changes in a feeding experience-dependent manner. Importantly, food valence is transmitted through social interaction. The purpose of this study is to establish mouse models to change food valence through social interaction. We found that (1) food neophobia, the phenomenon of avoiding the ingestion of novel foods, is attenuated by social interaction with other mice that are fed cheese just before the interaction, and that (2) sensory-specific hunger-like behaviors are induced through observation that other mice feed cheese or observation of cheese.

food neophobia, induced hunger, social transmission

講演番号：2D6a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D6 会場

条件付け場所嗜好性課題を応用した嗜好性の高い食物摂食によるポジティブ情動産生機構の解析
Understanding mechanisms for the generation of positive emotion by feeding palatable food using conditioning place preference test
○若山 直希、桑鶴 良文、喜田 聡（東大院農）
○Naoki WAKAYAMA, Yoshifumi KUWATSURU, Satoshi KIDA (the Univ. of Tokyo)

嗜好性の高い食物の摂食は快（ポジティブ）情動を産生させ、一方、低嗜好性の食物摂食は不快（ネガティブ）情動を産生する。一方、摂食行動はエネルギーの要求性に基づく代謝制御と食経験に基づく認知制御を受けている。情動産生を伴う食経験の記憶（食記憶）により食行動が認知制御されていると考えられるが、食記憶と情動産生を関連づける神経基盤は明らかになっていない。一方、条件づけ場所嗜好性課題（conditioning place preference test; CPP test）は快情動を産生する薬物依存を評価するために使われるか記憶課題である。本研究では、食記憶とポジティブ情動を関連づける神経メカニズムの解明を目的として、CPP test を応用して嗜好性の高い食物摂取経験の記憶によるポジティブ情動産生機構の解析を試みている。白箱と黒箱が連結して自由に往来できる装置内をマウスに 20 分間自由探索させることで装置に馴化させると共に、白箱と黒箱における滞在時間も測定して二つの箱に対する場所嗜好性を評価した（馴化）。続いて、往来できない状態で白箱と黒箱にそれぞれ 1 日 20 分間、計 8 日間滞在させて、白箱では食嗜好性が高いチーズを提示し、黒箱では通常飼育餌（CA-1）を提示するか、食物を与えなかった（条件づけ）。また、対照群として両箱で食物を与えない群、白箱でのみ通常食を与える群も設けた。条件づけ後、装置内を 20 分間自由に往来させて白箱と黒箱における滞在時間を測定し、馴化時に対して場所の嗜好性の変化を観察した。その結果、白箱でチーズを与えた 2 群の白箱滞在時間が、他の 2 群に比べて有意に上昇した。以上の結果から、チーズを摂食できる白箱に対する嗜好性が増加したこと、すなわち、チーズ摂食による快情動と白箱が結び付けられた場所嗜好性記憶（CPP 記憶）が形成されたことが示唆された。現在、この解析系を用いて神経活動依存的に発現誘導される c-Fos タンパク質の発現量を指標にして CPP 記憶形成に必要とされる脳領域の探索を行っている。

Eating preferred food (high-valued food) generates positive emotions. On the other hand, feeding behaviors are influenced by the memory of feeding food (food memory) that is associated with emotion. The purpose of our study is to understand the mechanisms for the association of food memory with positive emotion in mice. To do this, we first established the conditioned place preference (CPP) test using cheese (high-valued food) as an unconditioned stimulus and found that mice significantly preferred the place where mice ate cheese, suggesting that mice generate CPP memory and feeding cheese generates positive emotion. We are now trying to identify brain regions that generate and store CPP memory by measuring neural activity-dependent gene expression.

high-valued food, positive emotion

講演番号：2D6a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 D6 会場

環境エンリッチメントによる 3q29 領域欠失導入マウスの精神疾患様行動の回復

Environmental enrichment rescues psychiatric-disorder-related behaviors in a mouse model of 3q29 deletion syndrome.

○秋本 祐弥[1,2]、福島 穂高[2]、三浦 大樹[2]、橋本 均[3,4,5,6,7,8]、橋本 亮太[8]、中澤 敬信[2,8]([1]WDB 株式会社エウレカ社、[2]東農大生命、[3]阪大院薬、[4]阪大院連合小児子どものこころセ、[5]阪大院データビリティフロンティア機構、[6]阪大先導的学際研究機構、[7]阪大院医、[8]国立精神神経医療研究セ精神疾患病態研)

○Yuya AKIMOTO[1,2], Hotaka FUKUSHIMA[2], DAIKI MIURA[2], Hitoshi Hashimoto[3,4,5,6,7,8], Ryota Hashimoto[8], Takanobu NAKAZAWA[2,8] ([1]WDB Co., Ltd., EUREKA Co., [2]Dept. Life Sci., Tokyo Univ. Agr., [3]Grad. Sch. Pharmaceut. Sci., Osaka Univ., [4]United Grad. Sch. Child Dev., Osaka Univ., [5]Div. Biosci., Inst. Datability Sci., Osaka Univ., [6]Transdimensional Life Imaging Div., Inst. Open Transdiscip. Res. Initiatives, Osaka Univ., [7]Grad. Sch. Med., Osaka Univ., [8]Dept. Pathology of Mental Diseases, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry)

自閉スペクトラム症（ASD）発症の分子メカニズムは不明な点が多く残されているが、脳神経系の発達異常が主な原因の一つとして考えられている。ヒト染色体 3q29 領域欠失は ASD などの精神疾患と強く関連することが示唆されているが、その分子病態は不明である。我々は、ヒト染色体 3q29 領域と相同の領域に欠失を導入した疾患モデルマウス（3q29 欠失マウス）を作成し、成体期において ASD 様症状を示すことを報告している。本研究では、生後初期における脳機能発達の異常を明らかにするために、マウスの社会性行動の一つである超音波発声（USV）試験を実施した結果、3q29 欠失マウスは、USV の call 数が有意に少ないことが明らかになった。また、遺伝子発現解析を実施した結果、3q29 欠失マウスは最初期遺伝子群の発現量が高く、神経活動が過剰になっていることが示唆された。次に脳機能を改善させることが報告されている環境エンリッチメント（EE）を妊娠期の母マウスに施したところ、その胎児である 3q29 欠失マウスの生後初期における USV の異常が改善されることが明らかになった。今後、本研究をさらに推進することにより、ASD の分子病態解明のための重要な知見が得られることが期待される。

Although the molecular and cellular pathogenesis underlying the development of autism spectrum disorder (ASD) remain largely unknown, abnormalities in the central nervous system development are thought to be one of the main causes of this disease. Recent studies have suggested that 3q29 microdeletion, a rare copy number variant, is strongly associated with psychiatric disorders such as ASD, but its molecular and cellular pathogenesis is largely unclear. We have generated a mouse model of psychiatric disorders by introducing a deletion in a region homologous to the human chromosome 3q29 region (3q29 mouse) and reported that the mouse exhibits ASD-like symptoms in adulthood. In this study, we examined ultrasonic vocalization (USV), one of social behaviors of mice, in 3q29 pups to clarify abnormalities in brain function during the early postnatal period and found that 3q29 pups showed significantly decreased USV call number. Gene expression analysis revealed that the expression levels of immediate-early genes were significantly increased in 3q29 pups, suggesting that neural activity was increased, which may underlie the impaired USV in 3q29 pups. Then we applied environmental enrichment (EE), which is reported to improve brain functions, to pregnant mother mice and found that newborn 3q29 pups born from mother mice subjected to EE, showed improved USV abnormalities in the early postnatal period. Further research on the molecular and cellular mechanisms of the impaired USV and the positive effect of EE on the impaired USV provides important insights into the molecular and cellular pathogenesis of ASD

Neuroscience, Environmental enrichment, Ultrasonic vocalization

講演番号：2D6a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 D6 会場

条件づけ味覚嗜好学習によって苦味溶液に対する嗜好性の人為的向上

Increased preference for bitter taste solution by nicotine-conditioned taste preference learning

○高橋 明日香、劉 牧言、喜田 聡（東京大農）
○Asuka TAKAHASHI, Muyan Liu, Satoshi Kida (The Univ. of Tokyo)

子供の頃に苦手であった（嫌悪性を示す）コーヒーが大人になって好きになるように、食物に対する嗜好性(食物価値)は経験依存的に後天的に変化する。条件付け味覚嫌悪学習(Conditioned Taste Aversion: CTA)はヒトを含めた動物で広く観察され、初めて摂食する嗜好性の高い食物摂食後に内臓不快感を経験することでその食物を忌避するようになる現象であり、食物価値が低下するモデルであると考えられる。しかし、嫌悪性を示す嗜好性の低い食物の食物価値が経験依存的に向上する実験モデルは開発されておらず、その生物学的メカニズムの解明も進んでいない。本研究では、食物価値が経験依存的に向上する神経メカニズムを解明する端緒として、マウスにおける条件付け味覚嗜好学習(Conditioned Taste Preference: CTP)を新規開発したことを報告する。CTA におけるパブロフ型条件づけの原理に基づき、苦味溶液(キニーネ水溶液)摂取時にニコチンを投与して快情動を産生させることで、苦味と快情動の条件付けにより苦味溶液に対する嗜好性が向上するかを検討した。その結果、苦味溶液摂取時のニコチンの腹腔内 (0.015mg/kg)あるいは経口投与(♂:3μg/ml, ♀:10μg/ml)を 1 日 1 回計 3 日間繰り返し、その後、苦味溶液と水による二瓶選択試験を実施した。その結果、ニコチン投与群の苦味溶液摂取割合が溶媒投与群に比べて有意に増加すること、すなわち、CTP による苦味溶液に対する食物価値の向上が示唆された。興味深いことに、この CTP は苦味溶液としてコーヒーを用いた場合にも同様に観察され、マウスにおいてコーヒーに対する嗜好性の向上が誘導された。以上のように、本研究では条件付け味覚嗜好学習課題を確立して、苦味溶液とニコチンによる快情動との条件づけによって、苦味溶液の食物価値を人為的に向上させることに成功した。

Food valence (food preference) can be changed in an experience of feeding food-dependent manner. Conditioned taste aversion (CTA) is an associative learning and memory of taste and negative emotion, in which the high-valued taste is devaluated by negative emotion generated via visceral discomfort. In this study, we established a brand-new conditioned taste preference (CTP) task that enables to experience-dependently evaluate the food with negative valence. Mice were trained by drinking a bitter taste solution including quinine (0.2mg/ml) in combination with the systemic injection of nicotine (0.015mg/kg) or saline for 3 days and then assessed preference of the bitter solution. Interestingly, mice that received nicotine administration showed evaluation of the bitter solution compared with mice that received saline, indicating that the CTP task was established.

food preference, feeding behavior

発表責任者：喜田 聡（akida@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 D6 会場

Glyoxalase 1 の阻害はマウスの非糖尿病時の不安を減少させ、糖尿病時の不安を増加させる
Glyoxalase 1 inhibition decreases anxiety in non-diabetic mice and increases anxiety in diabetic mice

○白井 海斗[1]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Kaito SHIRAI[1], ASAKO TAKENAKA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ.)

【背景・目的】 Glyoxalase 1（Glo1）は抗不安作用を示す Methylglyoxal（MG）を代謝し、不安様行動を増加させる酵素であり、その発現レベルの違いはマウスの不安様行動に系統差が生じる原因の一つである。我々は、Streptozotocin（STZ）誘発糖尿病 による不安様行動の増加は Glo1 活性が高い DBA2（D2）マウスでは生じにくいことを示し、糖尿病時の MG の増加は逆に不安様行動の増加を引き起こす可能性を示した。本研究では Glo1 阻害による MG の増加が不安様行動の系統差と糖尿病時の不安様行動増加に及ぼす影響をそれぞれ解析した。
【方法・結果】 C57BL/6（B6）マウスと D2 マウスに Glo1 inhibitor（S-*p*-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester, 30 mg/kg）または vehicle を単回腹腔内投与し、Open Field test に供した。その結果、視床下部の Glo1 活性は Glo1 inhibitor 投与により両系統で低下したが、不安様行動は D2 マウスでのみ減少した。また、B6 マウスに STZ（60 mg/kg × 4, 120 mg/kg × 1）を腹腔内投与して糖尿病 B6 マウスを作製し、糖尿病 B6 マウスと非糖尿病 B6 マウスを用いて同様の実験を実施した。その結果、Glo1 inhibitor 投与により糖尿病マウスでのみ不安様行動が増加した。
【結論】 Glo1 は不安様行動を増加させて系統差の要因となる一方で、糖尿病時には不安様行動を減少させることが示された。低濃度の MG の抗不安作用が不安様行動の系統差に原因となる一方、糖尿病時の高濃度の MG は不安様行動を増加させる可能性が示唆された。

Glo1 is an enzyme that metabolizes MG, which has anxiolytic effects. Differences in Glo1 expression level are one of the causes of strain differences in anxiety-like behavior (AB) in mice. On the other hand, we have demonstrated that an increase in MG during diabetes may cause an increase in AB. In this study, we analyzed the effects of Glo1 inhibition on strain differences in AB and on the increase in AB during diabetes. B6 and D2 mice were given a single intraperitoneal dose of Glo1 inhibitor (S-*p*-bromobenzylglutathion cyclopentyl diester, 30 mg/kg) or vehicle and were subjected to the open field test to evaluate AB. In addition, diabetic B6 mice were generated by intraperitoneal administration of STZ (60 mg/kg × 4, 120 mg/kg × 1), and Glo1 inhibitor administration and behavioral analysis were performed on diabetic and non-diabetic B6 mice. Results showed that Glo1 increase AB and be a factor in strain differences, while it decreased AB in diabetes.

anxiety-like behavior, strain differences, Glyoxalase 1

講演番号：2D6a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 D6 会場

高脂肪食摂取マウスへのタンパク質制限がエネルギー代謝に及ぼす影響

Effect of protein restriction on energy metabolism in mice fed high fat diet

○相馬 大智[1]、金子 賢太朗[2]、竹中 麻子[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Taichi Soma[1], Kentaro Kaneko[2], Asako Takenaka[2] ([1]Graduate School of Agriculture , Meiji University, [2]School of Agriculture, Meiji University)

【目的】我々は、タンパク質制限により肝臓 fibroblast growth factor 21(FGF21)mRNA 量および血中 FGF21 濃度が増加し、白色脂肪組織(WAT)重量低下を引き起こすことを示した。さらにこの変化は高脂肪食摂取時に増大することをラットで示し、高脂肪食摂取時のタンパク質制限が強い体脂肪低下作用を持つ可能性を示した。本研究ではマウスで上述の現象を確認した後、エネルギー代謝を解析した。【方法】13 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを 4 群に分け、タンパク質含量 2, 20%(2C、20C)、脂質含量 5, 35%(CON、HF)を組み合わせた 4 種の飼料を各群に 14 日間給餌し、臓器重量、FGF21、uncoupling protein 1 (UCP1)の解析を行った(各群 n=4)。一方で同様の 4 種の飼料を 7 日間給餌し、エネルギー代謝測定システム(Oxymax)を用いて熱産生、呼吸商等を測定した(各群 n=4)。【結果】体重はタンパク質制限の影響で低下し、この低下は HF 群で CON 群より大きかった。タンパク質制限により eWAT、iWAT 重量が低下し、iWAT の低下は HF 群で CON 群より大きかった。肝臓 FGF21 mRNA 量および血中 FGF21 濃度はタンパク質制限により増加し、HF の影響を受けなかった。iWAT UCP1 量及びエネルギー消費量は CON 群ではタンパク質制限により増加したが、HF 群で増加が小さかった。呼吸商は HF 食摂取により低下し、CON 群ではタンパク質制限でも低下した。【結論】マウスへのタンパク質制限による WAT 重量低下は、高脂肪食でより顕著に現れる。また、タンパク質制限による WAT 重量低下は FGF21-UCP1 及び脂肪燃焼の増加を伴うが、高脂肪食による WAT 重量のさらなる低下は FGF21-UCP1 に依存せず生じる。

We found that protein restriction increases hepatic FGF21 mRNA level and plasma FGF21 concentration, leading to a decrease in white adipose tissue weight. Furthermore, these changes were greater with a high-fat diet, indicating that protein restriction in a high-fat diet may have significant effect to reduce fat mass. In this study, 13-week-old C57BL/6J male mice were divided into four groups, and each group was fed one of the four types of diet with a combination of protein content of 2、20% (2C, 20C) and fat content of 5、35% (CON, HF) for 14 days. The same four diets were fed for 7 days, and energy metabolism was measured. The results showed that the loss of WAT weight due to protein restriction was more significant with HF diet. In addition, the loss of WAT weight due to protein restriction was accompanied by increased FGF21-UCP1 and fat-oxidation, however, further reduction due to high-fat diet occured independent of FGF21-UCP1.

protein restriction, high-fat diet, fat-oxidation

講演番号：2D6p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 D6 会場

コリン欠乏に対する超生物学的適応

Superorganismal adaptation to choline deficiency

○小幡 史明[1,2]、藤田 有香[1,2] ([1]理化学研究所、[2]京大院生命)
○Fumiaki Obata[1,2], Yuka Fujita[1,2] ([1]RIKEN, [2]Kyoto University)

腸内微生物叢は動物の健康に不可欠な役割を果たしている。宿主と微生物の相互作用の主な機能の一つは、代謝物質を宿主に供給することによって栄養不足を改善することであるが、その分子メカニズムには不明な点が多い。我々は、ショウジョウバエ遺伝学を用いて、腸内細菌由来の代謝物が持つ生理機能解明をおこなっている。メタボローム及びリピドーム解析から細菌特異的な代謝物を複数同定している。その一つとして、*Acetobacter persici* が産生するフォルファチジルコリン（PC）を見出した。PC は必須栄養素であるコリンから主に合成される。*A. persici* はコリン欠乏によるショウジョウバエの発生不良を回復させた。また、A. persici の PC 生合成に必要な遺伝子 PmtA をショウジョウバエに異所発現させると、コリン欠乏による発生不良や生殖能力の低下、寿命短縮などがいずれも回復できることが明らかとなった。一方で、コリン欠乏により体内カルニチンが激減することが明らかとなり、これにはカルニチンによる新規リン脂質代謝恒常性が関与することが示唆された。本発表では、これらの知見について紹介し、栄養欠乏に対する個体の生理変化が宿主-腸内細菌の相互作用によってどのように緩和されるかを議論したい。

The gut microbiota is crucial for animal health, playing a key role in improving malnutrition by supplying metabolites to the host, although the molecular mechanisms involved are not fully understood. Using *Drosophila* genetics, we are elucidating the physiological functions of metabolites derived from gut bacteria. Through metabolome and lipidome analyses, we have identified several species-specific metabolites, including phosphatidylcholine (PC) produced by *Acetobacter persici*. PC is mainly synthesized from the essential nutrient choline. A. persici restored developmental defects in *Drosophila* caused by choline deficiency. Ectopic expression of the gene PmtA, responsible enzyme for PC biosynthesis in *A. persici*, rescued issues such as developmental lethality, reduced fecundity, and shortened lifespan caused by choline deficiency. In addition, we found that carnitine levels significantly decreased in choline-deficient conditions, suggesting a novel role for carnitine in the homeostasis of phospholipid metabolism. In this presentation, we introduce these findings and discuss how physiological changes due to nutritional deficiencies are mitigated by host-gut bacteria interactions.

Choline, Gut bacteria, Drosophila melanogaster

発表責任者：小幡史明（fumiaki.obata@riken.jp）

講演番号：2D6p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 D6 会場

アミノ酸バランス検知システムによる食欲調節メカニズムの解明
Elucidating the role of the amino acid balance sensing system in regulating food intake
吉田 健人[1]、○松居 翔[1]、塚本 麻衣[1]、淺原 俊一郎[2]、小栗 靖生[1]、都築 巧[1]、佐々木 努[1]([1]京大院農、[2]神大院医)
Kento YOSHIDA[1], ○ Sho MATSUI[1], Mai TSUKAMOTO[1], Shun-Ichiro ASAHARA[2], Yasuo OGURI[1], Satoshi TSUZUKI[1], Tsutomu SASAKI[1] ([1]The Univ. of Kyoto, [2]The Univ. Kobe)

生命維持には良質なタンパク質の摂取が必要不可欠だが、アミノ酸バランスを検知し摂食を調節する機序は未解明である。アミノ酸インバランスとの関連が報告されている細胞内センサー分子 GCN2（general control nonderepressible 2）とホルモン GDF15（growth and differentiation factor 15）に着目し、摂取タンパク質中のアミノ酸バランス検知と、それに応じた食欲調節機構の解明を試みた。

Thr（threonine）欠乏無血清培地（アミノ酸インバランス培地）中で 30 分以上培養した肝細胞株 AML12 では、GCN2 とその下流標的 eIF2α のリン酸化が確認された。マウスに低タンパク質食（LPD）に Thr 以外のアミノ酸を添加したアミノ酸インバランス餌を与えると、摂餌から 4 時間後の血中 GDF15 濃度が上昇し、その後 2 時間の摂食量が減少した。マウスに LPD もしくは LPD に必須アミノ酸 5 種を添加したアミノ酸インバランス餌（LPD+5EAA）を与えると、24 時間後の摂食量が LPD+5EAA 群で減少した。

これらの結果は、Thr の欠乏は肝臓 GCN2、eIF2α の活性化と血中 GDF15 濃度上昇を引き起こすこと、またアミノ酸インバランス食の摂食は、制限アミノ酸の種類や数によらず抑制されることを示している。

The intake of protein with good quality is essential to sustain life. However, how amino acid balance of food is detected and regulates food intake is not yet understood. We focused on the intracellular sensor molecules GCN2 and the hormone GDF15, which have been reported to be related to amino acid imbalance, and attempted to detect the amino acid balance in ingested proteins and to elucidate the appetite regulation mechanism accordingly.

Phosphorylation of GCN2 and its downstream target, eIF2α, was observed in hepatic AML12 cells cultured for 30 minutes in threonine-depleted medium. Mice fed a low-protein diet (LPD) supplemented with amino acids except threonine showed a significant increase in blood GDF15 4 hours after feeding, followed by a decrease in food intake for 2 hours. In addition, mice fed a LPD supplemented with five essential amino acids consumed less food than those fed only LPD.

These results indicate that threonine deficiency causes activation of hepatic GCN2 and eIF2α and induces GDF15 secretion, and that feeding of the amino-acid-imbalanced diet suppressed food intake regardless of the kinds and number of limiting amino acids.

GCN2, GDF15, Amino acid imbalance

発表責任者：松居翔（matsui.sho.4s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2D6p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 D6 会場

大腸炎マウスにおける皮膚遺伝子発現の解析

Analysis of skin gene expression in colitic mice

○佐伯 樹、山本 祥也、鈴木 卓弥（広島大学大学院統合生命科学研究科）
○Itsuki SAEKI, Yoshinari YAMAMOTO, Takuya SUZUKI (The Univ. of Hiroshima)

【目的】当研究室では、慢性皮膚疾患である乾癬のモデルマウスにおいて、乳酸菌の摂取が症状を抑制することを報告している（J Appl Microbiol. 2021）。この結果を含め、腸管機能や腸内環境が皮膚の健康に深く関わることが知られるが、その詳細なメカニズムは十分に明らかではない。そこで本研究では、腸－皮膚連環のメカニズムを探索する一環として、大腸炎モデルマウスの皮膚の遺伝子発現変化を調べ、その要因を検討した。【方法・結果】マウス（HR-1、オス、6 週齢）に、２%デキストラン硫酸ナトリウムを自由飲水させることで大腸炎を誘発した。食餌摂取量の影響をなくすため、マウスは個飼いにして、正常マウスの摂食量を大腸炎マウスと同じにした。皮膚組織の定量 PCR の結果、大腸炎マウスの皮膚では、バリア機能を担う Claudin-1 や Loricrin の遺伝子発現が減少した。さらに大腸炎マウスでは、真皮を構成する collagen3、collagen5、fibronectin1 の遺伝子発現、これらを産生する繊維芽細胞の増殖因子の１つである Fgf2 遺伝子発現も減少した。腸－皮膚連環のメディエーターの候補として、血漿中の有機酸濃度を測定したところ、大腸炎マウスでは酢酸の低下が認められた。現在、マウス線維芽細胞を用いて、酢酸による直接的な影響を検討中である。

Our previous study demonstrated that lactic acid bacteria suppressed symptoms in a mouse model of psoriasis, a chronic skin disease (J Appl Microbiol. 2021). Including this result, it is known that gut function and the gut environment are closely related to skin health, however, the underlying detailed mechanism is not well understood. Therefore, this study investigated gene expression changes in the skin of colitic mice and the mediator in the gut-skin axis. Mice (HR-1, male, 6 weeks old) were orally administered with 2% sodium dextran sulphate to induce colitis. Quantitative PCR of skin tissues showed that the gene expression of claudin-1 and loricrin, which play a role in barrier function, was decreased in colitic mice. In addition, gene expression of collagen3, collagen5, and fibronectin1, which compose the dermis, and Fgf2, one of the growth factors of the fibroblasts that produce them, was also decreased in colitic mice. As a candidate mediator of the gut-skin axis, we measured the plasma concentration of organic acids and found a decrease in acetic acid in colitic mice. The direct effects of acetic acid are currently being investigated using mouse fibroblasts.

Gut-skin axis, Mouse, Colitis

講演番号：2D6p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 D6 会場

グアーガム分解物はマウスの腸内環境を改善し、エタノール投与による肝脂肪蓄積を緩和させる。
Gut environment modulation by partially hydrolyzed guar gum (PHGG) improves hepatic fat accumulation caused by ethanol in mice.

○森島 爽[1,2]、安部 綾[2]、岡本 沙季[2]、カプール マヘンドラ[2]、大角 将秀[1]、大久保 勉[1]、小関 誠[1,2]、西尾 昌洋[1]、井上 亮[3] ([1]三重大生資、[2]太陽化学、[3]摂南大農)
○So MORISHIMA[1,2], Aya ABE[2], Saki OKAMOTO[2], Mahendra Parkash KAPOOR[2], Masahide OOSUMI[1], Tsutomu OHKUBO[1], Makoto OZEKI[1,2], Masahiro NISHIO[1], Ryo INOUE[3] ([1]Mie Univ., [2]Taiyokagaku, [3]Setsunan Univ.)

【背景】アルコール性脂肪肝はアルコール関連肝疾患（ALD）における重篤な疾患（肝炎、肝硬変）に至る前段階であり、その予防は重要な課題である。プレバイオティクスの一種であるグアーガム分解物（PHGG）は ALD を予防する可能性が示されているが、ALD 改善における腸ー肝軸を介した効果はこれまで評価されていない。そこで本研究では、エタノール（EtOH）投与による肝障害に対する、PHGG の腸内細菌を介した効果についてマウスモデルを用いて検討した。
【方法と結果】8 週齢雄性 C57BL/6N マウスに 5%PHGG を 2 週間前給餌したところ、EtOH の連続経口投与により誘発した肝脂肪蓄積は対照群に比して抑制された。腸内においては ALD との関連が報告されている *Streptococcus* の増加が抑制され、短鎖脂肪酸産生菌である *Bifidobacterium* が増加するとともに、その代表的な代謝産物である酢酸の盲腸内濃度も増加していた。相関ネットワーク解析を用いて肝脂肪の減少に寄与した要因を推定したところ、*Bifidobacterium* の占有率と盲腸内酢酸濃度が肝脂肪と負の相関を示した。以上より PHGG により増加した *Bifidobacterum* の産生する酢酸が門脈を介して肝臓に到達し、肝臓の脂質代謝調節効果をもたらす機序が予測された。
【結論】PHGG 摂取は腸内環境改善を介して ALD 予防に有用な効果をもたらすと期待される。

Alcoholic fatty liver is a precursor signs of hepatitis and cirrhosis in alcohol-related liver disease (ALD), and thus its prevention is important. While prebiotic partially hydrolyzed guar gum (PHGG) has been suggested to have potential for ALD prevention, the effect via gut-liver axis has not been evaluated. Therefore, we investigated the effects of PHGG consumption on alcohol-induced liver injury via gut microbiome in a mouse model.

Pre-feeding of 5% PHGG in 8-week-old male C57BL/6N mice for 2 weeks suppressed hepatic fat accumulation induced by oral administration of EtOH compared to controls. In the cecum, lower abundance of ALD associated bacterium, *Streptococcus* and higher of typical beneficial bacterium *Bifidobacterium* was observed in PHGG treated group compared to controls. Additionally, higher concentration of cecal acetic acid was also observed. Correlation network analysis indicates acetate production by *Bifidobacterium* may be a key mechanism for attenuation of liver fat accumulation. Finally, this study demonstrated that PHGG intake may be effective in reducing the risk of ALD via gut-liver axis as a prebiotics.

Partially hydrolyzed guar gum, alcoholic fatty liver, short-chain fatty acid

発表責任者：森島　爽（522D302@m.mie-u.ac.jp）

講演番号：2D6p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 D6 会場

新規鋤鼻受容体候補遺伝子 ancV1R 欠損オスマウスの表現型解析
Phenotypic analysis of ancV1R-deficient male mice.
○武田 紗季、近藤 宏、岩田 哲朗、二階堂 雅人、廣田 順二（東工大生命理工院）
○Saki TAKEDA, Hiro KONDO, Tetsuo IWATA, Masato NIKAIDO, Junji HIROTA (Tokyo Inst. of Tech)

フェロモンは、鋤鼻器の神経細胞に発現する鋤鼻受容体によって感知される。鋤鼻受容体(VRs)は、系統学的にⅠ型の V1R と、Ⅱ型の V2R に分類される。特に、V1R は種特異的な多重遺伝子ファミリーを形成していることから、種特異的なフェロモン受容に関与していると考えられている。近年、シーラカンス V1R 遺伝子の中に、爬虫類や両性類、哺乳類などのゲノムにも共通して存在する例外的な V1R 遺伝子が発見された。この新しい V1R 遺伝子は、古代魚から哺乳類まで長い進化の過程で保存されてきたことから、ancient V1R(ancV1R)と名付けられた。ancV1R の偽遺伝子化は鋤鼻器の退化と密接に関係していることから、鋤鼻器において重要な役割を担っていることが示唆される。本研究室の先行研究により、ancV1R の欠損がメスマウスにおいてオスに対する異常な反応を引き起こすことが明らかとなった。一方、ancV1R を欠損したオスマウスの表現型についての解析はまだ行われていない。本研究では、オスマウスに焦点を当て、性行動や匂いの嗜好性、メス特有の刺激に対する鋤鼻器神経細胞の応答の解析を行った。

Pheromones are detected by the vomeronasal receptors (VRs) expressed on the neurons of the vomeronasal organ (VNO). VRs are phylogenetically classified into Vomeronasal Receptor type-1 (V1R) and type-2 (V2R). In particular, V1Rs encode a species-specific multiple gene family. Therefore, they might be involved in species-specific pheromone reception. However, an exceptional V1R gene has been discovered in coelacanths that is also found in the genomes of amphibians, reptiles, and mammals. This novel V1R gene was named ancient V1R (ancV1R) because it has been conserved for over 400 million years of the vertebrate evolution. Since pseudogenization of ancV1R is closely related to the degeneration of VNO, it is predicted to play an important functional role in VNO. Previous studies in our laboratory revealed that loss of ancV1R causes abnormal responses to males in female mice. However, the phenotype of male mice lacking ancV1R is not analyzed. In this study, we focused on ancV1R-deficient male mice and analyzed their behavior, odor preferences, and responses of vomeronasal neurons to female-specific stimuli.

Vomeronasal organ, receptor, ancV1R

講演番号：2D6p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D6 会場

炎症性腸疾患に耐性を示す核内受容体型転写因子 NR4A3 欠損マウスの免疫応答と腸管構造

NR4A3 deficient mice exhibit increased intestinal mucin and goblet cells and resistance to inflammatory bowel disease.

○南川 夏己[1]、伊藤 直人[1]、片桐 万由佳[1]、中野 信浩[2]、原 むつ子[2]、樋上 賀一[3]、長田 和樹[1]、吉村 昭彦[4]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]順大院アトピー疾患研究センター、[3]東理大薬生命創薬、[4]慶大医)
○Natsuki MINAMIKAWA[1], Naoto ITO[1], Mayuka KATAGIRI[1], Nobuhiro NAKANO[2], Mutsuko HARA[2], Yoshikazu HIGAMI[3], Kazuki NAGATA[1], Akihiko YOSHIMURA[4], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo Univ. Sch. Med., [3]Dept. Med Life Sci., Tokyo Univ. Sci., [4]Keio Univ. Sch. Med.)

NR4A3 は 50 種類ほどの分子群より成る核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンド非依存的に活性化されるオーファン受容体である。*Nr4a3*$^{-/-}$マウスについて、神経の発生、並びに動脈硬化や皮膚疾患といった様々な病態の異常が報告されているが、炎症性腸疾患に対する NR4A3 の役割は不明であった。私達は DSS 誘導性大腸炎モデルを *Nr4a3*$^{-/-}$マウスに展開し、腸炎発症に伴う体重減少や大腸の萎縮、組織損傷、下痢や下血の程度が *Nr4a3*$^{+/+}$マウスと比較して劇的に緩和することを見出し報告してきた。今回、その分子機構を解明するため大腸炎マウスの各種指標を解析した結果、腸組織におけるサイトカイン発現や血中 IL-6 濃度の上昇、腸管膜リンパ節中の Th1、Th17、Treg 数の増加といった免疫応答のいずれに項目においても、*Nr4a3*$^{-/-}$マウスでは著しい抑制が確認された。一方、*Nr4a3*$^{-/-}$骨髄由来マクロファージや樹状細胞の LPS 依存的な炎症性サイトカイン分泌は、*Nr4a3*$^{+/+}$細胞と同等であった。健常時において *Nr4a3*$^{-/-}$マウス腸は *Nr4a3*$^{+/+}$のそれより有意に長く、内容物の移動速度に遅延が見られたことから組織学的解析を行ったところ、*Nr4a3*$^{-/-}$マウス腸粘膜ではムチンが多く、ムチン分泌に寄与する杯細胞の細胞数が有意に多いことが判明した。以上、NR4A3 の欠損が杯細胞の発生をはじめとした腸組織構造に影響を及ぼし、大腸炎への耐性をもたらすことが示唆された。現在杯細胞の発生や関連する分子群の遺伝子発現について解析中であり、併せて報告したい。

NR4A3 is a member of the nuclear receptor superfamily and functions as a ligand-independent transcription factor. NR4A3 is involved in development of the neuron, arteriosclerosis symptoms and skin diseases. However, the roles of NR4A3 in inflammatory bowel disease is largely unknown. We utilized DSS-induced colitis model, and showed the significantly improved weight loss, diarrhea, tissue damage and intestinal atrophy in *Nr4a3*$^{-/-}$ mice. In the present study, we found that the DSS-induced increase in expression of inflammatory cytokines in the colon, serum IL-6, number of Th1, Th17, Treg in MLN was suppressed in *Nr4a3*$^{-/-}$ compared to *Nr4a3*$^{+/+}$, whereas LPS-induced stimulation of dendritic cells, and macrophages was not affected by NR4A3 deficiency. An immunohistochemical analysis revealed the amount of mucin and number of goblet cells in the colon were increased in *Nr4a3*$^{-/-}$ mice. These results suggest that NR4A3 is involved in the severity of inflammatory bowel disease by regulating the development of intestinal tissue, particularly goblet cells. We are going to analyze goblet cell-related gene expression in *Nr4a3*$^{-/-}$ mice.

nuclear receptor, inflammatory bowel disease, goblet cell

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2D6p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D6 会場

NRF2 欠損の胎内環境並びに性差が及ぼす接触性皮膚炎への影響

Effects of NRF2 deficiency in prenatal environment and gender on contact hypersensitivity.

○杉原 彩夏、長田 和樹、西山 千春（東理大院先進工生命システム）
○Ayaka SUGIHARA, Kazuki NAGATA, Chiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

NRF2 は、活性酸素種や親電子性物質によって活性化される抗酸化ストレス応答のマスター転写調節因子である。NRF2 を欠損したマウスでは、自己免疫疾患や炎症性疾患が悪化することが報告されており、NRF2 が免疫恒常性維持や炎症抑制に寄与することが示唆される。本研究では、生体の免疫応答における NRF2 の役割を解明するため、NRF2 full knock out マウスに接触性皮膚炎（CHS）モデルを展開した。その結果、既報の通り *Nrf2*$^{-/-}$(KO)マウスでは *Nrf2*$^{+/+}$(WT)マウスと比較して耳介の肥厚が亢進していたが、加えて、*Nrf2*$^{+/-}$(Het)マウスにおいては耳介の肥厚が亢進される個体とされない個体の 2 極化が観察された。また、KO マウスの浮腫の程度が、性差間で異なる可能性も示唆された。KO 由来樹状細胞(DC)は WT DC と比べて抗原提示分子の発現が亢進していたことから、KO 生体内では T 細胞応答が過剰活性化することが予想された。Het マウスで個体間のばらつきが大きいこと、KO 体内で炎症促進が予想されることから、雌性 KO と雄性 WT、雌性 WT と雄性 KO の交配で得られる Het 同士を比較し、胎児期の環境が出生後の免疫応答に及ぼす影響を解析した。その結果、雌性 KO から生まれた Het は雌性 WT から生まれた Het より CHS における耳介の肥厚の程度が緩和される傾向が見られた。また、雄性 Het は雌性 Het と比べて症状が強く現れる傾向も観察された。現在、各種免疫細胞の挙動や遺伝子発現を解析中であり、併せて報告する予定である。

NRF2 is a master transcription factor of antioxidant response-related gene expression. Several studies using mouse model reported that deficiency of NRF2 deteriorates autoimmune diseases and inflammatory diseases, suggesting protective effects of NRF2 in inflammatory responses. In the present study, we found that ear swelling levels of contact hypersensitivity (CHS)-induced *Nrf2*$^{+/-}$(Het) were different between individual under the condition that enhanced swelling in *Nrf2*$^{-/-}$(KO) mice was observed as previously reported. In addition, exacerbation levels of KO mice seemed to be affected by gender. Expression levels of MHC class II and CD86 on bone marrow-derived DCs (BMDCs) generated from KO mice were higher than those of WT DC, suggesting increased antigen-presenting ability of DCs. To evaluate the effects of prenatal environment, we compared CHS symptom between Het mice born from KO female/WT male and Het from WT female/WT male. Ear swelling levels tended to be lesser in Het mice from KO female than Het from WT female and in Het female than Het male.

NRF2, Contact hypersensitivity, gender

講演番号：2D6p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D6 会場

転写抑制因子 Bach1 は多量体免疫グロブリン受容体の発現調節を介して腸管腔への IgA 分泌を制御する

BTB and CNC homology 1 deficiency disrupts intestinal IgA secretion through regulation of polymeric immunoglobulin receptor expression

○東村 泰希[1]、松本 健司[1]、三谷 塁一[2]、髙木 智久[3]、武藤 哲彦[4]、五十嵐 和彦[4]、内藤 裕二[3]（[1]石川県立大・生資環、[2]信州大院・農、[3]京府医大院・医、[4]東北大院・医）
○ Yasuki HIGASHIMURA[1], Kenji MATSUMOTO[1], Takakazu MITANI[2], Tomohisa TAKAGI[3], Akihiko MUTO[4], Kazuhiko IGARASHI[4], Yuji NAITO[3] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Shinshu Univ., [3]Kyoto Pref. Univ. Med., [4]Tohoku Univ.)

腸管管腔内へ分泌された IgA は感染防御の最前線として機能するため、IgA の質的・量的強化は免疫力低下に伴う疾病予防に対して重要である。BTB domain and CNC homology 1（Bach1）はヘム結合性の転写抑制因子であり、グロビン遺伝子や酸化ストレス応答系に関わる遺伝子の発現制御を担っている。Bach1 の発現は広範であるが、腸管生理機能に及ぼす影響については未だ明らかでない。本研究では野生型マウス C57BL/6J（WT）および Bach1 欠損マウス（Bach1KO）を用いて、Bach1 が IgA を介した腸管粘膜免疫に及ぼす影響について解析をおこなった。その結果、Bach1 遺伝子の欠損に伴い、腸管粘膜における IgA 産生は亢進するものの、腸管膜リンパ節およびパイエル板における IgA 産生 B 細胞（$B220^{+}IgA^{+}$）の割合は、Bach1KO において低値を示した。つまり、Bach1KO では、腸管組織内へと浸潤した IgA が腸管腔内へと適切に分泌されていない可能性が示唆された。この仮説を支持するように，Bach1KO では WT と比較して糞便中 IgA は減少し、逆に血中 IgA は高値を示した。続いて、腸管腔内への IgA 分泌において中心的な役割を果たす多量体免疫グロブリン受容体（pIgR）に着目し、その発現レベルに及ぼす Bach1 欠損の影響を解析した。WT および Bach1KO より大腸組織を摘出し、pIgR の発現レベルを解析した。その結果、mRNA およびタンパク質レベルの両方において、Bach1KO では *pIgR* mRNA の発現レベルが有意に低値を示した。さらに、ヒト大腸がん細胞株である LS174T 細胞を用いた *in vitro* 試験の結果、Bach1 による pIgR 発現制御は転写段階ではなく転写後段階、すなわち *pIgR* mRNA の安定性に寄与することが示された。

Immunoglobulin A (IgA) produced in intestine plays a crucial role in maintaining intestinal homeostasis. In the intestinal mucosa, IgA production induced in the gut-associated lymphoid tissue such as Peyer’s patch. IgA protect host immunity against pathogen infection by binding virus or bacteria in intestine. BTB domain and CNC homolog1 (Bach1) is a transcription repressor, which are mainly involved in the regulation of antioxidative pathway. Although Bach1 is ubiquitously expressed genes, its effect on intestinal physiology is still unclear. In this study, we investigated the function of Bach1 in IgA-mediated intestinal mucosal immunity using Bach1-deficient mice. In Bach1-deficient mice, the number of IgA-producing cells did not increase, despite the increase in IgA content in the intestinal mucosa. Furthermore, the expression of Polymeric Immunoglobulin Receptor, which is responsible for IgA secretion into the intestinal lumen, was decreased in Bach1-deficient mice.

immunoglobulin A, polymeric immunoglobulin receptor, mucosal immunity

発表責任者：東村泰希（yasuki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2D6p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D6 会場

常圧低酸素環境における酸素濃度の違いが身体に与える影響

Effects of Different Levels of Oxygen on Body under the Environment of Normobaric Hypoxia.

○藤掛 明日希[1]、岡本 真由美[2]、小島 匡人[1]、黒澤 麻由美[1]、松下 敬一[1]、坪井 玲奈[3]、寺尾 安生[2]([1]株式会社 TSM、[2]杏林大学、[3]High Altitude Management 株式会社)
○Asuki FUJIKAKE[1], Mayumi OKAMOTO[2], Masato KOJIMA[1], Mayumi KUROSAWA[1], Keiichi MASTUSHITA[1], Reina TSUBOI[3], Yasuo TERAO[2] ([1]TSM Inc., [2]Kyourin University, [3]High Altitude Management CO., LTD.)

【目的】常圧低酸素環境について平地環境（ｃｏｎｔｒｏｌ；酸素濃度２０．９％）と標高２５００ｍ（Ｈ２５００；酸素濃度１５．４％）環境、標高４０００ｍ（Ｈ４０００;１２．９％）環境下で身体にどのような影響を与えるのか血液データをもとに比較検討することを目的とした。【方法】６週齢のＣ５７ＢＬ／６雄マウスを使用し，ｃｏｎｔｒｏｌと Ｈ２５００、Ｈ４０００ｍの３群に分け、自由飲水摂餌の条件にて１週間飼育した。体重及び摂餌量測定、７日目に解剖、心採血を行なった。【結果】酸素濃度が低くなるにつれて体重増加抑制効果がみられた。３群の摂餌量に明らかな差はなかった。血液検査では赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットのそれぞれがＨ４０００、Ｈ２５００、ｃｏｎｔｒｏｌ群の順に高値を示した。【結論】酸素濃度が低いほど低酸素応答よる代償作用により血流量が増加し、酸素運搬能が向上し代謝機能が促進され、体重増加抑制効果がみられる機序が考えられた。

【PURPOSE】This study is to compare the effects of normobaric hypoxia on bodies measured by blood data under environments at sea level (oxygen concentration (Control; O_2 Conc. 20.9%), at an altitude of 2,500 meters (H2500; O_2 Conc. 15.4%) and at an altitude of 4,000 meters (H4000; O_2 Conc. 12.9%). 【METHODS】C57BL/6 male mice (6 wk-old) were divided into three groups; control, H2500 and H4000, keeping them under free drinking and feeding conditions for a week. Body weight and food intake had been measured. On the seventh day, these were euthanized and cardiac blood samples were taken. 【RESULTS】As O_2 Conc. get lower, suppression of gaining weight appears to be more and more noticeable. There is no apparent difference in food intake among the three groups. Blood test shows that erythrocyte count, hemoglobin, and hematocrit were higher in the H4000, followed by the H2500, and then the control group. 【CONCLUSION】It can be considered that the compensatory effect of hypoxia in response to low O_2 Conc. increases blood flow and improves oxygen delivery capacity and had promoted metabolic function and suppressed weight gain.

normobaric hypoxia, oxygen concentration, weight gain

講演番号：2D6p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D6 会場

膵ポリペプチド細胞の分化可塑性ならびに運命決定機序の研究
Analysis of plasticity and fate determination mechanism of pancreatic polypeptide cells
○佐藤 隆史[1]、中川 祐子[1]、深石 貴大[1]、福中 彩子[1]、綿田 裕孝[2]、藤谷 与士夫[1] ([1]群馬大生体調節研、[2]順天堂大院医)
○Takashi Sato[1], Yuko Nakagawa[1], Takahiro Fukaishi[1], Ayako Fukunaka[1], Hirotaka Watada[2], Yoshio Fujitani[1] ([1]Gunma Univ., [2]Juntendo Univ.)

膵ランゲルハンス島（ラ氏島）はインスリンを産生するβ細胞をはじめ様々な内分泌細胞で構成されている。ラ氏島では、膵ポリペプチド（Pancreatic polypeptide ;PP）を産生するγ細胞が数%の割合で存在し、PP をコードする Ppy 遺伝子はこの細胞に特異的に発現する。γ細胞の機能や役割は長く不明とされてきたが、我々はこれまで、Ppy 遺伝子座に Cre を導入したノックインマウスと Cre 依存的に蛍光タンパクを発現するマウスを交雑し、本細胞の分化系譜を解析してきた。これらの研究から、Ppy 発現細胞がγ細胞以外に, α , β などの他の内分泌細胞に分化し、これが分化後のβ細胞の機能的不均一性に寄与することを明らかにしてきた。（Fukaishi T.et al., 2021）。そこで、本研究では、この Ppy 発現細胞からの各種内分泌細胞の分化時期を特定するため、Ppy 遺伝子座に tamoxifen 誘導型 Cre を導入した Ppy-CreERT2 マウスを作製し、tamoxifen 投与により出生後の各生育段階で Cre 活性を誘導し、ラ氏島内において Cre に依存的に蛍光タンパクを発現する各細胞腫の割合を解析し、それらの運命追跡を行った。その結果、Ppy 発現細胞からのβ細胞への分化は出生後の早い時期でより割合高いことが明らかになった。これにより、器官形成過程で膵内分泌細胞へ分化する未成熟な細胞の多くは Ppy 遺伝子を発現する細胞と考えられ、今後膵内分泌組織形成過程における未知の分子機序解明の糸口として期待している。

Pancreatic islets are composed of various endocrine cell types including insulin-producing ß cells. In islets, γ cell which accounts for several percent produce pancreatic polypeptide (PP), and the Ppy gene encoding PP is specifically expressed in these cells. However, the functions and roles of γ cells have long been unclear. We have previously developed Cre-induced linage-tracing methods in mice and demonstrated that Ppy-expressing cells differentiate into other endocrine cell types such as α and ß in addition to γ cells, and that this contributes to the functional heterogeneity of ß cells. In this study, to determine the γ cell differentiation in specifically in various life stages, we generated Ppy-CreERT2 mice in which tamoxifen-inducible Cre was introduced into the Ppy gene locus, and performed linage-tracing of Ppy positive cells in islets. We induced Cre activity in pancreatic islets at each stage and tracked the fate of cells that express fluorescent proteins in Cre-dependent manner. The results revealed that the differentiation rate of Ppy-expressing cells into β cells was higher in the early postnatal period. These findings suggest that many of the immature cells that differentiate into pancreatic endocrine cells, especially during the organ formation process, are cells that express Ppy gene. These studies may lead to the elucidation of unknown molecular mechanisms on development of the endocrine tissues.

Linage-tracing, Endocrine cells, Knock-in mouse

講演番号：2D6p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D6 会場

Role of the mevalonate pathway in the regulation of selective autophagy and atrophy in skeletal muscle

○Liyang NI[1], Xiaolin Zhao[1], Hidetoshi Sakurai[2], Ryuichiro Sato[1], Yoshio Yamauchi[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

The mevalonate (MVA) pathway is a critical metabolic pathway that uses acetyl-CoA to produce sterols and isoprenoids. Statins are inhibitors of HMG-CoA reductase (HMGCR), the rate-limiting enzyme of the cholesterol biosynthesis in the MVA pathway that catalyzes the reduction of HMG-CoA to mevalonic acid. They are widely used for reducing plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and the risk of cardiovascular events. Although statins are well-tolerant, certain patients exhibit statin-related myotoxicity (SRM) such as myalgia, myopathy, and even rhabdomyolysis, which is a major cause of statin intolerance. This could be attributed to the effects of statins go beyond mere cholesterol reduction, since inhibition of HMGR suppresses the synthesis of all products downstream in the MVA pathway. Although these clinical data show the importance of the MVA pathway in skeletal muscle homeostasis, mechanisms of SRM are not fully understood. Herein, we develop an SRM model using human-induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived myocytes and find that SRM is caused by the deficiency of MVA pathway metabolites. Statins administration also leads to skeletal muscle atrophy in mice. To seek a molecular mechanism of SRM, we performed transcriptome analysis in hiPSC-derived myocytes treated with or without statin and mevalonic acid, a product of HMGCR. The results show the MVA pathway-dependent regulation of gene expression and significant enrichment in one of the selective autophagy process, endoplasmic reticulum (ER) phagy (reticulophagy), in hiPSC-derived myocytes, suggesting that the MVA pathway regulates ER-phagy. Notably, blocking the MVA pathway by stains treatment markedly upregulated the expression of an ER-phagy receptor in hiPSC-derived myocytes and skeletal muscle of mice. We are currently investigating a molecular mechanism and physiological role of the MVA pathway-dependent ER-phagy in skeletal muscle. In this meeting, we will present and discuss the critical role of the MVA pathway in regulating ER-phagy and skeletal muscle homeostasis.

Mevalonate pathway, Autophagy, Skeletal muscle

発表責任者：Yoshio Yamauchi（yoshio-yamauchi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D6p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D6 会場

カプサイシン型とオイゲノール型リガンドによるバニロイド受容体の活性化に対する嗅覚受容体およびフォルスコリンの調節作用の違い

Differential effects of human olfactory receptors and forskolin on transient receptor potential vanilloid 1 activation by capsaicin-type and eugenol-type ligands

○森山 さくら[1,2]、日沼 州司[2]、黒田 俊一[1,2]([1]大阪大学　生命機能研究科、[2]大阪大学　産業科学研究所)
○Sakura MORIYAMA[1,2], Shuji Hinuma[2], Shun’ihi Kuroda[1,2] ([1]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, [2]SANKEN, Osaka University)

嗅覚受容体(OR)がバニロイド受容体(TRPV1)の活性化に及ぼす影響について、OR と TRPV1 を共発現させた HEK293T 細胞を用いて解析した。その結果、OR による TRPV1 調節作用は同リガンドによって異なることがわかった。OR 共発現はカプサイシンに対する TRPV1 の反応を増強させたが、逆にオイゲノールに対する反応は減少させた。様々な TRPV1 リガンドを調べたところ、OR の調節作用に対してカプサイシンとオイゲノールと同様の TRPV1 活性化作用を示すリガンドをそれぞれカプサイシン型リガンドとオイゲノール型リガンドに分類できることがわかった。アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリン（FSK）は、両タイプのリガンドに対する TRPV1 の応答に対して OR とほぼ同じ調節作用を示した。この FSK による調節活性は、プロテインキナーゼ A（PKA）阻害剤である H-89 により阻害された。さらに、既知のリン酸化部位の TRPV1 変異体は、FSK の調節を受けなかった。これらの結果から、OR が cAMP 産生経路を活性化して、PKA による TRPV1 のリン酸化を誘導することにより、OR と FSK が両リガンド型による TRPV1 の活性化の調節作用を発揮していることが強く示唆された。さらに多様なバニロイド化合物による TRPV1 応答の FSK による変化を分析した結果、カプサイシン分子の「neck」と「tail」に相当する官能基と TRPV1 の相互作用が、TRPV1 リガンドがカプサイシン型とオイゲノール型のどちらに分類されるかを決定する上で極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。

We analyzed the effects of olfactory receptors (ORs) on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) activation using HEK293T cells co-expressing TRPV1 and ORs. Our results indicate that the effects of ORs varied depending on the TRPV1 ligands: ORs enhanced the response of TRPV1 to capsaicin but diminished that to eugenol. Based on susceptibility to the effects of ORs, we classified TRPV1 ligands as capsaicin and eugenol types, whose actions were similar to capsaicin and eugenol, respectively. An adenylate cyclase activator of forskolin (FSK) exhibited almost identical effects as ORs on TRPV1 responses to both types of ligands. The modulatory activities of FSK were inhibited by a protein kinase A (PKA) inhibitor, H-89. Furthermore, TRPV1 mutants at the known phosphorylation sites were insusceptible to the modulations of FSK. These results indicate that ORs activate the cAMP production pathway, leading to the phosphorylation of TRPV1 by PKA. It is strongly inferred that this phosphorylation amplifies the susceptibility of TRPV1 activation by both ligand types to the modulations of ORs and FSK. Analyzing various vanilloid compounds suggests that the interaction of TRPV1 with the chemical groups of capsaicin, which correspond to the ‘neck’ and ‘tail’, plays a pivotal role in determining whether TRPV1 ligands are classified as capsaicin or eugenol types.

olfactory receptor, Transient receptor potential channel, signal transduction

発表責任者：森山　さくら（kuroda44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2D6p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 D6 会場

発生期ゼブラフィッシュ胚において紫外線および青色光が DNA 損傷に与える影響
Effect of UV and Blue Light on DNA Integrity During Zebrafish Embryogenesis

○廣谷 陸、佐藤 大輝、佐藤 一臣（玉川大院）
○Riku HIROTANI, Taiki SATO, Kazuomi SATO (Grad. Sch. Agric. Tamagawa Univ.)

われわれは以前、青色光がケラチノサイトおよびメラノーマ細胞株に DNA の double strand breaks (DSB)と single-strand breaks (SSB)、ピリミジンおよびプリン塩基の酸化損傷を引き起こすことを報告した。本研究では、特に DSB と塩基損傷に焦点を当て、ゼブラフィッシュ胚の発生期における紫外線と可視光線の DNA 構造健全性への影響を調査し、培養細胞株で得られたデータと比較を行った。本研究では、ヒト由来ケラチノサイト細胞株 HaCaT とマウス由来メラノーマ細胞株 B16F1 を用いた。DSB の検出は、DNA 二本鎖切断時に生じるヒストン H2AX のリン酸化(γH2AX)を蛍光顕微鏡で検出した。シクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)、6-4 型光産物(6-4 PP)、Dewar 型光産物(Dewar PP)は ELISA および蛍光顕微鏡で検出した。培養細胞における実験では、紫外線および青色光照射により γH2AX レベルの顕著な上昇が確認された。しかし、ゼブラフィッシュ胚では紫外線照射による γH2AX レベルの上昇は確認されず、脱リン酸化などが照射後の復帰過程で誘導される可能性が示唆された。CPD、6-4 PP は、培養細胞とゼブラフィッシュ胚の両方で紫外線照射のみに顕著な上昇が確認された。

Previously, we reported that blue light induces DSBs and SSBs as well as oxidative damage of pyrimidine and purine bases in cultured cell lines. This study focused on the formation of DSBs and base damage, investigating the effects of UVC and blue light on DNA integrity during zebrafish embryogenesis. We also compared these effects with data obtained from cultured cell lines. The human HaCaT keratinocyte cell line and murine B16F1 melanoma cells were used in this study. DSB detection involves identification of the γH2AX using confocal microscopy. CPD, 6-4 PP, and Dewar PP were detected using ELISA and confocal microscopy. B16F1 melanoma cells showed a significant increase in γH2AX levels after exposure to UVC and blue light. However, γH2AX levels did not change in UVC-irradiated zebrafish embryos, suggesting the possibility of induced dephosphorylation or other post-irradiation recovery processes. CPD and 6-4 PP showed significant increases in both cell lines and zebrafish embryos following UVC exposure.

DNA damage, blue light, zebrafish

発表責任者：廣谷陸（tlxm23221@stu.tamagawa.ac.jp）

講演番号：2D6p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 D6 会場

ケヅメリクガメの TRPV1 遺伝子の解析
Analysis of TRPV1 in *Geochelone sulcata*
○海老原 充（関東学院大理工）
○Mitsuru EBIHARA (Kanto-gakuin Univ.)

Spicy food, such as chili peppers elicit painful sensation for almost all mammals. Recently, it has shown that some animals, such as tree shrew or chicken, consume spicy food. In tree shrew, single point mutation in transient receptor potential vanilloid type-1(TRPV1) lowers its sensitivity to capsaicin. In chicken, mutation of A578 residue of cTRPV1 is critical for capsaicin-induced activation. TRPV1 is important for sensing the temperature of environment as well. For cold-blooded animals, sensing the temperature of their environment and moving to areas with appropriate temperatures is essential for survival. *Geochelone sulcata* (African spurred tortoise), which lives in Africa, is known to burrow underground during the day to escape the heat, suggesting that they sense temperature of their environment. We cloned TRPV1 gene from G. sulcata and compared with those of human, mouse, chicken and tree shrew. A579, which is critical to sensing capsaicin in chicken was found in TRPV1 of *G. sulcata*, but E589, which is also important for sensing capsaicin, was conserved, suggesting that TRPV1 of *G. sulcata* sense temperature of their environment. Sensing of temperature in cold-blooded animals is discussed.

TRPV1, tortoise, capsaicin

発表責任者：海老原充（ebihara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：2D7a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 D7 会場

未利用資源由来多糖・オリゴ糖の調製と構造活性相関

Preparation and structure-activity relationships of poly- and oligosaccharides from unutilized resources

○藤澤 萌[1]、二階堂 望[1]、太田 空良[2]、上野 裕太郎[2]、渡邊 崇[1,2]、尾形 慎[3]、戸谷 一英[1,2]([1]一関高専・化学バイオ、[2]一関高専・専攻科、[3]福島大・農)
○Moe FUJISAWA[1], Nozomi NIKAIDO[1], Sora OHTA[2], Yutaro UENO[2], Takashi WATANABE[1,2], Makoto OGATA[3], Kazuhide TOTANI[1,2] ([1]Natl. Inst. Tech., Ichinoseki Col., Chem. Eng. & Biotech., [2]Natl. Inst. Tech., Ichinoseki Col., Adv. Eng. Crs., [3]Fukushima Univ., Fac. Food & Agric. Sci.)

ポストコロナにおいて、免疫力を高める機能性食品の摂取は有意義である（SDGs 3)。エビやカニ殻には α-キチンが、イカ中骨には β-キチンが、キノコには β-グルカンやキチンが含まれており、未利用廃棄物資源の有効利用が検討されてきた（SDGs 12)。これまでに、キチン 10 糖以上が IL-6 の産生を増強すること(Hayashi ら、2019)、β-グルカンの低分子量画分が NO 合成、TNF-α 産生の抑制能が増強すること(Fuchs ら、2018)が明らかとなっている。しかしながら、キチンやキチンオリゴ糖の粒子径や重合度、分子量と免疫活性の相関は必ずしも明らかになっていない。また、水溶性多糖の事例として、低分子型の β-グルカンの絶対分子量と免疫活性の違いも明確にしたい。

本研究では、未利用資源由来の多糖・オリゴ糖における免疫活性の構造活性相関を明らかにするために、ビーズミル粉砕によるキチンナノ粒子や、様々な分子量の多糖、リゾチームの糖転移反応を利用した高重合度のキチンオリゴ糖を調製し、これらを分画した。これら多糖・オリゴ糖の物性（粒子径、絶対分子量、重合度、結晶化度等）を評価し、マクロファージに対する活性と比較した。

In the post-COVID-19, it is meaningful to consume functional foods that enhance immunity (SDGs 3). Shrimp and crab shells contain α-chitin, squid pens contain β-chitin, and mushrooms contain β-glucan and chitin. The effective use of these unutilized waste resources has been considered (SDGs 12). Previous studies show that chitin oligosaccharides with more than 10 degrees of polymerization enhance the production of IL-6 (Hayashi *et al.*, 2019). Also, the low molecular weight fraction of β-glucan enhances the inhibitory capacity of NO synthesis and TNF-α production (Fuchs *et al.*, 2018). However, the effect of physicochemical properties of these saccharides on immune activity is not clear.

In this study, to clarify the correlation between immune activity and physicochemical properties of polysaccharides and oligosaccharides derived from unused resources, we prepared chitin nanoparticles by bead-milling, polysaccharides of various molecular weights, and highly polymerized chitin oligosaccharides using lysozyme glycosylation reaction and fractionated. We analyzed their physical properties such as particle size, absolute molecular weight, degree of polymerization, *etc.*, and compared with their activity against macrophage strain cells.

chitin, polysaccharides, oligosaccharides

発表責任者：戸谷一英（ktotani@ichinoseki.ac.jp）

講演番号：2D7a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 D7 会場

未利用糖質資源の免疫活性と MPS による評価

Immune activity of unused carbohydrate resources and evaluation with MPS

○和野崎 貴乙[1]、太田 空良[2]、藤澤 萌[1]、二階堂 望[1]、上野 裕太郎[2]、藤原 康宣[1,2]、渡邊 崇[1,2]、大沼 清[3]、長久保 大輔[4]、戸谷 一英[1,2]([1]一関高専・化学バイオ、[2]一関高専・専攻科、[3]長岡技科大・物質生物、[4]姫路獨協大・薬)

○Yoshiki WANOZAKI[1], Sora OHTA[2], Moe FUJISAWA[1], Nozomi NIKAIDO[1], Yutaro UENO[2], Yasunori FUJIWARA[1,2], Takashi WATANABE[1,2], Kiyoshi OHNUMA[3], Daisuke NAGAKUBO[4], Kazuhide TOTANI[1,2] ([1]Natl. Inst. Tech., Ichinoseki Col., Chem. Eng. & Biotech, [2]Natl. Inst. Tech., Ichinoseki Col., Adv. Eng. Crs, [3]Nagaoka Univ. Tech., Matl. Sci. & BioEng, [4]Himeji Dokkyo Univ., Fac. Pharm. Sci)

我々は，未利用糖質資源を人の健康に資する機能性食品として再利用することで，SDGs 3 および 12 の達成に貢献したい．本研究では，免疫活性を評価するための未利用資源由来のサンプルとして，カニ殻由来の α-キチン，イカ中骨由来の β-キチン由来のナノ粒子（1 μm 以下），低重合度および高重合度キチンオリゴ糖，各種 β-グルカンを使用した。これらサンプルをマクロファージ様ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 に加え，炎症性サイトカイン TNF-α の分泌量を ELISA にて測定した．THP-1 において、サンプル単体では α-キチンナノ粒子のみが顕著に TNF-α 産生を誘導した。キチンオリゴ糖は重合度が高くなるにつれて TNF-α 産生量が増加した。

また，評価系として生体模倣システム（MPS）に着目した．MPS は，USB サイズの樹脂やガラス基板の内部に臓器や組織を模した微小空間が構築されている．動物実験代替法の制定により化粧品分野において世界 44 カ国で動物実験が規制されたため，MPS によって動物実験に代わる評価系を構築したい．我々は，THP-1 培養系を MPS で構築し，潅流条件で TNF-α の産生量を測定し，免疫活性を評価した．

We want to develop functional foods from unused carbohydrate resources to contribute to the achievement of SDGs 3 and 12. In this study, we prepared α- and β-chitin nanoparticles from crab shells and squid pens, lowly and highly polymerized chitin oligosaccharides, and various β-glucans. These samples were added to THP-1 macrophage cells and measured TNF-α production by ELISA. The α-chitin nanoparticles induced TNF-α production significantly in THP-1. Chitin oligosaccharides also induced TNF-α production increased with increasing degree of polymerization.

We focused on Micro physiological system (MPS) as an evaluation system. It has micro space which imitates organs and tissues in USB-sized resin and glass substrates. Since animal experiments have been regulated in 44 countries in the cosmetics field by enactment of alternatives animal experiments laws. We are trying to construct an evaluation system to replace animal experiments by using MPS. We constructed a THP-1 culture system with MPS, then measured the production of TNF-α under perfusion conditions and evaluated its immune activity.

polysaccharides, immune activity, MPS

発表責任者：戸谷一英（ktotani@ichinoseki.ac.jp）

講演番号：2D7a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 D7 会場

シロイヌナズナ用転移酵素 GATL のペクチン生合成における役割

Role of Glycosyltransferase GATL for Pectin Biosynthesis in Arabidopsis

○濱田 紗愛、砂崎 遥香、石川 和也、家門 絵理、石水 毅（立命館大・生命）
○Sachika HAMADA, Haruka Sunazaki, Kazuya Ishikawa, Eri Kamon, Takeshi Ishimizu (Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

植物細胞壁の主要構成多糖のペクチンは、ガラクツロン酸(GalUA)を主成分とし、ホモガラクツロナン(HG)、ラムノガラクツロナン I (RG-I)、ラムノガラクツロナンⅡ(RG-II)から構成されている。HG を合成する GalUA 転移酵素として、糖転移酵素ファミリー8 (GT8) に属している 15 種類の GAUT が同定されている。RG-I 主鎖を合成する GalUA 転移酵素として、GT116 に属している 8 種類の RGGAT が同定されている。GT8 と GT116 は GT-A フォールドをした立体保持型糖転移酵素でアミノ酸配列相同性が認められる。これらのファミリーに属する糖転移酵素のうち、GT8 に属する 10 種類の GATL の生化学的機能が同定されていない。そこで本研究では、GATL の酵素活性を検出することにより、GATL のペクチン合成における役割を解明することを目的とした。GATL 酵素のいくつかを哺乳動物培養細胞 HEK293 細胞で発現させた。発現させた GATL タンパク質について GalUA 転移酵素活性を検出したため、GATL も GAUT や RGGAT と同様にペクチン合成に関わっていると考えられた。HG、RG-I、あるいは HG と RG-I の接続領域のうち、どの部分の生合成に関わっているのか、議論する。

Plant cell wall polysaccharide pectins are composed of homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan I (RG-I), and II (RG-II), with galacturonic acid (GalUA) as the main component. The galacturonosyltransferases involved in HG synthesis are encoded by 15 *GAUT* genes belonging to the glycosyltransferase family 8 (GT8). The galacturonosyltransferases involved in RG-I main chain synthesis are encoded by 8 *RGGAT* genes belonging to GT116. The glycosyltransferases in GT8 and GT116 are GT-A folded, the retaining glycosyltransferases, and their amino acid sequences have some degree of homology. Among the glycosyltransferases belonging to these families, the biochemical functions of 10 GATLs belonging to GT8 have not been identified yet. In this study, we attempted to elucidate the role of GATLs in pectin biosynthesis by detecting their enzymatic activities. Some GATL proteins were expressed in mammalian cultured HEK293 cells. The galacturonosyltransferase activity was detected in a recombinant GATL protein, suggesting that GATL is involved in pectin synthesis. Based on the experimental results, the role of GATLs in pectin biosynthesis will be discussed.

Galacturonic acid, Glycosyltransferase, Plant cell wall

発表責任者：濱田　紗愛（sb0095sr@ed.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2D7a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 D7 会場

シロイヌナズナ由来の機能未知ガラクトース転移酵素の選抜

Exploration of galactosyltransferases from Arabidopsis glycosyltransferases of unknown function

○福榮 美月、小野 真央、濱田 紗愛、石川 和也、家門 絵理、石水 毅（立命館大・生命）
○Mizuki Fukue, Mao Ono, Sachika Hamada, Kazuya Ishikawa, Eri Kamon, Takeshi Ishimizu (Col. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

植物は糖鎖の含有量が高く、他の生物種に比べて糖鎖構造の多様性もある。このことを反映して、シロイヌナズナやイネなど植物のゲノムには 500~600 個の糖転移酵素遺伝子が存在する。ここ 10 年ほどでいくつかの糖転移酵素の生化学的機能が明らかにされてきているが、多くが機能未知なままである。ペクチン、アラビノガラクタン、キシログルカンなど多くの植物多糖にガラクトース残基が含まれる。また、ペクチンラムノガラクツロナン I 側鎖のガラクタンが植物の柔軟性を決めている因子とされるように、ガラクトース残基と機能との関連に興味が持たれている。そこで本研究では、シロイヌナズナの機能未知糖転移酵素を対象に、ガラクトース転移酵素を選抜することを試みた。十数種類の糖転移酵素を哺乳動物培養細胞 HEK293 細胞にて発現させ、調製した。これらの糖転移酵素について、UDP-Glo アッセイを用いて UDP-ガラクトースに反応する糖転移酵素をいくつか選抜した。これらの糖転移酵素がどの多糖の生合成に関与しているか解析を進めている。

Plants have a high content of glycans and a diversity of glycan structures compared to other species. In fact, there are approximately 500-600 glycosyltransferase genes in the genomes of plants such as Arabidopsis and rice. The biochemical functions of some glycosyltransferases have been revealed in the last decade. However, the functions of many glycosyltransferases remain unknown. Many plant polysaccharides such as pectin, arabinogalactan, and xyloglucan contain galactose residues. There is also interest in the relationship between galactose residues and their functions, as galactan in the side chain of pectin rhamnogalacturonan I determines the flexibility of the plant. In this study, we attempted to select galactosyltransferases from Arabidopsis glycosyltransferases with unknown function. Several recombinant glycosyltransferases were expressed in mammalian cultured HEK293 cells and purified for biochemical assay. Among them, some galactosyltransferases that reacted with UDP-galactose were selected using the UDP-Glo assay. We are now analyzing them to determine which galactosyltransferase is involved in the biosynthesis of which polysaccharides.

galactose, glycosyltransferase, plant

講演番号：2D7a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 D7 会場

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ HS の立体構造と機能発現機構
Three-dimensional structure and functional expression mechanism of endo-β-N-acetylglucosaminidase HS

倉内 郁哉[1]、大倉 和貴[1]、森 真司[1]、米澤 健人[2]、清水 伸隆[2]、田中 里佳[3]、細川 千絵[1]、宮原 郁子[1]、○伊藤 和央[1]（[1]阪公大・院理、[2]KEK・物構研、[3]阪公大・工）
Ikuya KURAUCHI[1], Kazuki OKURA[1], Shinji MORI[1], Kento YONEZAWA[2], Nobutaka SHIMIZU[2], Rika TANAKA[3], Chie HOSOKAWA[1], Ikuko MIYAHARA[1], ○Kazuo ITO[1] ([1]Grad. Sch. of Sci., Osaka Metro. Univ., [2]IMSS, KEK, [3]Fac. of Eng., Osaka Metro. Univ.)

エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼHS(エンド HS)は、Fuc や Sia の存在にかかわらず、アスパラギン結合型糖鎖のうち 2～4 本鎖コンプレックス型糖鎖を、糖タンパク質から特異的に遊離するとともにこれらを転移し、糖鎖工学に有用な酵素である。本研究では、エンド HS の立体構造をもとに機能発現部位やドメインの機能を解析した。GHF85 酵素の触媒部位構成アミノ残基に相当する N216、E218、Y252 の置換酵素のうち、1 アミノ酸置換 N216A、E218Q、E218A 変異酵素の活性は、野生型酵素の 1/1000 以下であった。Y252F 変異酵素では 1/7 で、GHF85 酵素には存在しない Y282 の Y282F 変異酵素では 1/50 となった。2 アミノ酸置換 N216A/Y252F 変異酵素活性は野生型酵素の 1/10000 以下で、N216A/E218Q や E218Q/Y252F の変異酵素と 3 アミノ酸置換 N216A/E218Q/Y252F 変異酵素の活性は検出されなかった。このため、E218 を中心に、E218、N216、Y252、Y282 の 4 つのアミノ酸残基が本酵素の触媒部位を構成していると考えられた。エンド HS は、Hg^{2+}によって可逆的に阻害され、すべての C を 1 つずつ置換しても活性は低下せず、Hg^{2+}は複数の C と結合し阻害すると考えられた。また、E218Q/Y252F 変異酵素は糖鎖を介して糖タンパク質と結合したが、ドメイン IV は単独では結合性しなかった。このため、ドメイン IV はエンド HS を構成した状態で糖鎖との結合に関与すると考えられた。

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidases HS(Endo HS) can release and transfer *N*-glycans of bi, tri, tetra antennary complex type from native glycoproteins even in the presence of Sia and Fuc, and is useful for glycotechnology. In this research, amino acid residues responsible for the activity of Endo HS and the function of domain were investigated based on 3D structure of Endo HS. Conserved amino acid residues of the catalytic site of GHF85 enzyme, E218、N216、Y252 were substituted. Activities of mutant enzymes, N216A、E218Q、E218A were less than 1/1000 of wild type enzyme. The activity of Y252F mutant enzyme was about 1/7. Y282, not conserved in other GHF85 enzymes was substituted and the activity of Y282F mutant enzyme was about 1/50. Activity of double mutant enzyme N216A/Y252F was less than 1/10000. N216A/E218Q or E218Q/Y252F mutant enzyme showed no activity. Triple substitution N216A/E218Q/Y252F mutant enzyme showed no activity. These results indicate that catalytic site of Endo HS is composed of 4 amino acid residues, N216, E218, Y252 and Y282. Endo HS is reversibly inhibited by Hg^{2+}. Single substitution of all cysteine residues did not reduce the enzyme activity, suggesting Hg^{2+} binds to all cysteine residues to inhibit. E218Q/Y252F mutant enzyme bound to glycoproteins through *N*-glycan although domain IV alone did not bind.

endo-β-n-acetylglucosaminidase, three-dimensional structure, domain

講演番号：2D7a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 D7 会場

マトリグリカンオリゴ糖とクラスター分子の合成
Synthesis of matriglycan oligosaccharides and the clusters

○小寺 康太[1]、田村 敬裕[2]、望月 楽斗[3]、田村 純一[1,2,3] ([1]鳥大院農、[2]鳥大院連大農、[3]鳥大農)
○KOTA KOTERA[1], TAKAHIRO TAMURA[2], GAKUTO MOCHIZUKI[3], JUN-ICHI TAMURA[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sustain. Sci., Tottori Univ., [2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tottori Univ., [3]Dep. Life Environ. Agric. Sci., Fac. Agric., Tottori Univ.)

コア M3*O*-マンノシルグリカン(MG)は、筋細胞膜上の糖タンパク質ジストログリカンを修飾する糖鎖である。コア M3 *O*-MG は、細胞外マトリックスであるラミニンと相互作用し、筋繊維を安定化している（Fig. 1)。コア M3 *O*-MG は基質特異性の高い複数の糖転移酵素によって生合成されているが、その糖転移酵素の遺伝的欠失は難病である糖鎖異常型筋ジストロフィー症を引き起こす。最近、*O*-MG の非還元側に存在する、αXyl-βGlcA を繰返し単位とする多糖（マトリグリカン）がラミニンと直接相互作用することがわかってきた。このマトリグリカンの有機合成は、筋ジストロフィー症治療薬の開発に貢献することが期待される。我々はすでにマトリグリカン６糖の合成を達成し、合成糖鎖がラミニンと *in vitro* で相互作用を持つことを示した［１］。今回、より強固なラミニンとの相互作用を目指し、長鎖のマトリグリカンオリゴ糖合成と複数のマトリグリカンオリゴ糖を有するクラスター分子の合成を行ったので報告する。

Muscle fibers are stabilized by the interaction of core M3 *O*-mannosyl glycan (MG) and the extracellular matrix, laminin (Fig. 1). *O*-MG is a glycan that binds to dystroglycan on the cell membrane. Muscular Dystrophy is developed by the defects of *O*-MG. Matriglycan, a pivotal polysaccharide part of the core M3 *O*-MG composed of repeating disaccharide unit, αXyl-βGlcA. Synthesis of the matriglycan can contribute to develop a medicine for muscular dystrophy. We have already achieved the synthesis of a hexasaccharide of matriglycan which has been shown to have an affinity for laminin [1]. Here, we show the synthesis of longer matriglycan including linear oligosaccharides and glycoclusters.

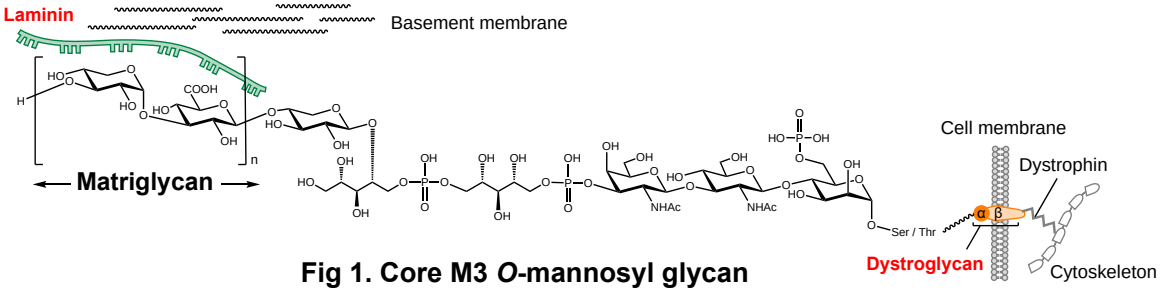


Fig 1. Core M3 *O*-mannosyl glycan

[1] T. Tamura *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2022, *20*, 8489-8500.

matriglycan, oligosaccharide, glycocluster

講演番号：2D7a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 D7 会場

ケラタン硫酸オリゴ糖の化学合成
Chemical synthesis of keratan sulfate oligosaccharide
○服部 怜、岩間 千明、植村 優那、武田-奥田 尚子、田村 純一 (鳥大農)
○REI HATTORI, CHIAKI IWAMA, YUNA UEMURA, NAOKO TAKEDA-OKUDA, JUN-ICHI TAMURA (Dep. Life Environ. Agric. Sci., Fac. Agric., Tottori Univ.)

末梢神経は傷ついても再生修復されるが、脳や脊髄などの中枢神経は、損傷を受けると再生することができない。この神経軸索伸長阻害作用にはコンドロイチン硫酸(CS)と同様にケラタン硫酸(KS)が関係していることが判明しつつある。KS は-3Galβ1→4GlcNAcβ1-からなる二糖繰り返し構造をもつ多糖であり、6 位水酸基の硫酸化パターンやコアタンパク質との結合様式の違いにより、構造多様性をもつ。そのため、KS の構造活性相関の解明を困難にしている。

すでに当研究室では、GlcNAc の 6 位水酸基のみが硫酸化されたビオチン化 KSL2 四糖の合成に成功している [1]。本研究では、神経軸索伸長阻害活性を制御する KS オリゴ糖の微細構造を明らかにするため、最も硫酸化度の高いすべての一級水酸基が硫酸化された L4 型 KS を精密化学合成することにした。

適切に保護された GlcNPhth 受容体と Gal 供与体を縮合し、立体選択的に Galβ1→4GlcNPhth 二糖単位を得た。この二糖を相当する供与体と受容体に誘導し、互いに縮合して四糖を得た。その際に複数の水酸基が遊離であっても所望の位置に優勢に縮合できた。同様の操作を繰り返して糖鎖を伸長し、すべての一級水酸基を硫酸化して、ビオチン化 KSL4 オリゴ糖(Fig.1)の合成に成功した。

Keratan sulfate (KS) is a linear polysaccharide composed of a repeating disaccharide unit, -3Galβ1→4GlcNAcβ1- of which primary hydroxyl groups are often sulfated. KS has structural diversity based on the sulfation patterns and conjugation patterns to the core protein. KS is known to inhibit neuroaxonal elongation. Our group has already synthesized the biotinylated KSL2 tetrasaccharide [1]. Here we report the synthesis of biotinylated longer KSL4 oligosaccharides (Fig.1) in a regio- and stereo-controlled manner.

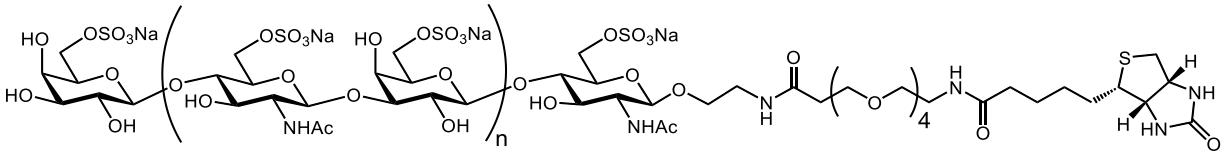


Fig. 1

[1] N. Takeda-Okuda *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **452**, 97-107 (2017).

keratan sulfate, chemical synthesis, glycosaminoglycan

発表責任者：服部 怜（b20a5168z@edu.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2D7a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 D7 会場

養殖銀鮭に含まれるグリコサミノグリカンの組成分析

Compositional analysis of glycosaminoglycans in farmed silver salmons

○北井 悠仁、田村 純一（鳥大農）
○YUJIN KITAI, JUN-ICHI TAMURA (Tottori Univ.)

天然から得られるコンドロイチン硫酸(CS)は、ブタの気管やサメ軟骨のほか、サケの鼻軟骨が原料として用いられる。サケ鼻軟骨は主に、鮭由来水産加工品の製造段階で生じる廃棄物から抽出される。一方で、鮭由来廃棄物の大半を占める鼻軟骨以外の頭部や内臓、鰭類は十分に活用されていない。本研究では鮭由来未利用部位に期待される生化学的な機能を明らかにし、新たな付加価値を与えるために、サケの未利用部位由来グリコサミノグリカン(GAG)の部位特異的な構造多様性について調査した。

安定して供給可能な養殖銀鮭(*Oncorhynchus kisutch*)の鼻軟骨および鼻軟骨以外の頭部、内臓、鰭を部位ごとに細断し、脱脂乾燥した。プロテアーゼによる脱脂乾燥物のタンパク分解を行い、透析し、エタノールを加えて糖鎖成分を沈殿させた。得られた糖鎖は、酵素を用いて不飽和二糖に分解し、HPLCを用いてCS/デルマタン硫酸(DS)およびヒアルロン酸(HA)の硫酸化パターンや、含有量について分析を行った。その結果、各種部位におけるGAGの組成や分布が異なることが判明した。

Commercially available chondroitin sulfate (CS) is often produced from porcine trachea, shark cartilage, and salmon nasal cartilage. However, most parts of salmon such as heads, internal organs, and fins are not fully utilized. Unknown biological importance maybe contained in these parts which prompted us to investigate the details of salmon glycosaminoglycans (GAGs). The waste tissues of farmed silver salmon above were cut into small pieces. The defatted and dried materials were digested by protease. After dialysis and precipitation from ethanol, glycans were obtained. Chondroitinase digestion of the glycans afforded the corresponding unsaturated disaccharides. We analyzed the sulfation patterns and contents of CS/dermatan sulfate (DS) and hyaluronan (HA). We clarified the composition and concentration of the GAGs from different tissues of salmon.

Glycosaminoglycan, Chondroitin sulfate, Dermatan sulfate

講演番号：2D7a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 D7 会場

Elizabethkingia 属細菌由来 O-glycoprotease の C 末端領域の解析

Analysis of the C-terminal region of O-glycoprotease from *Elizabethkingia miricola*

○高島 晶、黒河内 政樹、八須 和子、水野 真盛、高田 美生（（公財）野口研）
○Shou Takashima, Masaki Kurogochi, Kazuko Hachisu, Mamoru Mizuno, Yoshio Takada (The Noguchi Inst.)

O-glycoprotease は糖タンパク質上の 0 型糖鎖を認識し、その近傍のペプチド結合を切断する一群のプロテアーゼ/ペプチダーゼの総称である。この酵素は糖タンパク質から 0 型糖鎖含有ペプチドを産生することから、0 型糖鎖の構造や結合部位を解析する O-グライコプロテオミクスでの活用が期待されている。本研究では、core1 型 0 型糖鎖をおもに認識してその近傍を切断する *Akkermansia muciniphila* 由来の O-glycoprotease (OgpA)の類縁酵素である *Elizabethkingia miricola* 由来の酵素の解析を行なった。本酵素の糖鎖認識能と切断活性を糖ペプチド基質で調べたところ、core1 やα2,3-sialylcore1 の結合部位近傍を切断する活性が認められた。また fetuin などのシアリル 0 型糖鎖含有糖タンパク質に対する切断活性も確認できた。本酵素の C 末端側には OgpA にはない discoidin domain(F5/8 type C domain)とよばれるレクチン様ドメインが存在する。このドメインの欠失体では fetuin に対する切断活性が低下したが、シアリル糖鎖を含まない asialofetuin に対する切断活性は変わらなかった。本ドメインがシアリル 0 型糖鎖の認識に関与していることが示唆される。

O-glycoproteases are enzymes that recognize O-glycans on glycoproteins and cleave the peptide bond near the O-glycosylation site. As O-glycoproteases generate O-glycosylated peptides from glycoproteins, they are expected to be used as an analytical tool for O-glycoproteomics. In this study, the O-glycoprotease from *Elizabethkingia miricola*, which is a homolog of the O-glycoprotease from *Akkermansia muciniphila* (OgpA), was analyzed. This enzyme mainly cleaved the peptide bond near the O-glycosylation site with core1 and α2,3-sialylcore1 type O-glycans and exhibited activity toward sialylated O-glycan-containing glycoproteins such as fetuin. This enzyme has a lectin-like domain called the discoidin domain (F5/8 type C domain) in the C-terminal region. Deletion of this domain affected the cleavage activity toward fetuin but not asialofetuin, suggesting that the domain should be involved in the recognition of sialylated O-glycans.

O-glycoprotease, O-glycoproteomics, O-glycan

発表責任者：高島　晶（staka@noguchi.or.jp）

講演番号：2D7a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 D7 会場

乳由来シアリル糖ペプチドに含まれるシアル酸含有 *O* 結合型糖鎖の定性および定量分析

Qualitative and quantitative analysis of sialylated *O*-glycans in milk-derived sialylglycopeptide concentrate

○樋口 淳一[1]、黒河内 政樹[2]、三塚 翔[1]、石田 祐子[1]、福留 博文[1]、野々山 典子[1]、山口 敏幸[1]、水野 真盛[2]、郷田 雅之[1]、酒井 史彦[1]([1]雪印メグミルク（株） ミルクサイエンス研究所、[2]（公財）野口研究所 糖鎖有機化学研究室)

○Junichi HIGUCHI[1], Masaki KUROGOCHI[2], Sho MITSUDUKA[1], Yuko ISHIDA[1], Hirofumi FUKUDOME[1], Noriko NONOYAMA[1], Toshiyuki YAMAGUCHI[1], Mamoru MIZUNO[2], Masayuki GOTA[1], Fumihiko SAKAI[1] ([1]Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co., Ltd., [2]Laboratory of Glyco-organic Chemistry, The Noguchi Institute)

シアル酸を含有する食品素材は、病原体に対する感染防御やプレバイオティクスなどの保健機能を有する。我々はこれまでに、チーズホエイ由来の乳素材からシアル酸含有 *O* 結合型糖鎖を有する乳由来シアリル糖ペプチド（milk-derived sialylglycopeptide, mSGP）を濃縮し、そのビフィズス菌増殖促進能を明らかにした[1]。mSGP は多様な構造の *O* 結合型糖鎖から成るが、それらの組成や含有量は不明である。本研究では、mSGP の *O* 結合型糖鎖を定性的および定量的に分析した。チーズホエイ由来のホエイタンパク質分離物（WPI）を食品加工用のプロテアーゼで処理した後、分画分子量 1,000 の限外ろ過膜で濃縮および透析ろ過を行い、濃縮液を凍結乾燥して mSGP 濃縮物を得た。mSGP 濃縮物のシアル酸含量は 16.4% (w/w)であり、原料の WPI（シアル酸含量 1.3%）から約 12 倍増加した。次に、市販の *O* 結合型糖鎖解析キットを用いて mSGP 濃縮物に含まれる *O* 結合型糖鎖を遊離・蛍光標識した後に LC/FLD で解析した結果、5 種類の *O* 結合型糖鎖が検出された。LC/FLD で得られたそれぞれの糖鎖の面積値を比較したところ、3 種類のシアリルコア 1 型糖鎖（Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc (**1**)、Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc (**2**)、Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc (**3**)）が 90%以上を占めた。mSGP 濃縮物から精製した均一な糖ペプチドを標準物質として *O* 結合型糖鎖解析キットの検量線を作成し、mSGP 濃縮物に含まれる 3 種類のシアリルコア 1 型糖鎖 **1–3** を定量した。その結果、糖鎖 **1** が 20.4% (w/w)、糖鎖 **2** が 2.2% (w/w)、糖鎖 **3** が 0.3% (w/w)であった。この結果から、mSGP 濃縮物はシアリルコア 1 型の *O* 結合型糖鎖を 20% (w/w)以上含有する食品素材であることが明らかとなった。

Sialylated glycans have several biological functions. We have previously reported the preparation of milk-derived sialylglycopeptide (mSGP) concentrate containing sialylated *O*-glycans from an ingredient derived from cheese whey and its bifidogenic activity [1]. In this study, we performed qualitative and quantitative analysis of sialylated *O*-glycans in mSGP. mSGP concentrate was prepared by proteolytic digestion and ultrafiltration of whey protein isolate. LC/FLD analysis showed that the *O*-glycans of mSGP were mainly composed of three types of sialylated core1 *O*-glycans. These three *O*-glycans contained a total of 22.9% (w/w) in mSGP concentrate, of which the disialylated core1 *O*-glycan accounted for more than 80%. These results reveal that mSGP concentrate is a food material with a high sialylated core1 *O*-glycan content.

[1] Fukudome *et al.*, *J. Dairy. Sci.* 104, 1433-1444 (2021).

sialic acid, sialylglycopeptide, *O*-glycan

発表責任者：樋口 淳一（junichi-higuchi@meg-snow.com）

講演番号：2D7a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 D7 会場

ヒドロキシ脂肪酸（2-HOT）の化学合成と抗真菌活性
Chemical synthesis of hydroxy fatty acid (2-HOT) and the antifungal activity
○土肥 博史[1,2]、田中 萌瑛[1]、山本 和加子[1]、島田 貴士[1] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大 MCRC)
○Hirofumi DOHI[1,2], Moe Tanaka[1], Wakako Yamamoto[1], Takashi Shimada[1] ([1]Chiba Univ., [2]Chiba Univ. MCRC)

炭疽病菌は植物に付着して炭疽病を誘発し、これが作物の深刻な品質低下を招き世界中の農業生産効率を大きく低下させている。一方で、植物の葉で産生されるヒドロキシ脂肪酸（2-HOT）が炭疽病菌に対して非常に高い増殖抑制活性を示すことが明らかとなった（ref)。天然物である 2-HOT は環境負荷が低く強力な炭疽病菌防除剤となる可能性を秘めるが、その産生量は極めて少ないため実用化はほど遠い。よって化学合成による入手が有望であるが、現在まで報告例はない。また、ヒドロキシ基が結合したカルボン酸の α 炭素の絶対配置は未だ決定されていない。本研究では 2-HOT の化学合成法を確立するとともに、その立体構造を決定することを目的とした。

まずパルミチン酸エチルを用いてカルボン酸 α 位のヒドロキシ化を検討した。Davis 試薬と様々な塩基を用いて Davis 試薬による酸化反応を検討したところ、KHMDS を用いて THF 中-78 °C で反応させることにより 2-ヒドロキシ体が生成した。同様の反応を α-リノレン酸エチルに施したところ、2-ヒドロキシ体を 64%の収率で得ることに成功した。これをけん化することで 2-HOT をラセミ体として得た。続いてヒドロキシ基を D-グルコースや *N*-アセチルグルコサミンなどの糖誘導体とグリコシル化を行って光学分割し、得られた化合物の炭疽病菌に対する増殖抑制活性を検討した。

Colletotrichum species bacteria attach to plants and induce anthracnose disease, which causes serious deterioration in crop quality and greatly reduces agricultural production efficiency around the world. On the other hand, it has been revealed that hydroxy fatty acids (2-HOT) produced in plant leaves exhibit extremely high growth-suppressing activity against the *Colletotrichum* species bacteria (ref). 2-HOT, a natural product, has potential as a powerful anthrax control agent with a low environmental impact, but its production is extremely small and practical application is far from being achieved. Therefore, it is promising to obtain 2-HOT by chemical synthesis, but there have been no reports to date. Furthermore, the absolute configuration of the α carbon of 2-HOT to which a hydroxy group is bonded has not yet been determined. In this study, we attempted to establish a chemical synthesis method for 2-HOT and to determine its three-dimensional structure.

Ref: Shimada, T. L. et al., *Plant Physiol.* 164, 105 (2014).

fatty acid, antifungal activity, glycosides

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2D7a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 D7 会場

ガラクトヘプトース骨格を有する KRN7000 誘導体の合成
Synthesis of KRN7000 derivatives with galactoheptose skelton
○草間 明希[1]、渡邊 健吾[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大 MCRC)
○Akane KUSAMA[1], Kengo WATANABE[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]MCRC, Chiba Univ.)

α-GalCer 構造を有する KRN7000 は、NKT 細胞を強力に活性化し多量のサイトカインを産生誘導する。現在まで、免疫賦活活性型もしくは免疫抑制活性型のサイトカインのどちらかに偏った産生誘導させることを目的として数多くの α-GalCer 誘導体が合成されてきた。我々は新たな KRN7000 類縁体としてガラクトヘプトースを糖骨格にもつ化合物を設計し、D-*glycero* 型ガラクトヘプトースを持つ α-GalCer 誘導体の合成を完了した（ref)。しかし、ガラクトヘプトース 6 位の酸化反応の立体選択性が乏しいため D-*glycero* 体の収率が低く、また 6 位における立体反転反応が進行しなかったため L-*glycero* 型が得られていない。本研究では、D-*glycero* 体の収率の改善、ならびにグルコヘプトース誘導体の立体反転を経る合成経路による L-*glycero* 体の合成を行った。まず立体選択的還元反応による D-*glycero* 体の収率の改善を試みた。ガラクトヘプトース誘導体のジアステレオ混合物のヒドロキシ基を酸化後、得られたケトンに対して様々な条件で還元反応を行った。その結果、$NaBH_4$ を用いて THF 中、−78 ℃で反応させることでとして D-*glycero* 体を高選択的に得ることに成功した（D/L=12/1)。続いて L-*glycero* 体の合成を行った。4 位を NAP 基、2,3 位をベンジル基で保護したメチル α-D-グルコピラノシドを調製後、6 位を Swern 酸化によりアルデヒドに変換してから Wittig 反応を施してアルケンとした。続いてオスミウム酸化によりジオール化してグルコヘプトース骨格を D/L 混合物として得た。得られたアルコールをトリフレート化し、酢酸セシウムによる立体反転反応を検討した。

KRN7000, which has an α-GalCer structure, strongly activates NKT cells and induces the production of large amounts of cytokines. To date, many α-GalCer derivatives have been synthesized with the aim of inducing production biased toward either immunostimulatory or immunosuppressive cytokines. We have previously designed new KRN7000 analogues with a galactoheptose sugar skeleton and completed the synthesis of an α-GalCer derivative with D-*glycero*-type galactoheptose (ref). However, the yield of the D-*glycero* form was low due to the poor stereoselectivity of the oxidation reaction at the 6-position of galactoheptose, and the L-*glycero* form could not be obtained because the inversion at the 6-position did not proceed. In this study, we attempted to improve the yield of D-*glycero* form and to synthesize L-*glycero* form using a synthetic route involving inversion of glucoheptose derivatives.

Ref: 渡邊健吾、髙澤早希、西田芳弘、土肥博史　日本農芸化学会 2021 年度大会

glycolipid, stereoselective synthesis, cytokine

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2D7a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 D7 会場

天然多糖由来多孔質材料の開発
Development of Porous Materials Derived from Natural Polysaccharides

○菅野 憲一[1,2]、上田 麻未[1]、米村 陽[1]、畑中 大和[1]、斉藤 健太郎[1]、石川 健太[2]（[1]近大産理工、[2]近大院産理工）
○Kenichi KANNO[1,2], Asami Ueda[1], Hinata Yonemura[1], Yamato Hatanaka[1], Kentaro Saito[1], Kenta Ishikawa[2] ([1]Fuc. Hum., Kindai Univ., [2]Grad. Hum., Kindai Univ.)

天然多糖の多孔質材料にタンパク質などを吸着・放出可能な材料を開発することを目的として、ローカストビーンガム、キサンタンガム、グアーガム等の凍結・解凍によるクリオゲル化およびタンパク質の吸着を試みた。走査電子顕微鏡より、凍結解凍ゲルには、50μmから 150μmの孔を持つ多孔質構造が観察された。X 線回折（XRD）においては結晶による反射が確認されなかったことから、ポリビニルアルコール（PVA）やカルボキシメチルセルロース（CMC）などにみられる結晶領域の成長によるゲル化は起こっていないことが示された。得られたゲルにタンパク質としてリパーゼを吸着した。リパーゼの吸着を確認するために、タンパク質に含まれる硫黄を SEM-EDX によってマッピングしたところ、ゲル表面や孔の中に硫黄が存在していることが確認できた。リパーゼ吸着ゲルをバッファーに浸漬し、リパーゼの溶出挙動を調べた。ブラッドフォード試薬を用いてその吸光度の経時変化を追ったところ、6 時間後にはほぼ吸光度はプラトーに達していることが分かった。

We aimed to develop a porous natural polysaccharide material capable of adsorbing and releasing proteins. Various natural polysaccharides, such as locust bean gum, xanthan gum, guar gum, etc., underwent a freeze-thaw process to form cryogels. Examination under a scanning electron microscope revealed a porous structure in these gels, featuring pores ranging from 50 μm to 150 μm.

X-ray diffraction (XRD) revealed the absence of crystal peaks in these gels, suggesting that gelation attributed to the growth of crystalline regions observed in polyvinyl alcohol (PVA) and carboxymethyl cellulose (CMC) did not take place. Lipase was adsorbed onto the resultant gel as a protein. By using SEM-EDX, sulfur mapping was conducted on the gel surface to verify the presence of lipase on the pore surface. The release behavior of lipase from the gel in phosphate-buffered saline was monitored by tracking changes in absorbance over time using Bradford reagent.

cryogel, polysaccharide, SEM-EDX

講演番号：2D7a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 D7 会場

組換えヒトインテレクチン-1 の糖結合特異性

Carbohydrate-binding specificity of recombinant human intelectin-1

○林 勇輝、鷲見 勇吾、伊藤 誌小里、奥村 裕紀、氏田 稔 (名城大院農)
○Yuki HAYASHI, Yugo SUMI, Shiori ITO, Hiroki OKUMURA, Minoru UJITA (Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

ヒトインテレクチン-1（hITLN-1）は、小腸上皮細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞で発現するラクトフェリン受容体である。hITLN-1 はガラクトース結合レクチンであり、微生物の細胞壁に存在するガラクトフラノシル残基を認識することが報告されている。そのため、生体防御にも関与していると考えられている。しかし、hITLN-1 の詳細な糖結合特異性は未解明である。

そこで、hITLN-1 の詳細な糖結合特異性を解明するために、hITLN-1 に蛍光タンパク質である AcGFP1 を融合した組換え hITLN-1 を用いて、結合実験を行った。最初に、ガラクトース関連糖をリガンドに持つ、数種の不溶性糖鎖ゲルに対する組換え hITLN-1 の結合活性を調べた。続いて、数種の可溶性糖を用いて競合的結合実験を行い、組換え hITLN-1 の不溶性糖鎖ゲルへの結合が阻害されるかどうかを調べた。

その結果、組換え hITLN-1 はガラクトース関連糖に弱く結合し、可溶性糖の添加によって結合が阻害されないことが明らかとなり、本組換えタンパク質は hITLN-1 の生物学的機能の解明に役立つことが示唆された。

Human intelectin-1 (hITLN-1) is a lactoferrin receptor expressed in small intestinal epithelial cells, vascular endothelial cells, and adipocytes. hITLN-1, which is a galactose-binding lectin, has been reported to recognize galactofuranosyl residues present in the cell walls of microorganisms. Therefore, hITLN-1 is thought to be involved in host defense. However, carbohydrate-binding specificity of hITLN-1 remains unclear.

To elucidate carbohydrate-binding specificity of hITLN-1, recombinant hITLN-1 fused with the fluorescent protein AcGFP1 was used. We investigated the binding of recombinant hITLN-1 to insoluble gels containing galactose-related carbohydrates. Competitive binding studies were conducted to investigate whether the binding of recombinant hITLN-1 to the insoluble gels is inhibited by the addition of soluble carbohydrates.

It was revealed that recombinant hITLN-1 weakly binds to the insoluble gels containing galactose-related carbohydrates and the binding is not inhibited by soluble carbohydrates. These results suggest that this recombinant hITLN-1 can be used as a useful tool in elucidating the biological functions of hITLN-1.

human intelectin-1, carbohydrate-binding specificity, AcGFP1 fusion protein

発表責任者：氏田　稔（ujita@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2D7p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 D7 会場

トランスクリプトーム解析によるイネディフェンシン由来ペプチドの作用メカニズムの解析
Analysis of the action mechanism of peptides derived from rice defensin by transcriptome analysis
○落合 秋人[1,2]、東海林 裕翔[1]、芦原 紗喜[1]、大橋 一登[3]、谷口 正之[4]、提箸 祥幸[5]、田中 孝明[1,2]
([1]新潟大院自然研、[2]新潟大工、[3]群大・生調研、[4]新潟青陵短大・人間総合、[5]農研機構・生物研)
○ Akihito OCHIAI[1,2], Hiroto TOKAIRIN[1], Saki ASHIHARA[1], Kazuto OHASHI[3], Masayuki TANIGUCHI[4], Yoshiyuki SAGEHASHI[5], Takaaki TANAKA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Dep. of Mat. Technol., Niigata Univ., [3]IMCR, Gunma Univ., [4]Dep. of Liv. Stu., Niigata Seiryo Jnr. Col., [5]NIAS/NARO)

ディフェンシンは先天性免疫系において機能する抗菌ペプチドである。当研究室では、イネディフェンシン OsAFP1 がヒト病原性真菌に対してアポトーシスを誘導することにより抗菌活性を示すことを見出した。また、OsAFP1 と同様の作用メカニズムを示す短鎖型ペプチド OsAFP1-8L を設計した。本研究では、主にトランスクリプトーム解析と遺伝子破壊株を使用して OsAFP1-8L の詳細なメカニズムを明らかにするとともに、既存の抗真菌薬であるフルコナゾールとの協奏作用を評価した。

FITC 標識ペプチド用いた試験およびペプチド-脂質相互作用試験により、OsAFP1-8L は細胞膜表面に蓄積し、細胞膜に存在する脂質成分のひとつである PI(3)P に最もよく結合することがわかった。マイクロアレイ遺伝子解析の結果、細胞壁の組織化または生合成、イオン輸送、浸透圧ストレスへの応答関連遺伝子の発現が増加した。これらの結果から、上記ペプチドが真菌細胞壁に作用し、細胞内外のイオン輸送に影響を及ぼすとともに、シグナル伝達経路にも影響を及ぼすことが示唆された。また、フルコナゾールと OsAFP1-8L を同時処理した結果、低濃度の OsAFP1-8L はフルコナゾールの効果を協奏的に強化することを見出した。

Defensins are antimicrobial peptides that function in the innate immune system. In our laboratory, we found that rice defensin OsAFP1 exhibits antimicrobial activity against human pathogenic fungi by inducing apoptosis. We also designed a short-chain peptide, OsAFP1-8L, which exhibits a similar mechanism of action as OsAFP1. In this study, we mainly used transcriptome analysis and gene disruption strains to elucidate the detailed mechanism of OsAFP1-8L and to evaluate its concerted action with fluconazole, an existing antifungal drug.

FITC-labeled peptide and peptide-lipid interaction studies showed that OsAFP1-8L accumulates on the cell membrane surface and binds best to PI(3)P, one of the lipid components present in the cell membrane. Microarray gene analysis revealed increased expression of genes related to cell wall organization or biosynthesis, ion transport, and response to osmotic stress. These results suggest that the above peptides act on the fungal cell wall and affect ion transport into and out of the cell as well as signal transduction pathways. In addition, simultaneous treatment with fluconazole and OsAFP1-8L revealed that low concentrations of OsAFP1-8L concertedly enhanced the effects of fluconazole.

antifungal, peptide, action mechanism

発表責任者：落合秋人（ottie@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2D7p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 D7 会場

イネ由来多機能性ペプチドの機能性向上に関する研究

Studies on functional improvement of multifunctional peptide from rice

○遠藤 めい[1]、東海林 裕翔[1]、鈴木 優飛[1]、谷口 正之[2]、田中 孝明[1]、落合 秋人[1] ([1]新潟大院自然研、[2]新潟青陵短大・人間総合)
○Mei ENDO[1], Hiroto TOKAIRIN[1], Yuhi SUZUKI[1], Masayuki TANIGUCHI[2], Takaaki TANAKA[1], Akihito OCHIAI[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Dep. of Liv. Stu., Niigata Seiryo Jnr. Col.)

イネ由来α–アミラーゼ由来のペプチドAmyI-1–18は抗菌ペプチドとして見出され、*Porphyromonas gingivalis* などのヒト病原性微生物に対して広範な抗菌作用を示す。一方で、AmyI-1–18 は細菌内毒素の中和や一酸化窒素産生の抑制による抗炎症作用、細胞遊走や血管新生の促進による創傷治癒効果など多様な生理活性を示す。本研究では、AmyI-1–18 を高血圧治療薬としての可能性を探るとともに、応用を目指して AmyI-1–18 の安定性の向上を進めた。

レニン・アンジオテンシン系において高血圧に関与するアンジオテンシン変換酵素 ACE1 に対する AmyI-1–18 の効果を調べた。活性試験は、ACE1 溶液と合成蛍光基質（Hip-His-Leu）用いて行った。その結果、IC_{50}=57μM で AmyI-1–18 は ACE1 阻害活性を示したことから、AmyI-1–18 は高血圧治療薬として応用できる可能性が考えられた。また、AmyI-1–18 の欠点は消化酵素の影響を受けやすいことである。本研究では、その ACE1 阻害活性の特性を報告するとともに、PEG 化剤である SUNBRIGHT ME-050CS を用いて AmyI-1–18 の耐消化性の向上を試みたので報告する。

AmyI-1-18, a peptide derived from rice-derived α-amylase, is found as an antimicrobial peptide and shows broad-spectrum antimicrobial activity against human pathogenic microorganisms such as *Porphyromonas gingivalis*. On the other hand, AmyI-1-18 exhibits diverse physiological activities, including neutralization of bacterial endotoxins, anti-inflammatory effects by suppressing nitric oxide production, and wound healing effects by promoting cell migration and angiogenesis. In this study, we explored the potential of AmyI-1-18 as a therapeutic agent for hypertension and improved the stability of AmyI-1-18 for pharmaceutical applications.

The effect of AmyI-1-18 on ACE1, an angiotensin-converting enzyme involved in hypertension in the renin-angiotensin system, was investigated. The activity was tested using ACE1 solution and a synthetic fluorescent substrate (Hip-His-Leu). The results showed that AmyI-1-18 exhibited ACE1 inhibitory activity at IC50=57μM, suggesting that AmyI-1-18 may be applicable as a therapeutic agent for hypertension. Another drawback of AmyI-1-18 is its susceptibility to digestive enzymes. In this study, we report the characterization of its ACE1 inhibitory activity and our attempt to improve the digestion resistance of AmyI-1-18 using SUNBRIGHT ME-050CS, a PEGylated agent.

multifunctional peptide, angiotensin converting enzyme, inhibitor

発表責任者：落合秋人（ottie@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2D7p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 D7 会場

保護単糖による表面修飾シリカ粒子の合成と相互作用
Synthesis and interaction of silica particles surface-modified with protected carbohydrates
○加藤 佑介[1]、鈴木 綾乃[1]、中村 彩乃[1]、内田 司[1]、蟹江 善美[3]、蟹江 治[1,2] ([1]東海大 院、[2]東海大 工、[3]東海大 技)
○Yusuke KATO[1], Ayano SUZUKI[1], Ayano NAKAMURA[1], Tsukasa UCHIDA[1], Yoshimi KANIE[3], Osamu KANIE[1,2] ([1]Grad Sch Eng, Tokai Univ, [2]Dept Appl Biochem, Tokai Univ, [3]Tech Joint Mgmt Office, Tokai Univ)

特定の分子に対するバイオセンサーにおいて、分子を認識する素子部分は多くの場合タンパク質で構成されている。それらタンパク質を人工的に模倣することが出来れば、幅広い分野に利用が可能である。タンパク質は熱に不安定であり長期間の使用において問題がある。様々な分子をセンシングする基本技術となりうる基礎研究として、私達の研究室では安定性が高く表面積が大きいメソポーラスシリカと低分子で安定した 6 員環構造を持った糖に注目し、分子認識素子の研究に取り組んだ。本研究では糖誘導体の合成とこれを用いて表面を修飾したシリカゲル粒子（球状、TLC）の調整を行い、水の影響を受けにくい共焦点ラマン顕微鏡にて分子間相互作用の解析を行った。アノマー異性体、ならびに官能基としての保護基の効果について検討を行うため各糖誘導体の合成を行い、共焦点ラマン顕微鏡にて糖修飾シリカゲルとニトロベンゼン類縁体との相互作用を水中にて検討した。その結果パラニトロフェノールとの相互作用が強く検出でき、この相互作用は糖誘導体や保護基の種類、糖の表面密度によって変化する事が明らかになった。これらのことから糖修飾シリカゲルのセンシング素子としての有用性を示すことが出来た。

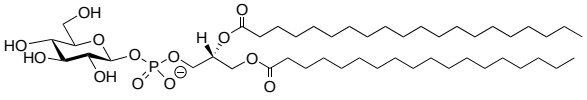
Biosensors play a pivotal role in diagnosis through specific receptor ligand interactions. However, receptor biomolecules such as proteins have inevitable in stability problems due to denaturation. Alternatively, utilization of the small molecules multivalently presented on porous silica particles as receptor components is considered to address the stability problems. We synthesized silica particles decorated with carbohydrate as receptor components. Carbohydrate derivatives were synthesized to study the effect of anomeric isomers and protecting groups as functional groups. We then examined the interaction of the surface-modified silica particles and nitrobenzene analogs using laser-scanning Raman microscopy. Relatively strong interactions were observed for p-nitrophenol depending on the sugar used and the protecting groups.

chemical sensing, protected carbohydrates, Surface-modified silica

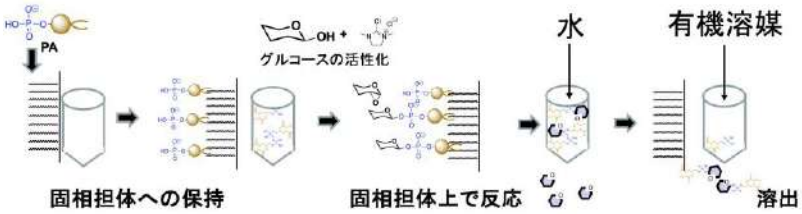
講演番号：2D7p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 D7 会場

ホスファチジルグルコシドの固相合成
Solid phase synthesis of PtdGlc
○松尾 一郎[1]、藤原 駿佑[1]、狩野 航輝[1]、グレイメル ピータ[2]、平林 義雄[2,3]、石井 希実[1]([1]群馬大院理工、[2]理研、[3]順天大院医)
○ Ichiro Matsuo[1], Shunsuke Fujiwara[1], Koki Kano[1], Peter Greimel[2], Yoshio Hirabayashi[2,3], Nozomi Ishii[1] ([1]Gunma Univ., [2]RIKEN, [3]Juntendo Univ.)

ホスファチジルグルコシド（PtdGlc）とはグリセロールの *sn*-1 位に C18:0、*sn*-2 位に C20:0 の飽和脂肪酸にグルコースがβ結合した構造からなる糖リン脂質で、2001 年に長塚らによって哺乳動物から初めて見出された [1]。近年、PtdGlc の代謝産物が GPR55 を介した神経軸索ガイダンス活性を有することが見出されたことを契機に PtdGlc とその誘導体の生物機能が注目されている [2]。しかし、これら PtdGlc 分子は生物試料中には微量にしか存在しないため、さらなる機能解明研究には十分量のサンプル供給が必要であった。我々は、水溶液中 D-グルコースと PA（18:0, 20:0）を 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド:DMC [3] で処理することで一段階の反応で PtdGlc が得られることを明らかにした [4]。
本研究では、PtdGlc の更なる簡便合成を目指して固相合成法へと展開した。具体的には、市販の PA(16:0, 16:0)を固相担体に吸着させたカラムを作成、その後、DMC で活性化したグルコース溶液を通液、ついで有機溶媒で溶出することで PtdGlc が純度よく得られることを明らかにした。



ホスファチジルグルコシド（PtdGlc）



Phosphatidylglucoside (PtdGlc) is a minor glycophospholipid expressed in the central nervous system of embryonic mice [1]. The biological functions of PtdGlc and its derivatives have attracted attention following the discovery that metabolites of PtdGlc:lysoPtdGlc have neuroaxonal guidance activity via GPR55 [2]. Recently, we reported the direct glycosylation to phosphatidic acid using 2-chloro-1,3-dimethyl-imidazolinium chloride-mediated activation with unprotected D-glucose in aqueous media [4]. In this study, we report the results of developing a solid phase synthesis method for the facile synthesis of PtdGlc.
[1] Y. Nagatsuka *et al.*, 2001, *FEBS Lett.* 497, 141–147.; [2] A. T. Guy, *et al.*, *Science* 2015, 349, 974–977.;
[3] T. Tanaka, S. Shoda *et. al, Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 2154–2157.;[4] K. Kano, *et al., Org. Biomol. Chem.* 2023, 21, 2138-2142.

Phosphatidylglucoside, Solid phase synthesis, 2-chloro-1,3-dimethyl-imidazolinium chloride

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2D7p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 D7 会場

複合型糖鎖を用いた抗体糖鎖特異的 ENGase（Endo-S）の活性検出

Detecting activity of Endo-S, an ENGase selectively hydrolyzes the glycans on IgG

○石井 希実、野口 智恵、井上 周征、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Nozomi ISHII, Tomoe NOGUCHI, Shusei INOUE, Ichiro MATSUO (Grad. Sch. Sci. Technol., Gunma Univ.)

Streptococcus pyogenes 由来のエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）である Endo-S は、抗体の Fc 領域に付加しているアスパラギン（*N*-）結合型糖鎖に特異的に作用し糖鎖を切り出す[1]。創薬分野において、Endo-S は抗体医薬品の糖鎖構造解析による品質管理のために必須の酵素であるが、Endo-S の酵素活性を高感度かつ簡便に検出できる化学プローブはない。そこで本研究では、Endo-S 活性を蛍光検出により追跡可能な Endo-S によって切断されると光る糖鎖分子プローブを開発することを目的とした。我々はこれまでに *N*-結合型糖鎖のコア 5 糖構造の分岐部分に蛍光性置換基、糖鎖還元末端部分に消光性置換基を導入することで ENGase の活性を簡便に検出できる糖鎖分子プローブを報告している。また、糖鎖構造を拡張し、フコシル化コア 6 糖、オリゴマンノース型糖鎖、混成型糖鎖、複合型糖鎖構造のプローブにより由来の異なる種々の ENGase の活性検出が可能になることを見出した。しかし、いずれの糖鎖プローブでも Endo-S の活性を検出することはできなかった。そこで糖鎖の分岐部分に蛍光基をもたない天然型の複合型糖鎖基質を用いて、Endo-S の活性を確認したところ、天然型基質は Endo-S によって切断されることを見出した。すなわち、蛍光基が Endo-S による糖鎖切断を阻害していたことが明らかとなった。本発表では、Endo-S の活性検出に向けて糖鎖プローブデザインを工夫した結果について報告する。

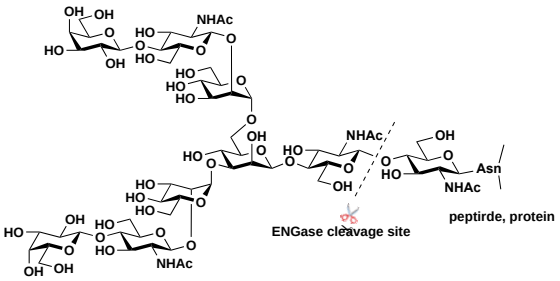


Fig. Typical structure of complex type *N*-glycan

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidases (ENGases) from *Streptococcus pyogenes*[1], Endo-S, hydrolyzes the chitobiose core of the asparagine-linked glycan on immunoglobulin G. To detect ENGase activity conveniently, we aim to develop Förster resonance energy transfer (FRET) type substrates with *N*-glycans structure carrying a fluorescent group and a quenching group. In our previous study, we have synthesized glycan probes with different structures of *N*-glycan, i.e., core pentasaccharide, core-fucosylated hexasaccharide, biantennary asialocomplex type nonasaccharide, fucosylated complex type decasaccharide, oligomannose type heptasaccharide, and hybrid type nonasaccharide. However, none of the glycan probes has detected Endo-S activity. In this session, we will present the new design of the glycan probe for Endo-S, the glycan probe's synthesis, and the hydrolysis results of the synthesized glycan probe.

[1] M. Collin *et al.*, *EMBO J.* 20, 3046-3055 (2001).

endo-ß-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase), complex type glycan, enzyme assay

発表責任者：石井希実（nozomiishii@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2D7p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 D7 会場

細胞壁多糖α-1,3-グルカン依存的凝集性の評価系構築に向けたα-1,3-グルカノオリゴ糖被覆 ビーズの作製

Preparation of α-1,3-glucanooligosaccharide-coated beads for evaluation of α-1,3-glucan-dependent aggregation

○竹俣 海志[1]、宮澤 拳[1]、小泉 亜未[1]、吉見 啓[2,4]、目黒 康洋[1]、佐藤 伸一[5]、岩田 忠久[3]、木村 聡[3]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院農、[2]東北大未来研、[3]東大院農、[4]京大院地環学、[5]東北大院学際研)
○ Kaishi TAKEMATA[1], Ken MIYAZAWA[1], Ami KOIZUMI[1], Akira YOSHIMI[2,4], Yasuhiro MEGURO[1], Shinichi SATO[5], Tadahisa IWATA[3], Satoshi KIMURA[3], Keietsu ABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ., [4]Grad. Sch. Agric. Sci., Kyoto Univ., [5]Front. Res. Inst. Interdiscip. Sci., Tohoku Univ.)

α-1,3-グルカン（AG）は *Aspergillus* 属菌の主要な細胞壁成分の一つであり、液体振盪培養時に菌糸接着因子として機能し、菌糸塊を形成させる。先行研究では、菌糸塊形状差に AG の分子量が起因していることが示唆された。しかし、AG の分子量が直接的に菌糸凝集性に関与することは実験的には示されていない。本研究では AG 分子量と菌糸凝集性の関係を示すための材料としてα-1,3-グルカノ（ニゲロ）オリゴ糖被覆粒子を作製することを目的とする。細菌由来酵素により合成した AG（ムタン）を出発物質としてアセトリシスを行い、100 mg のムタンから 14 mg のニゲロオリゴ糖（重合度 6~15）を得た。ストレプトアビジンコート磁気粒子へのニゲロオリゴ糖被覆のため、ニゲロオリゴ糖を $NaBH_3CN$ 存在下でビオチンヒドラジドと反応させ、ビオチン化ニゲロオリゴ糖を得た。FT-IR、^{1}H-NMR、MALDI-TOF MS によりビオチン化反応が進行したことを確認した。本反応により 10 mg のニゲロオリゴ糖から、1.5 mg のビオチン化ニゲロオリゴ糖が得られた。続いて、アビジン-ビオチン相互作用によりニゲロオリゴ糖をストレプトアビジンコート磁気粒子に被覆させた。本発表では、得られたニゲロオリゴ糖被覆粒子をムタンや分生子と混合した際の凝集能について報告する。

α-1,3-Glucan (AG) is one of the major components in the cell wall of *Aspergillus* species. AG has a role for hyphal aggregation during liquid shaking culture to form hyphal pellets. Previous studies suggested that the difference in the degree of aggregation of mycelial pellets was caused by the molecular mass of AG. However, it has not been experimentally shown that the molecular mass of AG is directly involved in hyphal aggregation. The purpose of this study is to prepare α-1,3-glucano (nigero) oligosaccharide-coated beads as a device to demonstrate the relationship between the molecular mass of AG and hyphal aggregation. Enzymatically synthesized bacterial AG (mutan), a starting material, was acetolyzed and 14 mg of nigerooligosaccharide (DP = 6–15) was obtained from 100 mg of mutan. Then the nigerooligosaccharide was reacted with biotin hydrazide for biotinylation. Progress of the biotinylation reaction was confirmed by FT-IR, ^{1}H-NMR, and MALDI-TOF MS. Through this reaction, 1.5 mg of biotinylated nigerooligosaccharide was obtained from 10 mg of nigerooligosaccharide. Next, streptavidin magnetic beads were coated with nigerooligosaccharides through avidin-biotin interaction. In this presentation, we will show the results of the aggregation assay using the nigerooligosaccharide-coated beads.

α-1,3-glucan, aggregation, nigerooligosaccaride coated beads

講演番号：2D7p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 D7 会場

ビフィズス菌由来の新規糖質加水分解酵素によりセヤル種アラビアガム AGP から切断されるオリゴ糖の構造解析

Structural analysis of oligosaccharides cleaved from gum arabic AGP of Acacia seyal by a novel Bifidobacterial glycosidase

○石渡 明弘[1]、佐々木 優紀[2,3]、松尾 綾子[2]、橋口 実々花[2]、藤村 花乃子[2]、北原 兼文[2]、藤田 清貴[2]、越野 広雪[1]、田中 克典[1,4]、伊藤 幸成[1,5]([1]理研、[2]鹿大農、[3]京大院生命、[4]東工大院物質理工、[5]阪大院理)

○Akihiro ISHIWATA[1], Yuki Sasaki[2,3], Ayako Matsuo[2], Mimika Hashiguchi[2], Kanoko Fujimura[2], Kanefumi Kitahara[2], Kiyotaka Fujita[2], Hiroyuki Koshino[1], Katzunori Tanaka[1,4], Yukishige Ito[1,5] ([1]RIKEN, [2]Kagoshima Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Tokyo Tech., [5]Osaka Univ.)

【目的】GH39 に属する 3-*O*-α-D-galactopyranosyl/β-L-arabinopyranosy-α-L-arabinofuranosidase (GAfase/AAfase) が、セネガル種 (*Acacia senegal*) のアラビアガムを構成するアラビノガラクタン・プロテイン (AGP) の修飾糖を加水分解する酵素として各種ビフィズス菌より見出された[1–5]。しかし、セネガル種と同様に商業的に利用されているセヤル種アラビアガムを分解することに関しての解析研究は進んでいない状況であった。その分解産物のオリゴ糖の構造解析を行い、未解明であったセヤル種アラビアガムのAGP側鎖構造の解明を行なったので報告する。

【方法と結果】 *Bifidobacterium longum* 由来 GAfase の相同性検索により得られた *B. catenulatum* 由来 GH39 ホモログによりセヤル種アラビアガムを処理し、得られた糖鎖の同定を化学変換およびNMRや質量分析などによる手法にて行なった。その結果、分解産物は、GH39 がセネガル種アラビアガムにおいて切り出す二糖 β-L-arabinopyranosy-(1→3)-α-arabinofuranoside 構造を内部に含み、さらに、その非還元末端側に extensin などのヒドロキシプロリンリッチ糖タンパク質の親水性部のβ-アラビノオリゴ糖[6,7] に見られる、β-L-arabinofuranoside が最大三糖まで修飾された糖鎖構造であることが明らかとなった。したがって本酵素は内部糖鎖の構造の α-L-arabinofuranoside を切断し五糖までを切り出す酵素であり、本研究により、AG側鎖として未報告の本五糖修飾分岐構造がセヤル種アラビアガムにおいて存在していることが明らかとなった[8]。

The GH39 homologue from *B. catenulatum* was treated with Seyal-type gum arabic, and the resulting glycans by hydrolysis were identified by chemical modifications and NMR and MS spectrometry. The result of analysis suggested that the degradation products contain a disaccharide β-L-arabinopyranosy-(1→3)-α-L-arabinofuranoside structure,[1–5] cleaved from Senegal-type gum arabic by GH39, and β-L-arabinofuranoside, found also in the hydrophilic moiety of extensin as β-arabino-oligosaccharides[6,7] composed of up to trisaccharides. Therefore, it was clarified that this GH39 enzyme cleaves up to pentasaccharide at α-L-arabinofuranoside of the inner residue of branched glycan on gum arabic. It was revealed that the branched glycan on galactan backbone of the Seyal-type gum arabic contains the terminal pentaarabinoside structure[8].

Ref. 1) Sasaki, Y. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, e02690-20; 2) Sasaki, Y. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **2022**, *88*, e02187-21; 3) Sasaki, Y. *et al.*, *Bul. App. Glycosci.* **2022**, *12*, 108; 4) 藤田清貴ら, *バイオサイエンスとインダストリー* **2022**, *80*, 466; 5) Sasaki, Y. *et al.*, *Microbiome Res. Rep.* **2023**, *2*, 12; 6) Akiyama, Y. & Kato, K. *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 2343; 7) Ishiwata, A. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *60*, 5754; 8) Fujita, K. *et al.*, JP 2023129492.

glycosidase, AGP, oligosaccharide

講演番号：2E1a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E1 会場

自然界酵母から清酒製造に適する醸造用酵母への効率的な育種方法の開発

A simple and feasible breeding method for natural *Saccharomyces cerevisiae* to make sake

○栗林 喬[1,2]、菅原 雅通[1]、金桶 光起[2]、小熊 哲哉[2]、鍋倉 義仁[1]、青木 俊夫[1]([1]新潟醸造試、[2]新潟食農大)
○ Takashi KURIBAYASHI[1,2], Masamichi Sugawara[1], Mitsuoki Kaneoke[2], Tetsuya Oguma[2], Yoshihito Nabekura[1], Toshio Aoki[1] ([1]Niigata Sake Res. Inst., [2]Niigata Agro-Food Univ.)

近年、清酒の個性化・多様化を目的として、地域の名所や産物から分離した酵母による清酒製造への利用が注目されている。一般に、自然界に存在する酵母は、清酒製造環境下で生息していないことから、清酒製造における醸造特性が低い場合が多い。そのため、このような酵母を用いて清酒製造を行う場合、アルコール生産性の低下やオフフレーバーの発生を伴うため、製造方法を改変する必要性が生じ、迅速に実用化することができない。

そこで本研究では、既存清酒酵母である新潟清酒酵母と、新潟県内から取得した自然界酵母を用いて、効率的な酵母の交配法を開発し、簡便かつ迅速に清酒製造者が自然界酵母を利用できるスキームを構築した。本法で育種された酵母は、自然界由来酵母の特徴も反映し、多様性のある酒質の清酒が得られる可能性も示唆された。

本研究は、JST、A-STEP、JPMJTM22C9 の支援を受けたものです。

Sake is a Japanese alcoholic beverage produced by the fermentation of steamed rice and koji (a culture of *Aspergillus oryzae* grown on steamed rice) with sake yeasts. Sake yeasts, which are strains of *Saccharomyces cerevisiae*, are important determinants of product quality and process efficiency. In this study a *S. cerevisiae* strain was isolated from nature in Niigata Prefecture. In recent years, it has been shown that some natural yeast strains may produce unique flavors and characteristics in sake. Therefore, sake made using *S. cerevisiae* strains isolated from regional sources would attract consumers. Furthermore, a natural isolate of *S. cerevisiae* could impart more desirable characteristics to brewed sake (compared to industrialized sake yeasts).

In this study, we have designed a feasible breeding method to produce sake using a natural yeast from the Niigata prefecture. The procedure put forth in this study is useful for sake brewers as it allows for simple yeast mating and enables sake production even with isolated yeasts that have a low alcohol-producing ability. We expect these breeding strains to contribute to high-quality sake making in Niigata Prefecture, Japan.

sake yeast, yeast mating, Niigata prefecture

発表責任者：栗林　喬（kuribayashi.takashi@pref.niigata.lg.jp）

講演番号：2E1a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E1 会場

尿素非生産性を維持したカプロン酸エチル高生産性清酒酵母の育種法の開発

Developing a breeding method for a sake yeast with high ethyl caproate production and without urea production

○田中 純平[1]、菅原 雅通[1]、栗林 喬[1,2]、佐藤 圭吾[1]、鍋倉 義仁[1]、城 斗志夫[3]、青木 俊夫[1] ([1]新潟醸造試、[2]新潟食農大、[3]新潟大農)

○JUMPEI TANAKA[1], MASAMICHI SUGAWARA[1], TAKASHI KURIBAYASHI[1,2], KEIGO SATO[1], YOSHIHITO NABEKURA[1], TOSHIO JOH[3], TOSHIO AOKI[1] ([1]Niigata Sake Res. Inst., [2]Niigata Agro-Food Univ., [3]Niigata Univ.)

本研究では、清酒酵母におけるカプロン酸エチル高生産性原因変異である *FAS2*-G1250S 変異を標的とする新たな PCR-RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）を構築した（図 1)。尿素非生産性を有する新潟吟醸酵母 S9 株のカプロン酸エチル生産性をさらに向上させた新規酵母の開発を行うため、この解析系を用いて、S9 株から 16 番染色体の倍加した一倍体の取得と接合による新規酵母の造成を行うことにより、目的とする高香気生産性酵母の取得とその育種法を確立した。

特に海外において、食の安全性の観点から関心が持たれているカルバミン酸エチル（EC）は、清酒中の尿素とエタノールとの化学反応によって生成する [1)]。本育種法で交配した酵母は、親株である S9 株と同様に、尿素非生産性を維持することを確認した。本育種法よって得られた酵母を清酒製造に用いることにより、得られる清酒中の EC の低減が図られることから、輸出拡大に対応した新製品の開発を促進することが可能となる。

1) V. Gowd, *et al*.. *Food Chem.,* **248**, 312-321 (2018).

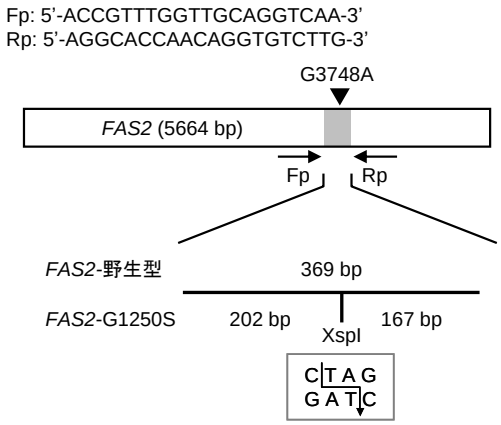


図1. 新潟吟醸酵母S9の*FAS2*変異部位を標的としたPCR-RFLP

In this study, we developed a new PCR-RFLP strategy targeting the *FAS2*-G1250S mutation, which is responsible for high production of ethyl caproate in sake yeast. We aimed to develop a new yeast that further improves the production of ethyl caproate from the Niigata *Ginjo* yeast strain S9; we used this analysis system to obtain a haploid strain with disomic chromosome XVI, from the S9 strain through conjugation. We developed a highly aromatic and productive yeast strain and established a breeding method for it.

In addition to improving the Niigata *Ginjo* yeasts, owned by the Niigata Prefectural Sake Research Institute, we will employ this breeding method for improving the non-urea producing sake yeast isolated in the Niigata Prefecture, for meeting the international demand of sake products. These findings will contribute to the development of new products.

Saccharomyces cerevisiae, sake brewing, non-urea-producing sake yeast

発表責任者：田中 純平（tanaka.jumpei@pref.niigata.lg.jp）

講演番号：2E1a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E1 会場

酵母におけるリン酸応答性アルコール発酵調節

Phosphate-responsive control of alcohol fermentation in yeast

美馬 未紗希、高木 博史、○渡辺 大輔（奈良先端大）
Misaki MIMA, Hiroshi TAKAGI, ○Daisuke WATANABE (NAIST)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はアルコール発酵を行う代表的な微生物であり、発酵・醸造産業において重要な役割を果たしている。先行研究において実施されたアルコール発酵調節因子のゲノムワイド探索により、リン酸シグナル伝達経路に関わる遺伝子が複数同定された。本研究では、リン酸がアルコール発酵調節に及ぼす影響を明らかにすると共に、その分子メカニズムの解明を目的とした。

リン酸濃度が異なる最少培地を用いて発酵試験を行った結果、野生株では培地中のリン酸濃度と発酵速度が正の相関を示し、酵母が環境中のリン酸濃度をモニターしてアルコール発酵を制御していることを見出した。一方、リン酸シグナル伝達経路のマスターレギュレーターであるサイクリン依存性プロテインキナーゼ Pho85p の欠損株ではリン酸濃度を高めても発酵速度は低く維持され、リン酸濃度に応じた変化が解消された。Pho85p 欠損株のメタボローム解析の結果、高リン酸条件下において解糖系の初発反応の生成物であるグルコース-6-リン酸の細胞内含量が顕著に少なく、解糖系への代謝フラックスの減少が示唆された。以上の結果から、Pho85p が細胞外のリン酸に応答してグルコース-6-リン酸の生成を制御する新規なアルコール発酵促進因子として機能するという知見が得られた。

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a representative microorganism for alcohol fermentation. Our previous genome-wide research for regulators of alcohol fermentation has identified genes involved in the phosphate signaling pathway. The objective of this study is to clarify the effect of inorganic phosphate on alcohol fermentation and its molecular mechanism.

Fermentation tests in minimal medium with different phosphate conditions revealed that the phosphate concentration positively correlates with the fermentation rate in the wild-type strain. This result demonstrated that yeast cells monitor the environmental phosphate concentration to control alcoholic fermentation. In contrast, in a strain lacking the Pho85p protein kinase, a master regulator of the phosphate signaling pathway, the fermentation rate was maintained low even when the phosphate concentration was increased. Metabolomic analysis of the Pho85p-deficient strain showed that the intracellular content of glucose-6-phosphate, a product of the primary reaction of glycolysis, was significantly lower under the high phosphate condition, suggesting a reduction in glycolytic flux. In conclusion, Pho85p functions as a novel activator of alcohol fermentation via glucose-6-phosphate production in response to extracellular phosphate.

alcoholic fermentation, phosphate, Pho85p

発表責任者：渡辺大輔（watanabe.daisuke@bs.naist.jp）

講演番号：2E1a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E1 会場

フラクトオリゴ糖生産酵母 *Zalaria* sp. Him3 株を用いたイソマルトオリゴ糖生産
Isomaltooligosaccharide production using fructooligosaccharide-producing yeast *Zalaria* sp. Him3.
○松谷 遥希[1]、田中 駿[2]、眞榮田 麻友美[2]、前橋 健二[1,2]、吉川 潤[1,2] ([1]東農大院応生、[2]東農大応生)
○ Haruki MATSUYA[1], Shun TANAKA[2], Mayumi MAEDA[2], Kenji MAEHASHI[1,2], Jun YOSHIKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

供試菌株である *Zalaria* sp. Him3 は、これまでにフラクトオリゴ糖(FOS)生産菌としての有用性について報告されたが、*Zalaria* 属酵母が 2017 年に新属として提唱された新しい種であることもあって、それ以外の生物工学的な研究はほとんど進んでいない。そこで、本研究では Him3 株の諸性質を明らかにする一端として、各種炭素源の資化性を調べた後、複数の二糖類でのオリゴ糖生産について検討を行った。

Zalaria sp. Him3 の炭素源 20 種における資化性を調べたところ、スクロースが最も良く資化され、それ以外にマルトースやトレハロース、グルコースなどを資化できると判断された。これら三種の二糖類を炭素源として培養した時、スクロースとマルトースでの培養液に TLC でオリゴ糖の生成が確認された。さらに、本菌をマルトースで培養した時にα-グルコシダーゼ活性が菌体懸濁液と培養上清の両画分に検出された。マルトース濃度を変化させて培養し、HPLC で経時的な培養液中の糖成分変化を解析したところ、イソマルトオリゴ糖（IMO）であるイソマルトース、パノース、イソマルトトリオースの生産が確認できた。これらの結果より、*Zalaria* sp. Him3 はスクロースから FOS を生産するだけでなく、マルトースから IMO も生産できることが明らかにされ、培養時の炭素源を変えるだけで異なる機能性オリゴ糖の生産に利用できることが示された。

Zalaria sp. Him3 has been reported to be a promising yeast for fructooligosaccharides (FOS) production. The biotechnological studies have been limited because *Zalaria* was proposed as a new genus in 2017. Therefore, in this study, an assimilation test for 20 carbon sources was investigated to elucidate the physiological property, and then the other oligosaccharides production was demonstrated. Sucrose was highly assimilated by *Zalaria* sp. Him3, and maltose, trehalose, and glucose were also utilized. Oligosaccharide production was confirmed using TLC in the culture medium of maltose as well as sucrose, but not in trehalose. When strain Him3 was cultivated in the maltose medium, α-glucosidase activity was detected in both fraction of the cell suspension and the culture supernatant. Furthermore, isomaltose, panose, and isomaltotriose, known as isomaltooligosaccharides (IMO), were identified using HPLC in the broth cultivated in various concentrations of maltose. These results indicated that *Zalaria* sp. Him3 can produce not only FOS from sucrose but also IMO from maltose and can produce multiple functional oligosaccharides by changing the carbon source.

isomaltooligosaccharides (IMO), *Zalaria*, α-glucosidase

発表責任者：吉川　潤（jy207183@nodai.ac.jp）

講演番号：2E1a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E1 会場

Citrobacter braakii TB-96 株における電気発酵の効果と応用による新規培養系の構築
Effect of electro-fermentation on *Citrobacter braakii* TB-96 strain and construction of new culture system through application
○柳瀬 卓馬[1]、井上 謙吾[1]、吉田 ナオト[1]、中島（神戸） 敏明[2]、清 啓自[1]([1]宮大院農、[2]筑波大院生命環境系)
○Takuma YANASE[1], Kengo Inoue[1], Naoto Yoshida[1], Toshiaki Nakjima-Kanbe[2], Keiji Kiyoshi[1]([1]The Univ. of Miyazaki, [2]The Univ. of Tsukuba)

陰極電気発酵（CEF）は、外部から還元力として電子を与えることで微生物の代謝バランスを変化させる技術として注目されている。*Citrobacter braakii* TB-96 株は、グリセロールからの 1,3-プロパンジオール（1,3-PD）生産能を有するが、副産物生成の多さが課題となっている。当株におけるグリセロールからの 1,3-PD 生産は多くの還元力を必要とすることから、CEF は 1,3-PD 発酵効率の改善に寄与すると考えられる。そこで本研究では、TB-96 株における CEF による 1,3-PD 生産の増強を試みた。TB-96 株の主要副産物の生産経路である D-乳酸デヒドロゲナーゼとピルビン酸ギ酸リアーゼをノックアウトした *Δldh Δpfl* 株における CEF では、グリセロールの消費が促進され、更に 1,3-PD 生産量も増大した。CEF 中のグリセロール代謝遺伝子の発現を測定したところ、1,3-PD 生産経路の発現量が CEF によって約 14 倍に増加しており、副産物生産経路に関する遺伝子も同様に発現量は 2 倍以上に増加した。また、電子供与体の代替として陽極電気発酵を併用して CEF を行う培養系の構築を行った。こちらの培養系では従来の CEF と同様の恩恵を得ると共に、-0.2～-0.7 mA の電流生成が確認できた。今後は CEF にかかるコストをより削減するため、電気発酵を単層で行う流加培養系の構築を進めている。
Cathode electro-fermentation (CEF) is a fermentation technique which changes the metabolism of microorganisms during fermentation by supplying extracellular electrons. The *Citrobacter braakii* strain TB-96 produces 1,3-propanediol (1,3-PD) from glycerol. However, this strain also produces a large amount of by-products. In this study, we attempted to suppress by-product production and enhance 1,3-PD production by CEF in TB-96. In *Δldh Δpfl* strain, which is a recombinant by disrupting lactate and formate producing pathway from strain TB-96, glycerol consumption and 1,3-PD production were increased by CEF. As a result of measuring the expression of glycerol metabolism genes in CEF, the expression levels of genes in the 1,3-PD production pathway were increased 14 times by CEF, and the expression levels of genes related to the by-products production pathways were also increased by 2 times. In addition, a culture system was constructed to perform CEF using an anode electro-fermentation as alternative electron donor. This culture system also produced the same effects as conventional CEF and was generated -0.2 to -0.7 mA current throughout the culture.

electro-fermentation, 1,3-propanediol, glycerol

講演番号：2E1a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E1 会場

窒素固定細菌を用いた大気中窒素を由来とする L-グルタミン酸発酵法の改良

Improved L-glutamate fermentation from aerial nitrogen using nitrogen-fixing bacteria

○吉留 大輔[1]、日髙 真誠[1]、伊藤 有亮[1,2]、古園 さおり[1,3]、西山 真[1,3]([1]東大院・農生科、[2]キッコーマン株式会社、[3]東大・微生物連携機構)
○ Daisuke YOSHIDOME[1], Makoto HIDAKA[1], Yusuke Ito[1,2], Saori KOSONO[1,3], Makoto NISHIYAMA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agri. & Life Sci., Utokyo, [2]Kikkoman Corporation, [3]CRIIM, Utokyo)

現行の L-グルタミン酸（Glu）の発酵生産は、Haber-Bosch 法で合成したアンモニアを窒素源とするためエネルギー消費の点から問題点が多い。我々は昨年度の大会で、窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* NG13 が *Corynebacterium glutamicum* のクエン酸合成酵素の発現（CgCS 株）、NG13 のクエン酸輸送体の強化（CitS 株）、およびそれらを組み合わせること（CgCS+CitS 株）によって、グルコースとクエン酸（各 7.5 g/L）を炭素源とした培地中で、大気中窒素を唯一の窒素源として Glu を生産することを発表した。今回は、その最大生産量（CgCS+CitS 株：0.15 g/L）を大幅に向上させることに成功した。まず、φ18 試験管からφ90 シャーレでの培養に変更し、大気中窒素の供給を強化したところ、CgCS+CitS 株の Glu 生産量は 0.6 g/L まで増大した。この培養において、CgCS+CitS 株は最初に旺盛なグルコース消費、高い窒素固定能発揮、Glu 生産を示すが、グルコース枯渇後には窒素固定能は消失し Glu を消費することが分かった。そこで、窒素固定能の持続を狙って培地のグルコース量を 2 倍にしたところ、Glu 生産量は 1.13 g/L にまで増加した。生産された Glu の炭素骨格は、CgCS 株ではグルコース、CitS 株ではクエン酸由来であったが、CgCS+CitS 株では全てクエン酸由来であった。このことから高い Glu 生産能を有する CgCS+CitS 株は、グルコースを窒素固定の駆動源、クエン酸を Glu の骨格として使い分ける興味深い代謝をしていると考えられる。

In the last annual meeting, we reported the successful Glu production using aerial N_2 by the recombinant N_2-fixing bacterium *Klebsiella oxytoca* NG13 strain (CgCS+CitS strain) that overproduced citrate synthase of *Corynebacterium glutamicum* (CgCS) and citrate transporter of NG13 (CitS) in a glucose and citrate-containing medium. In this presentation, we succeeded in improving Glu productivity. By an increase in the aerial N_2 supply by changing the culture vessel to φ90 plate with a wider diameter, Glu production increased to 0.6 g/L in the CgCS+CitS strain. In this culture, glutamate was produced only in the glucose-consuming phase with a higher N_2-fixing activity, and after glucose depletion, it halted N_2-fixation and started consuming Glu. When glucose was doubled to prolong N_2-fixing phase, Glu production was increased up to 1.13 g/L. The carbon atoms in produced Glu were derived only from citrate in the CgCS+CitS strain although it overproduced CgCS. This suggests that the CgCS+CitS strain has interesting carbon metabolism, using glucose as the energy source of N_2 fixation and citrate as the backbone of Glu.

nitrogen fixation, L-glutamate fermentation, carbon metabolism

発表責任者：吉留大輔（babubabu-babubu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2E1a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E1 会場

システインを高生産する酵母の育種と機能解析
Isolation and functional analysis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with increased intracellular cysteine

○磯貝 章太[1]、西村 明[1]、園原 詩野[2]、岡田 知之[2]、継国 孝司[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・研究推進、[2]武蔵精密工業・植物バイオ)
○Shota Isogai[1], Akira Nishimura[1], Shino Sonohara[2], Tomoyuki Okada[2], Takashi Tsugukuni[2], Hiroshi Takagi[1] ([1]NAIST, [2]Musashi Seimitsu Industry Co.,Ltd.)

システイン（Cys）は、抗酸化作用を示すアミノ酸であり、食品添加物や化粧品および医薬品の原材料として広く利用されている。また、タンパク質中の Cys 残基は、ジスルフィド結合を介してタンパク質の立体構造維持に寄与するとともに、細胞内の酸化還元状態を感知するセンサーとして酸化ストレスに対する生体防御システムに関与する。一方で、食品素材中の Cys 含量は少ないため、食事からの効率的な摂取が難しい。そのため、食品として高い安全性が認められている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて Cys を高生産する菌株を育種し、セルフヘルスケア製品の製造へ応用することで、適切な量の Cys の摂取に寄与することが期待できる。本研究は、Cys を高生産する酵母の変異株を取得するとともに、変異株の Cys 高生産機構を明らかにすることを目的とした。

これまでに、メチオニンの硫黄原子がセレンで置換されたセレノメチオニン（SeMet）を培地に添加すると、酵母の細胞内に取り込まれた後、セレノシステイン（SeCys）に変換されることが報告されている。SeCys はタンパク質中の Cys 残基の代わりにタンパク質中に取り込まれ、構造異常タンパク質を生成することで酵母の生育を阻害する。このような SeMet の細胞毒性は、細胞内 Cys 含量の増加により回避できるため、SeMet に耐性を示す株は、Cys を高生産することが期待できる。そこで、二倍体の実験室酵母 X-2180 株に突然変異処理を施した後、SeMet に耐性を示す変異株を単離した。得られた SeMet 耐性株の細胞内アミノ酸含量を測定したところ、親株と比較して Cys 含量が 2 倍以上に増加した変異株を 3 株取得した。現在、取得した変異株の全ゲノムシークエンス解析を行い、Cys 高生産に寄与する遺伝子変異の同定と解析を進めている。

Cysteine (Cys) is widely used as a food additive and an ingredient for cosmetics and pharmaceuticals due to the antioxidative property of Cys. Therefore, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with intracellular accumulation of Cys would help people ingest an appropriate amount of Cys, contributing to the extension of healthy lifespan and improvement of quality of life. In this study, we isolated some mutants resistant to selenomethionine (SeMet), which causes growth inhibition, by conventional mutagenesis. From them, we obtained three mutant strains containing two-fold higher Cys in the cell than the parental strain. We are now attempting to identify the gene(s) responsible for Cys overproduction by whole genome sequence analysis of these mutants.

Cysteine, *Saccharomyces cerevisiae*, Breeding

発表責任者：磯貝 章太（s-isogai@bs.naist.jp）

講演番号：2E1a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E1 会場

酵母の分岐鎖アミノ酸アミノトランスアミナーゼ変異体によるフーゼルアルコール生産性の向上
Improvement of fusel alcohol production by engineering of the yeast branched-chain amino acid aminotransaminase

KOONTHONGKAEW Jirasin、豊川 洋一、○高木 博史（奈良先端大バイオ）
Jirasin KOONTHONGKAEW, Yoichi TOYOKAWA, ○Hiroshi TAKAGI (Nara Inst. Sci. Tech.)

イソブタノール、イソアミルアルコール、活性アミルアルコールなどの分岐鎖高級アルコール（BCHA）は、次世代バイオ燃料や香気成分として有用である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、分岐鎖アミノ酸（BCAA）の代謝経路を経由して BCHA を合成するが、BCAA アミノトランスアミナーゼ（BCAT）は、BCAA の Ehrlich 経路を介して BCHA 生成の鍵となる酵素である。BCAT は分岐鎖 α-ケト酸（BCKA）と BCAA との双方向のアミノ転移反応を触媒しており、酵母ではミトコンドリア型 Bat1 とサイトゾル型 Bat2 が存在している。我々は、BCHA の生産性向上を目的に、Bat1 および Bat2 の変異体を *in silico* で設計した。まず、ヒト由来 BCAT の構造を鋳型に Bat2 の構造モデルを構築し、Bat2 に結合するリガンドの 5Å 以内の残基を抽出後、活性に直接関与しないと考えられる 12 残基を選抜した。12 残基について、Bat2 の安定性および基質結合親和性を高めると予想されるアミノ酸置換を設計した（Bat2: Gly316Ser, Gly316Trp, Bat1: Gly333Ser, Gly333Trp）。次に、各変異体を酵母細胞内で発現させると、そのほとんどが野生型酵素に比べて最少培地での生育が悪化した。興味深いことに、各変異体（Bat1-Gly333Ser, Bat1-Gly333Trp, Bat2-Gly316Ser）発現株では、野生型酵素と比較して BCHA 生産量が大幅に向上し、特に Bat1-Gly333Trp, Bat2-Gly316Ser ではイソブタノールが約 20 倍に増加した。一方、各変異体発現株では、野生型酵素と比較して BCAA 含量が有意に減少した。また、各変異体は野生型酵素よりも両基質（BCAA, BCKA）に対する活性が著しく低下しており、元の Gly から側鎖の大きい Ser, Trp への置換により分子内相互作用が増えたためだと考えられた。各変異体発現株では、活性が低下したことで BCAA 合成経路が弱化し、BCHA 生産が促進されたことが強く示唆された。今回の結果は、BCAT の機能改変によって BCHA 生産性が大幅に増加した初めての例である。

Recently, several studies have attempted to increase the production of branched-chain higher alcohols (BCHAs) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The key enzymes for the BCHA biosynthesis are the branched-chain amino acid aminotransaminases (BCATs), Bat1 and Bat2. Although deletion or overexpression of the genes encoding BCATs has an impact on the production of BCHAs, amino acid substitution variants of Bat1 and Bat2 that could affect enzymatic properties and BCHA productivity have not been fully studied. By *in silico* analysis, we designed these variants and expressed them in yeast cells. The engineered BCATs were found to decrease catalytic activities but to increase BCHA production. Our approach provides new insight into the functions of BCATs and will be useful in the construction of BCATs optimized for high-level production of BCHAs.

Saccharomyces cerevisiae, branched-chain amino acid aminotransaminase, fusel alcohol production

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：2E1a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E1 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 新規油脂超高蓄積変異株の取得と油脂高生産原因遺伝子の同定
Isolation of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutants with high lipid accumulation and identification of a gene involved in high lipid production

○佐藤 里佳子[1]、森 一樹[2]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、田代 康介[2]、石谷 孔司[3]、油谷 幸代[3]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]九州大・院農、[3]産総研・生物プロセス)
○Rikako SATO[1], Kazuki MORI[2], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Kosuke TASHIRO[2], Koji ISHIYA[3], Sachiyo ABURATANI[3], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pham. Med. Life Sci., [2]Kyushu Univ. Fac. Agri., [3]AIST BPRI)

様々な産業で高汎用性であるパーム油の需要は増加しているが、アブラヤシ栽培は環境・社会面で課題を抱えることから、需要に対応できる代替油脂生産技術開発は重要な課題である。その手段としてパーム油と類似油脂を生産する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の活用が期待される。しかし、実用化へ向けた油脂生産性向上に繋がる改変対象遺伝子情報など、油脂生産機構に関する知見は未解明な部分が残る。本研究では、既得の油脂生産制御因子を活用し、さらなる油脂生産機構解明に向けた新規油脂高蓄積変異株の取得及び油脂高生産関連因子の同定を目的とした。

油脂生産制御因子 LsSpt23p をコードする遺伝子の変異型遺伝子置換株(mSPT23)に対して UV 照射による突然変異誘発後、Percoll 密度勾配遠心法を用い、mSPT23 よりも油脂生産性が向上した油脂超高蓄積変異株 5 株を取得した。油脂生産性向上に寄与した遺伝子を明らかにするため、ゲノム比較解析を実施したところ、上記のうち 1 株(mSPT23-19)に前回大会で報告した油脂生産関連遺伝子 110315 にナンセンス変異が見出された。そこで、mSPT23 の野生型 110315 を変異型 110315 に置換したところ、mSPT23-19 と同程度の油脂生産量を示し、油脂生産性向上に寄与した遺伝子であることが明らかとなった。本研究の一部は、JSPS 科研費(22H02250)及び JSPS 科研費(23K19286)の支援を受けた。

The demand of palm oil, which is utilized in food and chemical industries, is increasing. However, development of oil production technology is important issues because of having environmental and social problems in oil palm plantation. Oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is an attractive lipid producer, which can produce lipid with a fatty acid composition similar to palm oil. To improve the lipid productivity for industrialization, the elucidation of lipid production mechanism in *L. starkeyi* is effective. In this study, we aimed to obtain novel mutant strains with high-lipid accumulation and identify factor of responsible for lipid productivity for further elucidation of lipid production mechanisms.

Mutagenesis was induced by treating the mSPT23 strain, which carries a gene encoding the lipid biosynthesis regulatory factor LsSpt23p, with UV irradiation.We obtained five mutant strains with significantly improved lipid productivity compared with mSPT23, using Percoll density gradient centrifugation. By comparative genomic analysis, we found that mutations occurred in 110315 gene (nonsense variant). The site-directed mutagenesis at 110315 gene locus demonstrated improving lipid production, and it reveals that the 110315 gene contributes to the enhancement of lipid production in mSPT23-19.

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2E1a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E1 会場

ルーメン細菌由来 Plasmalogen 合成遺伝子を導入した大腸菌でのエタノールアミン型 Plasmalogen の生産

Ethanolamine plasmalogen production by E. coli harboring plasmalogen synthesis gene from ruminal bacterium.

○吉井 直毅[1]、小野寺 智子[2]、阿部 直樹[1]、金子 淳[1] ([1]東北大院農、[2]名寄市立大栄)
○Naoki YOSHII[1], Tomoko Onodera[2], Naoki Abe[1], Jun Kaneko[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nayoro City Univ.)

Plasmalogen（Pls）は sn-1 位がビニルエーテル結合であるグリセロリン脂質であり、動物と嫌気性細菌の細胞に存在し、ヒトでは抗酸化作用やアルツハイマー症（AD）などのアンチエイジングサプリメントとして注目されている。我々はエタノールアミン型リン酸基頭部の Pls（PEPls）が AD 発症の病因タンパク質であるアミロイドβを産生するγ-セクレターゼの活性を抑制し、PEPls を豊富に含む偏性嫌気性ルーメン細菌 *Selenomonas ruminantium* 由来のリン脂質画分でも抑制活性を確認した[1)]。我々は解読した本菌のゲノム情報[2)]から *Clostridium* 属で見出された Pls 合成鍵遺伝子 *plsA, plsR* 遺伝子[3)]が融合した *plsAR* を見出し、それを導入した大腸菌と枯草菌で Pls 生産を確認した[4)]。

本講演では、*S. ruminantium* 由来 *plsAR* 遺伝子を通性嫌気性細菌である大腸菌で異種発現させた際の、細胞膜リン脂質での Pls 含有量を検討した。*plsAR* 遺伝子を発現している大腸菌を嫌気条件下で培養すると 24 時間で Pls 含量は約 7 割に達し、二次元 TLC で PEPls が確認できた。

Plasmalogens(Pls) are vinyl ether-containing glycerophospholipids distributed in mammals and anaerobic bacteria, and they draw attention to an anti-aging supplement for antioxidant and Alzheimer's disease prevention. The presence of phosphatidylethanolamine plasmalogen(PEPls) weakened activity of γ-secretase which produces amyloid beta, the pathogenic protein in AD, and PEPls from *Selenomonas ruminatium*, a strictly anaerobic ruminal bacterium, also inhibited γ-secretase activity. Recently, the key gene(*plsA, plsR*) for anaerobic plasmalogen biosynthesis was identified in *Clostridium*. In *S. ruminatium* genome, we found the gene which encodes the protein containing these motifs as a single fused gene (*plsAR*), and confirmed Pls biosynthesis activity in facultative anaerobic bacteria.

We examined the amount of Pls in *E. coli* introduced *plsAR* of *S. ruminantium*. When heterologously expression *E. coli* strain was cultured under anaerobic conditions, Pls content reached about 70% in 24 hours, and PEPls were confirmed by two-dimensional TLC.

1) Onodera et al., *J. Biochem.* 157(5) 301-309 (2015).
2) Kaneko et al., FEMS microbial. lett. 362(9) fnv050 (2015).
3) Jackson et al., Chem Biol 15;16(1):6-13.(2021)
4) Yoshi et al., 2023 Annual Meeting of JSBBA

Plasmalogen, anaerobic biosynthesis, *Selenomonas ruminantium*

講演番号：2E1p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E1 会場

野生酵母のゲノム情報から探る清酒酵母の低温発酵特性に関与する遺伝子の探索
Identification of novel genes involved in the high fermentation ability at low temperature in *sake* yeast

○川原 悠暉[1]、久松 賢太郎[2]、澤井 美伯[2]、吉村 明浩[2]、正木 和夫[3]、赤尾 健[3]、島田 昌也[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大院自然科学、[2]岐阜県食品科学研究所、[3]酒類総合研究所)
○Yuki KAWAHARA[1], Kentaro HISAMATSU[2], Yoshinori SAWAI[2], Akihiro YOSHIMURA[2], Kazuo MASAKI[3], Takeshi AKAO[3], Masaya SHIMADA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Prefectual Research Institute for Food Sciences, [3]National Research Institute of Brewing)

【目的】日本酒の風味は醸造に用いる酵母株の発酵特性に大きく依存する。全国で醸造されている日本酒は、大多数が「きょうかい酵母」を用いて醸造されているが、現在、きょうかい酵母とは異なる風味を醸す「野生酵母」による日本酒醸造の試みも増えつつある。しかし、野生酵母は一般的に低温下での発酵力が低いため、実際の日本酒醸造が困難なことが多い。そこで、本研究では野生酵母の低温発酵力向上に応用するため、きょうかい酵母の低温環境での高発酵力に関与する新規因子の同定を試みた。
【結果・考察】自然界から単離した野生酵母 3 株 GY38、GY115、GY156 と K7 株のゲノム配列を比較し、各酵母に特有のナンセンス変異遺伝子を特定した。その中で、K7 株の低温での発酵力向上に関与する可能性がある変異 *yhi9*-を同定した。*YHI9* にコードされるタンパク質は機能未知であり、その欠損はミトコンドリア活性や呼吸活性、金属ストレス耐性が低下する。また、*YHI9* のナンセンス変異は K7 株のみならず焼酎酵母といった日本古来の酒類を醸造する産業用酵母にも見られた。
【Introduction】The flavor of each *sake* is mainly dependent on the fermentation characteristics of the yeast strain. *Kyokai* yeasts are the most major yeast strains using *sake* making, but there are currently an increasing several attempts to make sake using "wild yeast strains," which have an ability to produce unique flavor different from *Kyokai* yeasts. However, wild yeast strains generally have a low fermentation ability at low temperatures, thus it is often difficult to actually make *sake*. In this study, we attempted to identify novel genes that are involved in the high fermentation ability in *Kyokai* yeast at low temperature, in order to understand that wild yeast strains do not show low fermentation ability at low temperature.
【Results and Discussion】By comparison of the genome sequences between strain K7 and three wild yeast strains, GY38, GY115, and GY156, we identified nonsense mutant genes in each yeast strains. Among them, we found that the deleted mutation of *yhi9* was involved in increasing the fermentation ability in strain K7 at low temperature. The function of the protein encoded by *YHI9* is now unknown, but its deletion results in decreased mitochondrial activity, respiratory activity, and metal stress tolerance. In addition, nonsense mutations in *YHI9* were found not only in strain K7, but also in industrial yeasts, such as *shochu* yeast strains.

Saccharomyces cerevisiae, Fermentation, *sake* yeast

発表責任者：中川 智行（nakagawa.tomoyuki.u0@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2E1p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E1 会場

協会系清酒酵母の胞子発芽異常に関与する新規遺伝子の探索
Search for novel genes involved in abnormal spore germination of Kyoukai sake yeast
○周 延、金井 宗良、赤尾 健（酒総研）
○Yan ZHOU, Muneyoshi KANAI, Takeshi AKAO (NRIB)

協会系清酒酵母には減数分裂時の染色体組換え機構に欠損があり、胞子形成及び胞子発芽に異常を示すことから、昔から清酒酵母間の交配育種が非常に困難であった。下飯らは、組換えに関与する *SPO11* 遺伝子の清酒酵母での機能不全が胞子発芽異常の原因であることを報告しているが（*Shimoi et al., JBB, 2020*）、その寄与の効果は部分的であり、他の遺伝子の関与も予想される。我々は、清酒酵母 *SPO11* を実験室酵母型 *SPO11*（*XSPO11*）に置換した協会系清酒酵母菌株の胞子形成率及び胞子発芽率を調べ、その表現型が異なる複数の清酒酵母菌株についてゲノム情報を比較した結果、ナンセンス変異を持つ遺伝子を候補として複数見出した。さらに、清酒酵母において *XSPO11* と共に、これら遺伝子の実験室酵母型アレルを含む YCp 型プラスミドを発現させた株の胞子発芽率を調べた結果、*XSPO11* とオートファジー関連遺伝子との共発現にて相乗効果を示したことから、ある種の清酒酵母の胞子発芽異常に対してオートファジー関連遺伝子の多型の関与が示唆された。

Kyokai sake yeasts have a defect in the chromosomal recombination mechanism by meiosis and show abnormalities in sporulation and spore germination. Accordingly, crossbreeding between various sake yeasts has been so difficult for a long time. Shimoi et al. (2020) reported that dysfunction of the sake yeast *SPO11* gene is the cause of the abnormal spore germination. However, the effect of its contribution is partial and other genes are expected to be involved. We investigated the sporulation and spore germination rates of Kyokai sake yeast strain in which *SPO11* was replaced by a laboratory yeast-type *SPO11* (*XSPO11*), and compared genomic information on several strains with different phenotypes, and found several candidate genes with nonsense mutations. Furthermore, we examined the spore germination rates of sake yeast strains expressing plasmids containing these laboratory yeast-type alleles together with *XSPO11*, and found that co-expression of *XSPO11* and the autophagy-related gene showed synergistic effects. These results indicated that polymorphisms in autophagy-related gene are involved in the abnormal spore germination of certain sake yeasts.

Sake yeast, Sporulation, Autophagy

発表責任者：赤尾 健（akao_t@nrib.go.jp）

講演番号：2E1p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E1 会場

比較ゲノミクスに基づくワイン酵母の潜在的な高発酵性に関する解析

Comparative genomics for the potential high fermentation ability in wine yeast

○髙橋 空良、渡辺 大輔（奈良先端大・バイオ）
○Sora TAKAHSHI, Daisuke Watanabe (NAIST)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール発酵調節メカニズムについては清酒酵母を中心に解析され、アルコール発酵の主要な阻害因子として働くプロテインキナーゼ Rim15p の発見に至った[1)]。一方、清酒もろみでの高発酵性を示すワイン酵母を探索し、清酒酵母 K901 株と同等の発酵性を示す株を複数見出した[2)]。このことから、清酒酵母とは異なる多様なアルコール発酵調節メカニズムの存在が推察される。本研究では、ワイン酵母の潜在的な高発酵性を生み出す原因について解析を行った。

高発酵性-低発酵性ワイン酵母株間の比較ゲノム解析の結果、高発酵性株において 52 個の遺伝子内の機能欠失変異が抽出された。高発酵性ワイン酵母の一つである OC-2 株では、*RIM15* 遺伝子上に清酒酵母と異なるナンセンス変異（Arg223*）がホモザイガスに存在しており、高発酵性の要因であることが示唆された。他の高発酵性株では、S-アデノシルメチオニン代謝、接合フェロモン、ヒートショックプロテインに関連した遺伝子の機能欠失変異を同定した。以上の結果から、ワイン酵母の潜在的な高発酵性は、清酒酵母と同様に Rim15p の機能欠損に起因したメカニズムにより獲得されるタイプと新規なアルコール発酵調節メカニズムに起因するタイプに分類されることが明らかとなった。

Regulatory mechanisms of alcoholic fermentation of yeast have been mainly studied using sake yeast, leading to the finding of protein kinase Rim15p as a major inhibition factor of alcoholic fermentation[1)]. More recently, phylogenetically distant wine yeast strains were reported to show a high potential of ethanol production in sake mash to the same extent as the sake yeast K901 strain[2)]. This finding suggested the variety in the regulatory mechanisms of alcoholic fermentation. In this study, we focused on the cause of the potential high fermentation ability in wine yeast.

Comparative genome analysis identified 52 genes, which carry loss-of-function mutations in high-fermentable wine yeast strains. A high-fermentable strain OC-2 contained a homozygous nonsense mutation in the *RIM15* gene, Arg223*, which is distinctive from the sake yeast-specific loss-of-function mutation in *RIM15*. The other high-fermentable strains contained loss-of-function mutations in S-adenosylmethionine metabolism, mating pheromone, and heat shock protein. Our results classified the mechanisms for the potential high fermentation ability in wine yeast into i) the sake yeast-like, Rim15p-involved type and ii) the novel regulatory factors-mediated type.

[Ref.] 1) Watanabe *et al.*: *NPJ Sci Food*, 2023; 2) Takahashi and Kazuoka: *J Brew Soc Jpn*, 2023.

Wine yeast, Alcoholic fermentation, *RIM15*

発表責任者：渡辺大輔（watanabe.daisuke@bs.naist.jp）

講演番号：2E1p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E1 会場

米麹中のα-アミラーゼの簡易測定法の改良

Modification of a Simple Method for Determination of α-Amylase Activity in Rice Koji

○五島 徹也[1]、織田 健[1]、島本 和美[1]、赤尾 健[1]、鈴木 繁哉[2]、下地 一彦[2] ([1]酒類総合研究所、[2]キッコーマンバイオケミファ)
○Tetsuya GOSHIMA[1], Ken ODA[1], Kazumi SHIMAMOTO[1], Takeshi AKAO[1], Shigeya SUZUKI[2], Kazuhiko SHIMOJI[2] ([1]NRIB, [2]Kikkoman Biochemifa)

米麹中のα-アミラーゼ活性は、清酒醸造管理の一指標として重要である。活性測定には酒類総合研究所標準分析法である可溶性デンプン法や合成基質（2-クロロ-4-ニトロフェニル 6[5]-アジド-6[5]-デオキシ-β-マルトペンタオシド, N3-G5-β-CNP）法が用いられている。今回、合成基質　エチリデン-4-ニトロフェニル-α-D-マルトヘプタオシド（Et-G7-PNP）を用いる測定法を開発し、N3-G5-β-CNP 法との相関性を評価した。

市販や小規模製造の米麹 7 種を標準分析法記載の方法[1)]で抽出し、測定試料とした。N3-G5-β-CNP 法による測定は、醸造分析キット・α-アミラーゼ測定キット（キッコーマンバイオケミファ製）にて行った。また、Et-G7-PNP 法による測定は、共役酵素グルコアミラーゼとα-グルコシダーゼの作用によって *p*-ニトロフェノール（PNP）を生じさせ、吸光度（400 nm）を定量することにより行った。

両法とも同様の操作で、迅速簡便に測定することができた。Et-G7-PNP 法（x）と N3-G5-β-CNP（y）の回帰式は y = 0.91 x －0.60 となり、良好な相関性が確認された（相関係数 r ＝ 0.993）。

【参考文献】　1）酒類総合研究所標準分析法注解　230～233 頁

Measurement of α-amylase activity in rice koji is important for sake brewing. As official methods, measurements using soluble starch or the synthetic substrate (2-chloro-4-nitrophenyl 6[5]-azido-6[5]-deoxy-β-maltopentaoside, N3-G5-β-CNP) are generally used. In this study, a new method for measurement of α-amylase activity in rice koji was developed using ethylidene-4-nitrophenyl-α-D-maltoheptaoside (Et-G7-PNP). Moreover, Et-G7-PNP method was compared with N3-G5-β-CNP method.

The test samples (n = 7) were prepared by the extraction of commercially available or small-scale manufacturing rice koji based on the NRIB standard method of analysis. N3-G5-β-CNP method was performed using the product of Kikkoman Biochemifa Company. Et-G7-PNP method was carried out by the measurement of absorbance of PNP (400 nm) produced by the conjugated glucoamylase and α-glucosidase reactions.

Et-G7-PNP method (x) was rapid and easy, and the procedures were similar to those of N3-G5-β-CNP method (y). Regression equation between two methods were calculated as y = 0.91 x －0.60, and a good correlation was observed (r = 0.993).

α-amylase, synthetic substrate, rice koji

発表責任者：五島徹也（t.goshima@nrib.go.jp）

講演番号：2E1p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E1 会場

大腸菌呼吸鎖変異株ΔNDH-IΔCytbo$_3$を用いたグルコースからの GABA の高生産

Improved fermentative GABA production from glucose by inactivation of respiratory chain components NDH-I and Cytbo$_3$ in Escherichia coli

○若原 洋輝、溝越 拓哉、吹谷 智、横田 篤、前田 智也（北大院農）
○ Hiroki WAKAHARA, Takuya MIZOKOSHI, Satoru FUKIYA, Atsushi YOKOTA, Tomoya MAEDA (Hokkaido Univ.)

γ-アミノ酪酸 (GABA) は、機能性食品の原料などに用いられており、グルタミン酸 (Glu) からグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) による一段階反応によって生合成される。我々は大腸菌において、呼吸鎖酵素のうちプロトンポンプ機能を有する I 型 NADH 脱水素酵素 (NDH-I) と、*bo* 型末端酸化酵素 (Cyt*bo*$_3$) の二重欠損株（ΔΔ株）が、Glu を異常生産（50 g/L のグルコースから約 7 g/L）することを見出している。本研究では、本株が有する特異な Glu 高生産能を活用することで、GABA 高生産株の育種を目指した。野生型 GAD は中性条件では不活性化されるため、中性 pH 付近でも活性を有する変異型 GadB (Glu89Gln/Δ452-466) を大腸菌野生株 (W1485) と ΔΔ 株にそれぞれ導入した W1485+*gadB´* と ΔΔ+*gadB´*を構築し、無機塩発酵培地を用いてジャーファーメンターによる培養試験を行い、GABA 生産量を比較した。その結果、ΔΔ+ *gadB´*株は GABA を約 1.0 g/L 生産し、W1485+ *gadB´*と比較して GABA 生産量が約 2 倍に増加した。さらに、ΔΔ+*gadB´*から野生型の GadA と GadB を欠損させると GABA 生産量が約 1.3 g/L に増加した。また、ΔΔ+ *gadB´*において GadC の C 末欠損 (Δ471-511) 変異を導入することで中性条件下での GABA/Glu アンチポート活性を上昇させたところ GABA 生産量が約 1.5 g/L に増加した。以上より、ΔΔ 株が GABA の高生産に有用であることが示された。

γ-Aminobutyric acid (GABA) is used as a functional food material. In *Escherichia coli*, GABA is synthesized from L-glutamic acid (Glu) in a single step by glutamate decarboxylase A and B (GadA and GadB). We previously found that the *E. coli* ΔΔ strain, harboring dual deletions of genes encoding type I NADH dehydrogenase (NDH-I) and cytochrome *bo* terminal oxidase (Cyt*bo*$_3$) produced approximately 7 g/L Glu from 50 g/L glucose. In this study, we aim to enhance GABA production from glucose using the ΔΔ strain. GadB is active only under acidic condition, while a mutated GadB (Glu89Gln/Δ452-466) retain the activity at neutral pH. Therefore, we introduced a plasmid expressing the mutated *gadB* gene (p*gadB´*) into the ΔΔ strain and its parent strain (W1485). As a result, the ΔΔ strain carrying p*gadB´* exhibited a 2-fold increase in GABA production, reaching 1.0 g/L, compared to the W1485 strain carrying p*gadB´*. Further optimizations were pursued by deleting the wild-type GadA and GadB from the ΔΔ strain carrying p*gadB´*, resulting in a GABA production increase to 1.3 g/L. Additionally, C-terminal deletion of GadC (Δ471-511) in the ΔΔ strain carrying p*gadB´* elevated GABA production to 1.5 g/L. These results indicate that the ΔΔ strain is a promising platform for enhanced GABA production.

GABA fermentation, respiratory chain, glutamate decarboxylase

発表責任者：前田智也（tomoya.maeda@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2E1p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 E1 会場

バナナ茎から単離した新規 Saccharomyces cerevisiae およびその泡盛醸造用ロイシン蓄積変異株の特性解析

Characterization of a new Saccharomyces cerevisiae isolated from banana stems and its mutant with leucine accumulation for awamori brewing

○塚原 正俊[1]、磯貝 章太[2]、東 春奈[1]、塚原 恵子[1]、豊川 洋一[2]、高木 博史[2] ([1]バイオジェット、[2]奈良先端大・バイオ)
○Masatoshi TSUKAHARA[1], Shota Isogai[2], Haruna Azuma[1], Keiko Tsukahara[1], Yoichi Toyokawa[2], Hiroshi Takagi[2] ([1]BioJet, [2]Nara Inst. Sci Tech.)

泡盛は、約 600 年の歴史を有する日本最古の蒸留酒で、沖縄県の代表的な特産品である。一方、泡盛は第二次世界大戦の地上戦などによる影響から、商業生産に用いることが可能な醸造微生物の株は限られており、泡盛の酒質のバラエティー化における課題となっている。我々はこれまでに、ほとんどの泡盛醸造に用いられている酵母 101 株、および沖縄に自生するハイビスカスの花から分離した酵母 HC02-5-2 株について、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム情報を用いて詳細な系統解析を行った。また、泡盛の香味性強化を目的に、ロイシン（Leu）の代謝中間体から合成され、吟醸香・バナナ香の主要成分である酢酸イソアミル（IAA）の含量が増加した変異株を取得し、α-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 をコードする遺伝子（*LEU4*）の新規変異を同定するとともに、Leu の高生産メカニズムを明らかにした。さらに、これらの株を用いて醸造した泡盛の商品化に成功している。

最近、我々は沖縄で栽培される島バナナの茎から泡盛醸造が可能な高いアルコール生産能を有する酵母（35a14 株）を単離した。全ゲノム解析の結果から、35a14 株は *Saccharomyces cerevisiae* の野生株領域に位置することが示された。また、35a14 株は古酒香成分バニリンの前駆体である 4-ビニルグアヤコール（4-VG）を高生産すること、IAA の生産性が低いことが判明した。そこで、35a14 株を親株にして変異処理を施し、Leu の毒性アナログ（5,5,5-トリフルオロ-DL-ロイシン）に耐性を示す変異株の中から、親株に比べて Leu および IAA を高生産する BNNL80 株を取得した。BNNL80 株は *LEU4* 遺伝子にアミノ酸置換（Asp578Asn）を伴う変異があり、以前に報告された清酒酵母での結果と同様に、Leu によるフィードバック阻害感受性の低下が Leu や IAA を高生産することが示唆された。

さらに、BNNL80 株を用いて泡盛の小仕込み試験を行った。その結果、4-VG 濃度は 101 株の約 4 倍であり、親株と同等の値であった。一方、IAA は 101 株の 1.5-2 倍、親株の 3-5 倍にそれぞれ増加していた。したがって、BNNL80 株を用いることで、101 株と比較して、4-VG および IAA の濃度がともに高い泡盛の醸造が可能であると考えられた。実際に、本菌株を用いて醸造した新たな泡盛が今年度中に商品化される予定である（「第 3 回農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成」の支援を受けた）。

We isolated a new strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 35a14, from banana stems in Okinawa. This strain did not belong to any industrial yeast groups in a phylogenetic tree and produced high levels of alcohol. Furthermore, awamori, an Okinawa's traditional distilled alcoholic beverage, brewed with a leucine overproducing mutant derived from 35a14 showed a high concentration of isoamyl acetate.

Awamori brewing, Saccharomyces cerevisiae, comparative genomics

発表責任者：塚原正俊（tsuka@biojet.jp）

講演番号：2E1p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E1 会場

油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* を用いた飽和脂肪酸の生産
Production of saturated fatty acids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*
○大道 春輝[1]、広瀬 大樹[1]、CHIH-CHAN Wu[2]、宮崎 健太郎[2]、冨田 宏矢[2,3]、本田 孝祐[2,3]([1]阪大院・工、[2]阪大・生工国交セ、[3]阪大・先導的学際研機構)
○Haruki OMICHI[1], Daiki HIROSE[1], Wu CHIH-CHAN[2], Kentaro MIYAZAKI[2], Hiroya TOMITA[2,3], Kohsuke HONDA[2,3] ([1]Osaka Univ., [2]ICBiotech, Osaka Univ., [3]OTRI, Osaka Univ.)

油脂酵母は細胞内の脂肪酸をトリアシルグリセロール（TAG）として蓄えることができ、これまでエイコサペンタエン酸（C20:5）などの微生物生産に応用されてきた。一方、油糧酵母による飽和脂肪酸の生産研究の前例は限られている。現在、飽和脂肪酸の供給源は主に動物に依存しており、その供給源を広げることは、持続可能な食糧供給に貢献しうる。本研究では、油脂酵母を新たな供給源とした飽和脂肪酸の生産を目指した。

本研究で使用する油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* W29 は多様な遺伝子ツールが開発されている。本菌株が生産する TAG には、飽和脂肪酸であるパルミチン酸（C16:0), ステアリン酸（C18:0）の他、パルミトレイン酸（C16:1), オレイン酸（C18:1）などが含まれる。そこで、この酵母が生産する脂肪酸を飽和脂肪酸に限定するため、CRISPR/Cas9 システムを利用して、脂肪酸の不飽和化を担う酵素遺伝子 *FAD9* をノックアウトした。得られた *Δ FAD9* 株の生育特性を調べたところ、この株は C16:1 や C18:1 等の存在下でのみ生育が可能な不飽和脂肪酸要求性を示した。また、不飽和脂肪酸を添加した条件下では、その不飽和脂肪酸が TAG に取り込まれることが分かった。よって、*Δ FAD9* 株を直ちに飽和脂肪酸生産株として利用することはできないが、不飽和脂肪酸の種類を外来のものに限定することは可能であることがわかった。

Oleaginous yeasts accumulate fatty acids as triacylglycerols (TAGs) and have been applied to the production of eicosapentaenoic acid (C20:5) and other functional fatty acids. On the other hand, little is reported on the production of saturated fatty acid (SFA) by oleaginous yeasts. As the majority of SFA is currently supplied from animal sources, development of novel SFA source is important to promote sustainability in global food supply. In this study, we aimed to produce SFA in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* W29, whose genetic engineering tools have been established. First, the *FAD9* gene encoding a fatty acid desaturase was knocked out using CRISPR/Cas9. The strain showed unsaturated fatty acids auxotrophy, and its TAG contains the exogenously added unsaturated fatty acid. This indicates that the composition of unsaturated fatty acids in this disruptant can be modified with exogenous fatty acids.

Triacylglycerol, Oleaginous yeast, Fatty acid

発表責任者：本田孝祐（honda.kohsuke.icb@osaka-u.ac.jp）

講演番号：2E1p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E1 会場

バクテリアルセルロース生産における培地成分の影響

Effect of　medium component on bacterial cellulose production

○鷹西 晴大[1]、片桐 瀬那[1]、樋口 杏奈[1]、小林 由衣乃[2]、鈴木 敏弘[3]、石川 森夫[3]、仁平 高則[1]、竹園 恵[1]、小野寺 正幸[1,2] ([1]新潟工大工、[2]新潟県微研、[3]東農大醸造)
○Haruto TAKANISHI[1], Sena KATAGIRI[1], Anna HIGUCHI[1], Yukino KOBAYASHI[2], Toshihiro SUZUKI[3], Morio ISHIKAWA[3], Takanori NIHIRA[1], Satoshi TAKESONO[1], Masayuki ONODERA[1,2] ([1]Niigata Inst. Tech., [2]Niigata Pref. Microb. Soci., [3]Tokyo Univ. Agri.)

【目的】酢酸菌の生産するバクテリアルセルロース（BC）は、その繊維の太さが 20～50nm と植物セルロースの 1/100 以下であり、この細い繊維が絡みあって微細な網目構造をとり、様々な物性を持つことが知られており、食品以外の産業分野において新規機能性を有する素材の一つとしてその応用に期待が注がれている。しかしながら、現時点では、その生産コストのさらなる低減が指摘されている。そこで、生産コストの低減を目指し、培地成分の影響について検討を行った。
【方法・結果】BC 生産菌として、*Komagataeibacter nataicola* NRIC 0616 を用いた。培地として HS 培地（グルコース:20g/L、ペプトン:5g/L、酵母エキス:5g/L、クエン酸一水和物:1.15g/L、Na_2HPO_4:2.7g/L(pH 6.0)）を基準として用いた。培養温度は 30℃とし、7 日間の静置培養を行った。BC 生産量は、BC を 1M-NaOH に浸し、その後、流水にて洗浄し乾燥重量にて評価した。窒素源の一つである高価なペプトンの代替を期待してコーンスティープ(CSL)を、また、ペプトンを 2.5g/L とし、安価な無機窒素源として硫安、塩安、リン酸三アンモニウムをそれぞれ 2.5g/L の添加による培養を行った。CSL を使用した場合、ペプトン使用時より、BC 生産量は低下した。無機窒素源として、リン酸三アンモニウムが適しているものと思われ、硫安や塩安の添加は、BC 生産量を低下させ、むしろ阻害的に働いているものと示唆された。現在、乳酸発酵乳ホエーでの BC 生産について検討している。

Bacterial cellulose (BC) is an all-round biomaterial and has found applications in many processes giving products like high-quality paper, wound repair materials, nanocomposites, etc. However, high cost and low-yield production of BC limits its use to a few biomedical devices and traditional fermented products, including Nata de Coco, in Asian countries. Here we reported that effect of medium component on BC production by *Komagataeibacter nataicola* NRIC 0616. HS medium (Glucose:20g/L, Peptone:5g/L, Yeast Extract:5g/L, Citric Acid Monohydrate:1.15g/L, Na_2HPO_4:2.7g/L (pH 6.0)) was used as a basal medium. Static cultivation was done and cultivation temperature was 30℃. BC production was decreased with Corn Steep Liquor Corn instead of Peptone. In the case of 2.5g/L of Peptone in medium, addition of 2.5g/L of Ammonium sulfate and ammonium chloride respectively made BC production decreased, while addition of 2.5g/L of triammmonium phosphate enhanced BC production. BC production with whey is currently in progress.

Bacterial cellulose, Nitrogen source, Triammonium phosphate

発表責任者：小野寺正幸（onodera@acb.niit.ac.jp）

講演番号：2E1p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E1 会場

清酒中オリゴ糖による香気成分の揮発抑制効果
Suppression of volatilization of aroma compounds by sake oligosaccharides
○六倉 春樹[1]、本田 千尋[2]、中山 俊一[1,3]、岡田 奈菜子[3]、馬宮 綾音[3]、進藤 斉[1,3]、穂坂 賢[1,3]、徳岡 昌文[1,3] ([1]東農大院・応生、[2]静岡県大・食栄、[3]東農大・応生)
○HARUKI MUTSUKURA[1], Chihiro Honda[2], Syunichi Nakayama[1,3], Nanako Okada[3], Ayane Mamiya[3], Hisashi Shindo[1,3], Masaru Hosaka[1,3], Masafumi Tokuoka[1,3] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Univ. of Shizuoka., [3]Tokyo Univ. of Agric.)

清酒中のオリゴ糖は全糖の 22～65%を占め特徴的な構造の糖を含むことが分かっており、清酒の丸味やコクに寄与するなど、清酒の味の調和に必要と考えられているものの、具体的な研究報告は限られている。本研究では清酒からオリゴ糖を精製し、官能評価及び機器分析により、清酒香味への影響を明らかにすることを目指した。

はじめに市販清酒から活性炭及び HPLC を用いて、重合度 3 以上のオリゴ糖を 5.5 g 精製した。精製したオリゴ糖を、モデル清酒に添加して官能評価を行ったところ、香りへの影響が示唆された。二点識別法による官能評価においても、清酒香気が有意に抑制されることが確認された。酢酸イソアミル及びカプロン酸エチルの揮発抑制効果を HS-GC/MS を用いて調べたところ、オリゴ糖の添加により、香気成分が液中に保持される傾向が示された。以上より、清酒中オリゴ糖は清酒の香気成分を保持する効果がある可能性が示された。

Oligosaccharides consist of 22-65% of the total sugar in sake and have characteristic structures. Sake oligosaccharides are needed to harmonize the taste of sake, such as contributing to the roundness and body; however, experimental demonstration has been scarce.
In this study, the effect of oligosaccharides on the flavor and taste of sake were evaluated through sensory evaluation and instrumental analysis. Oligosaccharides with a degree of polymerization of three or higher were purified from sake using activated charcoal and HPLC. Sensory evaluation suggested that oligosaccharides effect on the flavor of sake. HS-GC/MS analysis showed oligosaccharide addition suppressed volatilization of isoamyl acetate and ethyl caproate. Our data suggest that sake oligosaccharides could retain the aroma components of sake.

sake, oligosaccharides, aroma compounds

発表責任者：徳岡　昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：2E1p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E1 会場

Molecular breeding of the oleaginous fungus *Mortierella alpina* for the production of EPA at ordinary temperature

○Nina Barua[2], Akinori Ando[1,2], Tomoyo Okuda[2], MO Brian King Himm[2], Ryohei Nakatsuji[2], Hiroyuki Ikemoto[3], Hiroshi Kikukawa[5], Takaiku Sakamoto[4], Sakuradani Eiji[4], Jun Ogawa[1,2] ([1]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Nisshin Pharma Inc., [4]Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, [5]Div. Appl. Chem., Fac. Eng., Hokkaido Univ.)

Eicosapentaenoic acid (EPA), an ω3 fatty acid, is demanded as a pharmaceutical and food additive due to its benefits for human health. EPA is commonly derived from fish oil, but alternative sources are required because of some problems including sustainability and stability of supply. *Mortierella alpina* 1S-4, an oleaginous fungus, is known to accumulate EPA when cultivated at low temperatures (<15 ºC). However, low cultivation temperatures restrict growth of the organism. Moreover, endogenous ω3 desaturase (*ω*3DS), the enzyme catalyzing the conversion of arachidonic acid (ARA) to EPA, has broad substrate specificity, which causes the accumulation of undesired ω3 fatty acids other than EPA. Therefore, in this study, we addressed the isolation of heterologous genes that possess suitable substrate specificity and efficient expression at an ordinary temperature (28 °C), in order to produce EPA by molecularly bred *Mortierella alpina.*

We isolated an EPA-producing strain from soil identified as *Pythium torulosum*. In addition, *Pythium sulcatum* and *Plectospira myriandra*, species related to *P. torulosum*, were selected based on their high production ratio of EPA to ARA. Subsequently, three putative *ω3DS* genes were isolated from the genomes of these strains (*Ptω3* from *P. torulosum*, *Psω3* from *P. sulcatum* and *PmD17* from *P. myriandra*). Functional analysis of these genes by heterologous expression using yeasts at 28 °C revealed that *Ptω3* and *Psω3* convert 18- and 20-carbon ω6 fatty acids into corresponding ω3 fatty acids, while *PmD17* only converted 20-carbon ω6 fatty acids. When heterologously expressed in *M. alpina,* these desaturases showed enhanced EPA production. Especially the transformants with overexpressed *PmD17* showed an EPA composition of approximately 80 % of total fatty acids on a test tube scale. On a 5 L jar fermenter scale, this transformant showed 14 g/L fatty acid productivity and 52 % EPA composition.

PUFAs, EPA, *Mortierella alpina*

発表責任者：Jun Ogawa（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2E1p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E1 会場

味噌中のオリゴ糖の網羅的分析

Comprehensive analysis of oligosaccharides in miso

○河崎 乃々果[1]、勝田 亮[2]、徳岡 昌文[3]、熊澤 茂則[1]、本田 千尋[1] ([1]静県大食栄、[2]東農大院生命、[3]東農大院応生)
○ Nonoka KAWASAKI[1], Ryo KATSUTA[2], Masafumi TOKUOKA[3], Shigenori KUMAZAWA[1], Chihiro HONDA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric., [3]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】味噌は大豆と麹、塩を混ぜて発酵・熟成させたものであり、麹の種類や熟成期間によって味噌の成分組成は変わる。味噌中の単糖は味噌の甘味に、多糖は味噌のキメやコシに寄与していることが知られている。味噌中のオリゴ糖に関する研究は主に 1950~1970 年頃に行われていたが、当時の分析手法は現在に比べ感度が低かった。そこで本研究では高感度な分析法を用いて味噌中のオリゴ糖を網羅的に分析し、味噌の種類と含まれるオリゴ糖との関連を調べることを目的とした。
【方法・結果】親水性相互作用液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いて市販の米味噌、麦味噌、豆味噌を分析したところ、麦味噌からセロオリゴ糖であると思われる 2、3、4 糖のピークが検出され、加えて、これまでに清酒から発見された新規オリゴ糖と溶出時間が一致するピークが米味噌、麦味噌、豆味噌から共通して検出された。また、主成分分析を行ったところ、スコアプロットにおいて味噌の麹原料ごとにグルーピングされた。ローディングプロットにおいて、寄与率の高い成分は既知のものが多かったが、そのなかに PC2 の正の方向への寄与率が高く、米味噌に多く含まれる未同定の 2 糖があった。この 2 糖について NMR 解析した結果、還元末端を持つ β 結合の糖であることが分かった。現在、この糖の詳細な構造解析を進めている。
【Purpose】Miso is a traditional Japanese fermented food made from soybeans, koji, and salt through maturation process. Studies on oligosaccharides in miso have been conducted before 1970. In this study, we comprehensively analyzed oligosaccharides in miso using a sensitive analytical method to elucidate the correlation between the type of miso and oligosaccharide profiles.
【Methods・Results】Using HILIC-MS, we analyzed commercially available miso products and detected peaks of disaccharide, trisaccharide, and tetrasaccharide that were thought to be cello-oligosaccharides from barley miso. Furthermore, oligosaccharides with elution times identical to those already found in sake were commonly found in rice miso, barley miso, and soybean miso. Principal Component Analysis (PCA) revealed that miso samples could be grouped based on koji ingredient. We found out the uncharacterized disaccharide that has a high positive contribution of PC2 and is abundant in rice miso. NMR analysis revealed that the disaccharide is a beta-linked sugar with a reducing end.

oligosaccharide, miso, LC-MS

発表責任者：本田千尋（honda1201@u-shizuoka-ken.ac.jp）

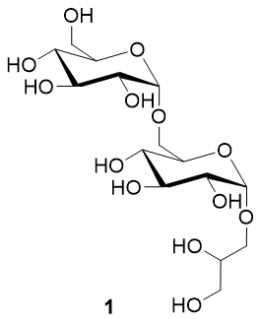
講演番号：2E1p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E1 会場

清酒より発見された配糖体の構造解析

Structural analysis of glycosides discovered in sake.

○秋山 唯[1]、本田 千尋[1]、吉澤 耕[2]、山田 明日香[2]、小泉 泉美[2]、徳岡 昌文[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静県大院薬食、[2]東農大院応生)
○Yui Akiyama[1], Chihiro Honda[1], Kou Yoshizawa[2], Asuka Yamada[2], Izumi Koizumi[2], Masafumi Tokuoka[2], Shigenori Kumazawa[1] ([1]The Univ. of Shizuoka, [2]Tokyo Univ. of Agric.)

清酒の糖化工程では、麹菌のα-グルコシダーゼの持つ糖転移作用によって様々な配糖体が生成される。清酒中のエチル-α-グルコシドやα-グルコシルグリセロールなどは呈味を持つ他、高い保湿性を有することから化粧品などにも利用されている。最近、清酒中の糖転移産物として、エチル-α-マルトシドとエチル-α-イソマルトシドが発見され、我々は清酒にはまだ未解明の糖転移産物が存在すると考えた。本研究では、新たな糖転移産物の発見を目的とし、清酒中成分の探索を行った。始めに、麹菌の主要なα-グルコシダーゼである AgdA の遺伝子破壊による影響を調べた。AgdA 遺伝子破壊株を用いた清酒の小仕込み試料とコントロールを LC-MS 分析により比較したところ、前者で顕著に減少する未同定化合物のピークが確認された。*m/z* 値から、この未同定化合物はα-グルコシルグリセロールにグルコースが結合した構造であると予想した。構造解析のための十分な量の試料を清酒から精製することは困難であると考え、マルトースとグリセロールを基質とした、AgdA による同一化合物の生成を試みた。生成物を LC-MS および LC-MS/MS 分析したところ、清酒中の未同定化合物と、溶出時間およびフラグメントイオンの一致するピークが検出された。NMR 解析の結果、未同定化合物は **1** の構造であることが明らかになった。また、この化合物は文献未記載の新規化合物であった。



1

In the saccharification process of sake, various glycosides are produced by the transglycosylation action of α-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. Therefore, in this study, we searched for components in sake with the aim of discovering new transglycosylation products. When comparing sake made with *koji* from the AgdA gene-disrupted *A. oryzae* strain with a control sample using LC-MS analysis, a peak of unidentified compound that was significantly reduced in the former, was observed. Based on the *m/z* value, it was predicted that this unidentified compound possesses a structure in which glucose is bound to α-glucosylglycerol. We attempted to generate the same compound from maltose and glycerol using AgdA. When the product was analyzed by LC-MS and LC-MS/MS, an unidentified compound in sake was detected, as well as peaks with matching elution times and fragment ions. NMR analysis revealed that the structure of the unidentified peak was determined as new compound **1.**

Sake, α-glucosidase, transglycosylation

発表責任者：本田千尋（honda1201@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E1p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E1 会場

タンパク質組成変異米を麹及び掛米に用いた製成酒の特徴について

Characteristic of sake brewed using the protein composition variation rice for koji and adding rice for sake brewing

○飯塚（古川） 幸子、長船 行雄、藤田 晃子、阿久津 武広、磯谷 敦子、鈴木 崇、向井 伸彦（酒総研）
○Sachiko IIZUKA(FURUKAWA), Yukio OSAFUNE, Akiko FUJITA, Takehiro AKUTSU, Atsuko ISOGAI, Takashi SUZUKI, Nobuhiko MUKAI (NRIB)

近年、清酒業界では、新しい果実様の香りを清酒に付与する醸造技術の確立が望まれている。これまでに、みずほのかなどのタンパク質組成変異米品種を用いた清酒には特有の香りが生じることがわかっているが[1)]、麹と掛米のどちらが効果的かなどの詳細を調べた例は報告されていない。そこで、本研究では、タンパク質組成変異米品種春陽を麹及び掛米に用いて醸造した製成酒の酒質を調べた。まず、春陽と対照として山田錦、種麹に吟醸用ハイ G（樋口松之助商店）を用いて製麹試験を行ったところ、春陽の麹はα-アミラーゼ、グルコアミラーゼの力価が低く、酸性カルボキシペプチダーゼの力価が高かった。次に、この製麹試験により得た麹を用いて、春陽と山田錦をそれぞれ麹と掛米の全量、麹のみ、掛米のみ用いる 4 区分の試験区を設定した清酒醸造試験を行った。その結果、製成酒の官能評価では、春陽を掛米とする試験区はマスカット・ライチ・グレープフルーツの香りの強度が山田錦を掛米とする試験区よりも有意に高かった。

1) 飯田ら：近畿中国四国農業研究センター研究報告，8，45-62，2009.

In recent years, the establishment of the brewing technology to give a new fruit-like aroma to sake is expected in the sake brewing industry. Although sake brewed using the protein composition variant rice such as *Mizuhonoka*, has the characteristic aroma[1)], there are no reports which of koji and adding rice is effective. In this study, we have examined the quality of sake brewed using the protein composition variant rice *Syunyo* as koji and adding rice. The koji making test was performed with the use of *Syunyo*, control rice *Yamadanishiki* and seed koji Hi-G (Higuchi Matsunosuke Shouten). The activity of alpha-amylase and glucoamylase of *Syunyo* was lower than that of *Yamadanishiki*, hence the activity of acid carboxypeptidase of *Syunyo* was higher than that of *Yamadanishiki*. Then Sake brewing test with koji obtained from the koji making test was performed, that set four test section : using *Syunyo* and *Yamadanishiki* each as for total rice, only koji or adding rice. In the sensory evaluation of obtained sake, the aroma intensity of muscat, lychee and grapefruit were significantly high in the sake brewed using *Syunyo* for adding rice compared to the sake using *Yamadanishi* for that.

1) Iida et al : Bull. Natl. Agric. Res. Cent. West. Reg., 8, 45-62, 2009

protein composition variant rice, new fruit-like aroma, characteristics of sake

講演番号：2E2a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E2 会場

細胞性粘菌の発生過程におけるスフィンゴミエリナーゼコード遺伝子の機能解析
Functional analysis of sphingomyelinase genes in *Dictyostelium* development
○池谷 彩佳[1]、成田 隆明[2] ([1]千葉工大・院先進工、[2]千葉工大・先進工・生命)
○Ayaka IKEYA[1], Takaaki NARITA[2] ([1]Grad. Sch. of Adv. Eng., Chiba Inst. of Tech., [2]Dep. of Lifesci. Fac. of Adv. Eng., Chiba Inst. of Tech.)

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が合成する二次代謝産物 DIF-1 は、*D. discoideum* において柄細胞分化誘導因子として機能しているが、その詳細な作用機構は明らかとなっていない。スフィンゴ脂質であるセラミドの生合成経路の一つとして、スフィンゴミエリナーゼ (SMase)によってスフィンゴミエリンからセラミドを遊離させる SMase 経路が存在する。セラミドはシグナル分子として機能して細胞死を誘導することが知られているが、*D. discoideum* におけるセラミドの機能は不明である。そこで本研究では、DIF-1 による柄細胞分化誘導メカニズムと SMase によるセラミド合成の関連性を明らかにするため、*D. discoideum* の発生過程で SMase 経路により合成されるセラミドが、シグナル分子としてどのように機能しているかを明らかにすることを目的とした。*D. discoideum* における SMase 遺伝子の一つ（*sgmB*)を破壊した *sgmB*株を作製し、その表現型の解析を行った結果、*sgmB*株は野生株と比較して Basal disc 形成率が有意に低下した。また、*sgmB*株では DIF-1 による柄細胞分化誘導率が有意に低下したことから、*sgmB*株は DIF-1 に対する応答能が低下していることが分かった。また、*sgmB*株における Basal disc 形成の欠損は *sgmB* の過剰発現によって相補されたことから、上記の表現型の欠損は *sgmB* の欠失により引き起こされていることを確認した。以上より、*sgmB* は *D. discoideum* の Basal disc 形成および DIF-1 応答能に関与しており、DIF-1 による柄細胞分化誘導メカニズムの下流に *sgmB* が存在していることが示唆された。

DIF-1 is a secondary metabolite produced by *Dictyostelium discoideum* and acts as the stalk cell inducing factor. However, its detailed mechanism of mode of action has been unclear. The sphingolipid ceramide is known for acting as a signalling molecule to induce cell death. In one of the biosynthetic pathways, ceramide is produced from sphingomyelin by sphingomyelinase (SMase). The role of ceramide is unknown in *Dictyostelium* development, so we examined the role of an SMase gene (*sgmB*) during development and the relationship between DIF-1 and ceramide in *D. discoideum*. We created and analysed *sgmB* knockout (*sgmB*$^-$) mutants. *SgmB*$^-$ mutants had defects in basal disc formation and showed reduced ability to respond to DIF-1. Overexpression of *sgmB* could rescue the basal disc formation in *sgmB*$^-$ mutants, indicating that the above phenotypes in *sgmB*$^-$ mutants were caused by the lack of *sgmB*. These results suggest that *sgmB* may be a downstream component of DIF-1 to induce stalk cell differentiation in *D. discoideum*.

Sphingomyelinase, Polyketide, Cellular slime mold

発表責任者：成田隆明（takaaki.narita@p.chibakoudai.jp）

講演番号：2E2a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E2 会場

セラミドの de novo 合成に関わる遺伝子の過剰発現が *Dictyostelium discoideum* の発生・分化に与える影響

Effects of overexpression of genes involved in the de novo biosynthesis for ceramides on *Dictyostelium* development

○木村 詩音[1]、成田 隆明[2] ([1]千葉工大・院先進工、[2]千葉工大・先進工・生命)
○Shion KIMURA[1], Takaaki NARITA[2] ([1]Grad. Sch. of Adv. Eng., Chiba Inst. of Tech, [2]Dep. of Lifesci. Fac. of Adv. Eng., Chiba Inst. of Tech)

スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは、構造脂質としての機能を担う一方で細胞内のシグナル分子として機能することが知られている。セラミドの代表的な生合成経路として、de novo 経路およびスフィンゴミエリナーゼが関与する SMase 経路が存在する。本研究では、シグナル分子としてのセラミドの機能に着目し、発生・分化のモデル生物である細胞性粘菌を研究対象とすることで、de novo 経路により合成されるセラミドが特異的に制御する生命現象を明らかにすることを目的とした。そこで、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* におけるセラミドの de novo 合成に関与していると考えられる 2 つの遺伝子（セラミド合成酵素遺伝子 *crsA*、ジヒドロセラミド不飽和化酵素遺伝子 *desA*）について、各遺伝子の過剰発現株（*crsA*^{OE} 株, *desA*^{OE} 株)ならびに二重過剰発現株（*crsA*^{OE}/*desA*^{OE} 株)を作製し、それらの表現型の解析を行った。その結果、*crsA*^{OE} 株と *desA*^{OE} 株では、野生株と比べて表現型に目立った違いは観察されなかった。一方、*crsA*^{OE}/*desA*^{OE} 株では、野生株に比べて多細胞体形成時の細胞集合範囲が狭くなり、小さな子実体が形成された。また、*crsA*^{OE}/*desA*^{OE} 株では野生株に比べて sporulation efficiency が減少したが、spore viability は正常であった。以上の結果から、*D. discoideum* において、*crsA* と *desA* が同時に過剰することで初めてセラミドの de novo 合成に影響が生じ、セラミドの過剰産生は *D. discoideum* の発生・分化に影響を与えることが示唆された。

The sphingolipid ceramide is known to function as not only a structural lipid but an intracellular signalling molecule. There are two typical pathways for ceramide biosynthesis, de novo pathway and SMase pathway. In this study, we aimed to clarify the biological process that was specifically regulated by ceramides produced in the de novo pathway in a model organism *D. discoideum*. We focused on two genes coding the ceramide synthase CrsA and the dihydroceramide desaturase DesA in *D. discoideum,* and analysed their overexpression strains (*crsA*^{OE}, *desA*^{OE}, and *crsA*^{OE}/*desA*^{OE} strains). In *crsA*^{OE} and *desA*^{OE} strains, there were no phenotypic differences compared to the wild-type. However, *crsA*^{OE}/*desA*^{OE} strains formed smaller multicellular aggregates, followed by forming smaller fruiting bodies compared to the wild-type. The sporulation efficiency was significantly decreased, while the spore viability was completely normal in *crsA*^{OE}/*desA*^{OE} strains. These results suggest that overexpressions of both *crsA* and *desA* affect to ceramide biosynthesis in the de novo pathway and to multicellular development in *D. discoideum*.

Ceramide, Development and differentiation, Dictyostelium

発表責任者：成田 隆明（takaaki.narita@p.chibakoudai.jp）

講演番号：2E2a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E2 会場

出芽酵母における微小管脱重合阻害剤添加によるミトコンドリア形態異常
Inhibition of mitochondrial fusion and fission by addition of microtubule polymerization inhibitors in budding yeast

○村田 和加惠[1,2]、山瀬 優日[1]、荻田 亮[3]、山口 良弘[2]、藤田 憲一[2]([1]米子高専、[2]大阪公大院・理、[3]大阪公大健康研セ)
○ Wakae MURATA[1,2], Yuni YAMASE[1], Akira OGITA[3], Yoshihiro YAMAGUCHI[2], Ken-ichi FUJITA[2] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol, [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ,, [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka Metro. Univ,)

真核生物の主要な細胞骨格の一つである微小管は、細胞の形態維持や細胞分裂などの多様な細胞機能において重要な役割を担っている。微小管はα-tubulin とβ-tubulin が結合した二量体を構成単位とし、微小管の両端では重合と脱重合が絶えず繰り返される動的な構造をもつ。一方、ミトコンドリアは細胞分裂に必要なエネルギー供給、アポトーシスの制御や細胞老化などにおいて重要な働きを担い、融合および分裂を繰り返すことで自身の形態を維持している細胞小器官である。ミトコンドリアの融合および分裂に関わるタンパク質はいくつか同定されている。しかしながら微小管との関係についての研究報告はほとんどなされていない。本研究では、出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。微小管重合阻害剤である Thiabendazol および微小管安定化剤である Nordihydroguaiarentic acid を *S. cerevisiae* に添加し、ミトコンドリアの融合および分裂異常がどのような割合で生じるのかを GFP を用いて細胞内での局在を観察することによって検証を行った。その結果、Thiabendazol 添加細胞においては分裂したミトコンドリアおよび微小管の伸長阻害が確認され、さらに細胞内での局在の変化も観察された。一方、Nordihydroguaiarentic acid 添加細胞においては、枝分かれしたミトコンドリアが観察され、微小管の伸長が確認された。微小管脱重合阻害剤添加細胞においてミトコンドリア GFP の蛍光が強く見られたため、RT-PCR を行った結果、ミトコンドリアに関連する遺伝子において微小管脱重合阻害剤を添加した細胞において転写量の増加が観察された。

Microtubules play an important role in maintaining cell morphology and various cellular functions such as cell division. Mitochondria are responsible for the production of energy necessary for cell division. Mitochondria maintain their own morphology by repeatedly fusing and dividing. Several proteins involved in mitochondrial fusion and fission have been identified. However, there have been few reports on the relationship between microtubules and mitochondria. In this study, microtubule polymerization inhibitor, Thiabendazole and the microtubule stabilizing agent, nordihydroguaiarentic acid were added to budding yeast, and the rate of mitochondrial fusion and fission abnormality was examined by observing the subcellular localization using GFP. Mitochondrial fission abnormalities were observed in Thiabendazol and nordihydroguaiarentic -treated cells. This suggests that microtubules were associated with mitochondrial fusion and fission.

Saccharomyces cerevisiae, mitochondria, microtubule

講演番号：2E2a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E2 会場

Persimmon tannin enhances *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to ethanol stress

○Ilhamzah[1], Yoshihiro Yamaguchi[1], Akira Ogita[1,2], Ken-ichi Fujita[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ., [2]Res. Center Urban Health Sports, Osaka Metro. Univ.)

Background and aim: *Saccharomyces cerevisiae* plays a pivotal role in various industrial processes, including bioethanol production and alcoholic beverage fermentation. However, during these fermentations, yeasts are subjected to various environmental stresses, such as ethanol stress, which hinder cell growth and ethanol production. Genetic manipulations and the addition of natural ingredients rich in antioxidants to the culture has been shown to overcome this. In this study, we investigated the potential of persimmon tannins, known for their antioxidative properties, to enhance the ethanol stress tolerance of yeast.

Results: The assessment of effects of 6.25 mg/mL persimmon tannins after 48 h of incubation revealed cell viability to be increased by 8.9- and 6.5-fold compared to the control treatment with and without 12.5% ethanol, respectively. In addition, persimmon tannins reduced ethanol-induced oxidative stress, including the production of cellular reactive oxygen species and acceleration of lipid peroxidation. However, persimmon tannins could hardly overcome ethanol-induced cell membrane damage.

Conclusion: The findings herein indicate the potential of persimmon tannin as a protective agent for increasing yeast tolerance to ethanol stress by restricting oxidative damage, but not membrane damage. Overall, this study unveils the implications of persimmon tannins for industries relying on yeast.

Saccharomyces cerevisiae, persimmon tannin, oxidative stress

発表責任者：Ilhamzah（sg22856e@st.omu.ac.jp）

講演番号：2E2a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E2 会場

アルコール発酵におけると酵母細胞内タンパク質の凝集と Btn2 の重要性
Aggregation of yeast intracellular proteins during alcoholic fermentation

今井 芙月、古谷 昇、○井澤 真吾（京都工繊大院工芸科学）
Futsuki Imai, Noboru Furutani, ○Shingo Izawa (Kyoto Inst. Technol.)

10%以上の高濃度エタノールはアルコール発酵を行う酵母にとってもシビアなストレスとなり、一部の細胞内タンパク質の変性・凝集を引き起こす。変性タンパク質は Btn2 などによって INQ などの deposition sites (DS) に隔離・蓄積され、その毒性の拡散が抑えられるとともに、DS 内で効率的に再生・分解される。一方、46˚C の熱ショックによって約 180 種の酵母タンパク質が凝集することが報告されている (Wallace *et al.*, 2015)。今回、酵母のプロテオスタシスに対する高濃度エタノールの影響についての理解を深めるために、46˚C で凝集するタンパク質が 10%エタノールストレス下でも同様に凝集するのか比較検討を行った結果、10%エタノールでは凝集しないタンパク質が確認された。

また、ワイン酵母 EC1118 株で *BTN2/btn2*Δと *btn2*Δ*/btn2*Δの遺伝子破壊株を構築し、合成果汁培地を用いた発酵試験を行った。その結果、遺伝子破壊株ではエタノール濃度の上昇に遅延が認められ、Btn2 による変性タンパク質の DS への隔離がアルコール発酵を行う上でも重要であることが示唆された。

High concentrations of ethanol (>10%) are severely stressful for yeast that conducts alcohol fermentation, causing denaturation and aggregation of some intracellular proteins. Denatured proteins are sequestered and accumulated at deposition sites (DS) such as INQ and CytoQ by Btn2 and others to prevent their toxicity from spreading, and are efficiently regenerated and degraded in the DS. On the other hand, it has been reported that heat shock stress at 46˚C denatures and aggregates about 180 of the 6000 yeast proteins (Wallace *et al.*, 2015). In order to better understand the effect of high ethanol concentration on yeast proteostasis, we compared whether the 180 proteins that aggregate at 46˚C also aggregate under 10% ethanol stress. The analysis revealed that some proteins did not aggregate under 10% ethanol stress.

In addition, we constructed gene disruption strains of BTN2/btn2Δ and btn2Δ/btn2Δ in wine yeast strain EC1118 and conducted fermentation tests using synthetic fruit juice medium, and found a delay in the increase in ethanol concentration in the gene disruption strains. These results suggest that, although there are differences from heat shock, sequestration to DS by Btn2 against ethanol-induced protein denaturation plays an important role in proper stress response and alcohol fermentation.

ethanol stress, proteostasis, protein aggregation

発表責任者：井沢真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：2E2a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E2 会場

下面発酵ビール醸造酵母の凝集とエタノール耐性の関係性について

Relationship between aggregation and ethanol tolerance in bottom fermented beer brewing yeast

○小島 香穂、三浦 健（東洋大院生命科学）
○Kaho KOJIMA, Takeshi MIURA (Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

ビール製造において上面発酵では *Saccharomyces cerevisiae* が用いられ、下面発酵では凝集能が強い *Saccharomyces pastorianus* が用いられている。*S. cerevisiae* において凝集がエタノールストレスの緩和に影響を与えているという報告はあるが、*S. pastorianus* ではない。そこで本研究では、*S. pastorianus* の凝集がエタノール耐性および生成に与える影響を解明することを目的とした。

ビール醸造株および標準菌株について、菌体が凝集する条件の検討を行った。その結果、Ca^{2+}存在下で最も凝集が見られた。2 株を比較したところ凝集能は醸造株の方が明らかに高かったため、醸造株を用いて実験を行った。まず、凝集状態の醸造株と EDTA により解凝集させた醸造株を用いてエタノール耐性試験を行った。その結果、5%においては生存率に差が見られなかったが、10%においては凝集状態の酵母の方が生存率が高かった。また、標準菌株の至適温度である 24℃で 72 時間培養した時の増殖率と 1 細胞あたりのエタノール生成量を測定した。凝集度の強弱で結果を比較したところ、凝集度が強い酵母の方が増殖率が高く、凝集度が増加することでエタノール生成量も増加した。現在は、エタノール存在下における *S. pastorianus* 特有の凝集性遺伝子（Lg-*FLO1*）および凝集有無におけるアルコール生成関連遺伝子（*ADH1*）の関係性に着目している。本発表ではこれらのデータの詳細について報告する。

In beer production, *Saccharomyces cerevisiae* is used for top fermentation, while *Saccharomyces pastorianus*, which has strong flocculating ability, is used for bottom fermentation. There are reports that flocculation affects ethanol stress relieving in *S. cerevisiae*, but not in *S. pastorianus*. Therefore, the purpose of this study was to elucidate the effect of *S. pastorianus* flocculation on ethanol tolerance and production.

The conditions under which beer brewing strains and standard strains agglutinate were examined. The results showed that the most aggregation occurred in the presence of Ca^{2+}. Comparison of the two strains showed that the brewer's strain had higher flocculating ability, so subsequent experiments were conducted using the brewer's strain. Ethanol tolerance tests were conducted using agglutinating and non-agglutinating yeast. At 10% ethanol, flocculating yeast had a higher survival rate. The number of viable bacteria and ethanol concentration were determined after 72 hours of incubation at 24°C. Yeasts with higher flocculence had higher growth rates, and ethanol production increased as flocculence increased. We are currently focusing on the flocculence gene (Lg-*FLO1*) and the alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*), and will report details of these data in this presentation.

beer yeast, aggregation, ethanol

発表責任者：三浦健（t-3ura@toyo.jp）

講演番号：2E2a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E2 会場

清酒酵母のエタノール応答関連遺伝子の QTL 解析
QTL analysis of ethanol response related genes in Sake yeast
○河内 孝之[1,2]、金井 宗良[1]、赤尾 健[1,2] ([1]酒総研、[2]広島大院・統合生命)
○Takayuki KOCHI[1,2], Muneyoshi KANAI[1], Takeshi AKAO[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

清酒酵母はエタノール発酵性に優れ 20%以上の高濃度のエタノールを生成できるが、その一方でストレス応答機構に欠損があり，エタノール耐性能が低いことが知られている。その原因として現在までにいくつかの遺伝子の関与が明らかにされているが，未知の因子の存在も示唆されており，未だ全貌の解明には至っていない。そこで本研究では清酒酵母のエタノール応答に関与する遺伝子及び変異の同定を目的とし，ゲノムワイドな遺伝統計学的手法である量的形質遺伝子座（QTL）解析により原因遺伝子の網羅的な探索を行った。

清酒酵母と実験室酵母を親とする交雑二倍体由来の一倍体 398 株についてエタノールストレス耐性試験を行い，表現型データを収集した。このデータとゲノム全域に約 3 kb ごとに設定した約 5,300 箇所の SNP マーカーを用いて QTL 解析を行ったところ，複数の有意な QTL が検出された。それらには清酒酵母型でストレス耐性能が高くなるものもあり、清酒酵母が示すストレス応答欠損には逆にそれを抑圧する別の機構が働いている可能性も示唆された。現在、原因遺伝子の同定のために、QTL に存在する各遺伝子について、清酒酵母型及び実験室酵母型アレルの機能評価を行っている。

Sake yeast has excellent ethanol fermentability and can produce ethanol at high concentrations of 20% or more, but on the other hand, it is known to have defects in its stress response mechanism and low ethanol tolerance. However, it is also known to have defects in the stress response mechanism and low ethanol tolerance. In this study, we aimed to identify genes and mutations involved in the ethanol response of sake yeast, and conducted a comprehensive search for causative genes using quantitative trait loci (QTL) analysis.

Phenotypic data were collected from ethanol stress tolerance tests of 398 haploid strains derived from crosses of sake yeast and laboratory yeast as parents. QTL analysis was performed using this data and approximately 5,300 SNP markers set approximately every 3 kb throughout the genome, and several significant QTL were detected. Some of them showed higher stress tolerance in the Sake yeast type, suggesting that the stress response defects exhibited by Sake yeast may be suppressed by other mechanisms. We are currently evaluating the function of sake yeast-type and laboratory yeast-type alleles for each gene present in the QTL to identify the causative gene.

Sake yeast, Ethanol stress, QTL analysis

発表責任者：赤尾健（akao_t@nrib.go.jp）

講演番号：2E2a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E2 会場

低酸素条件下におけるエノラーゼ活性の変化および変異体活性の変化の検証

Verification of changes in enolase activity and mutant activity under hypoxic conditions

○鷲尾 成実[1]、三浦 夏子[1,2]、片岡 道彦[1,2]（[1]阪府大・生命環境、[2]阪公大院・農）
○NARUMI WASHIO[1], NATSUKO MIURA[1,2], MICHIHIKO KATAOKA[1,2] ([1]Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch Agriculture, Osaka Metropolitan Univ.)

酵母 Saccharomyces cerevisiae において は，低酸素条件下で Glycolytic body と呼ばれる 20 種類以上の代謝酵素群の集合体が形成される(1,2). そのうちの 1 つであるエノラーゼでは集合体形成に重要な配列が同定されており，領域内の 1 アミノ酸変異が集合体形成に影響を与える(1,3) .

本研究では集合体形成率に影響を与えた変異が酵素活性に与える影響を明らかにすることを目的とし，野生型エノラーゼに加えて，低酸素条件下での集合体形成率が増加あるいは減少した 1 アミノ酸変異体 4 種類について， 細胞質 pH（pH 4～6）および中性領域における活性を測定した．実験には ，大腸菌を宿主として異種発現した精製タンパク質を用いた．また，酵素活性は紫外可視分光光度計 UV-1800（島津製作所製）を用いて生成するホスホエノールピルビン酸の 240 nm における吸光度の増加をモニタリングすることで算出した．

各変異体は活性を保持していた一方で比活性に違いがみられた．本発表では，各変異体の活性と集合体形成能の 関係について考察したのでまとめて発表する．

In the yeast Saccharomyces cerevisiae, an assembly consisted of more than 20 metabolic enzymes called glycolytic body is formed under hypoxic conditions (1,2). In one of them enolase, a sequence that is important for the assembly has been identified, and a single amino acid substitution in the region affects the formation of the assembly (1,3).

In this study, we measured the activity of four single-amino acid mutants with increased or decreased aggregation rates to clarify the effect of mutations affecting the rate of aggregation under hypoxia on enzyme activity at cytosolic pH (pH 4 to 6) and in the neutral range. Purified proteins heterologously expressed in E. coli were used in the experiments. Enzyme activity was calculated by monitoring the increase in absorbance of phosphoenolpyruvate at 240 nm using a UV-visible spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu Corporation).

While each mutant retained its activity, differences in specific activity were observed. In this presentation, the relationship between the activity and the aggregation ability of each mutant will be discussed and summarized.

(1)Miura et al. 2013 Eukaryotic Cell (2) Jin et al. 2017 Cell Reports(3) Murata et al. 2023 Letters in Applied Microbiology

Glycolitic body, enzyme activity, pH dependence

発表責任者：三浦夏子（miuran@omu.ac.jp）

講演番号：2E2a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E2 会場

低酸素培養における G-body 形成率経時的変化の観察

Observation of time-dependent G-body formation rate in hypoxic culture

○森川 穂香[1]、赤井 美咲[2]、三浦 夏子[1,2]、片岡 道彦[1,2] ([1]阪府大・生命環境、[2]阪公大院・農)
○Honoka MORIKAWA[1], Misaki AKAI[2], Natsuko MIURA[1,2], Michihiko KATAOKA[1,2] ([1]Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sci. Agriculture, Osaka Metropolitan Univ.)

G-body とは Glycolytic body の略称であり、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を低酸素条件下で培養した際に、解糖系酵素エノラーゼ(Eno2p)等の代謝酵素が代謝経路を調節するために形成する、タンパク質集合体である(1, 2)。先行研究において、様々なスケールでの低酸素培養により G-body 形成が確認されており、低酸素下で G-body を形成する酵素は順番に集合することが示唆されている(3)。そこで本研究では、2 つの異なるスケールで低酸素培養を行い、各酵素の集合体形成率の経時的変化を観察することを目的とした。使用した株は、酵母のエノラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、アルドラーゼ、トリオ―スリン酸イソメラーゼの集合を GFP の蛍光によって確認できる GFP 株(4)である。1 ウェルあたり 1 mL 容量の 24 ウェル培養法と、新たに検討した 300 mL 容ミニジャーファーメンター（サンキ精機社製）による培養法(5)を用いて培養した。2 時間ごとにサンプリングを行い、サンプルを用いて顕微鏡観察を行った。撮影した顕微鏡写真から G-body 形成率を算出した。また、培養の結果から G-body 形成率の経時的変化について考察したのでまとめて発表する。

G-body is the assembly composed of various proteins including glycolytic enzymes, such as enolase (Eno2p), and is considered to regulate metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* cells under hypoxia (1, 2). In the previous studies, G-body formation was confirmed in various small-scale culture(3). In the present study, we performed hypoxic cultures at two different scales and observed changes in the assembly formation rate of each enzyme over time. We used GFP strain visualized enolase, pyruvate carboxylase, phosphoglycerate mutase, aldolase, and triosephosphate isomerase assembly by GFP (4). We used a 24-well culture method with 1 mL volume per well and a newly investigated culture method with a 300 mL capacity mini-jar fermentor (5). To calculate G-body formation ratio, we took samples every two hours and conducted microscopic observation. In the presentation, we discuss time-dependent G-body formation rates.

(1) Miura et al. 2013 *Eukaryotic Cell*; (2) Jin et al. 2017 *Cell Reports*; (3) Yoshimura et al. 2021 *Cell Biology International*; (4) Huh et al. 2003 *Nature*; (5) Murata et al. 2023 *Letters in Applied Microbiology*

G-body, Hypoxia, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：三浦夏子（miuran@omu.ac.jp）

講演番号：2E2a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E2 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出した新たな活性カルボニル種消去分子と終末糖化産物の生成抑制機構

A novel reactive carbonyl species scavenger and its activity to inhibit the generation of advanced glycation end products found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○那須野 亮[1,2]、高木 博史[3] ([1]神戸大・先端バイオ、[2]奈良先端大・バイオ、[3]奈良先端大・研推)
○Ryo NASUNO[1,2], Hiroshi TAKAGI[3] ([1]Eng. Biol. Res. Ctr., Kobe Univ., [2]Div. of Biol. Sci., Grad. Schl. of Sci. and Tech., NAIST, [3]Inst. of Res. Init., NAIST)

【背景】 解糖系の副生成物である methylglyoxal (MGX) や glyoxal（GX）などの活性カルボニル種（RCS）は、タンパク質を非酵素的に修飾し、終末糖化産物（AGEs）を生成する。AGEs は糖尿病や心疾患などと関連するため、AGEs 生成抑制剤は創薬への応用が期待される。一方、これまでに我々は、酵母を用いた解析から、リボフラビン合成経路酵素 GTP cyclohydrolase II (GCH2)の反応生成物 2,5-diamino-6-(5-phospo-D-ribosylamino)-pyrimidin-4(3H)-one (DARP)が一酸化窒素（NO）を消去し、細胞の NO 耐性に寄与することを明らかにした。DARP と類似の構造を持つ o-phenylenediamine 類は RCS と反応することから、本研究では、DARP が RCS と反応してこれを消去し AGEs の生成を抑制すると仮説を立て、これを検証することを目的とした。**【結果と考察】** 牛血清アルブミンを用い、RCS による AGEs 形成を、抗 AGEs 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。その結果、DARP のピリミジン部位に相当する 2,4,5-triamino-1H-pyrimidin-6-one (TAPO) の共存により、AGEs 形成は顕著に抑制された。また、TAPO と RCS の反応液を LC/MS/MS 解析に供したところ、TAPO が、MGX または GX との反応により 7-methylpterin もしくは pterin に、それぞれ変換された。以上のことは、TAPO が RCS を消去し、AGEs 生成を抑制することを示している。現在、GCH2 により合成される DARP が細胞内 AGEs 生成抑制に寄与するかを解析している。

【Introduction】 Reactive carbonyl species (RCS) such as methylglyoxal (MGX) and glyoxal (GX) modify protein non-enzymatically, generating advanced glycation end products (AGEs), which is related with diabetes and cardiac diseases. Previously, we indicated that a reaction product of GTP cyclohydrolase II (GCH2), 2,5-diamino-6-(5-phospo-D-ribosylamino)-pyrimidin-4(3H)-one (DARP), scavenges nitric oxide to protect yeast cells from it. Based on the potential reactivity of DARP predicted from its chemical structure, we hypothesize that DARP reacts with RCS to inhibit AGEs generation. **【Results and Discussion】** The formation of AGEs on bovine serum albumin was clearly inhibited in the presence of 2,4,5-triamino-1H-pyrimidin-6-one (TAPO), which corresponds to the pyrimidine moiety of DARP. Our LC/MS/MS analysis demonstrated that TAPO was converted to 7-methylpterin or pterin by the reaction with MGX or GX, respectively. Our results indicate that TAPO scavenges RCS to inhibit AGEs generation. Now, we analyze whether DARP synthesized by GCH2 also reduces the intracellular AGEs formation.

Advanced Glycation End Products, Yeast, Glyoxal / Methylglyoxal

発表責任者：那須野　亮（rnasuno@tiger.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2E2a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 E2 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における培養温度に依存した浸透圧ストレスの解析
Analysis of incubation temperature-dependent osmotic stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○吉川 雄樹、伊藤 玲奈 (秋田県立大学)
○Yuki YOSHIKAWA, Reina Ito (Akita Prefectural University)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、種々の発酵食品やバイオエタノール生産に重要な微生物である。発酵生産過程において酵母は様々なストレスに曝されるため、それぞれの用途で生じるストレスに関連した研究が盛んに行われている。酵母を利用した発酵生産現場では、その目的に応じて環境中の糖濃度や温度は大きく異なり、発酵能抑制の原因となっている。前年度の報告において我々は、培養環境中のグルコース濃度に応じて酵母が生育可能な培養温度が明瞭に変化することを見出した。その後の解析結果から、グルコースに限らず培養環境中の浸透圧上昇に伴い、酵母の生育可能な培養温度も上昇することが示された。これまでに *HOG1* 遺伝子欠損株の浸透圧感受性が培養温度の上昇に伴い解消されることが報告されていることから（M Siderius *et al.*, *Mol Microbiol*, 2000）、これらの表現型は培養温度の上昇が浸透圧ストレスを軽減した結果である可能性が考えられた。現在は培養温度と浸透圧の複合的なストレスの作用機序について解析を進めている。

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is an important microorganism to produce various fermented foods and bioethanol. In the fermentation process, yeast is exposed to a variety of stress conditions. To improve fermentation productivity, there are large numbers of studies on the stress response mechanisms of yeast. In fermentation production using yeast, sugar concentrations, and incubation temperatures are very different, causing suppression of fermentation capacity. In our previous presentation, we reported that the incubation temperature at which yeast could grow changed depending on the glucose concentration in the medium. Subsequent analysis revealed that high-temperature growth of yeast improved with increasing osmotic pressure in the medium. Due to the osmotic sensitivity of *hog1* deficient cells has been reported to resolve with increasing incubation temperature, these phenotypes were speculated to be the result of increased incubation temperatures reducing osmotic stress. Now, we are analyzing the mechanism of the combined stresses in incubation temperature and osmotic pressure.

Yeast, osmotic pressure, incubation temperature

発表責任者：吉川　雄樹（yyoshikawa@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2E2a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 E2 会場

スフィンゴ脂質レベルに依存した転写因子 Com2 の分解制御によるスフィンゴ脂質代謝制御
Regulation of sphingolipid metabolism by sphingolipid level-dependent regulation of transcription factor Com2 degradation
○田淵 光昭、松本 康生、長井 彩音、白井 里樹、小松 楠於、石野 裕子、田中 直孝（香川大農）
○Mitsuaki TABUCHI, Kousei MATSUMOTO, Ayane NAGAI, Rina Shirai, Nao KOMATSU, YUKO ISHINO, Naotaka TANAKA (Kagawa Univ.)

細胞膜は，グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質，ステロールを主要な脂質として構成されており，これらの脂質量は厳密な代謝制御により一定に保たれている。我々は，これまでに出芽酵母においてスフィンゴ脂質代謝を制御する転写因子として Com2 を見出した。Com2 は、スフィンゴ脂質レベルの低下に伴いその発現量が上昇し，標的遺伝子の発現を制御することでスフィンゴ脂質代謝を制御する。Com2 の発現制御はプロモーターには依存せず, N 末端 40 アミノ酸残基を欠失した $Com2^{\Delta 2\text{-}40}$ では恒常的な発現上昇が見られた。また，セラミドの前駆体である PHS の添加によって細胞内スフィンゴ脂質レベルを増加させると Com2 の発現量が著しく低下した。しかし，この PHS 依存的な Com2 発現低下は，プロテアソーム阻害剤である MG132 の添加により抑制された。これらの結果から， Com2 は，細胞内スフィンゴ脂質レベルに依存したユビキチン-プロテアソーム依存的なタンパク質分解によりその発現量が制御され，結果として Com2 の標的遺伝子の発現制御を介して，細胞内スフィンゴ脂質代謝が制御される可能性が示唆された。

The cell membrane is composed of glycerophospholipids, sphingolipids, and sterols as major lipids, and these lipid levels are maintained by strict metabolic control. We have identified Com2 as a transcription factor that regulates sphingolipid metabolism in budding yeast. Com2 regulates sphingolipid metabolism by regulating the expression of target genes through its upregulation in response to decreased sphingolipid levels. In addition, Com2 expression was markedly decreased when intracellular sphingolipid levels were increased by addition of PHS, a ceramide precursor. However, this PHS-dependent decrease in Com2 expression was suppressed by the addition of MG132, a proteasome inhibitor. These results suggest that Com2 expression is regulated by ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis depending on intracellular sphingolipid levels and that, consequently, intracellular sphingolipid metabolism may be regulated through the regulation of Com2 target gene expression.

sphingolipid, Saccharomyces cerevisiae, eisosome

発表責任者：田淵　光昭（tabuchi.mitsuaki@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2E2a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 E2 会場

絶対嫌気性 *Clostridium* 属の O_2 感受性の分子機構に関する研究
Molecular mechanism of O_2 sensitivity of the obligate anaerobic bacteria *Clostridium*.
○畠 典雅、富岡 哲平、小宮山 新大、スチュワード グナルディ、川崎 信治（東農大院微生物）
○Tenga HATA, Teppei TOMIOKA, Arata KOMIYAMA, Goenardy STEWARD, Shinji KAWASAKI (Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景】 絶対嫌気性細菌の O_2 感受性は産業利用上の障壁となっているが、生育阻害要因に関する明確な回答は得られていない。これまでに *Clostridium* 属のタイプ種である酪酸菌 *Clostridium butyricum* は、自らが消費可能な O_2 濃度であれば O_2 を消費しながら周囲を嫌気環境にすることで生育する能力を持つことを報告した。また O_2 と活性酸素種を同時に消去する複合酵素系を同定し、活性酸素消去酵素の欠如が致死要因とするという従来の学説とは異なる生育阻害要因を推定し研究を進めている。本学会では O_2 による生育阻害要因の解明を目的とし、生育停止中の細胞の生理状態と生育停止の分子機構に関して研究を行ったので報告する。
【方法と結果】 *C. butyricum* を液体振盪培養すると、ある一定以上の O_2 濃度下で生育を停止するが、同様の生育の停止は H_2O_2 処理によっても観察され、共に一定時間後に生育が回復した。生育を停止した細胞を顕微鏡観察すると、少数の細胞が運動性を示す様子が観察された。一方、低濃度の O_2 濃度下で生育中の菌体に H_2O_2 処理を行った培養系では、生育の停止が観察されなかった。嫌気下での培養細胞と低濃度 O_2 処理後の培養細胞の抗酸化酵素系の発現を観察したところ、低濃度 O_2 添加時に顕著な発現上昇が観察された。類似の結果は他の *Clostridium* 属種でも観察された。以上の結果、生育停止後の回復過程における抗酸化酵素系の重要性が示唆された。
The reasons of growth inhibition of obligate anaerobic bacteria in the presence of O_2 are poorly understood. In this conference, we report on our research on the physiology of cells during growth arrest by O_2 with the aim of elucidating the molecular mechanism of O_2-related growth arrest. When *Clostridium butyricum* was cultured in liquid shaker culture, growth was arrested at elevated O_2 concentrations, and the same arrest was also observed when H_2O_2 was added. A small number of cells were observed to show motility during growth arrest. Growth arrest was not observed in the culture in which H_2O_2 was added with low concentrations of O_2. Similar growth behavior was observed in other *Clostridium* species. These results suggested the importance of antioxidative enzymes in the recovery process after growth cessation.
【謝辞】本研究の一部は科研費（22K07058）の助成を受けて行った。

Clostridium, oxidative stress, obligate anaerobes

講演番号：2E2a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 E2 会場

高度な光酸化ストレス耐性を持つ微細藻類のストレス応答性代謝プログラムのオミクス解析
Omics analysis of the program of photooxidative stress protection in a green microalga isolated from severe growth environments.
○豊島 拓樹[1]、三井 珠來[1]、石毛 太一郎[2]、高市 真一[1]、川﨑 信治[1]([1]東農大微生物、[2]東農大ゲノム解析セ)
○ Hiroki TOYOSHIMA[1], Tamaki MITSUI[1], Taichiro ISHIGE[2], Shinichi TAKAICHI[1], Shinji KAWASAKI[1] ([1]TUA microbiol., [2]TUA genome)

【目的】光合成生物は強光が伴う高塩濃度や乾燥ストレス環境下では、光酸化ストレスが発生し枯死に至る。当研究チームで真夏のアスファルト表面から単離したイカダモ科で新種の微細藻類 *Coelastrella astaxanthina* Ki-4 は光酸化ストレス下で藻体を赤色化させ長期間生存した [1)]。この赤色化した藻体から水溶性アスタキサンチン結合タンパク質が精製され、AstaP と命名された [2)]。AstaP は細胞表層に局在し、大量に発現することから、光合成生物では報告例のない強光防御機構への関与が推定された。一方、本藻類は光酸化ストレス付与直後に光合成活性が低下するが、速やかに活性を回復させる能力を有していた [3)]。この回復過程では *C. astaxanthina* が AstaP に依存しない光酸化ストレス耐性を獲得する代謝が行われると推察されるが、その全容は未知である。本学会では *C. astaxanthina* の光酸化ストレス耐性獲得過程に関して研究を行ったので報告する。
【方法・結果】光酸化ストレス (強光+0.7 M NaCl) 条件下での *C. astaxanthina* の光合成活性回復過程について、トランスクリプトーム解析を行った結果、*astaP* 遺伝子とともに複数のストレス誘導性遺伝子を検出したが、多くは機能未知遺伝子と同定された。そこで他のオミクス解析を行った結果、メタボロミクスではストレス付与直後から光合成活性の回復初期、遺伝子発現変動後と代謝産物組成が変化し、*C. astaxanthina* が光合成回復過程と協奏的に代謝を動かし、ストレス耐性能を獲得する様子が観察された。プロテオミクスでは既知の抗酸化酵素や複数の機能未知タンパク質の発現を確認し、これらタンパク質が *C. astaxanthina* の光酸化ストレス耐性に寄与すると推定された。
Photooxidative stress leads to generation of Reactive Oxygen Species and results in critical damage in photosynthetic organisms. Recently, we isolated and described a new species microalga, *Coelastrella astaxanthina* Ki-4, from the surface of asphalt in midsummer. Ki-4 can survive for a long period after the cells changed color from green to red under photooxidative stress conditions. We identified a novel water-soluble carotenoid-binding glycoprotein in stressed Ki-4 cells and named it AstaP since it bound astaxanthin. We assumed that Ki-4 has novel photooxidative stress defense mechanisms, not only AstaP expression. In this conference, we report the analysis of the process of acquiring photooxidative stress resistance in Ki-4
1) Kawasaki et al. *Phycological Research* 68:107-114 (2020). 2) Kawasaki et al. *Plant and Cell Physiology* 54:1027-1040 (2013). 3) Toyoshima et al. *Algal Research* 50 101988 (2020).
【謝辞】本研究の一部は科研費（研究活動スタート支援 22K20657）の助成を受けて行った。

photooxidative stress, astaxanthin, orange carotenoid protein

講演番号：2E2p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 E2 会場

大腸菌における新規 toxin-antitoxin system, *yjbL-yjbM* の同定

Identification of a novel toxin-antitoxin system, *yjbL-yjbM* in *Escherichia coli*

○比嘉 毬乃[1]、山口 良弘[2] ([1]阪市大理、[2]阪公大理)
○Marina HIGA[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[2] ([1]Osaka City Univ., [2]Osaka Metropolitan Univ.)

ほぼ全ての原核生物は、toxin-antitoxin (TA) system と呼ばれる生育制御システムを有する。TA system は、宿主自身に毒性を示す toxin およびその毒性を中和する antitoxin から構成され、ストレス環境下での生存に重要と考えられている。新規 TA system を見出し、 toxin の作用標的を同定することは、未だ不明な TA system の生理機能解明のために重要である。今回我々は、大腸菌において新規の *yjbL-yjbM* TA system を同定し、*yjbL* toxin の作用標的を解析した。

大腸菌 K-12 株における新規 TA system の探索の結果、*yjbL-yjbM* を候補遺伝子として見出した。YjbL の過剰発現は大腸菌の生育を阻害し、*yjbM* の共発現は *yjbL* による生育阻害を中和することが示された。よって *yjbL-yjbM* は TA system であることが明らかになった。また、YjbL は大腸菌の生育を静菌的に阻害することが示された。次に YjbL の作用標的を同定するために YjbL 発現後の DNA、RNA およびタンパク質合成量を調べた。その結果、DNA および RNA 合成は発現 40 分後からやや抑制された。一方でタンパク質合成は発現 5 分後から阻害され、40 分後にほぼ完全に停止した。よって、YjbL は RNA の安定性を阻害することが示唆された。

Almost all prokaryotes possess a growth regulatory system known as the toxin-antitoxin (TA) system. This system comprises toxins that are toxic to host itself and antitoxins that neutralize toxins, playing an important role to survive under stress conditions. Identifying novel TA systems and understanding their toxin targets are essential for unraveling the still unknown physiological functions of TA systems. Here, we identified a novel *yjbL-yjbM* TA system in *Escherichia coli* and analyzed the cellular target of the *yjbL* toxin.

We found YjbL-YjbM as a TA system candidate. We analyzed the cell growth after induction of the genes. Overexpression of YjbL inhibited *E. coli* growth and co-expression of YjbM counteracted the growth inhibition induced by YjbL. The data showed that YjbL-YjbM is a TA system in *E. coli*. We also found that YjbL inhibited cell growth bacteriostatically. To identify the target of YjbL, we examined DNA, RNA, and protein synthesis after induction of YjbL. The results indicated a slight inhibition of DNA and RNA synthesis 40 minutes after induction. In contrast, protein synthesis was inhibited 5 minutes after induction. These data suggest that YjbL affects on RNA stability.

toxin-antitoxin (TA) system, *Escherichia coli*, mRNA stability

発表責任者：山口良弘（yyamaguchi@omu.ac.jp）

講演番号：2E2p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E2 会場

酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* 3288 株における新規 toxin-antitoxin system の同定

Identification of a novel toxin-antitoxin system in *Komagataeibacter medellinensis* strain 3288

○池上 和里[1]、比嘉 毬乃[1]、山口 良弘[2] ([1]阪市大理、[2]阪公大理)
○ Airi IKEGAMI[1], Marina HIGA[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[2] ([1]Osaka City Univ., [2]Osaka Metropolitan Univ.)

Toxin-antitoxin（TA）system は、自身に毒性を示す toxin とその毒性を中和する antitoxin から構成され、ストレス環境下での生存やファージ耐性に関与することが示されている。一般的に toxin は対となる antitoxin とオペロンを構成している。これまで酢酸菌において、ゲノム DNA にコードされている TA system の網羅的な探索は行われていない。今回我々は、酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* 3288 株のゲノム DNA にコードされている新規 TA system を同定し、toxin の細胞内標的を解析したので報告する。

K. medellinensis 3288 株の全ゲノム中の機能未知遺伝子から、8 組の TA system 候補を見出した。各遺伝子の過剰発現が大腸菌の生育に与える影響を調べた結果、4 つの遺伝子で大腸菌の生育が阻害された。これら 4 つの各遺伝子と対となる遺伝子を共に過剰発現させた。その結果、生育阻害が解除されたペアが 1 組あった。よって、この遺伝子ペアは TA system であることが示された。次に toxin の過剰発現が、大腸菌の生育に与える影響を調べた。その結果、toxin は静菌的に生育を阻害した。 Toxin 発現後の DNA、RNA およびタンパク質合成は阻害されなかったが、toxin の過剰発現は DNA 分配に影響することが DAPI 染色の結果から示唆された。

The toxin-antitoxin (TA) system consists of toxins and antitoxins, which is important to survive under stress conditions and phage resistance. Generally, the toxin and antitoxins are encoded as an operon. The TA system encoded in the genomic DNA of acetic acid bacteria has not been comprehensively studied. Here, we identified a novel TA system *Komagataeibacter medellinensis* 3288 and analyzed the intracellular targets of the toxin. We found eight TA system candidates in the genome of *K. medellinensis* strain 3288. We analyzed the effect of overexpression of each gene in E. coli. It was shown that the expression of four genes inhibited cell growth. In one of them, the expression of cognate genes neutralized the toxicity indicating that this gene pair is a TA system. Moreover, we found that the toxin expression has no effect on DNA, RNA, and protein synthesis. Based on DAPI staining, we suggested that the toxin affects on DNA partitioning.

toxin-antitoxin (TA) system, acetic acid bacteria, *Komagataeibacter medellinensis*

発表責任者：山口良弘（yyamaguchi@omu.ac.jp）

講演番号：2E2p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E2 会場

耐熱菌由来ヒートショックタンパク質が大腸菌のマルチストレス耐性に及ぼす影響

Effects of small heat shock proteins from thermotolerant bacteria on the various stress resistance of Escherichia coli

○佐藤 悠[1]、岡野 憲司[2]、本田 孝祐[3,4]([1]山口大・中高温微セ、[2]関西大・化生工、[3]阪大・生工国際セ、[4]阪大・先導的学際研機構)
○Yu Sato[1], Kenji Okano[2], Kohsuke Honda[3,4] ([1]TMR, Yamaguchi Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]ICBiotech, Osaka Univ., [4]OTRI, Osaka Univ.)

HSP20 は低分子量の熱ショックタンパク質の 1 種であり、細胞内でのタンパク質の凝集の防止などを介して細胞内のタンパク質の恒常性に寄与している。これまでに中温性生物由来の sHSP を発現させることでモデル生物の多様なストレス耐性の向上が認められており、中には線虫由来の sHSP の発現により大腸菌の最高生育温度を上昇させた例も報告されている。「より過酷な環境下で増殖可能な微生物由来の sHSP であれば宿主のストレス耐性をさらに強化できる」と考え、本研究では高温で増殖可能なバクテリア由来の HSP20 の機能解析を試みた。大腸菌と系統的に近縁から遠縁まで多様な耐熱菌 13 種由来の 18 種類の HSP20 を選抜し大腸菌にて異種発現させた。可溶性画分にて 17 種類の HSP20 の発現が確認でき、いずれも熱処理(70℃、30 分)に耐えうる熱安定性を示した。これらの発現株を多様な条件[高温(52℃)、凍結融解、酸性(pH 3)、アルカリ性(pH 11)、高浸透圧(10% NaCl)]に暴露し、暴露前後の生菌数から生存率を算出した。その結果、空ベクターを含むコントロール株と比較して、いずれの条件においても各発現株の生存率の方が 1 桁から 3 桁ほど高いことが明らかとなった。また、一部の発現株は長期の高温ストレス下（52℃、5 日間)でも生存可能であることが示された。本成果により、宿主のストレス耐性を向上させる際に、高温で増殖可能なバクテリア由来 HSP20 の有用性が示された。

HSP20 is a type of small heat shock protein that contributes to intracellular protein homeostasis through the prevention of intracellular protein aggregation. Expression of HSP20 from mesophilic organisms has been shown to enhance stress tolerance in a variety of model organisms. Here, we analyze the function of HSP20 from thermotolerant bacteria based on the idea that “HSP20s from microorganisms that can grow under more severe conditions can further enhance host stress tolerance”. We selected 18 HSP20s from 13 thermotolerant bacteria phylogenetically related to *E. coli* and heterologously expressed them in *E. coli*. Seventeen HSP20 strains could be expressed in the soluble fraction, and all of them showed thermostability to withstand heat treatment (70°C, 30 min). These expressing strains were exposed to various stress conditions [high temperature (52°C), freeze-thaw, acidic (pH3), alkaline (pH11), and high osmotic pressure (10% NaCl)], and the cell viability was calculated. The results showed that the viability of each expression strain was one to three orders of magnitude higher under all conditions than that of control strains containing empty vectors. In addition, some of the expressed strains were able to survive under prolonged high temperature stress (52°C for 5 days). These results demonstrate the usefulness of bacterial HSP20, which can grow at high temperatures, in improving stress tolerance of host

heat shock protein, stress resistance, thermophile

発表責任者：佐藤 悠（yusato@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2E2p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E2 会場

大腸菌 Trk 型 K 取込みトランスポーターの進化的背景

Evolutionary Dynamics of Dual Trk-type K Uptake in *Escherichia coli* K-12

○Tanudjaja Ellen[1]、星 直美[1]、山本 兼由[2]、井原 邦夫[3]、古田 忠臣[4]、辻井 雅[1]、石丸 泰寛[1]、魚住 信之[1]([1]東北大学大学院工学研究科、[2]法政大学生命科学部生命機能学科、[3]名古屋大学遺伝子実験施設、[4]東京工業大学 生命理工学院)
○ Ellen Tanudjaja[1], Naomi Hoshi[1], Kaneyoshi Yamamoto[2], Kunio Ihara[3], Tadaomi Furuta[4], Masaru Tsujii[1], Yasuhiro Ishimaru[1], Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Dept. Front. Biosci., Hosei Univ., [3]Cent. Gene Res., Nagoya Univ., [4]Sch. Life Sci.Tech., Tokyo Inst. Tech.)

【背景・目的】大腸菌（*E. coli* K-12）では K チャネルは機能しておらず，２つの Trk/Ktr/HKT 系 K トランスポーター（TrkG と TrkH）が機能している．TrkG と TrkH はともに K 輸送体と長い間考えられてきた．しかし，イオン輸送活性を測定すると，TrkG は Na を透過する活性があり，TrkH は高い K 選択性をもつ輸送体であった．また，TrkH は TrkG よりも強い K 取り込み活性を持つことを報告した．今回，大腸菌に 2 種類の TrkG と TrkH が存在する理由と発現調節に関する検討を行った．
【結果・考察】*trkG* 遺伝子は rac プロファージ上に存在する．trkG が外来遺伝子の可能性が示唆されることから，外来遺伝子発現を抑制する核様体タンパク質 H-NS の影響を検討した．予想通り *trkG* の発現抑制は観察されたが，それでもなお十分な発現量が検出された．水平伝播で *trkG* が大腸菌ゲノムに挿入後，必要なタンパク質として機能していることが予想された．次に，TrkG の K もしくは Na の細胞内蓄積への寄与について多重変異株を作成して検討した．細胞内の K 濃度を *kdp* プロモーター活性でモニターしたところ，TrkG は TrkH の K 取り込み活性を補助していることが分かった．
【Background】*Escherichia coli* K-12 does not have functional K channels, but possess two Trk/Ktr/HKT family K transporters, TrkG and TrkH. Both TrkG and TrkH have long been considered as K transporters. However, we measured their ion transport activities, and detected Na transport activity of TrkG, and highly selective K transport activity of TrkH. Additionally, TrkH was reported to possess a stronger K uptake activity compared to TrkG. In this study, we investigated the reasons for the coexistence of two types of TrkG and TrkH in *E. coli* and explored their expression regulation.
【Results and Discussion】The trkG gene is located on the *rac* prophage. Given the potential implication of *trkG* as a foreign gene, we investigated the effect of the nucleoid-associated protein H-NS, known to suppress the expression of foreign genes. Suppression of *trkG* expression was observed, yet a significant level of expression persisted. This suggested that following horizontal transfer and insertion into the *E. coli* genome, TrkG functions as a necessary protein. We created multiple mutant strains to assess the contribution of TrkG to intracellular accumulation of K or Na. Monitoring intracellular K concentration through *kdp* promoter activity revealed that TrkG assists in the K uptake activity of TrkH. (Tanudjaja et al. JBC 299, 102846, 2023)

Escherichia coli, K transporters, horizontal gene transfer

講演番号：2E2p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E2 会場

枯草菌におけるリボソーム生合成と S-アデノシルメチオニン代謝との関連性の解析

Analysis of the relationship between ribosome biosynthesis and S-adenosylmethionine metabolism in Bacillus subtilis.

○大坂 夏木[1]、朝井 計[2]、田中 寛[1] ([1]東工大化生研、[2]東農大バイオ)
○NATSUKI OSAKA[1], KEI ASAI[2], KAN TANAKA[1] ([1]Tokyo Inst. of Tech., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

リボソーム生合成は細胞における最大のエネルギー消費過程であり、細胞の増殖活性と相関している。細胞の増殖を制御する上で、リボソーム生合成が種々の代謝・生体プロセスとどのように繋がっているかは未だ不明な点が多い。リボソーム生合成過程の一プロセスとして、S-アデノシルメチオニン(SAM)を供与体とする rRNA のメチル化修飾が知られる。我々の研究から、枯草菌において、SAM の主要な消費先はリボソーム生合成であること、SAM を合成する必須性は主にリボソーム生合成が担っていることが示唆された。さらに興味深いことに、SAM の消費・合成の必須性の双方において、特定の rRNA メチル化修飾が主要な役割を担っていることが示唆された。本大会では、これまでの結果を踏まえて、細胞増殖制御におけるリボソーム生合成と SAM 代謝のクロストークの意義について議論したい。

Ribosomal biosynthesis is the largest energy-consuming process in a cell. Ribosome biosynthesis is correlated with cell proliferative activity. It remains unclear how ribosome biosynthesis is linked to each metabolic and biological process for regulating cell proliferation. One of the ribosome biosynthetic processes is the rRNA methylation modification using S-adenosylmethionine (SAM) as a donor. Previous studies have suggested that ribosome biosynthesis is the major destination of SAM consumption and that ribosome biosynthesis is mainly responsible for the essentiality of SAM synthesis in *Bacillus subtilis*. More interestingly, it was suggested that specific rRNA methylation modifications play a major role in both consumption and essentiality for SAM synthesis. In light of our results, we would like to discuss the significance of the crosstalk between ribosome biosynthesis and SAM metabolism in the regulation of cell proliferation at this conference.

Ribosome biogenesis, S-adenosylmethionine, Bacillus subtilis

発表責任者：大坂夏木（natsuki.osaka@gmail.com）

講演番号：2E2p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E2 会場

部位特異的なゲノム DNA の二重鎖切断が枯草菌の胞子形成に与える影響の解析

Analysis of the effect of site-specific genomic DNA double-strand breaks on sporulation in Bacillus subtilis.

○本橋 直大、田中 俊平、朝井 計（東京農大院バイオ）
○Naohiro MOTOHASHI, Syunpei TANAKA, Kei ASAI (Tokyo Univ. of Agriculture)

非相同末端結合（NHEJ）は相同組換え修復（HDR）のように修復を促す鋳型 DNA を用いず、切断された DNA の末端同士をつなぎ合わせることにより DNA 修復を行う現象である。NHEJ による修復では変異が生じやすく、細菌においては進化の原動力になっているとされている。しかし、細菌において NHEJ についての知見は HDR に比べて少ないのが現状である。また、バクテリアは自然界では非増殖の状態にあることが多く、その状態では染色体の数が 1 コピーなので主に NHEJ による修復が行われていると考えられる。定常期細菌の DNA 修復機構の解析のため、モデル生物である枯草菌において研究を行った。
NHEJ に関与する基本的な因子をコードする遺伝子が胞子形成期特異的に転写されていることに着目し、胞子形成期に様々なゲノム DNA 上の位置で CRISPR/Cas9 による二重鎖切断を引き起こし胞子形成及び発芽への影響を調べた。これまでに、二重鎖切断は胞子形成過程を阻害せず発芽の過程で NHEJ により修復されるため、発芽効率に影響することが示唆されている。今回、切断したゲノム DNA 上の位置によっては胞子形成過程そのものに阻害効果をもたらす傾向があることが示唆された。その成果を本学会にて報告する。

Non-homologous end joining (NHEJ) is a DNA repair process in which the ends of cleaved DNA are joined together without a template DNA to facilitate repair, as in homologous recombination repair (HDR). NHEJ is a mutation-prone process and is believed to be a driving force of evolution in bacteria. In addition, bacteria are often in a non-multiplicative state in nature, in which the number of chromosomes is one copy, so repair by NHEJ is thought to occur primarily. We studied NHEJ using Bacillus subtilis to analyze DNA repair mechanisms in stationary-phase bacteria.
Noting that genes encoding basic factors involved in NHEJ are transcribed specifically during sporulation, we investigated the effects of CRISPR/Cas9-induced double-strand breaks at various positions on genomic DNA during sporulation on sporulation and germination. It was suggested that double-strand breaks do not inhibit the sporulation process and are repaired by NHEJ during germination, thus affecting germination efficiency. In the present study, it was suggested that depending on the position of the cleavage on the genomic DNA, the double-strand breaks tends to have an inhibitory effect on the sporulation process itself.

Bacillus subtilis, Double-strand break, Non-homologous end joining

講演番号：2E2p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 E2 会場

Thermococcus kodakarensis 由来リバースジャイレースに関する研究
Research on reverse gyrase from *Thermococcus kodakarensis*
○平木 陽向、東端 啓貴（東洋大生命）
○Hinata HIRAKI, Hiroki HIGASHIBATA (Toyo Univ.)

リバースジャイレース（Rgyr）は、高温環境下で生育する超好熱菌が持つ酵素であり、負の超らせん構造をとる DNA や弛緩型 DNA に作用し、ATP 依存的に正の超らせんを導入する。Rgyr が正の超らせんを染色体 DNA へ導入することによって、DNA の融解を防ぐことが超好熱菌の高温適応戦略の 1 つであると考えられてきた。しかし、超好熱菌から抽出されたほとんどのプラスミドは弛緩型であり、また、Rgyr は超らせんを導入できない線状二本鎖 DNA に結合し、熱による化学的分解を防ぐことが *in vitro* において明らかにされた（1)。超好熱菌細胞内における Rgyr の役割は、正の超らせん導入による染色体 DNA の安定化か、染色体 DNA への結合による化学的分解の防止かを明らかにすることを、本研究の目的とした。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の *rgyr* 変異株にプラスミドを導入後、抽出し、二次元ゲル電気泳動による DNA トポロジー解析を行った結果を報告する。
参考文献
（1） Kampmann, M. *et al*. Nucleic Acids Research 32: 3537-3545 (2004)

Reverse gyrases, especially found in hyperthermophiles and some thermophiles, introduce positive supercoils into circular DNA in an ATP-dependent manner. Positive supercoiling may not be essential for these organisms at high temperatures, as plasmids found in hyperthermophiles, which possess reverse gyrase, are typically in a relaxed form. Besides thermodenaturation, thermodegradation (backbone breakage) of DNA occurs in high temperature environments. Reverse gyrase exhibits DNA stabilization activity independent of supercoiling, preventing backbone breakage in both linear and circular DNAs at high temperatures [1]. To elucidate the essential role of reverse gyrase *in vivo* for DNA stabilization at elevated temperatures, mutations were introduced into the reverse gyrase gene within the *Thermococcus kodakarensis* genome. In this presentation, we would like to introduce DNA topology of plasmid extracted from each mutant.
References
[1] Kampmann, M. *et al*. Nucleic Acids Research 32: 3537-3545 (2004)

Reverse gyrase, DNA topology, thermoadaptation

講演番号：2E2p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E2 会場

放線菌における *sigR* を介した酸化ストレス応答のピロガロール誘導型分岐形成への関与
In *Streptomyces*, Involvement of *sigR*-mediated oxidative stress response in pyrogallol-induced hyphae branching formation
○福原 彩穂[1]、加藤 愛美[2]、浅水 俊平[3]、尾仲 宏康[1] ([1]学習院大理、[2]慶応大先端生命研、[3]神戸大先端バイオ)
○Saho FUKUHARA[1], Manami KATO[2], Shumpei ASAMIZU[3], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Gakushuin Univ., [2]Keio Univ., [3]Kobe Univ. EGBRC)

我々はピロガロールが複数の放線菌種に対して分岐形成誘導活性を示す事を以前報告した(2022 年日本農芸化学会)。同様の分岐形成誘導は過酸化水素存在下でも確認され、またカタラーゼ添加によりその活性が消失したことから、ピロガロールによる分岐形成誘導は、活性酸素種による酸化ストレスの影響によることが考えられた。*Streptomyces* 属において ECF シグマ因子である *sigR* は酸化ストレスに応答するグローバルレギュレーターのひとつであり、そのレギュロン遺伝子は *S. coelicolor* A3(2)においてピロガロールと類似構造を持つベンゾキノンにより発現誘導が起こることが報告されている。本研究では *sigR* がピロガロールによる分岐形成に与える影響を検証し、酸化ストレス応答の関与を分子レベルで解析した。モデル放線菌 *S. lividans* TK23 においてもピロガロール添加による分岐誘導が確認されたため、本株を用いて *sigR* 破壊株を作製した。YGGS 培地でスライドカルチャーを行い、培養 3 日目に菌糸形態を観察した。*sigR* 破壊株では、ピロガロールを添加したとき、親株と比較し分岐形成誘導が抑制された。また *sigR* 遺伝子の相補株では親株と同様の表現型に回復した。以上の結果から、ピロガロールによる分枝形成誘導には、*Streptomyces* 属の酸化ストレス応答レギュレーターである *sigR* の関与が強く示唆された。また *sigR* のアンチシグマ因子 *rsrA* は、酸化ストレスを介したジスルフィド形成や、そのアルキル化による不活性化を受け、その結果 *SigR* を遊離しレギュロン遺伝子の発現を誘導することが知られている。現在、*rsrA* の分岐形成への関与についても解析を進めている。

We found that the frequency of hyphae branching in *Streptomyces* species was highly increased by adding pyrogallol. Pyrogallol is a redox-active compound, and we hypothesized the involvement of oxidative stress response. *sigR* is an ECF sigma factor involved in oxidative stress response. This study aimed to elucidate the involvement of *sigR* for the pyrogallol-induced hyphae branching. We prepared a *sigR* disruptant using *S. lividans* TK23. When adding pyrogallol, the Δ*sigR* decreased hyphae branching frequency compared to the parent strain. The gene complementation rescued the phenotype to the parent strain. As a result, we revealed that *sigR* is involved in the pyrogallol-induced hyphae branching. Our results suggested the existence of the regulatory system of hyphae branching downstream of pyrogallol-induced oxidative stress response in *Streptomyces* species.

Streptomyces, oxidative stress, hyphae branch

発表責任者：尾仲宏康（hiroyasu.onaka@gakushuin.ac.jp）

講演番号：2E2p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E2 会場

新規糖刺激を PTS-TCS 間で伝えるコネクターRcsG

RcsG, a connector transmitting a novel sugar stimulus from PTS to TCS

○山口 和宣[1]、保山 菜穂子[2]、萩原 慧[1]、深見 知可[1]、加藤 明宣[1]([1]近畿大院農バイオ、[2]近畿大農バイオ)

○Kazunobu YAMAGUCHI[1], Naoko HOZAN[2], Kei HAGIHARA[1], Tomoka FUKAMI[1], Akinori KATO[1] ([1]Dept. of Ad. Bio. Sci. Grad. Sch. of Agri., Kindai Univ., [2]Dept. of Ad. Bio. Sci. Fac. of Agri., Kindai Univ.)

サルモネラ菌において、二成分制御系(TCS)間をつなぐ小タンパク質のコネクターが、病原性と薬剤耐性の調節ネットワークの形成に重要な役割を担うことが明らかとなって来た。一方、Phosphotransferase system (PTS)は、糖を取り込むと同時に、PTS 酵素群を経由した解糖系のホスホエノールピルビン酸由来のリン酸がその糖をリン酸化する。本研究では、PTS と TCS の間で糖刺激を伝える新規コネクターRcsG について報告する。

変則的な TCS の RcsBCD 系は細胞表層ストレスを受けると RcsC から RcsD、RcsB へのリン酸リレーにより *wzc* を含む莢膜多糖合成遺伝子群の転写を活性化する。本研究では、サルモネラ菌において、RcsD と相互作用し *wzc* を活性化する因子の RcsG がコードされる遺伝子クラスターの機能を推定した。PTS 転写因子 RcsH が N-アセチルグルコサミン酸(GlcNAcA)に応答し、この糖を代謝する遺伝子群と共に *rcsG* が発現誘導するもとの仮説を立て検証した。N-acetyl-D-hexosamine oxidase による GlcNAc の酸化によりを調整した GlcNAcA をサルモネラ菌のレポーター株に添加したところ、実際、GlcNAcA が *rcsH* 依存的に *rcsG* の発現を誘導し、下流の *wzc* の発現も *rcsG* と *rcsB* に依存的に活性化した。

Small “connector” proteins link two-component regulatory systems (TCSs) and play important roles in the regulatory network of virulence and antibiotic resistance in *Salmonella*. On the other hand, the phosphotransferase system (PTS) takes up sugars and simultaneously phosphorylates them with phosphates. In this study, we report a novel connector, RcsG, that integrates a sugar stimulus from a PTS to a TCS.

The unorthodox TCS RcsBCD activates transcription of the capsular polysaccharide (*cps*) biosynthesis operon genes including *wzc* through phosphorelay from RcsC to RcsD and RcsB upon cell surface stress. In this study, we tested the hypothesis that within the *rcsG* gene cluster, the PTS transcription factor RcsH responds to N-acetyl-D-glucosaminate (GlcNAcA) and induces the expression of *rcsG* as well as genes responsible for metabolizing this sugar on the *Salmonella* genome. GlcNAcA generated from GlcNAc oxidation by N-acetyl-D-hexosamine oxidase indeed induced *rcsG* expression in an *rcsH*-dependent manner, leading to the activation of downstream *wzc* expression in an *rcsG*- and *rcsB*-dependent manner.

Connector, *Salmonella*, Two-component system

講演番号：2E2p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E2 会場

様々な細菌集団および単離細菌株に対する有機塩素系殺虫剤分解酵素遺伝子のキャプチャリング実験

capturing experiments of dehalogenase genes for degradation of organochlorine pesticide toward various bacterial communities and isolates

○岡 俊璃、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二 (東北大院生命科学)
○Shunri OKA, Kouhei KISHIDA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA (Graduate school of Life Sciences Tohoku University)

有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane（HCH）は、人為起源の難分解性環境汚染物質であるが、世界各地の汚染環境から HCH 分解資化能を有するスフィンゴモナッド細菌株が多数単離されている。これら HCH 分解細菌株のゲノム解析から、HCH 分解細菌は環境中に広く存在するスフィンゴモナッド細菌株が HCH 分解に必要な特殊な遺伝子を取り込んで世界各地で独立的に出現したと推定されているが、それら遺伝子の起源および獲得の過程は未解明である。本研究では、HCH の初発分解過程に必要な 2 種類のデハロゲナーゼをコードする *linA* と *linB* 遺伝子の獲得機構に関する知見を得ることを目的として、当該遺伝子のキャプチャリング実験を行った。HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株由来の *linA* を欠失しカナマイシン（Km）耐性マーカーを導入した株と、*linB* を Km 耐性遺伝子で破壊した株を受容菌株として、各種細菌集団、単離細菌株と混合し、Km を含み HCH を唯一の炭素源とする無機塩培地での生育を指標にスクリーニングを行った。その結果、複数の組み合わせで、本培地上でクリアゾーンを形成し生育するコロニーが取得された。単純なプラスミドの接合伝達等では説明できない組み合わせでの相補株も得られており、現在、これらが実際に受容菌株が *linA* や *linB* 遺伝子を獲得した株であることを確認すると共に、導入機構に関して解析を進めている。

The organochlorine pesticide γ-hexachlorocyclohexane (HCH) is a persistent environmental pollutant of anthropogenic origin. Still, many sphingomonad bacterial strains capable of degrading HCH have been isolated from contaminated environments worldwide. Based on genome analysis of these HCH-degrading bacterial strains, it is assumed that HCH-degrading bacteria emerged independently worldwide by recruiting specific genes for HCH degradation. However, the origin and acquisition process of the genes remains unknown. In this study, we performed capturing experiments of the *linA* and *linB* genes, which encode two dehalogenases required for the primary degradation process of HCH, by using *Sphingobium japonicum* strain UT26-derived recipient strains. When these recipient strains were mixed with various bacterial communities and isolates, complementary strains were obtained in combinations that cannot be explained by simple plasmid conjugation, etc. We are now confirming that they are the recipient-derived strains that have acquired the *linA* or *linB* genes and are analyzing the mechanism of how they acquired the genes.

organochlorine pesticide, dehalogenase gene, lateral gene transfer

発表責任者：岡俊璃（oka.shunri.p2@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2E2p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E2 会場

ナノ秒パルス高電界による酵母代謝への影響
Effect of Nanosecond Pulsed Electric Fields on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolisms
○越村 匡博[1]、竹内 凜[2]、四田 杏美[2]、猪原 武士[3]、山﨑 隆志[1]([1]佐世保高専・物質工学科、[2]佐世保高専・専攻科、[3]佐世保高専・電気電子工学科)
○Masahiro KOSHIMURA[1], RIN TAKEUCHI[2], Azumi YOTSUDA[2], Takeshi IHARA[3], Takashi YAMASAKI[1] ([1]Dept. Chem. Biol. Eng., NITS, Sasebo College, [2]Adv. Eng. Course, NITS, Sasebo College, [3]Dept. Electr. Electron. Eng., NITS, Sasebo College)

超短時間で高エネルギーを放出するパルスパワーはパルス電界（PEF）やパルス放電プラズマなどの極限環境を作り出すことができ、特に PEF はエレクトロポレーションとして汎用されている。通常、エレクトロポレーションに使われるミリ秒からマイクロ秒の PEF は主に細胞膜に作用するのに対し、パルス幅がナノ秒のナノ秒パルス高電界（nsPEF）の作用は細胞内部に及ぶことが示されているが、細胞内でどのような摂動が引き起こされ、細胞応答に繋がっているかは未解明な部分が多い。本研究では、広く産業利用されている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて nsPEF が代謝に与える影響を明らかにすることを目的とした。

S. cerevisiae に対して電界強度 5, 10, 15, 20 kV/cm の nsPEF を 1 分間印加した結果、電界強度の違いによる生菌数およびエタノール生成量にほとんど差は確認されなかった。一方、代謝物質であるコハク酸は電界強度が高いほど有意に増加していたことから、nsPEF 印加によって代謝に変化が生じることが示唆された。

The pulse power that emits high energy in a very short time can create extreme environments such as pulsed electric fields (PEF) and pulsed discharge plasmas, and especially PEF is widely used as electroporation. It has been shown that millisecond to microsecond PEF used for electroporation mainly affects the cell membrane, whereas nanosecond pulsed electric fields (nsPEF) with nanosecond pulsed width has been shown to affect intracellular. However, there are there are many unclarified parts on what kind of perturbation occurs intracellular and lead to cellular responses. This study aimed to clarify the effect of nsPEF on metabolism using *Saccharomyces cerevisiae*, which is widely used in industry.

As a result of applying nsPEF with electric field strength of 5, 10, 15 and 20 kV/cm to *S. cerevisiae* for 1 min, there were almost no differences in the number of viable bacteria and ethanol production due to the difference in electric field strength. On the other hand, the metabolite succinic acid increased significantly with increasing electric field strength, suggesting that the application of nsPEF causes metabolic changes.

Nanosecond Pulsed Electric Fields (nsPEF), *Saccharomyces cerevisiae*, Intracellular

発表責任者：越村　匡博（kosimura@sasebo.ac.jp）

講演番号：2E2p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E2 会場

作出したカフェイン感受性株の変異箇所の特定について
Identification of mutation sites in caffeine-sensitive strains

○山口 穂香[1]、高久 美鈴[2]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2,4] ([1]東洋大、[2]東洋大院、[3]東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター、[4]東洋大学ライフイノベーション研究所)
○Honoka YAMAGUCHI[1], Misuzu TAKAKU[2], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2,4] ([1]Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences,Toyo Univ., [3]BNERC,Toyo Univ., [4]Institute of Life Innovation Studies,Toyo Univ.)

本研究室において標準菌株と比較し、カフェインに耐性のある *Lactobacillus paracasei* YKP4 株の単離・保存に成功し、カフェイン耐性機構を解明することを目的としている。そこで、本研究では、菌体内カフェイン量に着目した。暴露時間 2、24 時間における菌体内カフェイン量を HPLC により測定した結果、0.5%カフェインでは菌体内量が暴露時間によって差は見られなかったが、1.0%カフェインでは 2 時間と比較し、24 時間では大幅に減少していた。一方、YKP4 株に EMS 処理を行うことで作出したカフェイン感受性株 Y4-２株では、0.5%カフェインでは暴露時間の経過により菌体内量が増加していた。しかし、1.0%カフェインでは 2 時間と比較し 24 時間における菌体内量はあまり変化が見られなかった。

感受性株の変異箇所の特定を行った結果、輸送系が最も多く、興味深いことに二成分制御システムに関与する遺伝子にも変異が入っていた。そのため、YKP4 株のカフェイン耐性機構としてカフェインを検出し、輸送系に指令を出していることが考えられた。現在は、変異箇所に関与する遺伝子の発現量の解析などを行っている。

We have succeeded in isolating and preserving a caffeine-tolerant *Lactobacillus paracasei* YKP4 strain in our laboratory in comparison with standard strains, with the aim of elucidating the caffeine tolerance mechanism. In this study, we focused on the amount of caffeine in the bacteria. The amount of caffeine in the bacteria was measured by HPLC at exposure times of 2 and 24 hours. The results showed that the amount of caffeine in the bacteria at 0.5% caffeine did not differ depending on the exposure time, but at 1.0% caffeine, the amount of caffeine in the bacteria at 24 hours decreased significantly compared to 2 hours. On the other hand, in the caffeine-sensitive strain Y4-2, which was generated by EMS treatment of YKP4, the amount of caffeine in the bacteria increased with exposure time at 0.5% caffeine. However, at 1.0% caffeine, there was little change in the amount of caffeine in the bacteria at 24 hours compared to 2 hours.

Mutations in the susceptible strains were most frequently found in the transport system, and interestingly, mutations were also found in genes involved in the two-component system. Therefore, it was suggested that caffeine is detected as a caffeine tolerance mechanism in the YKP4 strain and directs the caffeine to the transport system. Currently, we are analyzing the expression levels of the genes involved in the mutation sites.

caffeine tolerance, *Lactobacillus paracasei*, caffeine sensibility

発表責任者：三浦健（t-3ura@toyo.jp）

講演番号：2E2p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E2 会場

クロロゲン酸による乳酸菌におけるカフェイン耐性の向上について
Improvement of Caffeine Tolerance in Lactic Acid Bacteria by Chlorogenic Acid
○髙久 美鈴[1]、山口 穂香[2]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2,4] ([1]東洋大院、[2]東洋大、[3]東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター、[4]東洋大学ライフイノベーション研究所)
○Misuzu TAKAKU[1], Honoka YAMAGUCHI[2], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2,4] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Toyo Univ., [3]BNERC, Toyo Univ., [4]Institute of Life Innovation Studies, Toyo Univ.)

カフェインは微生物に対して生育抑制効果を示すことが報告されている。当研究室において、カフェイン耐性乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* YKP4 株の単離に成功した。
クロロゲン酸は病原性細菌に対して抗菌作用を示す。しかし、クロロゲン酸の添加によって YKP4 株の生育が向上した。さらに、クロロゲン酸の一種である 5-カフェオイルキナ酸（5-CQA）とカフェインの添加において、カフェイン条件下と比較して生育の向上が見られた。そのため、本研究ではクロロゲン酸が *Lb. paracasei* のカフェイン耐性に与える影響の解明を目的とした。YKP4 株におけるカフェインの局在を明らかにするために、菌体内外カフェイン量を HPLC により測定したところ、5-CQA の添加によりカフェイン条件下と比較して、菌体内カフェイン量の減少が見られた。このことから、5-CQA の添加によって菌体内へのカフェインの取り込みを抑制する機構または、排出する機構が働いている可能性が考えられた。そこで、カフェインの取り込みや排出に関与している遺伝子の発現量を網羅的に解析するために RNA-seq 解析をした結果、5-CQA の添加によって、カフェイン条件下と比較して輸送や脂肪酸合成に関与する遺伝子の発現量の変化が見られた。現在は、カフェインの取り込みや排出に関与が考えられる遺伝子に着目し、RT-qPCR を行っている。

Caffeine exhibits a growth-inhibiting effect on microorganisms. *Lb. paracasei* YKP4 that are tolerant to caffeine was isolated in our laboratory. Chlorogenic acid exhibits antimicrobial activity against pathogenic bacteria. On the other hand, the addition of chlorogenic acid enhanced the growth of YKP4. The addition of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and caffeine also improved the growth of YKP4 compared to the addition of caffeine. Therefore, the purpose of this study was to clarify the effect of chlorogenic acid on caffeine tolerance in YKP4. The amount of caffeine inside and outside the cells was measured by HPLC, and the addition of 5-CQA resulted in a decrease in the amount of caffeine in the cells compared to caffeine conditions. This suggests that the addition of 5-CQA may suppress the uptake or efflux of caffeine in the cells. RNA-seq analysis showed that the addition of 5-CQA caused changes in the expression levels of genes involved in transport and fatty acid synthesis compared to caffeine conditions. We are currently performing RT-qPCR analysis focusing on genes that appear to be involved in caffeine uptake and efflux.

Lactobacillus paracasei, caffeine tolerance, chlorogenic acid

発表責任者：三浦健（t-3ura@toyo.jp）

講演番号：2E2p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E2 会場

グラム陽性菌における抗菌性陽イオン界面活性剤の作用機構の解析

Analysis of the action of antimicrobial cationic surfactants to the Gram-positive bacteria

○中田 陽[1]、佐々木 美穂[1,2]、松村 吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○ Haru NAKATA[1], Miho SASAKI[1,2], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Dept. Life Science & Biotechnol., Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

第四級アンモニウムイオン(QAC)型界面活性剤は強い抗菌作用を示し、消毒剤として利用されている。一方で、同一抗菌剤の継続使用に伴い、耐性株の出現が確認されているため、耐性株が出現しない抗菌処理法の開発が求められている。これまで、大腸菌を本タイプの臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)の 5 μM ずつの上昇系列で継代培養すると、容易に CTAB 耐性株が出現することを確認している。また、当該処理で活性酸素が過剰発生し、活性酸素に対する高いストレス応答能を保持する大腸菌株で高い CTAB 耐性能を獲得していた。一方で、同様の処理で黄色ブドウ球菌や枯草菌等では CTAB 耐性株は取得できない。当該処理した大腸菌と黄色ブドウ球菌を走査型電子顕微鏡で観察したが、細胞表層の変化は観察されなかった。そこでは、QAC 型界面活性剤処理した黄色ブドウ球菌で活性酸素の発生確認を行なったが、顕著な発生は観察されていないが、呼吸活性およびエステラーゼ活性は共に減少している細胞が増加していた。黄色ブドウ球菌では QAC 型界面活性剤の影響が細胞膜だけでなく、細胞内にまで及んでいると考えられた。今後は、活性酸素消去能を欠損させた黄色ブドウ球菌において、当該処理により活性酸素発生量の変化と耐性変異株の出現を調査する予定である。

Quaternary ammonium cation-type (QAC) surfactants exhibit strong antimicrobial activities and are used as disinfectants in medical and home fields. Our previous studies revealed that cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-resistant mutants in *Escherichia coli* readily emerge with cultivating in serial increasing broth of 5 μM CTAB and that CTAB treatment caused the excessive generation of reactive oxygen species (ROS). Some high resistant mutants to ROS also acquired high CTAB tolerance. In contrast, CTAB-resistant mutants in *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* couldn't be isolated. A scanning electron microscopic observation didn't reveal any changes of cell structure in *E. coli* and *S. aureus* by the treatment. In this study, the effects of QAC surfactant treatment were investigated in *S. aureus*. The QAC treatment inactivated respiratory and esterase activities using a CTC and CFDA staining analyses without excess ROS generation. These results suggest that QAC surfactants inactivate some enzymes in the cytoplasm and cellular membrane. Now, defective mutants of ROS scavenging abilities in *S. aureus* will be constructed and their ROS production by the QAC treatment be confirmed.

Antibacterial surfactant, Respiratory activity, Esterase activity

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：2E3a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E3 会場

過酸化リン脂質の代謝からみたフェロトーシス誘導機構の評価
Evaluation of ferroptosis induction mechanism from the perspective of phospholipid peroxide metabolism

○鈴木 優里[1]、加藤 主税[2]、加藤 俊治[1]、山崎 寛之[3]、Isabella Supardi Parida[1]、Mirinthorn jutanom[1]、竹腰 進[3]、仲川 清隆[1]（[1]東北大院農、[2]静岡大院農、[3]東海大医）
○Yuuri Suzuki[1], Chikara Kato[2], Shunji Kato[1], Hironobu Yamazaki[3], Isabella Supardi Parida[1], Mirinthorn jutanom[1], Susumu Takekoshi[3], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]The Univ. of Tohoku, [2]The Univ. of Shizuoka, [3]The Univ. of Tokai)

先に我々は、過酸化リン脂質（ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド; PCOOH）を HepG2（ヒト肝癌細胞）へ処理すると、PCOOH は細胞中で PC ヒドロキシド（PCOH）へと還元されるものの、残存する PCOOH によって細胞死が誘導されることを観察した。本研究では、この細胞死の詳細を知るために、各種の誘導剤や阻害剤を用いた評価を行った。その結果、PCOOH を HepG2 へ処理した際に観察される細胞死は、フェロトーシスの誘導剤によって増強され、阻害剤によって抑制されたため、PCOOH による細胞死はフェロトーシスであると推察された。次いで、上述の細胞内での PCOOH の還元を抑えると、強烈なフェロトーシスが観察されるのではと考えた。そこで、PCOOH の還元酵素グルタチオンペルオキシダーゼ 4（GPX4）をノックアウト（KO）した HepG2 を調製し、PCOOH を処理した。意外にも、PCOOH は PCOH へ還元されたものの、顕著なフェロトーシスが認められた。現在、このメカニズム（GPX4 以外の還元酵素の関わり等）の解析を進めている。昨今、フェロトーシスは疾病と関わるとして精力的に研究されている。しかし、GPX4 以外の還元酵素に着目した研究は少なく、我々の研究の進展によりフェロトーシスの機構の理解がさらに深まると期待される。

We previously observed that treatment of human hepatoma cell line HepG2 with phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) reduced PCOOH to PC hydroxide (PCOH) in the cells, but the remaining PCOOH induced cell death. In this study, we attempted to understand the details of this cell death using various inducers and inhibitors. The cell death observed when HepG2 was treated with PCOOH was enhanced and inhibited by ferroptosis inducers and inhibitors, respectively, suggesting that PCOOH-induced cell death is ferroptosis. Next, we wondered if strong ferroptosis could be observed if the above-mentioned intracellular reduction of PCOOH was inhibited. Therefore, we prepared glutathione peroxidase 4 (GPX4; reductase of PCOOH) knockout HepG2 and treated the knockout cells with PCOOH. Contrary to expectations, PCOOH was reduced to PCOH, but significant ferroptosis was observed. We are currently analyzing this mechanism (involvement of reductases other than GPX4, etc.). Recently, ferroptosis has been vigorously studied as it relates to disease. However, since few studies have focused on reductases other than GPX4, these our studies will contribute to further elucidate the mechanism of ferroptosis.

PCOOH, Ferroptosis, GPX4

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E3a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E3 会場

過酸化スクアレンによるヒト皮膚角化細胞へのフェロトーシスの誘導と植物抽出物による抑制
Induction of ferroptosis in human keratinocyte HaCaT cells by squalene peroxide: possible prevention of skin ferroptosis by botanical extracts

○加藤 主税[1,2]、楠本 惟吹[1]、加藤 俊治[1]、乙木 百合香[1]、伊藤 隼哉[1]、鈴木 優里[1]、戸塚 広乃[3]、Arun Rajgopal[4]、Jina Hong[4]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農、[2]静大院農、[3]Nutrilite 社、[4]ABG INTL 社)
○Chikara Kato[1,2], Ibuki Kusumoto[1], Shunji Kato[1], Yurika Otoki[1], Junya Ito[1], Yuuri Suzuki[1], Hirono Totsuka[3], Arun Rajgopal[4], Jina Hong[4], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]The Univ. of Tohoku, [2]The Univ. of Shizuoka, [3]Nutrilite Health Institute, [4]Access Business Group International, LLC)

鉄依存的なリン脂質の過酸化によって誘導される非アポトーシス性細胞死としてフェロトーシスが提唱され、種々の疾病との関連に注目が集まっている。これまでに我々は、過酸化リン脂質が HepG2（ヒト肝癌細胞）にフェロトーシスを誘導することを観察してきた。一方、ヒトの皮膚においては、皮脂に含まれる過酸化スクアレン（スクアレンヒドロペルオキシド; SQOOH, Fig.）が主要な過酸化脂質であるものの、SQOOH によるフェロトーシスの誘導は我々の知る限り報告されていない。

本研究では、SQOOH やフェロトーシス関連試薬を HaCaT（ヒト表皮角化細胞）に処理したところ、SQOOH はリン脂質の過酸化を惹起して、フェロトーシスを誘導すると示唆されるデータを得た。このフェロトーシスは、ポリフェノールを含有する植物抽出物（ケルセチン、ローズマリー、ターメリックの混合物：QRT）によって抑制され、これは QRT に含まれるケルセチンやロスマリン酸の作用によると考えられた。これらの結果から、皮膚の酸化とフェロトーシス、その皮膚疾患への関わりが新たに示唆され、これらの予防には QRT などの抗酸化物質の活用が考えられた。

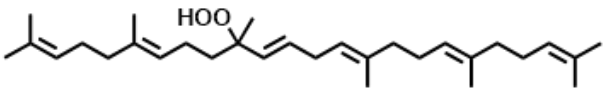


Fig. Squalene hydroperoxide

Ferroptosis has been studied since its proposal as a nonapoptotic cell death caused by iron ion-dependent phospholipid peroxidation. We have shown that treatment of human hepatoma cell line HepG2 with phospholipid hydroperoxide results in ferroptosis. However, in human sebum, the major hydroperoxide is squalene hydroperoxide (SQOOH, Fig.), and to our knowledge, it has not yet been established whether SQOOH induces ferroptosis in the skin.

Our present cell culture studies suggested that SQOOH may induce ferroptosis by causing phospholipid peroxidation in HaCaT cells. Furthermore, botanical extracts (a mixture of quercetin, rosemary, and turmeric extracts; QRT) inhibited SQOOH-induced HaCaT ferroptosis, and such inhibitory effect was attributed to quercetin and rosmarinic acid in QRT. Therefore, the focus of future research will be on the involvement of SQOOH-induced ferroptosis in the skin pathologies and the prevention of skin diseases through inhibition of ferroptosis by natural antioxidants such as QRT.

SQOOH, Ferroptosis, Botanical extracts

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E3a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E3 会場

カルノシン酸による線虫 *C.elegans* の GLO1 活性化と糖化抑制作用

Glyoxalase-1 activation and glycation inhibitory effect of *C. elegans* by carnosic acid

○瀬戸山 央（（地独）神奈川県立産技総研）
○Ou SETOYAMA (Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】カルノシン酸はシソ科植物に含まれる成分であり、抗酸化作用、抗肥満作用、記憶機能改善作用などがこれまでに明らかとされている。発表者はカルノシン酸が抗糖化作用を有することを線虫 *C.elegans* を用いた in vivo 評価により確認している。本研究ではカルノシン酸による線虫体内の糖化抑制作用に、糖化反応の中間体メチルグリオキサールの分解酵素であるグリオキサラーゼ－１（GOL-1）が関与している可能性を明らかにすることを目的とした。
【方法】線虫（N2 株、glod-4 変異株）を同調培養後、４日目にカルノシン酸を終濃度 180 μM となるように培地に加え培養した。15 日目に線虫を回収、洗浄後に超音波処理によりタンパク質抽出を行った。タンパク質抽出液に対して蛍光性 AGEs 由来の蛍光強度の測定および抗 AGEs 抗体を用いた ELISA を行った。さらに GLO-1 活性測定を行った。
【結果】線虫（N2 株）にカルノシン酸を投与した場合、蛍光性 AGEs 由来の蛍光強度および AGEs 量は低下する傾向が見られた。さらに GLO-1 活性はカルノシン酸処理で有意な上昇が認められた。また線虫（glod-4 変異株）にカルノシン酸を投与した場合、蛍光性 AGEs 由来の蛍光強度および AGEs 量の低下は見られなかった。このことから、カルノシン酸による線虫への糖化抑制作用には GLO-1 が関与していることが示唆され、カルノシン酸は線虫の GLO-1 を活性化させることで AGEs の生成抑制効果を発揮していると考えられた。

Carnosic acid is a component contained in plants of the Lamiaceae family. It has antioxidant effects, anti-obesity effects, and memory function improvement effects. The objective of this study was to clarify whether carnosic acid activates glyoxalase-1 (GLO-1), an enzyme that degrades methylglyoxal, and suppresses saccharification in *C.elegans*.
Carnosic acid(final 180μM) was added to the medium and *C.elegans*(N2, glod-4) were cultured. After that, measured the amount of AGEs and GLO-1 activity in the *C.elegans*.
C.elegans(N2) was treated with carnosic acid, the amount of AGEs decreased and GLO-1 activity increased. On the other hand, *C.elegans*(glod-4) was treated with carnosic acid, no decrease in the amount of AGEs was observed. These results suggest that carnosic acid activates GLO-1 in *C.elegans* and suppresses the production of AGEs.

glyoxalase-1, *C.elegans*, antiglyacation

発表責任者：瀬戸山央（setoyama@kistec.jp）

講演番号：2E3a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E3 会場

D-アラニンの経口摂取が中年マウスの行動に及ぼす影響
Effects of dietary D-alanine on the behaviors in middle-aged male mice.
○西 純可[1]、豊田 淳[1,2] ([1]茨大院農、[2]農工大院連合農)
○Sumika NISHI[1], Atsushi TOYODA[1,2] ([1]Ibaraki Univ, [2]Tokyo Agri. Tech. Univ)

日本などの先進諸国では高齢化が急速に進んでおり、認知症等の精神神経疾患の予防に資する研究の推進が一層重要になっている。私共は NMDA 型グルタミン酸受容体のコアゴニストである D-アラニン（D-Ala）の機能性に着目している。D-Ala はアルツハイマー病のバイオマーカーとなる可能性があり、また統合失調症患者の認知機能を改善するという報告がある。本研究では、D-Ala の老化予防効果を検証するため、マウスへの D-Ala 給与試験を実施した。中年期（47 週齢）および幼若期（4 週齢）の B6 オスマウスに、それぞれ 5 週間、37 週間にわたり D-Ala 混合飼料を給与した。対照群には標準飼料（AIN-93G）のみを給与した。給与期間終了後、Y 字迷路試験、新奇物体認識試験、巣作り行動試験、メス尿におい嗅ぎ試験を行った。中年期からの 5 週間の D-Ala 給与では、Y 字迷路試験における交替行動率が上昇し、新奇物体認識試験における新奇物体への探索時間が増加した。さらに、D-Ala 介入によって巣作りの開始が早くなり、また、メス尿のにおい嗅ぎ時間が延長した。これらの結果から、D-Ala の介入は加齢による記憶能力およびモチベーションの低下を抑制することが示唆された。

In advanced countries like Japan, the rapid aging of the population has made research into the prevention of mental and neurological disorders, such as dementia, increasingly important. Our research is focusing on the biological function of D-alanine (D-Ala), a co-agonist of the NMDA receptor. D-Ala may be a potential biomarker for Alzheimer's disease and has been reported to improve cognitive functions in patients with schizophrenia. In this study, we conducted D-Ala intervention trials on mice to examine its anti-aging effects. Middle-aged (47 weeks old) and young (4 weeks old) male B6 mice were fed a D-Ala-contained diet for 5 weeks and 37 weeks, respectively. The control group was fed only a standard diet (AIN-93G). After the feeding period, we conducted Y-maze test, novel object recognition test, nest-building test, and female urine sniffing test. A 5-week D-Ala intervention in middle age increased alternation behavior in the Y-maze test and the exploration time for novel objects in the novel object recognition test. Furthermore, D-Ala intervention led to facilitated nest building and prolonged sniffing time of female urine. These results suggest that D-Ala intervention may suppress age-related decline in memory ability and motivation.

Aging, Memory, Motivation

発表責任者：豊田　淳（atsushi.toyoda.0516@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：2E3a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E3 会場

カベルネ・ソーヴィニヨンワインに含まれる機能性成分の皮膚老化に対する効果

Effect on skin aging of functional compounds included in Cabernet Sauvignon Wine

○沢辺 昭義[1,2]、田中 文人[1]、山本 朱那[2]、竹田 竜嗣[3]（[1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]関西福祉科学大・健康福祉）
○Akiyoshi SAWABE[1,2], Ayato TANAKA[1], Akana YAMAMOTO[2], Ryuji TAKEDA[3] ([1]Graduate school of Agriculture, Kindai Univ., [2]Fac. of Agri., Kindai Univ., [3]Fac. of Health and Welfare, Kansai Univ. of Welfare Sci.)

近年，日本における高齢化，また食生活の欧米化の進行に伴い生活習慣病患者が増加している．高齢者や糖尿病患者は生体内での糖化反応が進行しやすく，それにより様々な疾病が引き起こされる．そこで本研究では抗糖化に着目し，健康食品への有効利用が期待できる抗糖化作用物質の探索を行った．これまでに我々は年間約 3,000t にも及ぶ量が排出，廃棄されているワイン圧搾残渣有効利用を目的とし，シャルドネ，カベルネ・ソーヴィニヨンおよびメルローのワイン圧搾残渣から抗糖化作用物質の探索を行い，ブドウの品種によってアントシアンの種類が異なることを見出した．今回はカベルネ・ソーヴィニヨンワインに含まれる抗糖化作用物質の探索を行うとともに，皮膚に対する老化抑制作用（美肌効果）について検討した．その結果，カベルネ・ソーヴィニヨンワインから 5-carboxypelargonidin-3-glucopyranoside，vitisin A，1-glucopyranosyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2*E*-propenoic acid および quercetin-3-*O*-glucopyranoside の 4 種の成分を単離した．また，単離物は，4 成分のいずれも良好な抗糖化作用を示した．

Japan is witnessing a rapid shift toward an aging society and a surge in the number of individuals with lifestyle-related diseases due to the westernization of eating habits. In the elderly or diabetics, in vivo glycation occurs, causing various diseases. Therefore, in this study, we focused on anti-glycation and searched for an anti-glycation substance that can be utilized as health food. Wine compression residue amounting to approximately 3,000 t per year is discarded and its utilization remains a pressing problem. We searched for anti-glycation substances from wine compression residues of Chardonnay, Cabernet Sauvignon, and Merlot, and found that the type of anthocyanin varied with the kind of grape. In this study, we investigated anti-glycation substances in Cabernet Sauvignon wine and compared them with our previous wine compounds. As a means to evaluate anti-glycation, we conducted the AGE (advanced glycation end product) inhibition test. 5-Carboxypelargonidin-3-glucopyranoside, vitisin A, 1-glucopyranosyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2*E*-propenoic acid, and quercetin-3-*O*-glucopyranoside showed the highest anti-glycation activities.

Wine, anti-glycation, anti-aging effects

発表責任者：澤邊昭義（sawabe@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2E3a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E3 会場

テリハボク(*C. inophyllum*) の産生するフラボノイドが糖化中間産物に及ぼす影響
Influence of flavonoids in *C. inophyllum* leaf on glycation intermediates
○加々美 龍大[1]、宇佐美 徹[2]、松川 哲也[1]、梶山 慎一郎[1] ([1]近大院生物理工、[2]株式会社すまエコ)
○Ryuta KAGAMI[1], Toru USAMI[2], Tetsuya MATUKAWA[1], Sinichiro KAJIYAMA[1] ([1]BOST, Kindai Univ., [2]Smaeco Inc.)

テリハボク(*Calophyllum inophyllum*)はテリハボク科テリハボク属の広葉樹であり、熱帯から亜熱帯の沿岸部に分布している。我々の研究室ではテリハボクのもつ新たな生理活性物質のスクリーニングを行ってきた。その結果、テリハボク葉には抗糖化活性物質が含まれることを見いだした。生体内で糖化反応が進むと、最終的に AGEs(advanced glycation end-products)が生成される。糖化反応の進行によるタンパク質の変性や AGEs 蓄積が老化や様々な疾患の原因と考えられており、糖化を抑制する手段の開発が求められている。そこで我々はテリハボク葉の抽出物に含まれる抗糖化活性物質の単離・構造解析および糖化抑制の機構解明を目的として研究を行っている。

活性がみられた葉の抽出物を用いて HPLC による単離・精製を行い、NMR による構造決定をしたところ、活性物質は quercitrin であることが同定された。また、糖化抑制の機構解明のため、quercitrin（MW 448）と糖化中間体であるメチルグリオキサール（MW 72）を混合した反応液を、LC-MS 分析に供した。その結果、反応により $[M-H]^-$=519 のピークが 4 本現れ，分子量 520 の異性体が 4 種生じることが示された。これらは quercitrin にメチルグリオキサールが 1 分子付加した構造異性体と推測された。現在、これら 4 種の化合物の同定を進めており、本講演ではその詳細について報告する。

Calophyllum inophyllum L. (Calophyllaceae) is an evergreen tree indegenous to tropical and subtropical coastal areas. We have screened for novel bioactive compounds in *Calophyllum inophyllum* and found that the leaf extract showed the anti-glycation activity.

Glycation *in vivo* leads to the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) which have been suggested to be involved in aging and various diseases, and thus, the suppression of glycation have been focused for anti-aging and/or prevention of diseases. The purpose of this study was to identify inhibitor(s) of AGEs formation and to elucidate the mechanism of anti-glycation.

We performed activity-guided isolation of anti-glycation compounds from *C. inophyllum* leaves and identified quercitrin as the active compound. To elucidate the anti-glycation mechanism of quercitrin, the reaction mixture composed of quercitrin (MW 448) and methylglyoxal (MW 72), a intermediate of glycation, were incubated, followed by LCMS analyses. Four $[M-H]^-$=519 peaks were occurred in LCMS chromatograms, suggesting that the four isomeric adducts of quercitrin with methylglyoxal were formed. Isolation and identification of these four compounds are in progress, and detailed results and discussion will be shown in our presentation.

Calophyllum inophyllum, glycation intermediates, flavonoids

発表責任者：梶山慎一郎（kajiyama@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2E3a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E3 会場

ローヤルゼリーは老化表皮角化細胞においてセノモルフィック効果を示す
Senomorphic effect of royal jelly in senescent human epidermal keratinocytes
○中川 友希江、伊藤 隆志、奥村 暢章（株式会社山田養蜂場）
○Yukie NAKAGAWA, Takashi ITO, Nobuaki OKUMURA (Yamada Bee Company, Inc.)

個体の老化の原因として細胞老化という現象が注目されている。老化細胞は様々なストレスによって不可逆的に細胞周期が停止した状態である。老化細胞は細胞老化関連分泌現象（SASP）因子とよばれる炎症性物質を分泌することで、周囲の細胞を老化細胞へ誘導する作用が知られている。実際に SASP 因子の抑制によって老化の表現型が改善される報告もあることから、SASP 因子を標的とした老化細胞阻害薬（セノモルフィック）が抗老化戦略として注目されている。ローヤルゼリー（RJ）はミツバチ（*Apis mellifera L.*）が作り出す天然物質であり、古くからアピセラピーと呼称されるミツバチ産品を使った代替医療として世界中で利用されている。しかしながら、老化細胞に対する作用は不明である。そこで本研究では RJ の SASP 因子抑制によるセノモルフィック効果を検証した。はじめにヒト表皮角化細胞を複製老化させ、老化モデルを作製した。次に作製した老化細胞に RJ を 24 時間添加後、SASP をはじめとした老化関連因子の遺伝子発現を網羅的に評価した。その結果、RJ 添加によって IL-6、ケモカインなどの SASP 因子の発現量低下が確認された。培養上清中においても複製老化で増加した IL-6 の発現が RJ 添加によって低下した。以上のことから RJ は SASP 因子抑制によるセノモルフィック効果が示唆された。

Cellular senescence, a state of irreversible cell cycle arrest induced by various stresses, is attracting attention as a cause of aging. Senescent cells induce senescence in neighboring cells through the secretion of senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors, which are inflammation mediators. Suppression of SASP factors improves the senescence phenotype; therefore, senomorphics that suppress SASP factors are promising as anti-aging agents. Royal jelly (RJ) is a yellowish-white creamy substance secreted by honeybees (*Apis mellifera L.*). It is used in apitherapy since ancient times; however, its effect on senescent cells remains unknown. In this study, we explored the senomorphic effect of RJ by replicating human epidermal keratinocytes as the senescence model. The model cells were treated with RJ for 24 h; then, we evaluated the expression of SASP and other senescence-related factors. RJ downregulated the expression of SASP factors such as IL-6 and chemokines; in addition, it reduced the levels of IL-6 in the culture supernatants. Therefore, RJ exerts a senomorphic effect on senescent cells.

royal jelly, cellular senescence, SASP

発表責任者：奥村 暢章（no1780@yamada-bee.com）

講演番号：2E3a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E3 会場

ラフマ葉抽出物による月経に伴う不定愁訴の改善

Improvement of unidentified complaints relating menstruation by *Apocynum venetum* leaf extract.

○押切 春佳、國吉 智子、小林 夕希子、楊 金緯 ((株)常磐植物化学研究所)
○Haruka Oshikiri, Tomoko Kuniyoshi, Yukiko Kobayashi, Yang Jinwei (Tokiwa Phytochemical Co., Ltd.)

【背景】月経に伴う様々な身体的・精神的不調は、女性の労働生産性や日常生活の満足度を低下させる要因である。ラフマ（*Apocynum venetum*）の葉の抽出物はフラボノイドであるイソクエルシトリンおよびヒペロシドを含み、睡眠の質改善や一時的なストレスに対する緩和効果を有する。本研究では、健常女性におけるラフマ葉抽出物の月経に伴う不定愁訴の改善効果を評価することを目的とした。
【方法】健常な 20~40 歳の日本人女性を対象に、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。被験者はプラセボ（n=22）もしくは 50 mg/日のラフマ葉抽出物を含む試験食品（n=22）を月経 1 周期の間摂取し、体感の変化を月経随伴症状に関する質問票 MDQ を用いて評価した。
【結果】ラフマ葉抽出物摂取群はプラセボ群と比較して、月経開始 3 日前（月経前）の MDQ 総得点および MDQ の下位尺度である負の感情、集中力、行動変化および自律神経が有意に低下した。さらに月経開始 2 日目（月経中）の MDQ 総得点と下位尺度である痛み、集中力、コントロールの各項目がプラセボ群と比較して、ラフマ葉抽出物摂取群において有意な低下が認められた。これらのことから、ラフマ葉抽出物は月経前および月経中の不定愁訴の改善効果を有することが明らかになった。

【Background】It is important to improve various complaints relating menstruation that result in a decrease in the work productivity and satisfaction of daily lives in women. In this study, we aimed to reveal the effects of *A. venetum* leaf extract on unidentified menstrual complaints in healthy women.
【Method】A randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group study was performed in aged 20-40 year-old healthy Japanese women. Placebo (n=22) or 50 mg/day of *A. venetum* leaf extract (n=22) was ingested for one menstrual cycle. The subjects answered Menstrual Distress Questionnaire (MDQ) on the 3rd day before menstruation (before menstruation) and 2nd day after the start of menstruation (during menstruation).
【Result】In the *A. venetum* leaf extract group, total scores of MDQ and the scores of subscales, Negative Affect, Concentration, Behavioral Change, and Autonomic Reactions, before menstruation were significantly lower than those in the placebo group. Furthermore, total scores of MDQ and the scores of subscales, Pain, Concentration, and Control, during menstruation were also significantly lower. Our findings suggested that *A. venetum* leaf extract improves unidentified complaints accompanying menstruation.

Apocynum venetum L., MDQ, menstrual cycle

発表責任者：楊 金緯（k-you@tokiwaph.co.jp）

講演番号：2E3a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E3 会場

ゼブラフィッシュを用いた抗酸化食品成分に関する研究

A study on the dietary-antioxidants using zebrafish

○小林 麻己人[1]、木元 広実[2]、佐藤 綾香[1] ([1]筑波大・医学医療系、[2]農研機構・食品研)
○Makoto KOBAYASHI[1], Hiromi KIMOTO-NIRA[2], Ayaka SATO[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]NARO)

近年、動物愛護の観点から動物実験代替法の促進が求められているが、外部食物摂取のない受精後約 1 週間のゼブラフィッシュ胚は行政的動物愛護の視点から動物実験の範疇には含まれていない。我々はこのゼブラフィッシュ胚の利点を用いて各種食品成分がもつ抗酸化増強作用に関する研究をしており、本発表ではその成果の一端をご紹介する。受精後 4 日のゼブラフィッシュ胚に過酸化水素などの酸化ストレス剤を処理すると大半の胚は致死となる。ところがその前にある種の食品成分を前処理するとゼブラフィッシュ体内の抗酸化活性が増強され、酸化ストレス剤による致死性に耐性になる。コントロールには、抗酸化増強作用をもつ食品成分として最もよく研究されているブロッコリースプラウト由来成分スルフォラファンを用いた。我々は約 50 種の食品成分を解析し、10 数成分に抗酸化増強作用があることを見出した。スルフォラファンは Nrf2 経路の活性化を介して抗酸化増強作用を示すことが知られているが、実際、Nrf2 破壊ゼブラフィッシュではスルフォラファンの効果は激減した。同様に調べた成分のうち 7 割方は Nrf2 依存的であったが、いくつかの成分は Nrf2 非依存的であり、別の抗酸化経路を活性化している可能性が示唆された。著名な効果があったのは乳酸菌 H61 株の抽出液であり、現在その抗酸化増強作用の実体解明に取り組んでいる。

In recent years, there has been a push to promote alternative methods to animal testing from the perspective of animal welfare. However, zebrafish embryos, in the approximately one-week post-fertilization stage without external food intake, is not currently considered within the scope of animal experimentation from an administrative animal welfare standpoint. Utilizing the advantages of zebrafish embryos, we are conducting research on the antioxidant-enhancing effects of various food components. When zebrafish embryos at four days post-fertilization are exposed to oxidative stressors such as hydrogen peroxide, the majority of the embryos experience lethality. However, pre-treating certain food components before exposure enhances the antioxidant activity within zebrafish, making them resistant to the lethal effects of oxidative stressors. As a control, we used sulforaphane, a component derived from broccoli sprouts that is well-studied for its antioxidant-enhancing effects. We analyzed approximately 50 food components and identified antioxidant-enhancing effects in over 10 components, including sulforaphane. Sulforaphane is known to demonstrate antioxidant-enhancing effects through the activation of the Nrf2 pathway. While about 70% of the analyzed components were Nrf2-dependent, some components suggested Nrf2-independent activation, indicating the potential involvement of alternative antioxidant pathways. Notably effective was the extract from the H61 strain of lactic acid bacteria, and we are currently investigating the underlying mechanisms of its antioxidant-enhancing effects.

antioxidant, lactic acid bacteria, zebrafish

発表責任者：小林 麻己人（makobayash@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2E3a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E3 会場

プレニル化がケンフェロールの抗酸化性に及ぼす影響
Effect of prenylation on the antioxidant properties of kaempferol
○立石 晟菜[1]、韓 俊文[2]、棟方 涼介[2]、矢崎 一史[2]、古賀 武尊[1]、田井 章博[1]、向井 理恵[1]([1]徳島大・生物資源、[2]京大・生存研)
○Sena TATEISHI[1], Toshifumi KAN[2], Ryosuke MUNAKATA[2], Kazufumi YAZAKI[2], Takeru KOGA[1], Akihiro TAI[1], Rie MUKAI[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Kyoto Univ.)

[目的]プレニルフラボノイドは母骨格のフラボノイドよりも強い生物活性を示す例がある。本研究では抗酸化性に対するプレニル化の影響を明らかにすることを目的とし、ケンフェロール（Kae）とそのプレニル化体を用いた検討を行った。
[方法・結果]プレニルケンフェロール（PK）は 5 種類を用いた。まず、クエン酸緩衝液（pH 3.0 または pH6.0）を用いて 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)（ABTS）ラジカル捕捉活性を評価し、ラジカル捕捉値［RSA(n)値］を算出した。その結果、pH 3.0 における 8-PK と 6-PK は Kae より高く、3'-PK は Kae よりも低かった。pH 6.0 では、8-PK が Kae と同程度で、他の PK は Kae より低かった。次に、2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride （AAPH）誘導酸化的溶血に対する保護作用を評価し、完全溶血の 50%に到達する時間を算出した。Kae と 8-PK の 50%溶血時間は同程度であったが、他の PK はいずれも 50%溶血に達する時間が短かかった。RSA(n)値（pH 6.0）と 50%溶血時間との相関解析では強い正の相関が認められた。
[結論] B 環 3'位へのプレニル基結合は Kae の抗酸化性を低下させた。6 位と 8 位のプレニル化は抗酸化性に影響を及ぼすが、影響の程度は 6 位へのプレニル化のほうがより大きいことが示唆された。
It had been reported that prenylation enhanced flavonoid function. We tried to clarify the effect of prenylation on the antioxidant property using kaempferol (Kae) and its prenylated compounds.
We applied five types of prenylated Kae (PK) in this study. Radical scavenging activity was determined by ABTS radical scavenging activity in citrate buffer. As a result, 8-PK and 6-PK had higher ABTS radical scavenging activity than Kae under pH 3.0, but no PK showed stronger ABTS radical scavenging activity (pH 6.0). The protective effect against AAPH-induced oxidative erythrocyte hemolysis was evaluated. 8-PK had a similar effect to Kae, but all other PKs had a weaker effect than Kae. We found a positive correlation between the radical scavenging values (RSA(n) values) of Kae and PK at pH 6.0 and those of the 50% hemolysis time.
Our results indicated that prenylation at C-3' position reduced the antioxidative activity of Kae. Although the effect of prenylation at C-6 or C-8 position on the antioxidant properties of Kae depends on the assay system, it was suggested that prenylation at the 6-position has a greater effect on the anti-oxidative property.

antioxidant, kaempferol, prenylated flavonoids

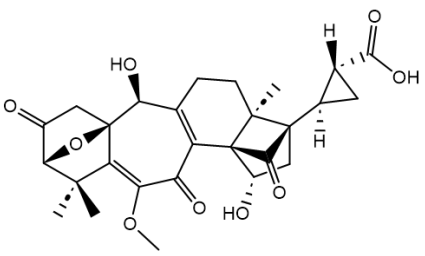
発表責任者：向井 理恵（rmukai@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：2E3p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 E3 会場

ジャガイモシストセンチュウ孵化誘因物質 solanoeclepin A および類縁体の実用的供給法

Construction of practical supply method for solanoeclepin A and related compounds

○山口 友喜、渡邊 正悟、岡本 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二（静岡県立大薬）
○Yuki YAMAGUCHI, Shogo Watanabe, Takumi Okamoto, Shinji Kishimoto, Kenji Watanabe (University of Shizuoka)



solanoeclepin A (**1**)

ナス科植物特異的に寄生するジャガイモシストセンチュウ（Potato cyst nematode, PCN）は、農作物の大幅な減収を引き起こして世界的な被害をもたらしている。その卵は硬い殻（シスト）で守られており、一度圃場に侵入されると根絶が非常に困難である。そこで PCN の孵化誘因物質である solanoeclepin A (**1**)を利用して宿主非存在下で強制的に孵化を誘因、餓死させることが可能と期待されているが、**1** の量的供給が課題となっている。近年、**1** の生合成解明に注目が集まっている中、我々はこれまでに生合成遺伝子や経路の推定を行ってきたが、生合成中間体の化学構造情報は全く解明されていない。植物科学的研究では変異体を用い最終生成物から遡ることで生合成経路を推定するのだが、本研究では生合成上流から下流に向かう変換を有機合成での反応検証という方法論を用い、分子誘導型推定生合成の構築を目的として研究に着手した。本法では合成品の活性を調べることで構造活性相関データも併せて取得可能である。

我々は生合成仮説に着想した合成計画を立案し、今回、solanoeclepin 類に特徴的な架橋エーテルと七員環を含む縮環構造の構築と種々の酸素官能基化による類縁体合成、および、合成品の活性評価を行ったので報告する。

Potato cyst nematode (PCN), a parasitic pest on Solanaceae plants, causes significant yield loss worldwide. The cyst enables PCN eggs to survive under sever conditions resulting in hardly to be removed. A hatching inducer of PCN, solanoeclepin A (**1**) is expected to be used for eradication of PCN. However, there is no practical supply of **1** to date. Recently, much attention has been paid to the elucidation of the biosynthesis of **1**, and we have identified candidate biosynthetic genes and proposed a putative biosynthetic pathway, while chemical structures of biosynthetic intermediates have never been elucidated at all. Thus, we decided to validate the proposed biosynthetic pathway by bioinspired organic synthesis. Moreover, the structure activity relationship of the PCN hatching inducer will be disclosed using a variety of synthesized compounds.

solanoeclepin A, Potato cyst nematode, biosynthesis

発表責任者：山口友喜（m21050@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E3p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E3 会場

Solanoeclepin A 生合成経路解明に向けた *Nicotiana benthamiana* への一過性異種発現における重要中間体 cycloartenol および関連化合物の単離構造解析について

Isolation of cycloartenol as an intermediate of solanoeclepin A from the heterologous expressed *Nicotiana benthamiana*

○青木 聡樹[1]、岡本 拓実[1]、山本 泰誠[2]、岸本 真治[1]、渡辺 賢二[1,2] ([1]静岡県大薬、[2]アデノプリベント)

○ Satoki AOKI[1], Takumi OKAMOTO[1], Taisei YAMAMOTO[2], Shinji KISHIMOTO[1], Kenji WATANABE[1,2] ([1]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [2]Adenoprevent Co., Ltd.)

【目的】当研究室では、ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の solanoeclepin A(**1**)の生合成経路解明研究を行っており、これまでに重要中間体 cycloartenol (**2**) 合成酵素遺伝子 (*CAS1*) の *N. benthamiana* における一過性発現に成功した[1,2]。一方、異種発現を行っていない株 (WT)からも cycloartane 型 triterpene の存在が NMR 解析により示唆された[3]。本発表では異種発現株における生成物の全容解明のため、**2** の単離精製及び、WT 由来 cycloartane 型 triterpene の同定を試みた。

【方法】*CAS1* 及び hydroxymethylglutaryl-CoA 還元酵素遺伝子 (t*HMGR*) 共発現株の粗抽出物よりシリカゲルカラム、固相抽出、HPLC にて **2** を単離した。また、同様の手法で WT に含まれる cycloartane 型 triterpene 類を単離した。

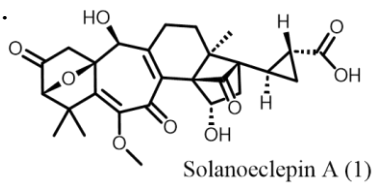
【結果・考察】標品との NMR および LCHRMS スペクトルの比較から、異種発現株より **2** の単離を確認した。また、WT 由来 cycloartane 型 triterpene も **2** 及びその類縁体と同定した。本研究により、**2** は粗抽出物より 1 回のカラムと固相抽出で粗精製に至ったことから、**2** の近傍の中間体であれば同様の手法にて迅速に単離・構造決定が可能であると期待された。

Introduction: Solanoeclepin A (**1**) is a hatching compound for potato cyst nematode and our focus is on an elucidation of the biosynthetic pathway of **1**. Recently, we had successfully heterologous expression of cycloartenol (**2**) synthase (*CAS1*) in *N. benthamiana*. In this study, we established an isolation method for **2** from heterologous expressed *N. benthamiana* leaves and identify putative cycloartane-type triterpenes in non-infected strain.

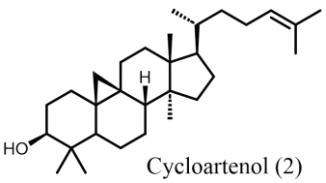
Methods: Extract of *CAS1* + t*HMGR* co-expressed *N. benthamiana* were fractionated with silica gel column, solid phase extraction and HPLC, **2** was isolated. Likewise, cycloartane-type triterpenes from wildtype were isolated using the same method.

Results & Discussion: **2** from *CAS1*+t*HMGR* was confirmed by NMR spectra, and putative cycloartane-type triterpenes from wildtype were identified as **2**. This method is expected to be applicable for isolating other intermediates of **2**.

1. 岡本 拓実 ほか , 日本農芸化学会2023年度大会, **2023**, 1F04-12.
2. 山本 泰誠 ほか ,日本農芸化学会2023年度大会, **2023** , 1F04-11.
3. 青木 聡樹 ほか , 第24回天然薬物の開発と応用シンポジウム, **2023** , SP-14.



Solanoeclepin A (1)



Cycloartenol (2)

Potato cyst nematode, solanoeclepin A, biosynthesis

講演番号：2E3p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E3 会場

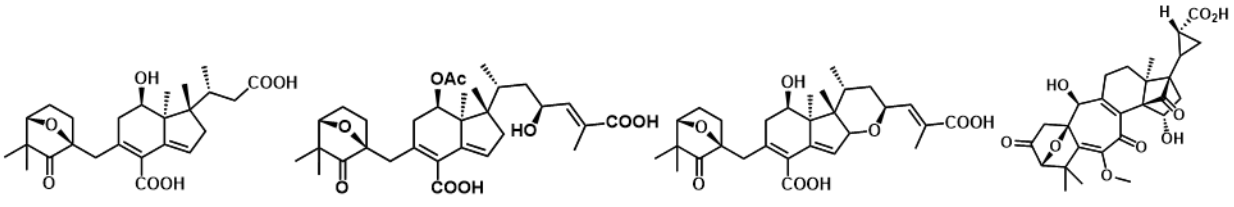
マメ科モデル植物およびその近縁種を用いたダイズシストセンチュウ孵化誘因物質 glycinoeclepin A の生合成遺伝子および経路の解明

Elucidation of the biosynthetic genes and pathways of glycinoeclepin A, a soybean cyst nematode hatching inducer produced by Fabaceae.

○村上 侑太郎、岡本 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Yutaro MURAKAMI, Takumi OKAMOTO, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

ダイズシストセンチュウ(soybean cyst nematode：SCN)はマメ科植物に寄生する病害線虫の一種であり、重大な生育不良を引き起こす原因となる。そのため、世界各地で SCN によるダイズの生産量の損失が問題視されてきた。その中で、SCN 孵化誘因物質として glycinoeclepin A (GEA, **1**)、及びその類縁体である glycinoeclepin B (**2**)や C (**3**)が単離され、SCN に対する孵化活性が確認された。そこで我々はマメ科モデル植物のミヤコグサ(*Lotus japonicus*)を用いて、GEs の生合成遺伝子及び経路の解明に着手した。マメ科植物の SCN 孵化活性試験系確立のため、*L. japonicus* に加えその近縁種を培養し、その培養液を SCN に添加したところ、コントロールと比較して有意に活性が認められた。また、**1** は化学骨格がジャガイモシストセンチュウ孵化誘因物質である solanoeclepin A (**4**)と類似しており、途中まで共通の生合成経路を有すると考えられるため、すでに **4** の生合成遺伝子であると考えられている遺伝子を基に、生合成遺伝子の候補を 8 つに絞った。

Soybean cyst nematode (SCN) is a type of parasitic nematode that causes serious growth defects to legume corps. Loss of soybean production caused by SCN has been a problem in various parts of the world. In this context, glycinoeclepin A (GEA, **1**) and its analogs, glycinoeclepin B (**2**) and C (**3**), were isolated as SCN-hatching inducers. Therefore, we aimed to elucidate the biosynthetic genes and pathways of GEs using *L. japonicus*, a Fabaceae model plant. To establish an experimental system for the SCN hatching activity, we cultivated *L. japonicus* and its related species, and added their culture medium to SCN, resulting in significant activity compared to the control. The biosynthetic pathways of **1** and solanoeclepin A (**4**), a hatching inducer of potato cyst nematode, were estimated to share common intermediates because the chemical structure of **1** resembles that of **4**. Based on this idea, eight candidate genes for the biosynthesis of **1** were discovered.



glycinoeclepin A, *Lotus japonicus*, soybean cyst nematode

講演番号：2E3p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E3 会場

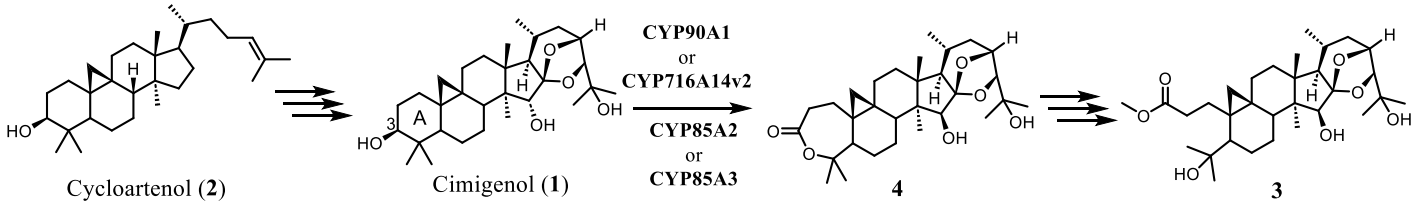
サラシナショウマの主成分 cimigenol を基点とした de novo transcriptome 解析による生合成遺伝子・経路の解明

Elucidation of the biosynthetic pathway of cimigenol in Cimicifuga simplex based on the results of de novo transcriptome

○岡本 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○Takumi OKAMOTO, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

サラシナショウマ（*Cimicifuga simplex*）はキンポウゲ科の植物であり、その根茎を乾燥させたものは、日本薬局方に収録されている生薬となっている。また、その主成分として、cimigenol (**1**) などが知られている。**1** のように、cycloartenol (**2**)を基質とする天然物が多く単離されている中で、**3** が最終産物と考えられ、ガン細胞や白血病細胞に対しての活性が確認されている。そこで、我々は *C. simplex* の網羅的遺伝子解析を行うことで、**1** 及び **3** の生合成遺伝子・経路を解明することを目的とした。まず、**1** や **3** の関連化合物の *C. simplex* における生産を確認したところ、根茎のサンプルで生産が確認できた。そのため、*de novo* transcriptome を行うことで、生合成候補遺伝子の特定を試みた。その結果、**1** の 3 位水酸基をケトン基に酸化する酵素や Baeyer-Villiger 酸化を触媒する酵素の候補遺伝子としてそれぞれ 8 個と 3 個見出すことができた。これらを出芽酵母に発現させ、*in vitro assay* による化合物変換反応を確認したところ、**1** から酸化された化合物を獲得できたので、それらの結果について報告する。

Cimicifuga simplex is a Ranunculaceae and its dried rhizome is used herbal medicine. Cimigenol (**1**) is known a main compound in *C. simplex.* Furthermore, natural products which were biosynthesized from cycloartenol (**2**) were isolated like **1** and **3** is a final product. **3** has activities toward cancer and leukemia cells. Therefore, we aimed to elucidate the biosynthetic pathway of **3**. First, we checked the production of **1**, **3** and related compounds in *C. simplex*. As a result, these compounds were produced in rhizome. Therefore, we performed *de novo* transcriptome and tried to identify biosynthetic candidate genes. As a result, we found out candidate genes which are considered to have a function of oxidation of 3'-OH and catalyzing Baeyer-Villiger. When we performed conversion reaction using these genes by *in vitro* assay, we could get compounds oxidated from **1**.



Cimicifuga simplex, de novo transcriptome, biosynthetic genes of natural products

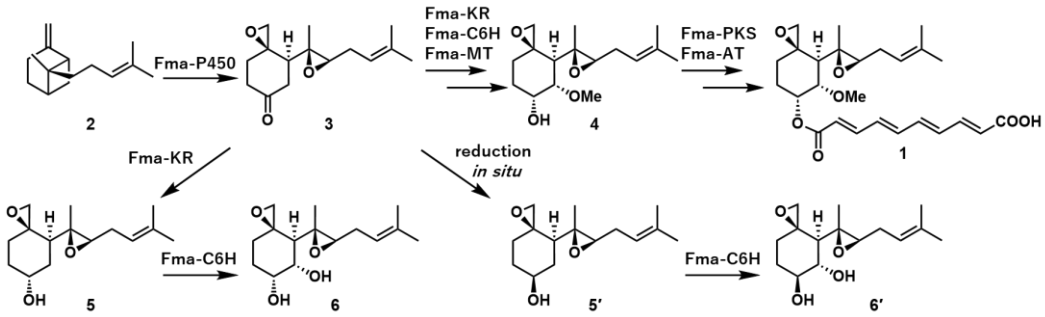
講演番号：2E3p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E3 会場

抗腫瘍性抗生物質 fumagillin 生合成遺伝子のウイルス発現系による新規抗がん遺伝子治療法の確立
Establishing gene therapy by expression of biosynthetic genes responsible for the formation of anticancer agent fumagillin

○根岸 天都、恒松 雄太、佐藤 道大、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Takato NEGISHI, Yuta TSUNEMATSU, Michio SATO, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

強力な生物活性を有する天然物であっても、標的細胞のみにその効果を発揮させることは困難である。天然物をヒト細胞内で生産させることができれば、革新的な天然物による治療法へとつながる。我々はこれをコンセプトに、強力な血管新生阻害剤でがん細胞増殖抑制効果による抗がん剤として期待される天然物 fumagillin (**1**) のヒト細胞内 *de novo* 合成を試みた。本研究では、**1** のセスキテルペン部分を持つ化合物 **4** のヒトがん細胞での生合成を目指した。はじめに、*fma-TC*、*fma-P450* を HeLa 細胞へ導入し、細胞内の FPP を基質とした化合物 **3** の生合成を行った。その結果、**3** の 5 位が還元された天然物の立体とは逆の化合物 5′の生産が確認できた。これは、**2** から **3** への反応が進行した後、細胞内在性の還元酵素により 5 位カルボニル基の立体選択的還元反応が進行し、生成したものと考えられた。そこで、5 位カルボニルの還元を担う *fma-KR* による変換反応を試みた。しかしながら、*fma-KR* の細胞内での発現は確認できなかったため、6 位の水酸化を触媒する *fma-C6H* を細胞に導入し、化合物 **6′** (FR65814) の生産を試みた。その結果、**6′**が生合成され、その生合成によって誘導された細胞死が認められた。

We have attempted to establish a basis of *de novo* biosynthesis of natural products in human cells. In this study, we aimed to biosynthesize fumagillin (**1**), which is a potent angiogenesis inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*, in human cancer cells. First, *fma-TC* and *fma-P450* were introduced into HeLa cells to biosynthesize compound **3** using intracellular FPP as a substrate. We found the production of compound **5′**, in which the 5-position of **3** was reduced. Next, we attempted the conversion reaction by *fma-KR*, but we could not confirm the expression of *fma-KR* in the cells. Then, we introduced *fma-P450* and *fma-C6H* into cells to produce compound **6′** (FR65814), which was reported to possess the inhibitory activity of cell proliferation. As a result, the cells expressing these genes and producing compound **6′** showed a cell death phenotype.



1 : fumagillin, 2: β-*trans*-bergamotene, 3: 5-*keto*-demethoxyfumagillol, 4: fumagillol, 5: demethoxyfumagillol, 5′: 5-*epi*-demethoxyfumagillol, 6: demethylfumagillol, 6′: 5-*epi*-demethylfumagillol

gene therapy, natural products, heterologous biosynthesis

発表責任者：渡辺賢二（kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E3p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E3 会場

放線菌 *Streptomyce albulus* における硫黄キャリアタンパク質を介した新規メチオニン生合成経路の解明

Identification of novel methionine biosynthetic pathway using sulfur carrier protein in *Streptomyces albulus*

○足立 和也、丸山 千登勢、濱野 吉十、長谷部 文人（福井県大院生物資源）
○Kazuya ADACHI, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO, Fumihito HASEBE (Fukui Pref. Univ.)

methionine は含硫のタンパク質性アミノ酸であり、メチル基供与体として知られる *S*-adenosyl-L-methionine の前駆体である。この methionine は homoserine (**1**) や homocysteine (**2**)を中間体として生合成される。2019 年にそのゲノム配列が報告された放線菌 *Streptomyces albulus* NBRC14147 は、興味深いことに methionine 生合成遺伝子として知られる *metA* や *metX* がそのゲノム中に見出されないにも関わらず M9 最小培地で生育可能であることから、未知の methionine 生合成遺伝子を有すると考えられた。昨年度大会で我々は、ゲノム情報から *S. albulus* において新規 methionine 生合成経路に関与する候補遺伝子(以降 *metM*)と、その下流に存在する Sulfur carrier protein (SCP)と機能推測されるタンパク質をコードする遺伝子(以降 *metO*)を見いだし、*metM* の破壊株が methionine や **2** の要求性を示すこと、MetM が *O*-phospho-L-homoserine (**3**)から **2** への変換を触媒すること、さらにこの遺伝子が *Streptomyces* 属放線菌で高度に保存されていることを報告した。今回は、*S. albulus* において **1** から **3** への変換を担う Homoserine kinase をコードする遺伝子の破壊株の生育試験と MetO に由来するチオカルボン酸化体を用いた MetM の *in vitro* 反応を試みた。それらの結果、*in vivo* における **3** の methionine 生合成への関与を細菌として初めて明らかにし、MetM が MetO に由来するチオカルボン酸化体を硫黄源として利用できることを明らかにした。

Methionine is a sulfur-containing proteinogenic amino acid and a precursor of *S*-adenosyl-L-methionine known as a methyl group donor. In canonical methionine biosynthesis, homoserine (**1**) and homocysteine (**2**) are known to be the intermediates. *Streptomyces albulus* NBRC14147, whose draft-genome data was reported in 2019, can grow on the M9 minimal medium; however, this strain has no homologous gene of *metA* or *metX* responsible for the pathway of **1** to **2**. Based on the viability in the M9 medium, this strain should have a novel methionine biosynthetic pathway. Previously, we identified a gene of unknown function (*metM*) highly conserved in *Streptomyces* strains and clustered with the *metO* gene encoding a putative sulfur carrier protein (SCP). We further demonstrated that knockout mutants of the *metM* gene were auxotrophic for methionine or **2** and that MetM converted *O*-phospho-L-homoserine (**3**) to **2**. In this study, we report that knockout mutants of the gene encoding Homoserine kinase required threonine and methionine to grow on the M9 medium. In addition, we demonstrated that MetM could utilize a thiocarboxylated SCP derived from MetO as a sulfur donor when converting **3** to **2**.

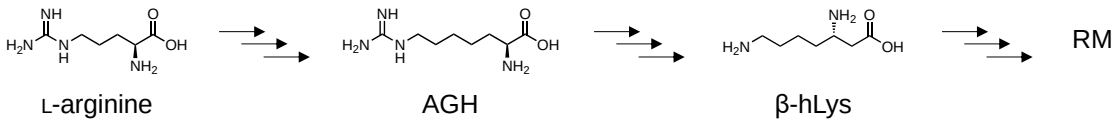
methionine biosynthesis, sulfur carrier protein, *Streptomyces*

発表責任者：長谷部文人（ufhasebe@fpu.ac.jp）

講演番号：2E3p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 E3 会場

抗生物質 resormycin が有するβ-homolysine の生合成機構の解明
Study on the biosynthetic mechanism of β-homolysine found in resormycin
○今堀 千咲[1]、小笠原 泰志[2]、山中 一也[3]、長谷部 文人[1]、五十嵐 雅之[4]、大利 徹[2]、濱野 吉十[1]、丸山 千登勢[1] ([1]福井県大院生物資源、[2]北大院工、[3]関西大化生工、[4]微化研)
○ Chisaki IMAHORI[1], Yasushi OGASAWARA[2], Kazuya YAMANAKA[3], Fumihito HASEBE[1], Masayuki IGARASHI[4], Tohru DAIRI[2], Yoshimitsu HAMANO[1], Chitose MARUYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ, [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ, [3]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ, [4]Institute of Microbial Chemistry, BIKAKEN)

【目的】抗生物質 resormycin (RM) [1]が有する β-homolysine (β-hLys)の生合成研究において、これまでに我々は、L-Arg を出発物質として、α-hLys の側鎖アミノ基がグアニジド化された化合物 2-amino-7-guanidino heptanoic acid (AGH)を経由して生合成されることを報告した。そこで L-Arg から AGH への炭素鎖伸長反応を触媒する酵素遺伝子を探索したところ、Res11 が、Val から Leu の生合成において、2-oxo-isovalerate を基質として acetyl-CoA との縮合反応を触媒する 2-isopropylmalate synthase に相同性を示すことを見出した。そこで Res11 が同様に L-Arg からの炭素鎖伸長に関わると考えると、L-Arg は 2-oxo-Arg へと変換された後、Res11 の基質となる可能性が示唆された。そこで本研究では、このアミノ基転移反応に関わる酵素遺伝子として、PLP 依存型 aminotransferase、Res4 に着目し、組換え酵素を用いた *in vitro* 解析を試みた。【方法と結果】L-Arg および AGH を基質に、アミノ基受容体として幾つかのケト酸を添加して *in vitro* 反応を行ったところ、pyrvate を添加した反応において、L-Arg を 2-oxo-Arg へと変換した。また興味深いことに、AGH も基質として認識し、2-oxo-7-guanidino heptanoic acid （OGH）を生成した。この反応は、AGH を生成する逆反応であると考えられ、Res4 は、L-Arg から AGH へ至る生合成経路の２段階を触媒することを明らかにした。



In our biosynthetic study of β-homolysine (β-hLys) in the antibiotic resormycin (RM), we have previously reported that β-hLys is synthesized from L-Arg via 2-amino-7-guanidino heptanoic acid (AGH). Then we searched for the genes involved in the carbon skeleton rearrangement from L-Arg to AGH and found that Res11 is homologous to 2-isopropylmalate synthase, which catalyzes the condensation reaction between 2-oxo-isovalerate and acetyl-CoA. Given that Res11 would be involved in this carbon chain elongation, we suggested that L-Arg be converted to 2-oxo-Arg and accepted by Res11 as a substrate. Therefore, we focused on the PLP-dependent aminotransferase, Res4, as the only candidate related to the amino group transfer and performed the *in vitro* reaction using the Res4 recombinant enzyme.

Streptomyces strain, antibiotics, biosynthetic mechanism

発表責任者：丸山千登勢（c-maruyama@fpu.ac.jp）

講演番号：2E3p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E3 会場

パプアニューギニア産珪藻 *Nitzschia navis-varingica* のカイノイド生産酵素の同定
Identification of kainoid synthase of the diatom, *Nitzschia navis-varingica*, collected from Papua New Guinea

○芦田 康洋[1]、Clyde Puilingi[2]、前野 優香理[3]、工藤 雄大[4,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、小瀧 裕一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]Pacific Adventist Univ.、[3]東大院農、[4]東北大学際研)
○Yasuhiro Ashida[1], Puilingi Clyde[2], Yukari Maeno[3], Yuta Kudo[4,1], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Yuichi Kotaki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Pacific Adventist Univ., [3]Univ. Tokyo, Agri., [4]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】 ドウモイ酸(domoic acid, DA, **1,** Figure 1)は記憶喪失性貝毒の主成分であり、強力なカイニン酸型のイオンチャネル型グルタミン酸受容体のアゴニストである。我々はこれまで7'-carboxy-*N*-geranyl-L-Glu (Figure 2)がDAの前駆体であることを 日本産DA生産珪藻*Pseudo-nitzschia multiseries* を用いて初めて証明した[1)]。*P. multiseries* やDA生産紅藻ハナヤナギ*Chondria armata*から類似のDA生合成遺伝子が同定されたが[2,3)]、*P. multiseries*の環化酵素DabCはisodomoic acid A (IA, **2**)を、*C. armata* の環化酵素RadCはisodomoic acid B (IB, **3**)を主に生成する(Figure 2)。一方、Puilingiらはパプアニューギニア産の珪藻*Nitzschia navis-varingica*もDA類を生産し、無毒株や異なる類縁体比を示す株も存在すると報告した[4)]。*Nitzschia*属のDA生合成遺伝子はまだ報告されていない。本研究では、*N. navis-varingica* の環化酵素を同定し、生成物を特定することを目的とした。

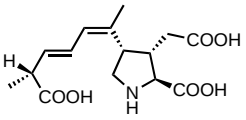


Figure 1 The structure of domoic acid (DA, **1**)

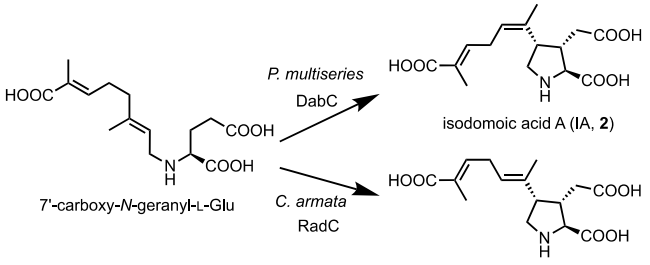


Figure 2 The reactions of kainoid synthases, DabC and RadC

【方法、結果】 *N. navis-varingica* (PNB19-01)株の全 RNA を精製し、DabC や RadC などのアミノ酸配列から設計した degenerate primer で RT-PCR を行った。得られた amplicon の配列を BLAST 検索し、目的である環化酵素の部分配列が得られたことが示された。その部分配列から primer を作成し、RACE 法によって cDNA の 3'末端まで遺伝子配列を決定した。さらに全長の解析を進めている。

Domoic acid (DA, **1**) is the causative toxin of Amnesic Shellfish Poisoning, a potent agonist of iGluR. Recently, several strains of the diatom *Nitzschia navis-varingica* from Papua New Guinea were reported to produce different composition of DA and its analogues. In this study, we attempted to identify the kainoid synthase (cyclase) from *N. navis-varingica.* The degenerate primers for the kainoid synthase were designed and RT-PCR was performed using total RNA extracted from *N. navis-varingica* PNB19-01 strain as template.

【References】 1) Y. Maeno, M. Yotsu-Yamashita, *et al*., *Sci. Rep*. **2018**, *8*, 356. 2) J. K. Brunson, S. M. K. McKinnie, B. S. Moore, *et al*., *Science*, **2018**, *361*, 1356-1358. 3) T. S. Steele, J. K. Brunson, B. S. Moore, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2022**, *119*, e2117407119. 4) C. Puilingi, Y. Kotaki, *et al., Toxicon*, **2022**, *216*, 65-72.

domoic acid, kainoid synthase, diatom

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E3p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E3 会場

異種発現カイノイド合成酵素を用いた新規カイニン酸類縁体の調製

Preparation of novel kainic acid analogues using the heterologously expressed kainoid synthases

山田 基生[1]、○望月 政希[1]、前野 優香理[2]、小瀧 裕一[1]、寺田 竜太[3]、工藤 雄大[4,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東大院農、[3]鹿児島大院連合農、[4]東北大学際研)
Motomi Yamada[1], ○Masaki Mochizuki[1], Yukari Maeno[2], Kotaki Yuichi[1], Ryuta Terada[3], Yuta Kudo[4,1], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Univ. Tokyo. Agri., [3]Kagoshima Univ. Agri., [4]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】カイニン酸 (Kainic acid, KA, **1**, Figure 1) やドウモイ酸(Domoic acid, DA, **2**)はイオンチャネル型グルタミン酸受容体の活性化剤である。KA の環化酵素 KabC を用いた KA の大量生産が報告され[1)]、我々は DA の環化酵素 DabC[2)]を用いて DA 類縁体を調製した[3)]。本研究では、さらなる KA 類縁体の構造活性相関研究を目的に、カイノイド合成酵素で非天然型 KA 類縁体を調製した。

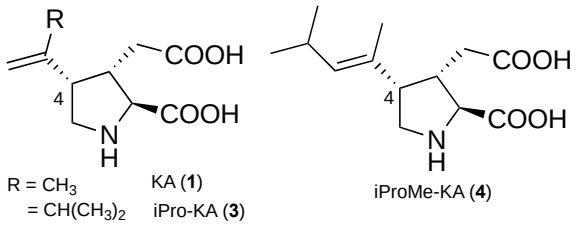


Figure 1. The structures of KA (**1**) and the novel unnatural KA analogues (**3**, **4**) prepared in this study.

【方法】KabC の基質特異性に関するこれまでの知見を基に[4)]、4 位側鎖末端が isopropyl 基または isopropyl methyl 基をもつ開環型 KA 前駆体を化学合成した。その前駆体を、KabC または DabC を発現させた大腸菌培養液に加えて環化を試した。反応の進行は高分解能 (HR)-LC-MS で追跡し、生成物を単離、精製し、NMR で構造解析した。

【結果】開環型 KA 前駆体の 4 位側鎖末端が isopropyl 基の基質は KabC で環化が進行し、iPro-KA (**3**)が得られた(Figure 1)。一方、isopropyl methyl 基の場合は KabC で殆ど反応しなかったが、DabC では容易に環化が進行して iProMe-KA (**4**)が生成した。化合物 **3**, **4** の立体化学は NOE で証明した。

The biosynthetic genes for kainic acid (KA) and domoic acid (DA) have been reported[1,2)]. The kainoid synthase (KabC and DabC) have been applied to produce KA and DA and their analogues[1,3)]. In this study, we prepared two novel unnatural analogues of KA for SAR study using KabC and DabC. The substrates were selected based on the predicted substrate specificity of KabC [4)]. The linear substrates which have an isopropyl or an isopropyl methyl group in the C4 side chain were chemically synthesized, and these substrates were added to the culture medium of KabC or DabC expressing *E. coli.* The obtained cyclized products have been identified using NMR(Figure1).

[References] 1) J. R. Chekan, B. S. Moore, *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* **2019**, *58*, 1–5.
2) J. K. Brunson, S. M. K. McKinnie, B. S. Moore, *et al.*, *Science,* **2018**, *361*, 1356–1358.
3) Y. Maeno, M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *19*, 7894–7902.
4) M. Yamada, M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, The symposium papers, The 64th Symposium on the Chemistry of Natural Products, **2022**, 301–304.

kainic acid, iGulR activator, kainoid synthases

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E3p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E3 会場

In vivo 標識及び免疫染色による渦鞭毛藻サキシトキシン生合成の明暗サイクル内変動解析
Analysis of diurnal changes in dinoflagellate STX biosynthesis by *in vivo* labeling and immunostaining
○長 由扶子[1]、土屋 成輝[1]、大村 卓朗[2]、此木 敬一[1]、大島 泰克[3]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]水圏科学、[3]東北大院生命)
○Yuko CHO[1], Shigeki Tsuchiya[1], Takuo Omura[2], Keiichi Konoki[1], Yasukatsu Oshima[3], Mari Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]LASC, [3]Tohoku Univ. Life Sci.)

【背景・目的】渦鞭毛藻の細胞内でサキシトキシン及びその類縁体(STXs)の量は海洋環境変動に応答して大きく変動する。我々は ^{15}N 標識硝酸イオンを用いて渦鞭毛藻を *in vivo* 標識し、動的解析により STXs 関連化合物の蓄積、再利用生合成、*de novo* 生合成成分の存在を提唱した [1, 2]。さらに初期の生合成酵素 SxtA 及び SxtG の細胞内発現と局在の解析法を確立した[3, 4]。本研究では明暗サイクル内における生合成酵素の時空間変動と毒の生合成と代謝変動の相関を調べることを目的とした。
【方法】渦鞭毛藻 *Alexandrium cetenella* (Group I)の有毒株を ^{15}N 標識硝酸ナトリウム含有 *in vivo* 標識培地で培養し明暗サイクル内で経時的に収穫した。高分解能 HILIC-MS 法で前駆体アミノ酸、推定生合成中間体及び主要 STXs の全同位体異性体を定量し、統計解析した。また同時に収穫した細胞を多重免疫染色に供し、初期段階の生合成酵素 SxtA 及び SxtG の発現と局在を解析した。
【結果・考察】明暗サイクル内の時期によって再利用生合成と *de novo* 生合成の生産速度及び ^{15}N 取り込み率が変動していることが明らかとなった。SxtA 及び SxtG の発現と局在も経時的に変化しており、動的解析データとの相関がみられた。

In paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates, the intracellular levels of saxitoxin and their analogues (STXs) are believed to be controlled by a balance between degradation and synthesis in response to marine environmental changes. *In vivo* labeling with a stable isotope of sodium nitrate has enabled the dynamic analysis of metabolic fluxes of STXs in dinoflagellates [1, 2]. Moreover, we established the observation method of expression and localization of STX biosynthetic enzymes, SxtA and SxtG, hypothesizing that the regulation of STX biosynthesis may be related with their changes in dinoflagellates [3]. In this study these methods were applied to a time course study of *Alexandrium cetenella* (Group I) to examine diurnal changes.^{15}N incorporation rates and production rates of *de novo* and salvage biosynthesis varied with time. The expression and localization of SxtA and SxtG also changed over time and correlated with the dynamic analysis data.

References
1. Cho, Y. *et al.*, Scientific Reports, 9, 3460 (2019), 2. Cho, Y. *et al.*, Harmful Algae, 122, 10372 (2023),
3. Cho, Y. *et al.*, Harmful Algae, 101 101972 (2021), 4. 長ら、2022 年度日本農芸化学会要旨集

saxitoxin, biosynthesis, imaging

発表責任者：長　由扶子（yuko.cho.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E3p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E3 会場

SREBP-1 特異的阻害剤創製を目指したバインダースクリーニング

Discovery of Direct Binders to SREBP-1 by High-Throughput Screening

○廣 佳穂里[1]、高橋 裕[1]、丸山 貴史[1]、岡部 隆義[2]、小島 宏建[2]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[2]([1]東大院農、[2]東大院薬)
○ Kahori HIRO[1], Yu TAKAHASHI[1], Takashi MARUYAMA[1], Takayoshi OKABE[2], Hirotatsu KOJIMA[2], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[2] ([1]The Univ.of Tokyo Faculty of Agriculture, [2]The Univ.of Tokyo Faculty of Pharmaceutical Sciences)

転写因子 SREBP（Sterol regulatory element-binding protein）-1 は脂肪酸生合成の主要制御因子であり、生活習慣病の発症や進展への関与が強く疑われるが、具体的な証左は乏しい。SREBP-1 特異的阻害剤は疾患治療標的分子としての SREBP-1 の可能性を検証する上で強力なツールとなるが、既知の特異的阻害剤は存在しない。非酵素である SREBP-1 には活性調節ポケットが存在しない可能性が想定されるため、本研究では、E3 リガーゼのリガンドを繋いだプロテインノックダウン化合物による SREBP-1 特異的タンパク質分解を目指し、精製 SREBP-1 に直接結合する化合物を数万の化合物ライブラリより探索した。

SREBP-1 のタンパク質精製を行った報告例は存在しないため、まずは SREBP-2 との相同性が低く転写活性に重要な N 末端領域について、二段階精製による精製 SREBP-1 タンパク質を取得した。得られた精製 SREBP-1 を用いて、結合の有無を高スループットで評価可能な Thermal shift assay、結合の特異性、親和性を評価可能な表面プラズモン共鳴法による複数段階の評価を行い、4 化合物の選抜に成功した。今後は、構造活性相関取得による SREBP-1 に対する結合親和性の向上を目指す。

The transcription factor SREBP (Sterol regulatory element-binding protein)-1, a master regulator of fatty acid biosynthesis, is suggested to induce or worsen metabolic diseases; however, its pathological functions remain elusive. SREBP-1-specific inhibitors would be crucial to examine whether SREBP-1 can be a target molecule for treating such diseases. Given that SREBP-1 might not possess a cavity where small molecules bind and through which transcriptional activity is regulated, we conducted a large-scale compound screening to identify specific binders to purified human SREBP-1, which would lead to the development of protein knockdown compounds that enable specific protein degradation of SREBP-1.

First, we prepared purified SREBP-1 protein of the N-terminal region, which is responsible for its transcriptional activity and possesses high specificity against SREBP-2. Using the purified protein, we performed the first screening from tens of thousands of chemical libraries by Thermal shift assay, followed by Surface plasmon resonance to ensure the binding specificity and affinity of the compounds. Consequently, we succeeded in selecting four SREBP-1 binders. Through structure-activity relationships, compounds with higher affinity would be found and developed into protein knockdown compounds.

Binder screening, SREBP-1, Biophysics

発表責任者：廣佳穂里（hirokahori0925@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2E3p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E3 会場

芳香族アミン誘導体の水素ー重水素交換反応

Mild and Selective Hydrogen-Deuterium Exchange for Aromatic Hydrogen of Amines

○橋本 誠[1]、タクリム ゼトリアナ プテリ[1,2]、デシタ トリアナ[1]、村井 勇太[1] ([1]北大院農、[2]インドネシア国立研究開発機構)
○ Makoto HASHIMOTO[1], Zetryana Puteri TACHRIM[1,2], Triana DESITA[1], Yuta MURAI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]BRIN (Badan Riset dan Inovasi Nasional))

重水素化有機化合物は、生物学的に活性な化合物や医薬品の機能増強、や化学および生物学的プロセスのプローブとして使用されます。 水素-重水素交換（H-D 交換）は、重水素標識化合物の調製に使用される方法の 1 つであり、H-D 交換による重水素の導入は、化合物の構築の最終ステップに使用できることから有用な方法として考えられています。 多くの化合物は窒素含有化合物であるため、芳香族アミンおよびアミドの重水素化は非常に重要となりますが、これまで重水素化トリフルオロ酢酸を使用し、100℃以上の長時間反応で、アニリン、アセトアニリド、ベンジルアミン等の芳香族位置の H-D 交換が報告されています。重水素化トリフルオロメタンスルホン酸（TfOD）が、芳香族化合物の H-D 交換試薬として利用できることを報告しています。 我々はは、光学活性なα-アミノ酸およびペプチド、インドール-3-アルカン酸の芳香族重水素化、およびヒスチジンおよびヒスタミンのイミダゾール環の重水素化における TfOD の役割を集中的に研究してきました。今回 TfOD を利用した穏やかな条件下での、芳香族アミンおよびアミドに対する H-D 交換はを検討しました。

Deuterated organic compounds have been used as probes for mechanistic studies of biologically active compounds and pharmaceuticals and in chemical and biological processes. Hydrogen–deuterium exchange (H–D exchange) is one of the methods used for preparation of deuterium-labelled compounds. The introduction of deuterium by H–D exchange is beneficial as the final step in the construction of bioactive compounds. Deuteration of aromatic amines and amides is of significant importance as many drug candidates are nitrogen-containing compounds. In acidic condition, H–D exchange for the aromatic positions of aniline, acetanilide, and benzylamine derivatives have been reported by the utilization of deuterated trifluoroacetic acid with or without a palladium catalyst over 100 °C and with long reaction time. Trifluoromethanesulfonic acid (TfOH) has special features in that it can act as a solvent and as a catalyst for the electrophilic aromatic substitution. Deuterated TfOH (TfOD) is already reported as an acid H–D exchange reagent for aromatic compounds. Our group has intensively studied the role of TfOD in aromatic deuteration of optically active α-amino acids and peptides, indole-3-alkanoic acids, and the imidazole ring deuteration of histidine and histamine. The H–D exchange under mild conditions utilizing TfOD is conducted to aromatic amines and amides.

Hydrogen-Deuterium exchange, Trifluoromethanesulfonic Acid, Aromatic amines

発表責任者：橋本 誠（hasimoto@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2E3p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E3 会場

3-スチリルフラボン類の合成及び HL-60 に対する増殖抑制活性に関する研究

Synthesis and bioactivity of 3-Styrylflavones

○堤 ありさ[1]、川井 悟[1]、吉澤 結子[2]、常盤野 哲生[2] ([1]電大院先端研、[2]秋田県大)
○ Arisa TSUTSUMI[1], Satoru Kawai[1], Yuko Yoshizawa[2], Tetsuo Tokiwano[2] ([1]Tokyo Denki University, [2]Akita prefectural university)

【目的】従来の創薬研究では、生理活性発現部位を一つだけ持つ天然資源由来化合物をリード化合物として精力的な研究が行われてきたが、新規構造の枯渇が問題化している。そこで生理活性発現部位を複数組み合わせた複合分子を合成することで、新たな生物活性の発現や活性増強をはかる研究が注目されている。フラボン類には，多くの植物中に配糖体として存在しており、抗酸化作用、抗炎症作用など様々な生理活性を示すことが報告されている。一方、スチルベン類にも多様な生物活性が知られており、両者を複合分子化することで生物活性の増強や新しい生物活性の発現が期待されることから、当研究室ではフラボンとスチルベンの複合分子であるスチリルフラボン類の合成について検討している。本発表では、フラボン C 環へスチリル基を導入した 3-スチリルフラボン類の合成とその生物活性について報告する。

【方法】3-スチリルフラボンのスチリル基における E 体と Z 体の生物活性の差についても興味が持たれたので、両者が著量生成する Wittig 反応によるスチリル基導入を行うこととした。Wittig 反応において、フラボン側をホスホニウム塩、ベンジル基側をアルデヒドとする経路と逆にフラボン側をアルデヒドとし、ベンジル基側をホスホニウム塩とする経路があるが、フラボン骨格へのホルミル基導入は、芳香環である A 環と B 環で優先的に起こり、C 環 3 位のホルミル化は困難であることが予想された。そこで、フラボン側をホスホニウム塩側にするため、2’-ヒドロキシプロピオフェノン類を出発物質とし、THF 溶媒下で安息香酸類との Yamaguchi エステル化を行い 2-プロピオフェニルベンゾエート類を合成した。これを塩基性条件下で Baker-Venkataraman 転位, 分子内環化を経て数種の 3-メチルフラボン類を合成した。その 3 位のメチル基を Wohl-Ziegler 反応により臭素化した後、PPh3 と反応させてホスホニウム塩とし、ベンズアルデヒド類と Wittig 反応させて、3-(*E*)-スチリルフラボン類を合成した。合成した化合物は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標としてその生物活性を評価した。

【結果】3-メチルフラボン類 3 種類、3-(*E*)-スチリルフラボン類とその類縁体 22 種類を合成し、一部の構造において生物活性を確認した。

In this presentation, we report the investigation of a systematic synthesis of 3-styrylflavones as an analogous skeleton to the hybrid molecules containing the flavone and the stilbene moieties. 3-Methylflavones prepared by the appropriate combination of 2’-hydroxypropiophenones and benzoic acids, were converted into their phosphonium ylides, which were then applied to the Wittig reaction to afford 3-styrylflavones. Their biological activity was examined by the antiproliferative test to HL-60.

3-Styrylflavone, HL-60, Hybrid molecule

講演番号：2E3p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E3 会場

フラバン-3-オール-加熱安定化ゼラチン複合体の機能性評価
Functional evaluation of flavan-3-ol - heat stabilized gelatin complex
○山下 啓太[1]、青木 環[1]、堀口 諒太[1]、植村 美希[2]、谷口 正紘[2]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工、[2]大阪電通大工)
○ Keita YAMASHITA[1], Atoru AOKI[1], Ryota HORIGUCHI[1], Miki UEMURA[2], Masahiro TANIGUCHI[2], Akiko SAITO[1,2] ([1]Graduate School of Engineering, OECU, [2]Faculty of Engineering, OECU)

我々はこれまで，加熱安定化ゼラチンと高機能性ポリフェノール化合物で複合体を調製し，機能性素材としての応用を目的に検討を行ってきた。本発表では,ゼラチンの加熱時間に関する検討を行い，ポリフェノール複合体のカプセル化効率やラジカル消去活性について検討したので報告する。

膨潤させた加熱安定化ゼラチンの体積が加熱時間の増加とともに減少したことから，ゼラチン粒子内で縮合反応などが進行して架橋したことが示唆された．また，ゼラチン粒子の表面積を大きくすることで，結合するポリフェノールの量を増加させることができると考え，破砕していないゼラチンと破砕したしたゼラチンのカプセル化効率と担持容量を比較した。その結果，ゼラチンを破砕したことによりカプセル化効率と担持容量が変化した。また，担持容量はゼラチンを加熱する時間を増加する程減少した。ゼラチンに結合したポリフェノールの機能性を調べるために DPPH ラジカル消去活性試験を行った．ラジカル消去率は加熱時間に関係なく一定であった。本発表では加熱安定化ゼラチンとポリフェノール化合物の複合体に関する実験についての詳細について報告する。

We have been studying the application of materials prepared from complexes of heat-stabilized gelatin and highly functional polyphenolic compounds. In this paper, we report on our studies on the encapsulation efficiency and radical scavenging activity of polyphenol complexes by examining the heating time of gelatin. The volume of swollen heat-stabilized gelatin decreased with increasing heating time. We thought that increasing the surface area of gelatin particles could increase the amount of bound polyphenols, so we measured the encapsulation efficiency and loading capacity of uncrushed gelatin and crushed gelatin. Encapsulation efficiency and loading capacity were altered by crushing the gelatin. The loading capacity decreased as the time to heat the gelatin increased. DPPH radical scavenging activity test was conducted to investigate the functionality of polyphenols bound to gelatin. The radical scavenging rate remained constant regardless of heating time.

Interaction between gelatin and polyphenols, Flavan-3-ol derivatives, Functional analysis of gelatin-polyphenol complex

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2E4a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E4 会場

Preparation and degradability of novel cross-linked functional hydrogels from enzymatic synthesized α-1,3-glucan and its carboxymethyl derivative

○ZHENGYU SU[1], HARUKA KINOSHITA[1], YOICHI TAKEDA[1], MAKOTO OGAITO[2], MATSUI DAISUKE[1], YOSUKE TOYOTAKE[1], MAMORU WAKAYAMA[1] ([1]The Univ. of Ritsumeikan, [2]Shimadzu Corporation)

[Introduction] Polysaccharide-based hydrogels, which are three-dimensional structures composed of hydrophilic biopolymer networks, have attracted considerable attention as effective adsorbents and biomedical materials. They are known for their high-water retention capacity, good biocompatibility, biodegradability, and low toxicity. α-1,3-Glucan is a water-insoluble glucose homopolymer that can be generated through enzymatic polymerization and easily purified without using organic solvents. Thus, it is attracting attention as a new bio-based material. Our previous report has discussed α-1,3-glucan based nanomicelles as hydrophobic drug delivery vehicles (Zhengyu S *et al., Colloid Polym Sci.,* 2023). Here, we prepared a novel biodegradable hydrogel as a versatile adsorbent material by mixing α-1,3-glucan with its carboxymethyl derivatives.

[Methods and Results] In this work, α-1,3-glucan was synthesized from sucrose using glycosyltransferase I from *Streptococcus mutans*. The resulting α-1,3-glucan was converted to carboxymethyl glucan (CMG), and hydrogels were prepared by crosslinking with ethylene glycol diglycidyl ether. The detailed structures of the hydrogels were determined using a scanning electron microscope. The resulting hydrogel was highly swellable, self-standing, and pH-sensitive with an enhanced highly developed structure. Analyses also revealed that the swelling ratio of the hydrogels increased as the CMG content increased. Furthermore, hen egg white lysozyme and BSA were used as model proteins to determine the protein adsorption ability of the hydrogels. The results showed that in all of the investigated cases, the hydrogels had a good protein absorption and the amount of adsorbed protein increased with the CMG content increased. In addition, due to a great number of active groups, such as hydroxyl groups and carboxyl groups in the hydrogel providing enough adsorption active sites, the hydrogel had excellent adsorption performances. Various organic dyes, such as malachite green, methylene blue and basic blue, could be effectively removed. Moreover, the hydrogels had good biodegradability and could be degraded in soil extract solution and enzyme solution. Herein, the prepared hydrogels based on α-1,3-glucan and its carboxymethyl derivatives have potential applications as a green and environmentally friendly adsorbent for the effective removal of organic dyes in printing and dyeing wastewater.

α-1,3-glucan, Hydrogel, Carboxymethylated polysaccharides

発表責任者：WAKAYAMA MAMORU（wakayama@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2E4a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E4 会場

In vivo evolution of the *Ralstonia* sp. phosphite dehydrogenase (PtxD): isolation and biochemical characterization of the nitrate resistant PtxD

○Gamal Nasser Abdel-Hady[1,2], Linh Thi Thuy Cao[1], Takenori Ishida[1], Takeshi Ikeda[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1], Ryuichi Hirota[1] ([1]Unit of Biotechnology, Division of Biological and Life Sciences, Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, Hiroshima, Japan, [2]Department of Genetics, Faculty of Agriculture, Minia University, Minia, Egypt)

Phosphite dehydrogenase (PtxD) catalyzes the NAD-dependent oxidation of phosphite ($H_2PO_3^-$, Pt) to phosphate ($H_2PO_4^{2-}$, Pi). Previously, we established a Pt-dependent cyanobacterial strain capable of growing exclusively on Pt, but not Pi. This strain was established by expressing the PtxD isolated from *Ralstonia* sp. 4506 in a *Synechococcus elongatus* PCC 7942 lacking its endogenous Pi transporters. In this study, passaging the Pt-dependent *Synechococcus* strain (RH714) in a modified BG-11 medium with an elevated nitrate concentration (approximately 35 mM) resulted in the generation of the strain that possesses mutant PtxD where Gly157 was substituted with Ser ($PtxD_{G157S}$). This amino acid substitution occurred within the pyrophosphate-binding (GXXGXGXXG) motif of the nucleotide-binding Rossmann-fold domain. Using the *Esherichia coli* expression system, the $PtxD_{G157S}$ mutant protein was expressed and purified to homogeneity. Kinetic analysis of $PtxD_{G157S}$ revealed an approximately 5- and 8-fold increase in K_m values for NAD^+ and Pt, respectively, compared to the wild type. Interestingly, the $PtxD_{G157S}$ mutant exhibited a stronger resistance toward nitrate than the wild-type enzyme, suggesting that the reduced affinity for both NAD^+ and Pt alleviated nitrate inhibition of PtxD. Further kinetic characterization of $PtxD_{G157S}$ revealed that nitrate acts as a non-competitive inhibitor for both NAD^+ and Pt. Increasing concentrations of NAD^+ or Pt failed to restore the catalytic activity of the $PtxD_{G157S}$ mutant in the presence of nitrate, strongly indicating a non-competitive inhibition mode of nitrate. Overall, these findings highlight the significance of Gly157 in NAD^+ binding, potentially influencing nitrate resistance.

phosphite dehydrogenase, nitrate resistance, non-competitive inhibition

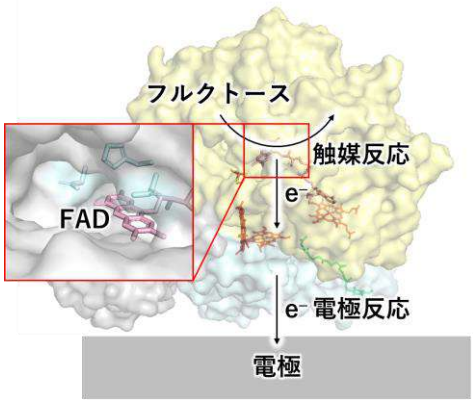
発表責任者：Ryuichi Hirota（hirota@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2E4a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E4 会場

構造生物電気化学的手法による膜結合型フルクトース脱水素酵素の反応機構解明

Structural and bioelectrochemical elucidation for the mechanisms of membrane-bound fructose dehydrogenase

○府川 江央留、宋和 慶盛、北隅 優希、白井 理（京大院農）
○ Eole FUKAWA, Keisei SOWA, Yuki KITAZUMI, Osamu SHIRAI (Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)



FDH の DET 型酵素電極反応

化学物質のセンシング需要が高まる現代社会において，酸化還元酵素を利用した電気化学バイオセンサは，多様な物質を簡便に測定できる手法として注目されている．また，本センサの次世代基盤技術として，酵素が直接的に電極と電子授受を行う直接電子移動（DET: Direct Electron Transfer）型酵素電極反応が知られている．本反応は，電子メディエータが不要なため，生体／環境適合性と設計自由度に優れた理想的なバイオセンサを設計可能である．一方，本反応を実現できる酵素（DET 型酵素）の報告例は極めて少なく，検出対象が限定的という課題が存在する．本課題の解決策として DET 型酵素の基質特異性改変が有効だと考えられる．本研究では，DET 型モデル酵素“酢酸菌 *Gluconobacter japonicus* 由来の膜結合型フルクトース脱水素酵素（FDH）”に注目し，本酵素の触媒反応機構解明を目的とする．計算科学的な観点から FDH の反応中心である FAD 近傍のアミノ酸残基に着目し，酵素工学的に変異体を作製した．各変異体の立体構造および電気化学特性を解析し，基質認識や触媒活性に関与するアミノ酸残基を構造生物電気化学的に解明した．

Sensing various chemical substances is in demand, and electrochemical biosensors using redox enzymes are attracting attention as a simple and easy method. Direct electron transfer (DET)-type bioelectrocatalysis, in which enzymes can exchange electrons directly with electrodes, is known as the next-generation fundamental technology for the sensors. Owing to its mediator-less configuration, the reaction is suitable for constructing ideal biosensors. However, their few reports of the DET-type enzymes limit their detection targets. Modification of the substrate specificity of the enzymes is considered an effective solution to tackle this issue. In this study, we focus on a DET-type model enzyme, membrane-bound fructose dehydrogenase (FDH) from *Gluconobacter japonicus,* to elucidate its catalytic reaction mechanism. From a viewpoint of bioinformatics, we focused on the amino acid residues near the FAD, the reaction center of FDH, and constructed several variants with protein engineering. The steric structures and electrochemical properties of the variants were analyzed, and the amino acid residues involved in substrate recognition and catalytic reaction were elucidated by structural bioelectrochemistry.

bioelectrocatalysis, Cryo-EM, direct electron transfer

発表責任者：宋和慶盛（sowa.keisei.2u@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2E4a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E4 会場

新規 PET 分解酵素の同定と表面特徴量解析を用いた酵素改変
Identification of novel PET-degrading enzymes and enzyme engineering using surface feature analysis

○馬橋 英章[1]、平井 洵[1]、桜井 滋[1]、井手 圭吾[1]、小川 雅人[1]、細川 正人[1,2]、津田 宗一郎[1]([1]bitBiome 株式会社、[2] 早大院・先進理工)
○Hideaki MABASHI[1], Makoto HIRAI[1], Shigeru SAKURAI[1], Keigo IDE[1], Masato KOGAWA[1], Masahito HOSOKAWA[1,2], Soichiro TSUDA[1] ([1]bitBiome, Inc., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

世界的に廃プラスチック問題は広く認知されるようになり、酵素を用いた新たなリサイクル法が注目されている。近年、プラスチックの中でもポリエチレンテレフタラート（PET）の分解酵素は、その発見を機に様々な酵素改変が行われ、多くの変異体が報告されてきた。我々は産業用途に資する酵素開発を最終目標とし、新たに PET 分解酵素を同定し、directed evolution による酵素改変を行った。

我々は当社が構築した大規模微生物遺伝子データベース bit-GEM を探索し、7 個の新規 PET 分解酵素を同定した。次に、そのうちの 1 酵素の PET 分解活性を高めるために directed evolution による酵素改変を行った。変異導入アミノ酸の選定には、基質結合ポケット周辺を解析する独自ツールである表面特徴量解析と公共のタンパク質言語モデルを使用した。その結果、PET ナノ粒子を分解する活性は 5 倍に上昇した。上昇した活性のほとんどは表面特徴量解析が提示した変異アミノ酸の組み合わせで達成されたことから、この解析ツールの酵素改変における有用性が示された。

The global issue of plastic waste has become widely recognized, and recycling methods utilizing enzymes have attracted attention. In recent years, following the discovery of enzymes capable of degrading polyethylene terephthalate (PET), various enzyme modifications have been reported. With the ultimate goal of developing a PET-degrading enzyme suitable for industrial applications, we identified novel PET-degrading enzymes and conducted enzyme modification through directed evolution.

Through exploring our massive microbial genome database, bit-GEM, we identified seven novel PET-degrading enzymes. Subsequently, we conducted enzyme modification through directed evolution to enhance the PET degradation activity of one of them. Selection of mutated amino acids was achieved using a unique tool, surface feature analysis, to analyze the substrate-binding pocket surroundings, coupled with a public protein language model. As a result, the activity for degrading PET nanoparticles increased by five-fold. This increase was mostly achieved through combinations of mutations suggested by the surface feature analysis, demonstrating the utility of this tool in enzyme modification.

microbial genome database, PET-degrading enzyme, enzyme engineering

発表責任者：津田宗一郎（soichiro.tsuda@bitbiome.co.jp）

講演番号：2E4a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E4 会場

コケ由来ペルオキシダーゼ Prx34 の TPX フィルム培養による生産

Production of moss-derived peroxidase Prx34 by TPX film culture

伊藤 健司[1,3]、日下志 和也[1]、○中 雄輝[1]、秋田 求[2,3]（[1]近畿大院生物理工、[2]近畿大生物理工、[3]株式会社セルフィルム研究所）
Kenji Ito[1,3], Kazuya Higashi[1], ○Yuki Naka[1], Motomu Akita[2,3] ([1]Grad. BOST., Kindai Univ., [2]Fac. BOST., Kindai Univ., [3]Cell Film Lab. CO., LTD)

ペルオキシダーゼは広い基質特異性をもち、研究や工業分野などに幅広く使用されている商業的価値の高い酵素である。私達は、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrium patens*)由来ペルオキシダーゼ Prx34 を大腸菌（Rosetta 株）や *Brevibacillus choshinensis* に分泌生産させ、反応速度論的解析を行った結果、組換え Prx34（rPrx34）が HRP に比べ高い代謝回転率を有することを報告している。Prx34 生産のため、これらを、高いガス透過性を有するポリメチルペンテン（TPX）製フィルム容器を用いて静置培養した。TPX フィルムは高いガス透過性と光透過性を有し、オートクレーブや紫外線による殺菌が可能であるため、培養容器として優れた特性を持つ。このフィルムを使用する培養方法では、撹拌などによる機械的通気が必要なく、振とう機等の設備やそのためのスペース、培養のための電力を削減できる。まず、A8 サイズの袋状の容器を用い、そこに 2 mL の培養液を入れ培養した。結果、振とう培養と遜色ない生育とペルオキシダーゼ生産性が観察された。容器サイズに比例させて培地量を増やした場合や、容器の設置間隔を密にしても安定した生産が見られた。本報告では、この TPX 製容器を用いた培養法を紹介し、本培養法の特徴と rPrx34 生産の効率化について報告する。

Peroxidases are commercially valuable enzymes with high substrate specificity and are widely used in research and industrial fields. We have analyzed the reaction kinetics of Prx34, a peroxidase from *Physcomitrium patens*, by secretory production in *E. coli* (Rosetta) and *Brevibacillus choshinensis* for the production of Prx34. The recombinant Prx34 (rPrx34) was incubated in a gas-permeable polymethylpentene (TPX) film container. TPX film has excellent characteristics as a culture vessel because of its high gas and light permeability and its ability to be sterilized by autoclaving and UV light. The culture method using this film does not require mechanical aeration by agitation, etc., reducing the need for equipment such as a shaker, space for such equipment, and power for culture. First, an A8-size medium was used and 2 mL of culture medium was placed in the bag. As a result, growth and peroxidase productivity comparable to shaking culture were observed. Stable production was observed even when the amount of medium was increased in proportion to the vessel size or when the vessels were placed at close intervals. In this report, we present a culture method using these TPX containers and report on the characteristics of this culture method and the efficiency of rPrx34 production.

Oxygen permeable film, Liquid static culture, Recombinant protein

発表責任者：秋田　求（akita@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2E4a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E4 会場

Norovirus-based platform for modular displaying of antigenic protein candidates for mosquito-borne infectious diseases

○Jirayu Boonyakida, Enoch Y. Park (Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., Japan)

Malaria and dengue are listed as two of the most concerning mosquito-borne diseases in the tropical region and have threatened approximately 220 million and 390 million individuals, respectively, annually. Despite the seriousness of the diseases, only a few vaccines have been approved for clinical use, but only to be used in children in endemic areas. Therefore, there is an urgent need to develop a vaccine that can induce a potent immune response against such diseases.

Virus-like particles (VLPs) have been recently employed as a tool for vaccine technologies due to their safety profile and ability to enhance immune response. VLPs are comprised of repetitive subunits organized in a well-defined icosahedral symmetry, making them ideal platforms for displaying foreign antigenic proteins or peptides on their surfaces. We have successfully developed our SpyTagged-norovirus-like particle (NoV-LP/SpT) by introducing the short SpyTag peptide to the C-terminus of VP1 protein, the major structural protein of NoV-LP, through a genetic fusion with a peptide spacer between the VP1 and the SpyTag peptide to improve a conjugation efficiency. To demonstrate the versatility of the norovirus-based platform, the NoV-LP/SpT was then used as a scaffold for carrying vaccine antigens such as envelope protein domain III (EDIII) of dengue virus (DENV), 19 kDa C-terminal region of merozoite surface protein 1 of Plasmodium yoelii (PyMSP119), and circumsporozoite protein of P. yoelii (PyCSP) through the spontaneous isopeptide bond formation between the SpyTag/SpyCatcher reactive pair.

Through this modular method, the next generation of vaccines exploiting nanoscale-scaffold can potentially contribute to the challenges in human and animal health and can facilitate vaccine development against emerging diseases.

Norovirus-like particle, Mosquito-borne diseases, Modular displaying

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E4a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E4 会場

Envelope Domain III (EDIII) displaying Dengue virus-like particle: A tetravalent Virus Like Particle (VLP) using silkworm expression system

○Krishna Raja MUTHURAMAN[1], Jirayu BOONYAKIDA[2], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., Japan, [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., Japan)

Dengue is common among human viral infections transmitted through mosquitoes. Nearly 4 billion populations are at risk. In this study, we developed a tetravalent antigen displaying virus-like particle (VLP) targeting all four serotypes of dengue virus (DENV). The envelope domain III (EDIII) was selected as the antigen candidate due to its receptor-binding interaction. The EDIII was PCR amplified using sequence-specific primers for all four serotypes, and SpyCatcher (SpC)-fused genetic constructs were cloned separately in the pFastBac vector for transposition into Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) bacmid for expression in silkworm larvae. Similarly, the SpyTag (SpT)-fused DENV capsid for serotype 2 was also expressed. The Capsid size and particle characteristics were determined using a transmission electron microscope and dynamic light scattering. Expressed proteins were confirmed by western blot using serotype-specific antibodies for EDIII and anti-capsid antibody for Capsid, respectively. Affinity purified Strep-tagged EDIII proteins (~21 kDa) of all four serotypes individually. Flag-tagged Capsid (~15 kDa) proteins and Strep-tagged EDIII proteins were concentrated and conjugated for displaying the EDIII on the surface of Capsid using SpT/SpC covalent binding. The displayed four EDIIIs were confirmed using western blot. Our study of displaying a tetravalent EDIII antigen of all four serotypes on the dengue viral Capsid may be a suitable vaccine candidate against dengue infection.

Viral like Particle, Capsid, Envelope domain

発表責任者：Enoch Y Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E4a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E4 会場

耐熱性ヘリカーゼと耐熱性鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いた等温核酸増幅法

Isothermal DNA Amplification by Thermostable Helicase and Thermostable Strand-Displacing DNA Polymerase.

○村上 雄人[1]、生田 宗一郎[1,2]、柳原 格[3]、保川 清[4]、藤原 伸介[1,2]([1]関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻、[2]関西学院大学生命環境学部、[3]大阪母子医療センター、[4]京都大学大学院農学研究科)

○Yuto Murakami[1], Soichiro Ikuta[1,2], Itaru Yanagihara[3], Kiyoshi Yasukawa[4], Shinsuke Fujiwara[1,2] ([1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Kwansei-Gakuin university, [2]Department of Biosciences, School of Biological and Environmental Sciences, Kwansei-Gakuin University, [3]Osaka Women's and Children's Hospital, [4]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【研究目的】等温核酸増幅法とは PCR 法のような温度変化を必要としない核酸増幅法である。本研究では耐熱性ヘリカーゼと耐熱性鎖置換型ポリメラーゼを利用し、サーマルサイクラーを必要としない DNA 増幅の開発を目指した。【実験方法】*Aeribacillus pallidus* H1 株の鎖置換型耐熱性 DNA ポリメラーゼ H1-Pol(1)および *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株由来の 3'→5'ヘリカーゼ EshA(2)及び 5'→3'ヘリカーゼ Upf1(3)を組換え体として取得した。鋳型には M13 ファージの ssDNA、RF の dsDNA を用い、特異的プライマーで増幅を検証した。温度、反応時間など、反応条件の最適化を行った。【結果及び考察】ssDNA を鋳型とする増幅はいずれのヘリカーゼでも確認された。一方、dsDNA を鋳型とした場合、ヘリカーゼに Upf1 を用いた方が効率が高かった。これは Upf1 の持つアンワインド活性に起因すると考えられる。H1-Pol と Upf1 ヘリカーゼの増幅では、最初の変性処理も不要で、反応時間に依存して DNA 増幅が高まることが確認された。本発表では Upf1/H1-Pol 増幅の特徴について紹介する。

[Research Objectives] Isothermal DNA amplification is a unique method that obviates the need for temperature cycling, distinguishing it from PCR. This study aims to develop DNA amplification using a thermostable helicase and a thermostable strand-displacing DNA polymerase. [Experimental Methods] The thermostable DNA polymerase H1-Pol (1) from *Aeribacillus pallidus* H1 and the 3'→5' helicase EshA (2) and 5'→3' helicase Upf1 (3) from *Thermococcus kodakarensis* KOD1 were employed. Amplification was performed with ssDNA or RF dsDNA from bacteriophage M13 as template with specific primers. Reaction conditions, such as temperature and time, were optimized. [Results and Discussion] Amplification from ssDNA templates was confirmed with both helicases. When dsDNA was the template, Upf1 demonstrated higher efficiency than EshA. Upf1/H1-Pol amplification did not necessitate an initial denaturation process, and DNA amplification was enhanced in a time-dependent manner. This presentation will delve into the detailed characteristics of Upf1/H1-Pol amplification.

(1) Juma, K.M. et al., J. Biosci. Bioeng. 135, 282 (2023), (2) Fujiwara, A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 82, 3022 (2016), (3) Hidese, R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 495, 2189 (2018)

Isothermal amplification, Helicase-dependent amplification, Thermostable enzymes

講演番号：2E4a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E4 会場

キメラ DNA ポリメラーゼを用いた鎖置換活性に影響を与える領域の特定

Estimation of regions affecting strand displacement activity using chimeric DNA polymerases

○西 晃輝[1]、生田 宗一郎[1]、柳原 格[2]、保川 清[3]、藤原 伸介[1]([1]関学理工、[2]大阪母子医療センター、[3]京大院農)
○ Koki NISHI[1], Souitiro IKUTA[1], Itaru YANAGIHARA[2], Kiyoshi YASUKAWA[3], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]KWANSEI GAKUIN Univ., [2]Osaka Women's and Children's Hospital, [3]Kyoto Univ.)

【研究目的】核酸を増幅する技術として等温核酸増幅法がある。本法では、二本鎖を解離しながら DNA を合成する鋳型鎖置換型 DNA ポリメラーゼが必要になる。発酵堆肥から分離された *Geobacillus zalihae* C1 株、及び *Aeribacillus pallidus* H1 株の鎖置換型耐熱性 DNA ポリメラーゼ（C1-Pol 及び H1-Pol）を比較すると H1-Pol の方が鎖置換活性が高かった。本研究ではドメインの一部を置換したキメラ酵素を構築し、鎖置換活性に関与する領域の特定を目的とした。【実験方法】C1-Pol において DNA ポリメラーゼに特徴的な機能ドメイン(palm^{s}、palm^{L}、finger、3’-5’exonuclease、5’-3’exonuclease)を H1-Pol のドメインに置換した 5 種のキメラ酵素を設計し、組換えタンパク質を精製した。耐熱性を指標に分子の安定性を評価した。さらに DNA 合成活性と鎖置換活性を比較した。【結果及び考察】5 種のキメラ酵素は大腸菌内で安定に発現した。各キメラ酵素を精製し、野生型酵素と比較した結果、C1-Pol に H1-Pol の一部ドメインを挿入することで鎖置換活性の向上が確認された。鎖置換活性の高さは特定の領域に起因すると予想された。

[Research Objectives] *Geobacillus zalihae* C1 and *Aeribacillus pallidus* H1 strains contain thermostable strand-displacing DNA polymerase (C1-Pol and H1-Pol). H1-Pol shows higher activity than C1-Pol. Chimeric enzymes were constructed based on C1-Pol by replacing specific domains (palm^{s}, palm^{L}, finger, 3'-5' exonuclease, and 5'-3' exonuclease) with ones derived from H1-Pol to identify the regions involved in strand-displacement activity. [Experimental Methods] Five chimeric enzymes were expressed in *Escherichia coli* cells in a recombinant form and purified. Protein stability was compared by evaluating thermostability at elevated temperatures, and strand displacement activity was examined by rolling circle-type DNA synthesis using M13 single-stranded circular DNA as a template. [Results and Discussion] All five chimeric enzymes were successfully expressed in *E. coli* and purified. Chimeric C1-Pol, in which specific domains were replaced with those from H1-Pol, showed enhanced strand displacement activity compared to parental C1-Pol, suggesting that a specific region plays an important role in strand-replacement activity.

strand displacement activity, DNA polymerase, chimaera

発表責任者：藤原伸介（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

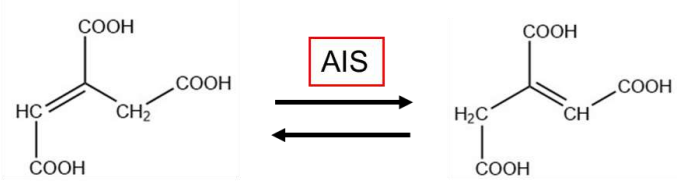
講演番号：2E4a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E4 会場

アミノ酸配列及び部位特異的変異を用いた *Pseudomonas* sp. WU-001 由来アコニット酸イソメラーゼの活性に必須なアミノ酸残基の特定

Identification of Amino Acid Residues Essential for Aconitate Isomerase Activity Derived from *Pseudomonas* sp. WU-001 Based on the Conserved Amino Acid Sequence and Site-directed Mutagenesis

○小林 万稀[1]、石井 義孝[2]、桐村 光太郎[1,2] ([1]早大院先進理工、[2]早大理工総研)
○Maki KOBAYASHI[1], Yoshitaka ISHII[2], Kohtaro KIRIMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

aconitic acid はシストートランス異性体が存在する不飽和トリカルボンの一種であり、機能性樹脂等の原料として化学工業に利用されている。aconitate isomerase (AIS; EC 5.3.3.7) は aconitic acid のシストートランス異性体間の可逆的異性化を触媒する酵素である。演者らは、当研究室保有 *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来の AIS(PwAIS) の酵素的諸性質の決定および当該遺伝子の同定を終えている。本研究では、AIS の反応機構解明を目的として、AIS ホモログのアミノ酸の保存配列、ならびに推定立体構造に対するドッキングシミュレーションを基に、触媒残基の特定を試みた。PwAIS に関しては、146 位の Asp と 197 位の Glu を触媒残基と考え、部位特異的変異導入により D146A および E197A 変異体を作製した。両変異体とも AIS 活性を消失していたことから、146 位の Asp と 197 位の Glu が PwAIS の触媒残基と考えられる。本研究は、AIS の反応の分子機構と触媒部位に関する初めてかつ重要な成果である。



trans-Aconitic acid　　*cis*-Aconitic acid

Aconitic acid is an unsaturated tricarboxylic acid with *cis-trans* isomers, and is used in the chemical industry as a raw material for functional plastics. Aconitate isomerase (AIS; EC 5.3.3.7) catalyzes the reversible isomerization between *cis-trans* isomers of aconitic acid. The enzymatic properties and gene identification of AIS derived from *Pseudomonas* sp. WU-0701 (PwAIS) have been achieved in our laboratory. In this study, with the objective to understand the catalytic mechanism of AIS, we attempted to identify the catalytic residues of PwAIS based on conserved amino acid sequences and the docking simulation for the predicted structure. As for PwAIS, both of D146A and E197A mutants created by site-directed mutagenesis showed no AIS activity. These results indicate that Asp at position 146 and Glu at position 197 are the catalytic residues of PwAIS. This study is a first and important result that leads to the elucidation of the catalytic mechanism of PwAIS.

Aconitic acid, Aconitate isomerase, *Pseudomonas* sp. WU-0701

講演番号：2E4a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 E4 会場

低温菌シンプル酵素触媒における熱処理の影響

Effects of heat treatment on the psychrophile-based simple biocatalyst

○田島 誉久、穴田 康太、緋田 安希子、加藤 純一（広島大院統合生命）
○Takahisa TAJIMA, Kota ANADA, Akiko HIDA, Junichi KATO (Gra. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

低温菌シンプル酵素触媒は、細胞増殖や酵素発現と酵素変換の時期を分けるとともに酵素変換時には宿主の代謝酵素が機能しないように中温の熱処理で失活させることで変換酵素を低温菌細胞から精製することなく収率 100%の物質変換を目指すことができる生体触媒である。これまでに様々なポリマー素材の効率的な物質変換を示してきた。その一方で熱処理により、変換酵素が宿主細胞から漏出することで触媒を繰り返して変換反応に利用できないことが課題である。触媒の包括的固定化により解決できるが、固定化せずに細胞のまま利用できる触媒を構築するためには、熱処理による細胞への影響を評価し、酵素漏出の原因を理解することが必要である。そこで本研究では、熱処理した際の低温菌細胞への影響を評価することを目的とした。緑色蛍光タンパク質（GFP）をマーカーとして異なるサイズの酵素について漏出の影響を評価した。その結果、タンパク質の分子量に依存して漏出の割合が異なることが示された。培養時間や培地成分によって酵素漏出の割合が変化する可能性が示されたため、詳細な検討を進めている。

Psychrophile-based simple biocatalyst (PSCat) can achieve high conversion yield without enzyme purification from psychrophilic cells. The enzyme conversion phase can be separated from the cell growth and enzyme expression phases by inactivating the host metabolic enzymes through moderate temperature heat treatment. We have demonstrated the efficient conversion of several valuable chemicals by PSCat. On the other hand, the catalyst cannot be used repeatedly for the conversion reaction because the conversion enzyme is leaked from the host cell by the heat treatment. Although immobilization of the catalyst could solve this problem, it is necessary to evaluate the effect of heat treatment on cells and understand the cause of enzyme leakage in order to construct PSCat that can be used without immobilization. In this study, we investigated the effect of heat treatment on psychrophilic cells. The effect of leakage was evaluated for enzymes of different sizes using green fluorescent protein (GFP) as a leakage marker. The results showed that the rate of leakage depended on the molecular weight of the protein. We considered that the ratio of enzyme leakage may change depending on the incubation time and culture medium components.

Shewanella sp., heat treatment, psychrophile

発表責任者：田島誉久（ttajima@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2E4a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 E4 会場

Enzymatic synthesis of non-natural plasmalogen by improving solubility of *Streptomyces antibioticus* derived phospholipase D in recombinant *E. coli*

○Shamoli Akter[1], Riko Yamaguchi[2], Aki Kanehama[3], Takahiro Iwamoto[2], Meme Hasegawa[3], Akeno Ito[2], Megumi Nishimukai[1,3], Miwa Yamada[1,3], Akiko Kashiwagi[1,2] ([1]UGAS, Iwate University, [2]Hirosaki University, [3]Faculty of Agriculture, Iwate University)

Background and purpose: Plasmalogens, functional glycerophospholipids with vinyl ether bond at the *sn*-1 position, have antioxidant properties and relate to diseases. As inositol or serine plays significant roles in intracellular and neuronal signaling, plasmalogens with them bound to the phosphate group at the *sn*-3 position are also expected to have important physiological functions. However, it is difficult to obtain plasmalogens with these functional groups from natural sources. Therefore, the establishment of production method for these plasmalogens is desired.. Phospholipase D (PLD) has both hydrolysis and transphosphatidylation activity. Specifically, PLD from *Streptomyces antibioticus* has been widely used to modify a functional group of glycerophospholipids due to its high transphosphatidylation activity. However, it is difficult to express recombinant PLD in *E. coli* as a soluble protein. Our initial challenge was to produce a plasmalogen containing 1,4-cyclohexanediol among different cyclohexanols, including inositol, due to PLD's higher substrate specificity for this Thus, our objective is to establish a stable PLD expression system in *E. coli* and creating non-natural plasmalogen by using this.
Methods: The stability of PLD expression from the T7 promoter was evaluated using the plasmids with replication origins of pMB1 and pSC101. The amount of PLD expressed as the soluble fraction was evaluated using *E. coli* BL21 (DE3) and SoluBL21 ™. The PLD was expressed at 25°C in 1.2 l M9 medium. We carried out an in vitro reaction with a bacterial plasmalogen obtained from *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* and 1,4-cyclohexanediol using PLD precipitated by 40-60% ammonium sulfate saturation at 37 °C. The reaction products were analyzed by LC/MS/MS.
Results: Utilizing of *E. coli* SoluBL21™ as a host increased the soluble fraction about 20% in the cell than *E. coli* BL21 (DE3). We obtained PLD with ~63 mU mg^{-1} of specific activity. The yield was ~1920 mU l^{-1} culture, corresponding to 774 mU per gram of wet cells. The activity in our system was 0.35%−3.5% of the previously reported activity. Finally, we succeed in synthesizing the plasmalogen with 1,4-cyclohexanediol bound to the phosphate group at the *sn*-3 position.
In conclusion, employing this method to create non-natural plasmalogens will facilitate the production of plasmalogens with rare, high-value functional groups, potentially contributing to the prevention of various diseases.
This research was reported in Yamaguchi et al., *Lett. Appl. Microbiol.*, 2023, 76, 1–10.

phospholipase D, transphosphatidylation, plasmalogen

発表責任者：柏木　明子（kashi_a1@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2E4p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 E4 会場

酵素を構成するアミノ酸の性質に基づく可溶性変異の導入－タンパク質の記憶をたどって－

Introduction of soluble mutations based on the constituent amino acid properties of the enzyme

○篠田 優、浅野 泰久（富山県大工）
○Suguru SHINODA, Yasuhisa ASANO (Toyama Pref. Univ.)

【目的】大腸菌を宿主とした組換タンパク質の生産において、発現したタンパク質が不溶化し、封入体を形成する問題がある。当研究グループではこの問題に対して、不溶化に関与するアミノ酸残基（ホットスポット）を予測する方法である「α-helix rule」と「Hydropathy contradiction rule」を開発し、それらの有用性を示してきた [1)]。Hydropathy contradiction rule は、アミノ酸の性質の一つである疎水性度を取り入れたコンセンサス設計法であるが、さらに効率的にホットスポットを予測するためには、アミノ酸の他の性質と不溶化との関係性を紐解くことが重要である。従って本研究では、部位特異的変異導入によるアミノ酸の性質と不溶化との関係性の解明を目的とした。
【方法・結果】本研究では、大腸菌由来グルタミナーゼ (YbaS) をモデルタンパク質として使用した。また解析を簡便化するために、20 種類のアミノ酸を側鎖の性質に基づき 5 種類のグループに分類した 2)。各グループの変異体の設計は、例えば「Negatively charged R groups」の場合、マルチプルシーケンスアライメントから得られる保存率分布を用いてグループに属するグルタミン酸 (Glu) とアスパラギン酸 (Asp) の保存率が高い順に残基を抽出、次に YbaS のアミノ酸残基が Glu 又は Asp 以外の場合に保存率が高い Glu 又は Asp に変異した。変異部位は 6 か所とし、グループ毎に変異体を作成した。各変異体は大腸菌にてオートインダクション培地を用いて 30℃、16 時間培養し発現させた。その結果、「Positively charged R groups」に分類されるアミノ酸の割合を増加させた変異体は、野生型と比較して可溶性発現量が向上した。一方で、「Aromatic R groups」と「Nonpolar, aliphatic R groups」の割合を増加させた変異体では可溶性発現量が著しく減少する結果となった。

1) S. Shinoda, et al., ACS Omega.,7, 29508-29516 (2022).
2) David L. Nelson, et al., Lehninger Principles of Biochemistry Sixth Edition, W.H. Freeman (2012)

In the production of recombinant proteins using *Escherichia coli* as a host, the proteins often fail to fold correctly, resulting in aggregation known as inclusion bodies. Our group found two rules, “α-helix rule” and “hydropathy contradiction rule”, to predict residues which make protein folding easier from the results of directed evolution and primary structure analysis. For more efficient prediction using the hydropathy contradiction rule, it is necessary to elucidate the relationship between properties of amino acids and inclusion body formation. In this study, we focused on the classification based on the properties of amino acid side chains in biochemistry[2)], and aimed to elucidate the relationship between these properties and inclusion body formation.

glutaminase, heterologous expression, inclusion body

発表責任者：浅野 泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2E4p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E4 会場

Single-molecule display system for directed evolution of enzymes
○Jasmina DAMNJANOVIC[1], Ai SUGIYAMA[1], Kyoka ISHIHARA[1], Yugo IWASAKI[2], Hideo NAKANO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Chubu Univ.)

Evolutionary molecular engineering plays a major role in protein design. Random mutagenesis is used to generate a large genetic and phenotypic diversity which is selected under controlled evolutionary pressure. Selected proteins usually possess greatly improved properties as compared to the starting template protein.

Due to the large generated diversity, selection is the most critical step for the successful and timely acquisition of evolved proteins. *In vitro* selection methods, and among them, display technologies, enable screening of the largest libraries (up to 10^{13} variants) in the shortest time and with minimal effort, because the use of living cells is replaced by cell-free protein synthesis during which a molecular display is formed by a stable link between genes and corresponding proteins. While display technologies have been widely used for peptide evolution, their application in enzyme engineering is still far from realization due to numerous challenges.

In this presentation, we will introduce some of the recent results regarding the establishment of the novel single-molecule display system for the directed evolution of enzymes, with application to microbial transglutaminase (MTG) and phospholipase D (PLD).

MTG is a preferred choice for position-specific crosslinking during the production of antibody-drug conjugates to be used as pharmaceuticals. For this purpose, MTG should have strict specificity for a targeted sequence of the antibody, which requires evolution of the wild-type enzyme. Enzymatic synthesis of functional phospholipids (to be used as supplements, drug delivery systems, food, and drug additives) by PLD suffers from insufficient yield due to the generation of a side-product, phosphatidic acid. This problem could be solved by the evolution of PLD in terms of its substrate specificity. We have used different strategies to optimize cell-free protein synthesis and conserved parts of the amino acid sequence of MTG and PLD to allow the formation of active displayed enzymes. Currently, we are optimizing the selection conditions and selection efficiency.

Due to its universal nature and many benefits including the short operation time, low cost and robustness, our single-molecule display system will become indispensable tool for acquisition of enzymes with desired properties for biotechnological applications.

enzyme engineering, *in vitro* molecular display, transglutaminase

発表責任者：Jasmina DAMNJANOVIC（jasmina@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2E4p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E4 会場

シンチレーション特性を示す蛍光タンパク質の開発
Development of fluorescent proteins exhibiting scintillation properties
○千葉 拓馬[1]、杉浦 一徳[2]、永井 健治[2]、栗田 悠子[1]、小林 奈通子[1]、田野井 慶太朗[1]([1]東大院農、[2]阪大産研)
○ Takuma CHIBA[1], Kazunori SUGIURA[2], Takeharu NAGAI[2], Yuko KURITA[1], Natsuko KOBAYASHI[1], Keitaro TANOI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]SANKEN Osaka Univ.)

これまで放射線の活用は工業生産ラインや医療分野に限られていた。近年、放射線で励起し光を発する物質であるシンチレータを活用することで、イメージングや光遺伝学を利用する報告がされるなど、放射線の新たな生物応用が注目されつつある。そこで本研究では、生体由来の分子にシンチレータの機能を保有させることを目指し、放射線で励起し光を発する蛍光タンパク質（Fluorescence Protein: FP）の探索、および開発を行った。

まず、さまざまな励起波長・蛍光波長をもつ蛍光タンパク質１１種に対し、１４C もしくは３５S と混合することでこれら由来の β 線を照射し、蛍光を発するものを探索した。その結果、光を発した蛍光タンパク質を複数見いだすことに成功した。これら放射線で光る蛍光タンパク質は、すべて発光波長 500nm 以下の BFP または CFP に分類されるものであった。これらの蛍光タンパク質は、タンパク質濃度および放射線量に依存し発光量が増大した。放射線で光る蛍光タンパク質の中でも最も発光が多かったのは、短い波長の蛍光を発する Sumire であった。現在、Sumire をテンプレートとしてさらに放射線によって発光量の多い FP の創出を試みている。

Until now, the application of radiation has been limited to industrial production lines and the medical field. In recent years, there has been growing attention on new biological applications of radiation, such as using scintillators, substances that emit light when excited by radiation, for imaging and optogenetics. In this study, we conducted research on the discovery and development of fluorescent proteins (FPs) that emit light when excited by radiation.

First, we explored various fluorescent proteins with different excitation and emission wavelengths. We irradiated them with β-rays originating from 14C or 35S, and searched for those that emitted fluorescence. As a result, we successfully identified multiple fluorescent proteins that emitted light. All of these radiation-emitting fluorescent proteins emitted 500 nm or less fluorescence light. Among them, Sumire, which emits the shortest wavelength fluorescence, showed the most significant light emission. We are currently attempting to create more intensely luminescent FPs using Sumire as a template.

Fluorescent Proteins, Scintillation, Beta ray

講演番号：2E4p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E4 会場

抗ウイルス性能を付与したポリプロピレン表面コーティング
Polypropylene surface coating with antiviral properties

○平尾 理恵、竹内 久人、河田 順平、石田 亘広（（株）豊田中央研究所)
○Rie Hirao, Hisato Takeuchi, Jumpei Kawada, Nobuhiro Ishida (Toyota Central R&D Labs., Inc.)

ウイルスの感染拡大を防ぐため、ポリマー表面に抗ウイルス性能を付与することが求められている。工業的に汎用されているポリプロピレン(PP)はその 1 つであるが、反応性が低く他の有機分子を結合させるのが困難であった。そこで、我々は抗菌・抗ウイルス性能を持つ 4 級アンモニウム(QA)塩である塩化ベンザルコニウムと類似した構造を持つポリ(N-ベンジル-4-ビニルピリジウムブロマイド)(PBVP)と呼ばれるポリマーを PP の表面にグラフト処理させた材料を提案する。PBVP コーティング層の厚さ、表面粗さ、QA の量は、グラフト処理時の紫外線照射時間と強度を調整することで制御可能である。抗ウイルス性能は膜構造を持つエンベロープ型モデルウイルス(バクテリオファージ φ6)と膜構造を持たないノンエンベロープ型モデルウイルス(バクテリオファージ Qβ)を使用して評価した。その結果、バクテリオファージ φ6 に対する抗ウイルス効果だけでなく、一般的に QA では効果が低いとされるバクテリオファージ Qβ に対しても抗ウイルス効果が示唆された。さらに、コーティング層に厚みを持たせることで、表面の摩耗や擦れを模擬した表面研磨後も効果が維持されることを見出した。

To prevent the spread of viral infections, there is a need for technology to impart antiviral property to polymer surfaces. Polypropylene (PP), one of the most widely used polymers in industry, exhibits low reactivity and is difficult to bind other organic molecules. Therefore, we propose a material in which a polymer called poly(N-benzyl-4-vinylpyridium bromide) (PBVP) which has a structure similar to benzalkonium chloride, a quaternary ammonium (QA) salt with antibacterial and antiviral properties, is grafted onto the surface of PP. The coating layer thickness, surface roughness, and QA can be controlled by adjusting the UV irradiation time and intensity during the grafting process. Antiviral property was evaluated using enveloped model virus with membrane structure (bacteriophage φ6) and non-enveloped model virus without membrane structure (bacteriophage Qβ). The results suggested antiviral effects not only against bacteriophage φ6, but also against bacteriophage Qβ, which is generally considered less effective in QA. We also found that if the coating layer was sufficiently thick, the effect was maintained even after surface polishing to simulate surface wear and abrasion.

antiviral, polypropylene, quaternary ammonium group

発表責任者：平尾　理恵（e1792@mosk.tytlabs.co.jp）

講演番号：2E4p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E4 会場

レトルトパウチ×高温高圧処理を利用した PCR 産物の汚染除去と遺伝情報漏洩対策

Removal of PCR product contamination and countermeasures against genetic information leakage using retort pouches with high temperature and high pressure processing

○陶山 哲志、佐々木 章（産総研バイオメディカル）
○Tetsushi SUYAMA, Akira SASAKI (Biomedical RI, AIST)

PCR で増幅した DNA が、再び別の PCR で増幅されないように不活化する方法を検討した。DNA は安定な物質で、特に定量 PCR で増幅するような短い断片は簡単には不活化できない。一度拡散させてしまうと汚染の除去は困難になる。拡散した PCR 産物が他の測定サンプルに混入すると偽陽性を引き起こし、深刻な問題になる。滅菌で使用するオートクレーブは水蒸気を放出するのと一緒に断片化した DNA を拡散させてしまうので問題であった。本研究では DNA を漏洩させない工夫としてレトルトパウチの中に鋳型となる DNA を封じ込めて、破裂を避けるため加圧をしながら長時間加熱することで DNA を不活化する処理装置を開発した(特許第 7356668 号)。分解を促進するためには PCR 産物を予め希釈または中和し、酸素を含む空気とともに加熱処理することが効果的であった。将来的に DNA 汚染を防ぐ機器の社会実装が行われることを期待している。

We investigated a method for inactivating DNA amplified by PCR so that it would not be amplified again by another PCR. DNA is a stable substance, and short fragments, such as those amplified by quantitative PCR, cannot be inactivated easily. Once spread, it becomes difficult to remove the contamination. If the diffused PCR product contaminates other measurement samples, it will cause false positives and become a serious problem. The autoclave used for sterilization was problematic because it releases water vapor and also spread fragmented DNA together. In this research, we developed a processing device that seals the template DNA in a retort pouch to prevent DNA from leaking, and inactivates the DNA by applying pressure to avoid rupture and heating for a long period of time (Japanese Patent No. 7356668). In order to promote decomposition, it was effective to dilute or neutralize the PCR product in advance and heat it with air-containing oxygen. We hope that devices that prevent DNA contamination will be implemented in society in the near future.

PCR, contamination, inactivation

発表責任者：陶山哲志（t.suyama@aist.go.jp）

講演番号：2E4p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E4 会場

ニッキング酵素とヌクレアーゼを用いた高速・高感度等温核酸増幅

Fast and sensitive isothermal nucleic acid amplification using nicking enzyme and nucleases

○藤井 亮太、矢内 久陽、天野 仰（三井化学（株））
○RYOTA FUJII, HISAAKI YANAI, KOH AMANO (Mitsui Chemicals Inc.)

等温核酸増幅技術は医療や分子生物学の分野で広く活用されている。反応温度を上下させる必要が無いことから PCR 法より反応時間が短くて済み、さらに、厳密な温度制御が不要であることから装置の小型化及び簡易化が可能で、食品衛生検査やクリニックでの POCT（Point Of Care Testing；臨床現場即時検査）といった、現場での検査に適している。等温核酸増幅技術は、増幅メカニズム中にニック形成酵素を使用する方法（SDA 法、NEAR 法等）と、使用しない方法（LAMP 法等）に分類される。ニック形成酵素を使用する方法はプライマーの構成がシンプルで、反応速度が他の等温増幅方法より速いという利点を有するが、非特異的な核酸増幅がしばしば発生し、標的の検出感度を低下させることがある。われわれは、特定の DNA ポリメラーゼとヌクレアーゼの組み合わせにより、従来の方法と比較して非特異的増幅を大幅に抑制することに成功し、高速かつ高感度な核酸検出を達成した。本技術は微生物、ウイルス、血中マイクロ RNA 等を検出対象とすることができ、37℃という人肌温度での増幅も可能であり、検査・診断領域に幅広く貢献できると考えられる。

Isothermal nucleic acid amplification technology is widely used in the fields of medical and molecular biology. Since there is no need to raise or lower the reaction temperature, the reaction time is shorter than that of the PCR method. Furthermore, since strict temperature control is not required, the equipment can be made smaller and simpler, making it suitable for food hygiene inspections and POCT (Point Of Care Testing) in clinics. Isothermal nucleic acid amplification techniques are classified into methods that use nick-forming enzymes during the amplification mechanism (SDA, NEAR, etc.) and methods that do not use them (LAMP, etc.). Methods using nicking enzymes have the advantage of simple primer composition and faster reaction rates than other isothermal amplification methods, but non-specific nucleic acid amplification often occurs, reducing sensitivity of target detection. Using a combination of specific DNA polymerase and nuclease, we succeeded in significantly suppressing non-specific amplification compared to conventional methods, and we achieved fast and highly sensitive detection of nucleic acids. This technology can detect microorganisms, viruses, blood microRNA, etc., and can also amplify at the human skin temperature of 37°C, making it possible to contribute to a wide range of testing and diagnostic fields.

isothermal amplification, micro RNA, nicking endonuclease

発表責任者：藤井亮太（Ryota.Fujii@mitsuichemicals.com）

講演番号：2E4p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 E4 会場

ラマン分光を核としたマルチモーダルラベルフリーイメージングで迫る希少放線菌胞子嚢の特異な構成成分

Distinct components of rare actinomycete sporangia studied with multimodal, label-free imaging including Raman spectroscopy

○宇佐美 慶典[1]、手塚 武揚[2,3]、大西 康夫[2]、重藤 真介[1]（[1]関学大院・理工、[2]東大院・農生科・応生工、[3]北里大院・感染制御）

○Keisuke Usami[1], Takeaki Tezuka[2,3], Yasuo Ohnishi[2], Shinsuke Shigeto[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kwansei Gakuin Univ., [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [3]Grad. Sch. of Infection Control Sci., Kitasato Univ.)

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は数百個の胞子を含む胞子嚢を形成するというユニークな形態分化を示すが，胞子嚢の構成成分とその局在を分子レベルで解析した例は皆無である。本研究では，蛍光法に代わる新たな解析手法として注目されているラマン散乱およびコヒーレントアンチストークスラマン散乱（CARS）を核としたマルチモーダル・ラベルフリー分子イメージングを駆使して，*A. missouriensis* 胞子嚢の構成成分を明らかにし，それらの局在を可視化することを目的とした。

多変量データ解析の一種である多変量波形分解–交互最小二乗法（MCR–ALS）と組み合わせた自発ラマン・CARS イメージングを *A. missouriensis* の単一胞子嚢に応用した結果，3 つの主要構成成分を分離・検出することができた。そのうち 2 成分は胞子嚢に内包される胞子を構成するタンパク質およびカロテノイドに帰属される。残りの 1 成分は胞子嚢外壁部分に局在するが，そのラマンスペクトルは脂質に特徴的なピークに加えて典型的なリン脂質や中性脂質（トリアシルグリセロールなど）には見られないピークを示した。これらの結果から，この成分は胞子嚢壁に特異的な新規脂質関連物質であることが強く示唆された。さらに，第二高調波発生（SHG）や 3 次和周波発生（TSFG）などの非線形光学効果を用いたイメージングにより，この未知成分の対称性に関する情報の取得にも成功した。

The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* is known to produce sporangia containing hundreds of spores, but the chemical components of the sporangium and their localization are still poorly understood. Here, we present multimodal, label-free imaging of the sporangia of *A. missouriensis* based on spontaneous Raman scattering and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS).

We analyzed the Raman and CARS imaging data of *A. missouriensis* sporangia with multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR–ALS) and found three major components of the sporangia. Two of them are attributed to proteins and carotenoids, which consist of spores within the sporangia. Intriguingly, the remaining component, which is localized to the sporangium wall, exhibits not only Raman peaks of lipids but also those that are not observed in typical phospholipids or neutral lipids (e.g., triacylglycerols). These results suggest that this component is a novel lipid-related substance specific to the sporangium wall. Furthermore, we successfully obtained information on the symmetry of this novel component using second harmonic generation (SHG) and third-order sum-frequency generation (TSFG).

Raman microspectroscopy, nonlinear optical imaging, sporangium wall

発表責任者：宇佐美　慶典（gur53691@kwansei.ac.jp）

講演番号：2E4p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E4 会場

油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪球動態解析に向けた蛍光染色検討
Fluorescence Staining Considerations for Analyzing Lipid Droplet Dynamics in the Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*

○高橋 優花[1]、志田 洋介[1]、中村 彰宏[1]、佐藤 里佳子[2]、仁子 陽輔[3]、高久 暁洋[2]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技大、[2]新潟薬科大・応生命、[3]高大・複合領域科学)
○Yuka TAKAHASHI[1], Yosuke SHIDA[1], Akihiro NAKAMURA[1], Rikako SATO[2], Yosuke NIKO[3], Hiroaki TAKAKU[2], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Fac. Appl. Life Sci., Nigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]Multidisciplinary Sci. Cluster, Kochi Univ)

油脂需要が高まっている世界において、油脂酵母は新たな油脂供給源としての期待が高まっている。*Lipomyces starkeyi* は、乾燥菌体重量の 85%以上の油脂を蓄積する油脂酵母である。油脂酵母における脂肪球形成モデルはいくつか提唱されている一方で、実際の脂肪球の形成機構や形態学的特徴、油脂蓄積過程における肥大化する際のメカニズムについては明らかにされていない。そこで，本研究は *L. starkeyi* の脂肪球の形成機構および脂肪球の肥大化メカニズムの解明に繋がる新たな知見を形態学的に明らかにすることを目的とした。これまで、*L.starkeyi*(CBS1807)の菌体を倒立顕微鏡下で寒天培地を用いて固定培養し、タイムラプス撮影を行って、生細胞の油脂蓄積および生育過程をリアルタイムで観察した。その結果、脂肪球の肥大化や蓄積過程をリアルタイムで捉えることができた。しかし、取得したリアルタイムデータは明視野画像であり、脂肪球の証明や形態的特徴評価には不十分である。そこで、蛍光画像をリアルタイムで取得するために、生体膜の相状態を可視化する蛍光色素、LipiORDER を用いて経時撮影およびリアルタイム撮影を行った。その結果、特徴的な脂肪球およびオルガネラの動態を捉えることに成功し、培養条件によって菌体内の脂肪球が異なる特徴を示すことが示唆された。

In a world with rising demand for lipids, oleaginous yeast, particularly *Lipomyces starkeyi*, is gaining attention as a promising new source. This yeast accumulates over 85% of lipids in its dry cell weight. While various models for lipid droplet formation in lipid yeast exist, the actual mechanisms, morphological features, and enlargement processes during lipid accumulation remain unclear. This study aims to shed light on these aspects, providing valuable insights into the dynamic formation and enlargement of lipid droplets in *L. starkeyi*. Cultivating *L. starkeyi* (CBS1807) on agar medium under inverted microscopy allowed real-time observation of lipid accumulation and growth processes. However, the obtained bright-field images were insufficient for confirming lipid droplets and evaluating morphological features. To address this, LipiORDER, a fluorescent dye, was used for real-time imaging, successfully capturing dynamic features of distinct lipid droplets and organelles. The results suggest that lipid droplets within cells bodies exhibit unique characteristics under different culture conditions.

Oleaginous yeast, Lipid droplet, Imaging

発表責任者：小笠原渉（owataru@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2E4p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E4 会場

枯草菌の細胞内 pH 調節関連遺伝子の網羅的な探索
Identification of intracellular pH regulation genes in *Bacillus subtilis* by using Colony Live System
○倉川 尊[1]、柄澤 匠[1]、福田 紘子[2]、森 浩禎[3]、中嶋 幹男[4]、片岡 正和[2]([1]信州大工、[2]信州大院総理工研、[3]広東省農業科学院、[4]MSL)
○ Takeru KURAKAWA[1], Takumi KARASAWA[1], Hiroko FUKUDA[2], Hirotada MORI[3], Mikio NAKAJIMA[4], Masakazu KATAOKA[2] ([1]Shinshu Univ, [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ, [3]Guangdong Acad. Agr. Sci., ,China, [4]MSL Corp)

細菌の研究において, 増殖を定量的に観測することは重要である. しかし, 従来の増殖測定法では, スループットが低いため, 網羅的な解析には不向きである. そこで, 網羅的な解析を行うために, 約 74000 個の大腸菌コロニーの増殖を同時に定量化可能な Colony-live system が開発された. 先行研究では, 大腸菌の全ての非必須遺伝子を単一欠失させたライブラリーと Colony-live system を用いて, 大腸菌の細胞内 pH 調節関連遺伝子を選定した. 大腸菌と同じく好中性細菌の枯草菌では, 細胞内 pH 調節関連遺伝子の網羅的な探索はいまだに行われておらず, 複数の細胞内 pH 調節関連遺伝子の存在は推測の域を出ない.

本研究では、枯草菌単一欠失株ライブラリーである BKE collection と Colony-live system を用いた枯草菌の細胞内 pH 調節関連遺伝子の同定を目的とした. BKE collection を pH 条件の異なる固体培地で培養し, Colony-live system を用いて菌体増殖の定量化を行い, 生育を比較した.

While quantitative measurement of bacterial growth is important for bacterial research, conventional methods are too slow for exhaustive measurement. Thus, Colony-live system was developed to measure growth parameters with a high throughput at 73728 *E. coli* colonies at the same time. In previous studies, the Colony-live system applied on comprehensive single-gene deletion library of *E. coli* to identify genes involved with intracellular pH regulation in *E. coli*. Even though *Bacillus subtilis* is another important model microorganism, pH regulation system of *B. subtilis* is still unclear.

The aim of this study is to identify genes related to intracellular pH regulation in *B. subtilis* using comprehensive single-gene deletion library of *B. subtilis* (BKE collection). The Colony-live system was applied to BKE collection colonies grown on variety of pH conditions for growth parameters quantification.

exhaustive measurement, BKE collection, intracellular pH

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2E4p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E4 会場

大腸菌細胞内の pH 調節に関与する候補遺伝子の網羅的スクリーニング
Screening of intracellular pH regulation genes by exhaustive investigation on *E.coli*
○福田 紘子[1]、倉川 尊[2]、柄澤 匠[2]、森 浩禎[3]、中嶋 幹男[4]、片岡 正和[1]（[1]信州大院総理工研、[2]信州大工、[3]広東省農業科学院、[4]MSL）
○ Hiroko FUKUDA[1], Takeru KURAKAWA[2], Takumi KARASAWA[2], Hirotada MORI[3], Mikio NAKAJIMA[4], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci Technol., Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ., [3]Guangdong. Acad Agri. Sci., [4]MSL Corp.)

ほとんどの微生物の細胞内 pH は狭い範囲に保たれている。pH は酵素活性や反応速度、タンパク質の安定性、核酸の構造、その他多くの生物学的分子に影響を与えるため、細胞内 pH を維持する調節機構は非常に重要である。例えば、外部 pH が 5.0～9.0 のどの値であっても、大腸菌の細胞内 pH は 7.2～7.8 の範囲に維持される。大腸菌の細胞内 pH 調節機構には、酸性条件下で酸耐性機構、アルカリ条件下で cation / H^+ antiporter の関与が報告されている。しかし、当研究室で実施された細胞内 pH に関する研究より、既に報告されている機構とは別の機構の存在が示唆された。そこで、本研究の目的を大腸菌細胞内 pH 調節に関わる遺伝子の網羅的な探索とした。研究では、大腸菌全遺伝子単一欠失株(Keio collection)を pH 条件の異なる寒天培地で生育させた。そして、高精度菌体生育測定システム(Colony-live system)と AI を用いて増殖動態の定量化や解析を実施した。その結果、細胞内 pH 調節に関与する候補遺伝子を抽出することができた。本発表では、抽出した候補遺伝子に着目した検証結果を報告する。

The intracellular pH of most microbes is maintained within a narrow range. Since the pH affects enzyme activity, reaction rates, protein stability, structure of nucleic acids and many other biological molecules, maintenance of intracellular pH is very important for the cells. In case of *Escherichia coli*, even though the external pH varies between 5.0–9.0, the intracellular pH is maintained in a range of pH 7.2–7.8. It is reported that the acid tolerance mechanisms play an important role for intracellular pH regulation in *E. coli* under acidic condition. In contrast, cation / H^+ antiporters work as well under alkaline condition. However, our previous studies on intracellular pH suggested that there may be mechanisms that have not yet been discovered. Therefore, the objective of this study was set as an exhaustive investigation of intracellular pH regulation genes. In this study, we used comprehensive single-gene deletion library of *E. coli* (Keio collection), a high-throughput colony growth measurement system (Colony-live) and an AI system called auto encoder. Each strain of the Keio collection was grown on media of different pH conditions. The Colony-live system quantified the growth kinetics and then AI analyzed them. As a result, we could determine candidate genes for intracellular pH regulation. This presentation reports our results focusing on the candidate genes.

intracellular pH regulation, Keio collection, a high-throughput colony growth measurement system

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2E4p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E4 会場

ゲノム編集を利用したリン代謝経路のデザインによる生物学的封じ込め技術の高度化
Enhancement of the biological containment strategy based on the design of phosphorus metabolic pathways via genome editing
○百川 直輝、石田 丈典、池田 丈、舟橋 久景、黒田 章夫、廣田 隆一（広大院統合生命）
○ Naoki MOMOKAWA, Takenori ISHIDA, Takeshi IKEDA, Hisakage FUNABASHI, Akio KURODA, Ryuichi HIROTA (Hiroshima Univ.)

当研究室では、環境中にほとんど存在しない亜リン酸に宿主生物の生育を完全に依存させることで環境への拡散を防ぐ生物学的封じ込め手法を開発している。これまで、本手法の実用化を目指す上で重要となる、亜リン酸依存性の適用が宿主生物に及ぼす影響の解析を行ってきた。しかし、株の作製に使用した選択マーカーによる制約のため、更なる遺伝子の導入や破壊などを行うことが困難であった。そこで本研究では、大腸菌において亜リン酸依存性株作製手法の改良を行い、これまで実施できなかった表現型解析および本手法の高度化を試みた。従来の大腸菌亜リン酸依存性株の作製手法では、内在性リン酸輸送体遺伝子破壊に用いた選択マーカーを染色体から除去できず、更なる遺伝子改変が困難だった。そこで、CRISPR-Cas システムを応用して染色体上に選択マーカーを残さず内在性リン酸輸送体遺伝子を破壊し、亜リン酸依存性株を作製した。この改良により、オリジナルの亜リン酸依存性株では困難だった直接的な遺伝子改変が可能となり、表現型解析を行う際の利便性が向上した。現在、亜リン酸資化能の最適化や亜リン酸依存性株作製の簡便化など、本手法の更なる改良を検討している。

Our laboratory developed the biocontainment strategy that makes the growth of host cell strictly dependent on an environmentally rare phosphorus compound, phosphite (Pt). We have been analyzing the phenotypic changes of host cells due to Pt-dependency, which is important for the practical use of this strategy. However, further genetic modification into the currently established Pt-dependent strains were difficult due to the limitation of the selection markers used in the strains. In this study, we improved the construction process of Pt-dependent *Escherichia coli* strain and performed phenotypic analysis using the strain. In the previous Pt-dependent *E. coli* strain, the selection marker used for disruption of the endogenous phosphate transporter genes could not be eliminated from the chromosome, making further genetic modification difficult. Therefore, endogenous phosphate transporter genes were disrupted without leaving the selection marker on the chromosome using CRISPR-Cas mediated genome editing. This improvement enabled direct genetic modification into new Pt-dependent strain for the phenotypic analysis. We also attempted to optimize the Pt-assimilation ability and simplify the application process of Pt-dependency into *E. coli*.

phosphite, biocontainment, genome editing

発表責任者：廣田隆一（hirota@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2E4p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E4 会場

速度論的代謝解析におけるアンサンブルモデリングの高速化に向けた経験的棄却法の提案と検証
Proposal and verification of empirical rejection for accelerating ensemble kinetic modeling of metabolism

○竹谷 友之[1]、戸谷 吉博[2]、佐藤 美和[1]、二井手 哲平[2]、田邉 麻衣子[1]、清水 浩[2]、神鳥 明彦[1] ([1]日立研開・基礎研、[2]阪大院・情報)
○Tomoyuki TAKEYA[1], Yoshihiro TOYA[2], Miwa SATO[1], Teppei NIIDE[2], Maiko TANABE[1], Hiroshi SHIMIZU[2], Akihiko KANDORI[1] ([1]Hitachi, Ltd. R&D group, CER., [2]Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

微生物を用いた物質生産において、目的物質の高効率な生産につながる代謝改変を計算機上で提案するために、速度論モデルの構築が行われている。速度論モデルは、代謝経路中の酵素反応の速度式で構成され、代謝物質濃度や代謝フラックスの動態解析に用いることができる。しかし、速度論モデルの構築においては酵素の k_{cat} や K_M 等、多くの未知パラメータの決定が必要な場合が多い。加えて、決定されたパラメータの値によっては速度論モデルが不安定化し、代謝改変の効果の予測が不可能となる。そのため、本研究では、速度論モデルが安定となるようなパラメータ値を、大量の実験を行うことなく、自動的かつ迅速に決定する手法の確立をめざしている。我々は、パラメータ値として大量の乱数を生成し、速度論モデルが安定となるパラメータ値を選抜するアンサンブルモデリング法に着目し、同方法の課題である計算時間の長さを短縮する経験的棄却法を開発した。本講演では、本方法を用いたアンサンブルモデリング法の迅速化の概念実証結果について報告する。

Kinetic models of microbial metabolism are constructed to computationally suggest metabolic interventions which lead to the efficient production of the target chemical. Kinetic models consist of rate equations of enzymatic reaction occurring in the metabolic pathway, and can be used for analyzing the dynamics of metabolite concentrations and metabolic fluxes. However, it is often necessary to determine a lot of unknown parameters, such as k_{cat} and K_M of the enzymes, for constructing a kinetic model. In addition, model stability, which is a prerequisite for predicting the effects of metabolic interventions, depends on the determined parameter values. In this study, we aim to establish a method for automatically and rapidly determining the parameter values at which the kinetic model is stable, without the need for a great deal of experiments. We first focused on ensemble modeling, which generates a large set of kinetic models parameterized with random value vectors and screens them based on the stability, and found that its disadvantage is a long computing time. In this presentation, we show a novel method, empirical rejection, for accelerating ensemble modeling, and its proof-of-concept results.

simulation of metabolism, kinetic model, parameterization

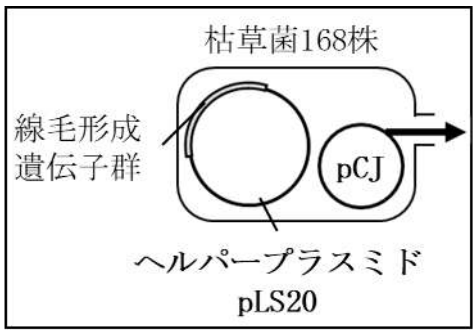
講演番号：2E4p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E4 会場

枯草菌をドナーとした接合伝達体による遺伝子組換え系構築

Construction of DNA transfer system by conjugation using Bacillus subtilis as donor

○須田 和奏、朝井 計（東農大）
○Wakana SUDA, Kei ASAI (TUA)

Bacillus 属細菌とその近縁には、研究および産業利用の観点から有用でありながら、軽質転換が困難な種や株が数多く存在する。我々はこれら有用細菌の解析・利用促進を目指し、グラム陽性モデル細菌である枯草菌(*Bacillus subtilis*)をドナーとした接合伝達を利用した遺伝子組換え系を構築した（図)。この系では、線毛形成遺伝子群を有する pLS20 を“ヘルパー”とする。pCJ は、この pLS20 依存的に移送される、接合伝達性プラスミド pUB110 の配列を使用して作製した大腸菌―枯草菌間シャトルベクターである。枯草菌の亜種である納豆菌をレシピエントとすると pCJ 移送効率が低下し、制限酵素遺伝子に変異を有する株では効率が回復したことから、移送された DNA がレシピエントの制限酵素により分解されており、これが本系を活用する際の障壁になると考えた。そこで現在、本系において高頻度に接合伝達体を得られる実験条件の決定と、接合伝達効率向上株の作製に取り組んでいる。



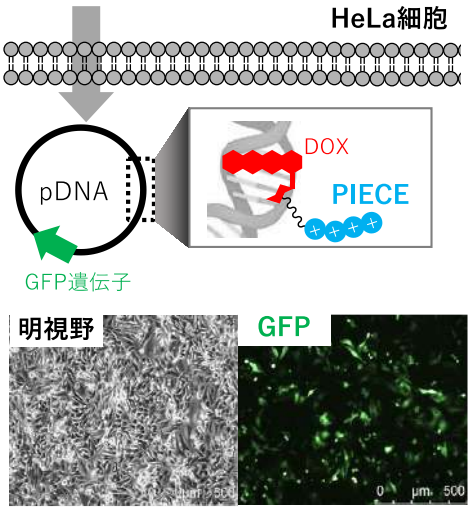
There are many useful bacterial species in the genus Bacillus and its relatives from the viewpoint of academic and industrial applications. Functional modification and analysis are necessary to promote the study of these useful bacteria, but many of these species are difficult to transform by conventional methods. We have introduced a DNA transfer system by conjugation using B. subtilis as a donor. A conjugative transfer plasmid, pLS20, derived from B. subtilis natto, is known to possess transfer ability among various Bacillus species.
Gram-positive broad host range plasmid, pUB110, which is transferred between B. subtilis using pLS20 as a helper. The pCJ plasmid was constructed by fusing a plasmid pBR322 with a portion of pUB110.

bacreria, conjugation, genetic tool

発表責任者：須田和奏（11723003@nodai.ac.jp）

講演番号：2E4p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E4 会場

ε-poly-L-α-lysine-doxorubicin コンジュゲートを用いた DNA 導入技術の開発
DNA delivery system using an ε-poly-L-α-lysine-doxorubicin conjugate
○山中 雅喜、武内 大和、長谷部 文人、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大院生物資源）
○ Masaki YAMANAKA, Yamato TAKEUCHI, Fumihito HASEBE, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)



最近我々は、放線菌 *Streptomyces albulus* によって生産される ε-poly-L-α-lysine (ε-PαL) が動物細胞の細胞膜を直接透過することを報告している[1]。さらに、高分子であるタンパク質に ε-PαL を化学的に共有結合 (ε-PαL 修飾) させたコンジュゲートは、細胞膜を容易に透過し細胞内で分解されることなくその機能を発揮した[1]。そこで本研究では、同じく高分子化合物であるプラスミド DNA (pDNA) を ε-PαL 修飾することで細胞内に直接送達できるか検証した。pDNA を直接的に ε-PαL 修飾することは難しい。そこで、二本鎖 DNA にインターカーレートする doxorubicin (DOX) を ε-PαL 修飾し (ε-PαL-DOX)、DOX を介して間接的に pDNA を ε-PαL 修飾した。ε-PαL-DOX と蛍光タンパクの遺伝子をコードしている pDNA を混合し、HeLa 細胞の培養液に添加したところ、pDNA の ε-PαL-DOX 修飾依存的に蛍光タンパク質を発現する細胞を検出した。リポフェクション法による pDNA 導入においては、動物細胞種によって導入効率が大きく異なる。そこで現在、ε-PαL-DOX 修飾の有用性について各種動物細胞において検証しているところであり、これら結果についても報告する。

We recently reported that ε-poly-L-α-lysine (ε-PαL) produced by *Streptomyces albulus* entered mammalian cells *via* a direct penetration route [1]. We further demonstrated that ε-PαL-proteins conjugate was also internalized into cells and showed their functions inside the cells. Therefore, in this study, we focused our attention on the cellular internalization of plasmid DNA (pDNA) by ε-PαL. Because of the difficulty of conjugating pDNA with ε-PαL, a DNA intercalator doxorubicin (DOX) was chemically conjugated with ε-PαL, producing an ε-PαL-DOX. ε-PαL-DOX was mixed with pDNA encoding a fluorescent protein and then added to HeLa cells. Interestingly, we detected the fluorescent signals in the HeLa cells, despite no signals with non-modified pDNA. In DNA transfections mediated by cationic liposomes (lipofection), their transfection efficiency is significantly different among mammalian cell lines. We will report the availability of our method in different cell lines.

[1] Takeuchi, Y. *et al.*, *Commun. Biol.*, 5, 1132 (2022)

Cell-penetrating peptide, lipofection, polylysine

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2E5a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E5 会場

微生物を利用した熟成サーモンに含まれる血圧降下作用物質の分析

Analysis of substances with hypotensive effects from salmon aged with microorganisms

○片山 太智[1]、村上 周一郎[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Taichi KATAYAMA[1], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]Meiji Univ. School of Agriculture, [2]Meiji Univ.)

魚肉には、人体の昇圧系において血圧の上昇を引き起こすアンジオテンシン変換酵素(ACE)を阻害する物質(ACE 阻害物質)を有するものが多く、血圧降下剤としての利用が期待されている。当研究室では、これまでにノルウェー産サーモンを *Helicostylum* sp. JW-1 株を用いて 3 週間熟成することで、血圧降下作用の指標となる ACE 阻害活性が経日的に増加し、熟成させていない試料(コントロール)と比較して高い血圧降下作用を示すことを報告した[1)]。そこで本研究では、JW-1 株が熟成過程で生成した ACE 阻害物質の特性を解析することを目的としている。

まず、熟成したサーモンおよびコントロールをホモジナイズした後、Sephadex G-10 ゲルろ過カラムに供して目的物質の分離を試みた。その結果、コントロールでは活性を含む画分が 11 画分であったのに対し、熟成試料では 16 の活性画分が得られた。また、熟成試料の総活性はコントロールの総活性と比較して約 4 倍となった。この結果から、熟成に使用した *Helicostylum* sp. JW-1 株が熟成過程で新奇な ACE 阻害物質を生成したことが示唆された。現在、ゲルろ過で得られた活性画分に対して HPLC での分析、および分取を進めている。

1)原田ら、日本農芸化学会 2020 年度大会、大会講演要旨集 p. 301.

Fish meats contain substances that inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE), which causes an increase in blood pressure in the human body's pressure-raising system. The substances were called as ACE inhibitors (ACEI), and expected to be used as blood pressure-lowering agents. In the previous report, we have demonstrated that ACE inhibitory activity, which is used as an indicator of hypotensive effects, increased in Norwegian salmon aged for 3 weeks with *Helicostylum* sp. strain JW-1, and showed higher hypotensive effects, compared to no aged salmon (control). Therefore, this study aims to characterize the ACEI produced by strain JW-1 during the aging process.

First, after homogenizing salmon aged with *Helicostylum* sp. strain JW-1 and control, they were applied to a Sephadex G-10 gel filtration column to separate the target substances. Separation by gel filtration resulted in 16 active fractions in the aged sample, compared to 11 fractions containing the activity in the control. The total activity of the aged samples was approximately four times greater than that of the control. The results suggest that the strain produced a novel ACEI during the aging process. Currently, HPLC analysis and fractionation of the active substances obtained by gel filtration are performed.

angiotensin-converting enzyme inhibitor, aged fish, Helicostylum

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：2E5a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E5 会場

Mucor lusitanicus が生産する抗酸化物質の生産条件の検討
Consideration of production conditions of antioxidants from *Mucor lusitanicus*
○坂上 真衣[1]、村上 周一郎[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Mai SAKAGAMI[1], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ.)

これまでの研究で、低温性接合菌 *Helicostylum* sp. JW-1 を用いて作製した熟成肉では、経日的に抗酸化活性が上昇することを見出した[1)]。そこで本研究では、接合菌における抗酸化物質を探索する目的で、当研究室で保存している接合菌を培養し、得られた培養上清中の抗酸化活性を評価した。

3 種の接合菌 *Helicostylum* sp. JW-1、*Thamnidium elegans* NBRC5429、*Mucor lusitanicus* ATCC1216B を液体培地中で振とう培養したところ、*M. lusitanicus* の培養上清が最も高い抗酸化活性を示した。次に *M. lusitanicus* の抗酸化物質生産条件を検討したところ、培養温度 25℃でより高い抗酸化活性を示したが、添加する脂質の種類、通気度、菌糸の有無、前培養期間により有意な誘導生産は見られなかった。

また同じ条件で培養しているのにも関わらず、菌の形態がペレット状の場合、抗酸化活性が低くなる傾向が見られた。これはペレットが形成されたことにより、ペレット内部への栄養や酸素の供給が低下することが原因であると考えられる。

1）舘野ら、日本食品科学工学会第 66 回大会講演集、p. 165（2019）.

In our previous study, we found that antioxidant activity increased chronologically in dry-aging beef prepared with the psychrophilic zygomycete *Helicostylum* sp. JW-1. In this study, we evaluated the antioxidant activity in the cultural supernatants obtained from zygomycetes in order to search antioxidants-producers in zygomycetes.

When the three kinds of zygomycetes *Helicostylum* sp. JW-1, *Thamnidium elegans* NBRC5429, and *Mucor lusitanicus* ATCC1216B were cultivated in liquid medium with shaking, the cultural supernatant of *M. lusitanicus* showed the highest antioxidant activity. We examined the conditions for antioxidant production by *M. lusintanicus*, and found that the fungus showed higher antioxidant activity at incubation temperature of 25℃. However, no significant difference of activity was observed by the addition of fatty acids, aeration, presence of mycelia, or pre-cultivated period.

In addition, the antioxidant activity tended to be lower when *M. lusintanicus* was in pellet form, even though the strain was cultivated under the same conditions. This may be due to the fact that the formation of pellets reduces the supply of nutrients and oxygen to the inside of the pellets.

Mucor lusitanicus, antioxidant, morphology engineering

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：2E5a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E5 会場

大腸菌によるレチナール生産

Retinal production by engineered *Escherichia coli*

○雨宮 彩恵[1]、弘埜 陽子[1]、松田 史生[2]、戸谷 吉博[2]、石井 純[3]、原 清敬[1]([1]静県大食栄、[2]阪大院情報、[3]神戸大先端バイオ工研セ)
○Sae AMEMIYA[1], Yoko HIRONO[1], Fumio MATSUDA[2], Yoshihiro TOYA[2], Jun ISHII[3], Kiyotaka HARA[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Osaka Univ., [3]Kobe Univ.)

レチナールは、視力、骨の発達、生殖、皮膚の健康などに必要なレチノイドの一つである。主に化粧品素材として用いられ、にきび、アンチエイジングに効果が期待されている。しかし、レチナールは、酸化されやすく、光に対して不安定な性質を持つ。そこで、本研究では、大腸菌を用いたレチナールの安定化と、生産性の向上を目的とした。β-カロテンを生産し、レチナールへ変換させる代謝経路の酵素群を導入した大腸菌をフラスコ培養し、菌体からレチナールをアセトン抽出した。HPLC を用いて 371 nm と 470 nm の波長のピークからレチナールとβ-カロテンの生産量をそれぞれ測定した。また、レチナールの安定性を図るため、レチナール結合タンパク質であるロドプシンも導入し、HPLC やヒドロキシルアミンを用いた吸光度測定により、レチナール生産量の比較検討を行った。その結果、レチナール合成経路導入株の培地条件の最適化により、LB 培地の約 4 倍のレチナール生産を達成した。また、ロドプシンを導入したところ、LB 培地でレチナール生産が約 3 倍に向上した。今後、複数の最適条件を組み合わせることで、レチナール生産をさらに向上できると考えている。

Retinal is one of the retinoids necessary for vision, bone development, reproduction, and skin health. It is mainly used as a cosmetic material and is expected to be effective for acne and anti-aging. However, retinal is easily oxidized and unstable by light. In this study, to stabilize retinal and improve its productivity, a retinal synthetic pathway via ß-carotene was introduced into *Escherichia coli*. The engineered *E. coli* was cultured in flask, and retinal was extracted from the cell by acetone. Retinal and ß-carotene production were determined from the peak at 371 nm and 470 nm wavelengths, respectively, using HPLC. By optimizing the culture conditions of the engineered strain, the retinal production was approximately 4-fold higher than that of LB medium. Rhodopsin, a retinal binding protein, was also introduced into *E. coli* for retinal stability, and the retinal concentration was compared by HPLC and absorbance measurements using hydroxylamine. The introduction of rhodopsin improved retinal production by about 3-fold in LB medium. The retinal production would be further improved by combining several optimal conditions.

Carotenoid, Retinoid, Rhodopsin

発表責任者：原　清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E5a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E5 会場

植物性素材中で D-アミノ酸を生産する *Lactiplantibacillus plantarum* の遺伝学的な特徴に関する解析

Genetic characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* producing D-amino acids in plant-based material.

○加田 茂樹、大淵 俊、宮本 真理 (雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所)
○Shigeki KADA, Shun OBUCHI, Mari MIYAMOTO (Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co.,Ltd.)

天然に存在するα-アミノ酸の殆どは L-体のアミノ酸であるが、発酵食品をはじめとして食品中には D-アミノ酸が含まれる。我々はポストバイオティクスとしての D-アミノ酸の利活用を目指し、D-アミノ酸を生産する当社独自の乳酸菌として *Lactiplantibacillus plantarum* に分類される菌株を見出したことを昨年度報告した。近年、持続的な開発目標(SDGs)の設定は必須の課題となっており、食品産業においても植物性素材への転換が 1 つの大きなトレンドとなっている。そこで、我々は植物性素材の商品に利活用可能な素材においても D-アミノ酸を生産する乳酸菌を探索した。エンドウマメタンパク質抽出物を含む培地中で分離源の異なる *L. plantarum* を嫌気的に培養した後、培養上清中の総 D-アミノ酸濃度を D-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼアッセイ系により定量した。一方、試験に供した *L. plantarum* 菌株について、Multilocus sequence analysis を行い、分子系統的なクラスターに分割した。その結果、ヒト糞便由来の菌株を多く含むクラスターの菌株は発酵食品由来の菌株を多く含むクラスターの菌株と比較して、エンドウマメタンパク質中で生産する D-アミノ酸濃度が高い傾向があることがわかった。

Most of the naturally occurring α-amino acids are L-amino acids, but D-amino acids are contained in foods, including fermented foods. We aim to utilise D-amino acids as a postbiotic and reported last year that we have found a strain of lactic acid bacteria classified as *Lactiplantibacillus plantarum*, which is unique to our company and produces D-amino acids. In recent years, the setting of Sustainable Development Goals has become an essential issue, and one of the major trends in the food industry is the shift to plant-based ingredients. We therefore searched for lactic acid bacteria that also produce D-amino acids in materials that can be utilised in plant-based foods. After anaerobic cultivation of *L. plantarum* from different sources in a medium containing pea protein extract, the total D-amino acid concentration in the culture supernatant was quantified by the D-amino acid oxidase-peroxidase assay system. Meanwhile, the *L. plantarum* strains tested were divided into phylogenetic clusters by multilocus sequence analysis. The results showed that strains from clusters containing more human faecal-derived strains tended to have higher concentrations of D-amino acids produced in pea protein compared to strains from clusters containing more fermented food-derived strains.

SDGs, Plant-based material, D-amino acids

発表責任者：加田茂樹（kada@meg-snow.com）

講演番号：2E5a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E5 会場

ヒト腸内細菌 *Phocaeicola dorei* JCM 13471^T 由来 2 ドメイン型アラニンラセマーゼの組換えタンパク質発現と酵素学的性質の解析

Two-domain alanine racemase from human gut bacterium, *Phocaeicola dorei* JCM 13471^T; expression of the recombinant protein and characterization of enzymological properties

○牟田口 祐太[1]、塚原 拓也[2]、加田 茂樹[2] ([1]秋田県大生資、[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所)
○Yuta MUTAGUCHI[1], Takuya TSUKAHARA[2], Shigeki KADA[2] ([1]Akita Pre. Univ., [2]Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co., Ltd.)

近年の研究により、腸内細菌叢が生産する D-アミノ酸が哺乳類宿主の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。我々は、日本人のエンテロタイプを特徴付ける細菌種について D-アミノ酸代謝の解析を進めている。その中で、*Phocaeicola dorei* JCM 13471^T のゲノム中に、N 末端側に UDP-*N*-アセチルムラモイル-トリペプチド--D-アラニル-D-アラニンリガーゼ(MurF)と、C 末端側にアラニンラセマーゼ(AR)とそれぞれ相同性をもつ 2 ドメイン型酵素遺伝子を見出した。この酵素の AR 活性を確認するため、2 つのドメインを含む全長のタンパク質を His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。精製組換えタンパク質は L-アラニンを基質とするラセマーゼ活性を示し、N 末端側 MurF ドメインの基質の一部となる D-アラニンを C 末端側 AR ドメインが生成していることが示唆された。加えて、本酵素はタンパク質構成 L-アミノ酸のうち、L-セリンに対してもラセマーゼ活性を示したことから、*P. dorei* JCM 13471^T における D-セリン代謝にも関与している可能性が示唆された。本講演では、この 2 ドメイン型 AR の酵素学的性質を報告する。

Recent studies have revealed that D-amino acids produced by the gut microbiota play an important role in the homeostasis of the mammalian host. We are currently analyzing D-amino acid metabolism in the bacterial species characterising Japanese enterotypes.

In this study, a gene encoding a two-domain enzyme with homology to UDP-*N*-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase (MurF) on the N-terminal side and alanine racemase (AR) on the C-terminal sides was found in the genome of *Phocaeicola dorei* JCM 13471^T. To confirm the AR activity of this enzyme, the entire protein including the two domains was expressed in *Escherichia coli* as a His-tag fusion protein and purified using Ni affinity chromatography. The purified recombinant protein showed racemase activity toward L-alanine as a substrate, suggesting that the C-terminal AR domain produces D-alanine, which is consists of a part of substrate for the N-terminal MurF domain. In addition, this enzyme also showed racemase activity toward L-serine among protein-constructing L-amino acids, suggesting that it may also involved in D-serine metabolism in *P. dorei* JCM 13471^T. We will report the enzymological properties of this two-domain AR in this study.

D-amino acid, racemase, Phocaeicola dorei

発表責任者：牟田口祐太（y-muta@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2E5a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E5 会場

ウェルシュ菌発現系のための新規発現ベクターの構築

Construction of novel vectors for clostridial expression system

○加藤 史帆[1]、荒川 利行[1]、成谷 宏文[2]、宮田 茂[1] ([1]中部大・院・応用生物、[2]十文字女大・人間生活)
○Shiho KATO[1], Riyuki ARAKAWA[1], Hirofumi NARIYA[2], Sigeru MIYATA[1] ([1]Chubu University, [2]Jumonji University)

【目的】*Clostridium* 属細菌は多種の有用なタンパク質を生産するが、その遺伝子が極端に AT-rich であるため、*Escherichia coli* などを用いた汎用の組換え発現系ではその遺伝子発現が困難である。我々は *C. perfringens* を用いた発現系の開発を行ってきたが、今回、組換えタンパク質の分泌生産のために、シグナル配列コード領域をクローニングした新規分泌発現用ベクターの構築を試みた。
【方法及び結果】当研究室で開発した *C. perfringens* 発現ベクターpCC12 の T7 プロモーター下流領域に、*C. perfringens* 13 株の培養上清中で多く発現が見られた、*colA* 及び CPE1281 のシグナル配列をコードする DNA 断片をクローニングし、pCC24 及び pCC25 を構築した。これらのプラスミドに、*C. acetobutylicum* のエンドグルカナーゼ遺伝子（*eglA*）、*C. perfringens* の菌体内シアリダーゼ遺伝子（*nanH*）及び *C. beijerinckii* のラミナリナーゼ遺伝子（Cbei_2828）をクローニングし、キシロース添加により T7 RNA ポリメラーゼが発現する *C. perfringens* mT7VI 株を形質転換した。これらの形質転換株を培養し、発現誘導後、培養上清中のタンパク質及び酵素活性を解析した結果、すべての酵素の分泌生産に成功したことが明らかとなった。

Many bacteria belonging to the genus *Clostridium*, extremely AT-rich Gram-positive anaerobic rods, secrete a variety of proteins of industrial and medical importance directly into the culture medium. Due to differences in codon preference, it is difficult to dramatically increase the expression of the clostridial gene encoding a relatively large protein by using *E. coli* as the expression host. Therefore, we have been developing an expression system using *C. perfringens*; in this study, we attempted to construct a novel clostridial expression vector by cloning signal sequence coding regions for the production and secretion of clostridial proteins.
DNA fragments encoding the signal sequences of ColA and CPE1281 were cloned into pCC12, an expression vector with a T7 promoter developed in our laboratory. The endoglucanase gene (*eglA*) of *C. acetobutylicum*, the intracellular sialidase gene (*nanH*) of *C. perfringens*, and the laminarinase gene (Cbei_2828) of *C. beijerinckii* were cloned into these plasmids, and the *C. perfringens* mT7VI, harboring the xylose-inducible T7 RNA polymerase gene, was transformed. Finally, it was revealed that secretory production of all enzymes was successful.

Clostridium perfringens, clostridial expression system, T7

講演番号：2E5a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E5 会場

ウェルシュ菌による各種リパーゼ遺伝子の発現解析

Expression analysis of various lipase genes in *Clostridium perfringens*

○小泉 ありさ、加藤 史帆、加藤 実希、宮田 茂（中部大・応用生物）
○Arisa KOIZUMI, Shiho KATO, Miki KATO, Shigeru MIYATA (Chubu Univ.)

【目的】現在の化石燃料源に代わる選択肢の 1 つである水素の生物的生産に対する関心の増加から、*Clostridium* 属のような水素生産菌が注目されている。*C. perfringens* は、多糖類やポリペプチドのようなポリマーを分解する強力な酵素を多数生産し、それらの有機物を異化することで水素を生産する。しかし、本菌が産生するリパーゼは致死性のα毒素であり、本菌を水素生産菌として利用する場合、他の lipase に置換する必要がある。そこで、本研究では、本菌で高発現するリパーゼ遺伝子のスクリーニングと一部性質を明らかにすることを試みた。
【方法・結果】*C. sporogenes* 及び *Bacillus subtilis* のリパーゼをコードしていると考えられる遺伝子を、6 種類の菌体外タンパク質を欠損させた *C. perfringens* Δ6 株で発現させた。その結果、発現させた遺伝子のなかで、*C. sporogenes* 由来の *lip3* 遺伝子が最も高発現し、高い脂質分解活性を示した。また、本酵素のシグナルペプチドを改変し、分泌量に及ぼす影響を調べた。現在、発現させたリパーゼの生化学的性質の解析を進めている。

The increased concern regarding the biological production of H_2, as one of the alternatives to current fossil energy sources, has led to significant interest in H_2-evolving microorganisms, including the genus *Clostridium*. *C. perfringens* produces several potent hydrolytic enzymes, which degrade various polymeric molecules such as polysaccharides, polypeptides and lipids, enabling it to gain fermentable substrates. However, the lipase in this bacterium is alpha-toxin that acts as a lethal toxin. To use this bacterium as a H_2-producing microorganism, it is necessary to replace the alpha-toxin with another type of lipase. Therefore, this study attempted to screen for highly expressed lipase genes in this bacterium and elucidate some of their properties.
Several genes presumed to encode lipases from *C. sporogenes* and *Bacillus subtilis* were expressed in *C. perfringens* Δ6 strains, which lacked six extracellular proteins. Among them, the *lip3* gene from *C. sporogenes* exhibited the highest expression and demonstrated significant lipid-hydrolyzing activity. Furthermore, we modified the signal peptide of this enzyme to investigate its effect on secretion levels. Currently, further analysis is underway to understand the biochemical properties of the expressed lipase.

Clostridium perfringens, lipase, clostridial expression system

講演番号：2E5a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E5 会場

ゲノム編集によるウェルシュ菌へのキシロース資化性とキシラン分解活性の付与

Conferment of xylose utilization and xylan degradation capabilities to *Clostridium perfringens* via genome editing

○内山 奈奈香、川畑 博暉、宮城 侑弥、森山 龍一、宮田 茂（中部大学・院・応用生物）
○Nanako UCHIYAMA, Hiroki KAWHATA, Yuya MIYAGI, Ryuichi MORIYAMA, Sigeru MIYATA (Chubu Univ)

【目的】未利用バイオマス資源として植物系バイオマスの有効利用が考えられている。また、一方で水素は次世代クリーン・エネルギーとして着目されている。*Clostridium perfringens* は、最適条件下では 10 分以下で分裂し、増殖にともなって大量の水素を生産するが、hemicellulose の分解活性や xylose の資化性はない。本研究では、hemicellulose の主成分である xylan を効率的に分解し、xylose を資化可能な *C. perfringens* の構築を目的とし、xylose 資化性の付与とともに *C. perfringens* で高発現する xylanase 遺伝子の探索を試みた。
【方法・結果】xylose 資化性を付与するために *C. beijerinckii* の xylose 利用オペロンをコードしていると考えられる遺伝子(*xylFGHAB*)を *C. perfringens* の *pfoA* と置換した。得られた置換株（xyl）を xylose 含有培地で培養した結果、親株と比較して高い増殖性と水素生産性を示した。次に、xylanase をコードしていると考えられる各種遺伝子を、*C. perfringens* で発現させ、高い発現量と活性を示した遺伝子を *C. perfringens* xyl の CPE1281 遺伝子座と置換した株を構築した。得られた株は、安定的に xylanase を発現した。現在、xylosidase 遺伝子の探索を進めている。

Plant-based biomass is being considered for effective utilization as an underutilized biomass resource, while hydrogen is being highlighted as the next-generation clean energy source. *Clostridium perfringens* divides in less than 10 minutes under optimal conditions, producing large amounts of hydrogen during growth; however, it lacks activity in hemicellulose degradation and xylose utilization. In this study, we attempted to screen xylanase genes that express at high levels within *C. perfringens* and to acquire the capability to utilize xylose.

In order to confer xylose-utilizing ability, the gene thought to encode the xylose-utilization operon, *xylFGHAB* of *C. beijerinckii* was replaced with the *pfoA* gene in *C. perfringens*. The resulting recombinant strain, xyl, when cultured in xylose-containing medium, exhibited higher proliferation and hydrogen productivity compared to the parent strain. Next, various genes presumed to encode xylanase were expressed in *C. perfringens*, and among them, a gene demonstrating high expression and activity was replaced at the CPE1281 locus in the *C. perfringens* xyl strain. The obtained strain consistently expressed xylanase.

Clostridium perfringens, xylanase, xylose utilization

講演番号：2E5a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E5 会場

ゲノム編集によるウェルシュ菌のグリセロール資化性の改善：グリセロール代謝系遺伝子の発現が増殖に及ぼす影響

Improvement of glycerol utilization in *Clostridium perfringens* via genome editing: effect of glycerol metabolism gene expression on growth

○佐藤 孝祐、佐藤 悠一朗、加藤 実希、矢野 智奈美、宮田 茂（中部大・院・応用生物）
○Kosuke SATO, Yuichiro SATO, Miki KATO, Chinami YANO, Shigeru MIYATA (Chubu Univ.)

【目的】*Clostridium perfringens* は嫌気要求度の低い偏性嫌気性菌で、現在知られている細菌の中で最も早い増殖速度を示す細菌の一種である。旺盛な有機物分解能を示し、生育に伴い大量の水素を生産する。しかし、本菌をグリセロール含有培地で培養した結果、グルコース含有培地と比較して到達菌体量及び水素生産量が大幅に低下した。そこで、本研究ではゲノム編集によって、グリセロール代謝経路を改変し、増殖の改善と水素生産の増大を試みた。
【方法・結果】グリセロールから 1.3-propanediol に代謝される初発酵素である glycerol dehydratase 遺伝子(*pduCDE*)を、*C. perfringens* 13 株のゲノムから欠失させた結果、到達菌体量と水素生産量がグルコース含有培地で培養した場合と同程度まで改善した。現在、さらなる増殖能の改善を目指し、*pduCDE* を欠失させた *C. perfringens 13* 株の毒素遺伝子と、*Clostridium butyricum* が保有するそれぞれ glycerol kinase 及び glycerol dehydrogenase を初発酵素とするグリセロール代謝系遺伝子を置換し、表現型の変化を調べている。

Clostridium perfringens is an obligate anaerobic bacterium with low anaerobic requirements, and it is recognized as one of the bacterial species exhibiting the fastest growth rate among currently known bacteria. It demonstrates a strong ability to degrade organic matter and produces a large amount of hydrogen during growth. However, when cultured in a glycerol-containing medium, both the bacterial growth and hydrogen production were significantly lower compared to cultivation in a glucose-containing medium. In this study, we attempted to improve growth and increase hydrogen production by modifying the metabolic pathway through genome editing.
When the glycerol dehydratase gene (*pduCDE*), responsible for metabolizing glycerol into 1,3-propanediol, was deleted from the genome of *C. perfringens* strain 13, both the bacterial growth and hydrogen production were improved to levels comparable to those achieved when cultivated in glucose-containing medium. Currently, we are replacing the toxin genes in the *pduCDE*-deleted *C. perfringens* strain 13 with glycerol metabolism genes, specifically the genes from glycerol kinase and glycerol dehydrogenase, of *Clostridium butyricum*, to investigate the resulting phenotypic changes.

Clostridium perfringens, glycerol metabolism, genome editing

講演番号：2E5a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E5 会場

各種発酵経路の遺伝子欠失と補充がウェルシュ菌のグリセロール資化性に及ぼす影響

Effect of gene deletions and complementation in various fermentation pathways on glycerol utilization in *Clostridium perfringens*

○宮本 航太、佐藤 悠一朗、矢野 智奈美、森山 龍一、宮田 茂 (中部大院応用生物)
○Kota MIYAMOTO, Yuichiro SATO, Chinami YANO, Ryuichi MORIYAMA, Shigeru MIYATA (Chubu University)

【目的】*Clostridium perfringens* は、高い有機物分解能を持ちクリーンエネルギー源である水素をグルコース 1 mol あたり約 2.5 mol 産生する。本研究では、グリセロール資化性が改善した glycerol dehydratase 遺伝子（*pduCDE*）欠失株を用いて、各種発酵経路の遺伝子の欠失と過剰発現が、グリセロール含有培地での本菌の増殖に及ぼす効果を検討した。

【方法・結果】*pduCDE* 欠失株からさらに各種発酵系遺伝子を欠失させ株を、グルコース含有培地とグリセロール含有培地で培養した結果、グルコース含有培地では代謝産物として高割合で酢酸を生成したが、グリセロール含有培地では酪酸の生成割合が上昇した。*C. acetobutylicum* の phosphate acetyltransferase と acetate kinase をコードする遺伝子 *pta-ackA* を、マルチコピー構成的発現プラスミドである pCC11N にクローニングし、グリセロール含有培地での増殖が抑制された多重欠失株を形質転換した。得られた菌株とベクター・コントロールとして pCC11N で形質転換した多重欠失株の増殖を、グリセロール含有培地で比較した結果、著しい増殖改善効果は認められなかった。これらの結果をもとに、現在、酪酸発酵系の初発酵素で 2 分子のアセチル-CoA からアセトアセチル-CoA を合成する acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase)遺伝子 *atoB* を欠失させ、*C. perfringens* の増殖や水素生産に与える影響を調べている。

Clostridium perfringens, possessing high organic matter degradation capabilities, produces approximately 2.5 moles of hydrogen, a clean energy source, per glucose mole. In this study, using a glycerol-utilizing improved strain lacking the glycerol dehydratase gene, *pduCDE*, as the parent strain, we investigated the effects of gene deletions and overexpression within various fermentation pathways on the growth of this bacterium in glycerol-containing media.

Upon culturing strains with further deletions of various fermentation-related genes from the *pduCDE*-deficient strain, we observed a higher production of acetic acid in glucose-containing media and an increased production of butyric acid in glycerol-containing media. The overexpression of *pta-ackA*, encoding phosphate acetyltransferase and acetate kinase from *C. acetobutylicum*, did not lead to a significant improvement in growth. We are currently investigating the effect of deletion of the *atoB* gene on growth and hydrogen production of *C. perfringens*.

Clostridium perfringens, glycerol metabolism, genome editing

講演番号：2E5a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 E5 会場

超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株のアルコール脱水素酵素遺伝子の機能解析
Functional analysis of alcohol dehydrogenase genes of a super oligotroph, *Rhodococcus qingshengii* N9T-4

○近藤 雪[1]、池田 裕布里[1]、新谷 政己[1,2]、吉田 信行[1] ([1]静大院・総合技科、[2]静大・グリーン研)
○ Yuki KONDO[1], Yuri IKEDA[1], Masaki SHINTANI[1,2], Nobuyuki YOSHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株は，炭素・窒素・硫黄源およびエネルギー源を添加しない低栄養培地上でも良好に生育する．当研究室では本菌の低栄養性を利用した新規バイオプロセスの構築を目指している．これまでに，本菌が低栄養条件で生育する際に特に高発現する遺伝子として *aldA* と *mnoA* を同定し，低栄養生育に重要な遺伝子として検討を進めてきた．これらは本菌のゲノム上の低栄養性遺伝子クラスター領域に存在し，それぞれ NAD 依存性アルデヒド脱水素酵素，NDMA 依存性メタノール脱水素酵素とアノテーションされている．このうち *aldA* については，先行研究により詳細な研究が進められ，遺伝子産物の基質特異性などの性質が明らかとなり，*aldA* プロモーターを利用した低栄養性遺伝子高発現系の構築にも成功している．本研究では，詳細がまだ明らかとなっていない *mnoA* に加え，本菌の低栄養性遺伝子クラスター上に存在し，鉄含有アルコール脱水素酵素とアノテーションされている遺伝子 *mnoB* についても機能解析を試みた．*mnoA, mnoB* および，それ以外の低栄養生育に関与すると予想される遺伝子の欠損株を用いて，様々なアルコール／アルデヒドに対する資化性および耐性を比較した．その結果，*mnoA* はエタノール，ペンタノールの資化に, *mnoB* は試験した全てのアルコールの資化に関与することが示唆された．さらに，Δ*mnoB* は Δ*mnoA* 同様，あるいはそれ以上に低栄養生育に重要な遺伝子であることが予想された．

A super oligotroph, *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 can grow well on an inorganic medium without any additional carbon, nitrogen, sulfur, and energy sources. We previously found that *aldA* and *mnoA* encoding an NAD-dependent aldehyde dehydrogenase and an NDMA-dependent methanol dehydrogenase, respectively, were highly upregulated under the oligotrophic conditions. Whereas we elucidated enzymatic properties of AldA and constructed high-level gene-expression system using an *aldA* promoter, function of *mnoA* is still unknown. In this study, we attempted functional analysis of *mnoA* and *mnoB*, which is annotated as an iron-containing alcohol dehydrogenase and exists in an oligotrophic gene cluster in N9T-4 genome. We constructed gene deletion mutants for *mnoA* and *mnoB*, and examined the growth on various alcohol. As a result, it was found that both genes were strongly involved in oligotrophic growth, and *mnoA* was involved in the growth on ethanol and pentanol, whereas the growth of Δ*mnoB* was remarkably decreased on all alcohols tested.

alcohol dehydrogenase, oligotroph, *Rhodococcus qingshengii*

発表責任者：吉田　信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E5a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 E5 会場

超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株を用いたポリヒドロキシアルカン酸の生産
Production of polyhydroxyalkanoate in a super oligotroph, *Rhodococcus qingshengii* N9T-4
○大塚 彬弘[1]、岸本 晃次郎[1]、池田 裕布里[1]、折田 和泉[2]、吉田 信行[1]([1]静大院・総合科技、[2]東工大・生命理工)
○Akihiro OTSUKA[1], Kojiro KISHIMOTO[1], Yuri IKEDA[1], Izumi ORITA[2], Nobuyuki YOSHIDA[1]
([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Tokyo Tech.)

Rhodococcus qingshengii N9T-4 株は，炭素源無添加の無機塩培地上で良好に生育する超低栄養性細菌である．当研究室では，本菌の CO_2, CO, アンモニア, アルコールなどのガス状化合物の資化性を活かした有用物質生産の新規バイオプロセスの構築を目指している．ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性プラスチックとして知られ，日本政府は年間 200 万トンの生産を目指しており，国内外で多くの研究が進められている．本研究では，超低栄養性細菌を用いた PHA 生産プロセスの開発を目的とし，N9T-4 株に PHA 生合成経路の導入を試みたので報告する．

ゲノム情報から予想される代謝経路では, 本菌は PHA 生合成に必要な遺伝子を持たず, 実際に PHA の生産も見られない．そこで，既存の PHA 生産菌として知られる *Cupriavidus necator* H16 株の *phaC1*，*phaA*，*phaB1* を，N9T-4 株の *aldA* プロモーターの下流にタンデムに連結し，大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターである pNit-RK2 に導入した．*aldA* は本菌が低栄養条件で生育した際に高発現するアルデヒド脱水素酵素をコードする遺伝子で，そのプロモーターは低栄養誘導型プロモーターとして利用できる．得られた形質転換体の無細胞抽出液を SDS-PAGE によって解析したところ，３つの遺伝子産物のバンドが検出され，低栄養条件での PHA 生合成遺伝子の発現を確認することができた．さらに，形質転換体をナイルレッド染色し，蛍光顕微鏡観察を行ったところ，コントロール株と比べ有意に強い蛍光強度を検出することができた．現在，炭素・窒素源などの培養条件を検討するとともに，PHA の蓄積率とモノマー組成について調べている．

Rhodococcus qingshengii N9T-4 is one of super oligotrophs we isolated, which grows on an inorganic medium without additional any carbon, nitrogen, and sulfur sources. We are attempting to establish novel low-carbon and low-energy bioprocesses for useful compounds by N9T-4. In this study, we attempted to introduce a polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthetic pathway in N9T-4.

phaC1, *phaA*, and *phaB1* of *Cupriavidus necator* H16, which is well-known as a PHA-producer, were introduced tandemly downstream of *aldA* promoter of N9T-4 in pNit-RK2, by which N9T-4 *ΔligD* was transformed. SDS-PAGE analysis of cell extract of the transformant cultivated under the oligotrophic conditions showed remarkable expression of three proteins involved in PHA biosynthesis. Now, we are examining culture conditions for PHA biosynthesis and evaluating the PHA content and the monomer composition.

polyhydroxyalkanoate, oligotroph, *Rhodococcus qingshengii*

発表責任者：吉田　信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E5a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 E5 会場

超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株を用いたトリアシルグリセロールの生産
Production of triacylglycerol in a super oligotroph, *Rhodococcus qingshengii* N9T-4
○岸本 晃次郎、大塚 彬弘、池田 裕布理、吉田 信行（静大院・総合技科）
○Kojiro KISHIMOTO, Akihiro OTSUKA, Yuri IKEDA, Nobuyuki YOSHIDA (Grad.Sch.Shizuoka Univ.)

超低栄養性細菌 *Rhodococcus qingshengii* N9T-4 株は，炭素・窒素・硫黄源無添加の無機塩からなる固体培地で良好な生育が可能であり,当研究室では本菌を用いた有用物質生産の新規バイオプロセスの構築を試みている．トリアシルグリセロール(TAG)はいわゆる中性脂肪として微生物から動物まで様々な生物に存在し，生命の重要なエネルギー貯蔵物質となっている.一方で,TAG から生産できる脂肪酸メチルエステルはバイオディーゼルとして軽油に代わる液体燃料として期待されている．本研究では, N9T-4 株による TAG の高生産を試みた. N9T-4 株はグルコン酸を炭素源とした場合に細胞内に TAG を蓄積するが，その生産性は TAG 生産菌として知られている *R. wratislaviensis* DSM 44193 株に比べかなり低い. DSM44193 株における TAG 生産では, TAG 生産の最終反応経路であるジアシルグリセロールから TAG の変換に関与するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼコードする *atf1, atf2* が重要であることが分かっている. N9T-4 株にも両オルソログが存在するが，それらの相同性は低い.そこで, DSM 44193 株の *atf1, atf2* を *aldA* プロモーターの下流にタンデムに連結したものを，大腸菌 - *Rhodococcus* シャトルベクターである pNit-RK2 に導入し, N9T-4 株 *ΔligD* 株を形質転換した. 得られた形質転換体を低栄養条件で培養し，ナイルレッド染色後に蛍光顕微鏡観察を行ったところ，コントロール株と比べ有意に細胞の蛍光強度が高く, TAG の高生産が示唆された.

Rhodococcus qingshengii N9T-4 is a super oligotrophs, which grows on an inorganic medium without any additional carbon, nitrogen, and sulfur sources. We are aiming to establish novel sustainable bioprocesses for various useful compounds by N9T-4. While triacylglycerol (TAG) is an important energy storage compound in various organism from bacteria to human, it is also expected to be a feedstock for biodiesel fuel. *R. wratislaviensis* DSM 44193 is a well-known TAG-producing bacterium and *atf1/2* encoding diacylglycerol acyltransferase in this bacterium are important for hyper production of TAG. In this study, *atf1/2* of DSM 44193 were introduced tandemly downstream of *aldA* promoter of N9T-4 in pNit-RK2. We previously reported that the *aldA* promoter provided strong gene expression under oligotrophic conditions. N9T-4 transformed by the recombinant plasmid was cultivated and stained by Nile Red, followed by fluorescent microscopy. As a result, remarkable fluorescence of cells of the transformant was observed, suggesting that introduction of *atf1/2* provided hyper TAG-accumulation in N9T-4.

triacylglycerol, super oligotroph, *Rhodococcus qingshengii*

発表責任者：吉田　信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2E5a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 E5 会場

天然ゴム資化性放線菌のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝に関与するアルデヒド 脱水素酵素の同定
Identification of aldehyde dehydrogenase involved in poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation of natural rubber-utilizing actinomycete

○川極 幸村[1]、儀武 菜美子[1]、ダム トゥイ ハン[2]、レー トゥアン[2]、谷川 大輔[3]、佐藤 伸[4]、グエン ラン フオン[2]、笠井 大輔[1] ([1]長岡技科大院・物質生物、[2]ハノイ工大・生物、[3]呉高専・環境、[4]鳥取環境大・環境)
○Yukimura KAWAGIWA[1], Namiko GIBU[1], Thuy Hang DAM[2], Tuan LE[2], Daisuke TANIKAWA[3], Shin SATO[4], Lan Huong NGUYEN[2], Daisuke KASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. of Technol., [2]Hanoi Univ. of Sci. Technol., [3]NIT, Kure College, [4]Tottori Univ. of Environment. Stud.)

【背景・目的】ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)（PI）を主成分とする天然ゴムは、様々な工業材料として利用されているが、その廃棄物は一般的に燃焼や埋立てにより処理されているため、廃棄物処理による環境負荷が懸念されている。そこで、微生物の酵素機能を用いた低環境負荷な廃棄物処理技術の開発が求められている。天然ゴムを唯一の炭素源・エネルギー源として生育する *Rhodococcus* sp. RDE2 株は、PI オキシゲナーゼ（Latex clearing protein; Lcp）によって、細胞外で PI をオリゴイソプレンアルデヒド（OIA）へと低分子化する。しかしこれまでに、RDE2 株の OIA 代謝に関与する酵素や代謝経路は不明であった。本研究では、RDE2 株の PI 代謝系の全容を解明するために、OIA の分解に関与する遺伝子の同定とその遺伝子産物の機能解析を行った。
【方法・結果】RDE2 株のゲノム解析と分子系統学的解析により、OIA 分解に関わると考えられる 6 つのアルデヒド脱水素酵素遺伝子を発見した。これらの遺伝子の転写誘導性や遺伝子産物の機能、遺伝子欠失株の解析から、RDE2_16440、RDE2_35730、及び RDE2_42360 の 3 つの遺伝子が RDE2 株の OIA 分解と PI 代謝に関与することが示唆された。

Natural rubber which is mainly composed of poly(*cis*-1,4-isoprene) (PI), is used as useful material for various industrial applications. However, their waste is generally disposed of by incineration or landfilling, which causes environmental concerns. Therefore, the development of the waste treatment system with low environmental impact using the function of microorganisms and their enzymes is needed. *Rhodococcus* sp. strain RDE2, which can utilize natural rubber as a sole source of carbona and energy, degrades PI into oligo-isoprene aldehyde (OIA) by the reaction of PI oxygenase (Latex clearing protein; Lcp). However, the catabolic pathway and enzyme system which are involved in the OIA degradation have not been elucidated. In this study, OIA-degrading genes and enzymes were identified and characterized to elucidate the PI and natural rubber utilization system of strain RDE2.

Based on the whole genome analysis of strain RDE2 and the molecular phylogenetic analysis, six aldehyde dehydrogenase genes which are thought to be involved in OIA degradation were identified. Transcriptional inducibility of these genes, the function of gene products, and the enzymatic ability of the gene deletion mutants revealed that three genes including RDE2_16440, RDE2_35730, and RDE2_42360 might be involved in the OIA degradation and PI catabolism in strain RDE2.

aldehyde dehydrogenase, poly(*cis*-1,4-isoprene), natural rubber

発表責任者：笠井大輔（dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2E5p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 E5 会場

Leuconostoc citreum KD3 株由来多糖合成酵素の基礎性状および転写発現量の解析
Analysis of properties of the enzymes and the transcriptional expression levels of enzyme genes from *Leuconostoc citreum* KD3

○吉田 健太郎[1]、阿部 秀飛[3]、柴田 栞里[3]、田中 裕大[2]、巻田 春香[2]、松本 健司[2]、本多 裕司[2]、小柳 喬[2] ([1]石川県大院　生資環、[2]石川県大　生資環、[3]サンエイ糖化)
○Kentaro YOSHIDA[1], Shuto ABE[3], Shiori SHIBATA[3], Yudai TANAKA[2], Haruka MAKIDA[2], Kenji MATSUMOTO[2], Yuji HONDA[2], Takashi KOYANAGI[2] ([1]Grad. School Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]San-ei Sucrochem.)

【目的】デキストランはグルコースからなるホモ多糖体であり、一般に α-1,6 グリコシド結合を主鎖とし、僅かな α-1,3 グリコシド結合による分岐構造を有する。石川県産発酵漬物より分離された乳酸菌 *Leuconostoc citreum* KD3 株が産生するデキストランは本基本構造に加えて α-1,2 グリコシド結合の分岐構造を含有する。特異的な構造を持つ本デキストランは、将来的に様々な産業利用が期待されている。本研究では、多糖合成酵素遺伝子群を同定し、遺伝子産物の基礎性状および培養条件ごとの酵素遺伝子の転写量を解析した。
【方法･結果】*L. citreum* KD3 株より dextransucrase 4 種（DSI、DSII、DsrC および EpsA)、alternansucrase 2 種（AS および ASII）が同定された。各酵素遺伝子の大腸菌における異種発現系を構築し酵素の基礎性状を解析したところ、DSII および AS が α-1,2 グリコシド結合の分岐を付与することが示唆された。また、各酵素の至適温度は 25-35℃であり至適 pH は 5.5 であった。*L. citreum* KD3 株における酵素遺伝子の転写発現量をリアルタイム PCR にて測定したところ、対数増殖期前期において AS の発現量がスクロース存在下にて増大することが認められた。

【Objective】Dextran, a glucose polymer, contains the main backbone of α-1,6 glycosidic bonds with a slight amount of α-1,3 glycosidic bonds branching. *Leuconostoc citreum* KD3, isolated from fermented pickle in Ishikawa prefecture, Japan, produces a dextran with α-1,2 branching in addition to above structure (KD3-EPS). This type of dextran hasn't been industrially utilized yet. In this study, we identified the glycoside hydrolase genes responsible for the synthesis of KD3-EPS, and analyzed the properties of the enzymes for future industrial applications.
【Methods and results】Four dextransucrase (DSI, DSII, DsrC and EpsA) and two alternansucrase (AS and ASII) genes were identified in *L. citreum* KD3. Each enzyme gene was heterologously expressed in *E. coli* and the enzyme properties were analyzed. The results revealed that DSII and AS form α-1,2 glycosidic bonds. The optimum temperature and pH for each enzyme activity were 25-35℃ and 5.5, respectively. The transcriptional expression levels of *L. citreum* KD3, as analyzed by real-time PCR, showed an increase in AS in the presence of sucrose during the early logarithmic growth phase.

Dextransucrase, *Leuconostoc citreum*, Lactic acid bacteria

発表責任者：小柳喬（koyataka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2E5p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E5 会場

発酵漬物由来 Leuconostoc citreum KD3 株のα-1,2 分岐デキストランの産生量およびグリコシド結合様式に培養条件が及ぼす影響

Influence of cultivation condition on the production level and glycosidic linkage property of branched dextran derived from Leuconostoc citreum KD3 isolated from fermented pickle

○伊藤 日向子[1]、吉田 健太郎[2]、柴田 栞里[3]、阿部 秀飛[3]、本多 裕司[1]、松本 健司[1]、小柳 喬[1] ([1]石川県立大　生資環、[2]石川県立大院　生資環、[3]サンエイ糖化)
○ Hinako ITO[1], Kentaro YOSHIDA[2], Shiori SHIBATA[3], Shuto ABE[3], Yuji HONDA[1], Kenji MATSUMOTO[1], Takashi KOYANAGI[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Ishikawa Pref. Univ., [3]San-ei Sucrochem.)

Leuconostoc 属乳酸菌は菌体外多糖（Exopolysaccharide：EPS）として α-1,6 グリコシド結合を主鎖とするデキストランを産生し、株によって様々な α-1,2、1,3、および 1,4 グリコシド結合による分岐を有する。本研究では、石川県産漬物由来乳酸菌 *L. citreum* KD3 株が産生する α-1,2 分岐 EPS に着目し、培養温度等の条件によるグリコシド結合様式の変動を詳細に把握することを目的とした。De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) 液体培地にて *L. citreum* KD3 株を培養し、10～35℃の間で 5℃ごとに培養温度を変化させ経時的に EPS 収量および pH を測定した。培養中 24 時間ごとにスクロースを流加し、濃度を約 5 % (w/v) となるよう維持した。培養上清をエタノール沈澱を行うことによって EPS を回収し、各培養時間および温度別に得られた EPS のグリコシド結合様式を ^{1}H-NMR により解析した。その結果、培養温度 10～30℃においては EPS 収量に差は見られず、35℃において EPS 収量が顕著に減少したことから、EPS 合成酵素の至適温度が 35℃未満であることが示唆された。また、^{1}H-NMR 解析において、培養温度が低温になるほど EPS の α-1,2 グリコシド結合の割合が増加する傾向がみられた。本結果より、温度条件の最適化によって α-1,2 グリコシド結合の割合をコントロールできる可能性が示唆された。本分岐 EPS には免疫賦活等のプレバイオティクス効果も確認されており、今後の産業応用への展開が期待される。

Leuconostoc citreum KD3, derived from fermented pickle in Ishikawa Prefecture, Japan, produces the α-1,2-branched dextran as an exopolysaccharide (EPS). In the present study, we aimed to evaluate the influence of cultivation condition such as temperature on the glycosidic linkages in the KD3-derived EPS. *L. citreum* KD3 was inoculated into de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) liquid medium and cultivated at 10-35 °C, and the amount of EPS and pH of culture supernatant were monitored. During the cultivation, sucrose was added with an interval of 24 h to keep its concentration at approximately 5 % (w/v). As a result, the EPS production was greatly reduced when cultivated at 35 °C, indicating that the EPS synthesizing enzymes could not work at this temperature. In addition, the ratio of α-1,2 glucosidic linkage increased at low cultivation temperature, indicating that the α-1,2-branching property of EPS could be controlled by temperature optimization.

Exopolysuccharide, Lactic acid bacteria, Leuconostoc

発表責任者：小柳喬（koyataka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2E5p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E5 会場

モデル藍藻 Synechocystis sp. PCC6803 由来新規硫酸多糖シネカンの合成・制御機構の解明と生産性向上

Elucidation of the biosynthesis and regulation mechanisms of a novel sulfated polysaccharide synechan from the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and improvement of its productivity

○前田 海成[1]、榎本 元[2]、大舘 和真[3]、渡辺 智[3]、田中 寛[1]、池内 昌彦[4]([1]東工大化生研、[2]電通大基盤理工、[3]東京農大生命、[4]東大)
○Kaisei Maeda[1], Gen Enomoto[2], Kazuma Odate[3], Satoru Watanabe[3], Kan Tanaka[1], Masahiko Ikeuchi[4] ([1]Tokyo Tech, [2]UEC, [3]Tokyo Univ.of Agri., [4]The Univ. of Tokyo)

硫酸基で修飾された多糖である硫酸多糖はグリコサミノグリカンの成分として有名な多糖類であり、動物の様々な生理機能に関わるだけでなく、コンドロイチン硫酸に代表されるように食品や医薬品等の様々な用途に用いられる有用高分子である。自然界において動物以外で硫酸多糖を生産する生物は真核藻類と藍藻(シアノバクテリア)という光合成微生物にほぼ限られる。中でも藍藻はバクテリアの中でほぼ唯一硫酸多糖を作る生物群であり、非常に多様な硫酸多糖を細胞外多糖として生産する。しかし、藍藻硫酸多糖の合成機構は未同定であり、生理的な機能もあまり研究されていなかった。

本研究において我々は淡水性モデル藍藻の 1 種である *Synechocystis* sp. PCC 6803(以下 *S.*6803)の特定の研究室株が細胞外に新規硫酸多糖シネカンを蓄積し bloom(アオコ)のようなバイオフィルムを形成する現象を発見し、これを手掛かりとして硫酸多糖合成・制御遺伝子群をバクテリアで初めて網羅的に同定した。更に、二成分制御系と新規転写制御因子によるシネカン合成制御メカニズムの一部を解明し、その改変によりシネカン生産性が野生株の約 19 倍に向上した株の作製に成功した。シネカンの有用性は現在研究中であるが、 *S.*6803 は培養や遺伝子組換えが容易な種であるため、藍藻を用いた光合成による硫酸多糖生産系のモデルとして高い適性があると我々は考えている。

Sulfated polysaccharides (SPS) are well-known polysaccharides as a component of glycosaminoglycans and are not only involved in various physiological functions in animals but also useful polymers used in various applications such as food and pharmaceuticals, as represented by chondroitin sulfate. Cyanobacteria are almost the only group of bacteria that produce SPS, and they produce various SPSs as extracellular polysaccharides. However, their biosynthesis mechanism and physiological functions have not been well studied. In this study, we found that a freshwater model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*S.*6803) accumulated a novel SPS, synechan, and formed bloom-like biofilm. Then we comprehensively identified a group of SPS biosynthesis/regulation genes for the first time in bacteria. Furthermore, we have elucidated a part of the regulatory mechanism and succeeded to increase synechan productivity 19 times than wild type by modifying it. Although the usefulness of synechan is still under study, we believe that *S.* 6803 is highly suitable as a model for a photosynthetic SPS production system using cyanobacteria because it is an easy species to culture and transformation.

Sulfated polysaccharide, Cyanobacteria, Exopolysaccharide

発表責任者：前田海成（kmaeda@res.titech.ac.jp）

講演番号：2E5p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E5 会場

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の細胞外硫酸多糖 シネカンの大量生産系の確立と有用性の探索
Establishment of a mass production system for the sulfated exopolysaccharide, synechan, from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and exploration of its usefulness
前田 海成[1]、○大舘 和真[2] ([1]東工大・研究院・化生研、[2]東農大院・バイオ)
KAISE MAEDA[1], ○Kazuma OHDATE[2] ([1]Tokyo Tech, [2]Tokyo Univ. Agri)

シネカンは、モデル藍藻である *Synechocystis* sp. PCC 6803 が生産する硫酸多糖の一種である。硫酸多糖は動物や真核藻類、そして藍藻が作る硫酸基で修飾された多糖であり、保湿性や生理活性などから化粧品や医薬品の原料として幅広く利用されている。特に藍藻由来硫酸多糖の一種であるサクランは高い保湿性や抗炎症性といった有用性が確認されているが、合成遺伝子や制御系は未解明であり、生産ホスト藍藻の増殖が遅いという問題がある。一方、新たに発見されたシネカンは合成や制御機構が詳細に解析されており、シネカン制御因子 *xssS* を破壊することで野生株の生産量より 19 倍増加することが確認されている。しかし有用性を検証できるほど十分なシネカンは得られていない。そのため我々はシネカンをより効率良く生産するために培養や精製の条件を検討した。培養スケールの拡大や回収・精製の大幅な簡略化などの培養システムの改良を行った。精製度や硫酸基を維持したまま、短期間でさらに数十倍のシネカン精製物を得ることに成功した。また培地の検討を行い、培養過程で消費される培地成分を補うことで、シネカンの生産量をさらに引き上げることが出来た。現在は更なる生産量増加を目指し、シネカン高生産株の取得を行っている。

Synechan is a type of polysaccharide sulfate produced by the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Polysaccharide sulfate, derived from animals, eukaryotic algae, and cyanobacteria, finds extensive use in cosmetics and pharmaceuticals. Specifically, sacran, a cyanobacteria-derived sulfate polysaccharide, boasts moisturizing and anti-inflammatory properties. However, the synthesis gene and control system for sacran remain elusive, and the growth of the host cyanobacteria is slow. In contrast, the newly discovered synechan, with its detailed synthesis and regulatory mechanism, has shown a 19-fold increase in production upon disrupting the synechan regulatory factor *xssS.* Despite this progress, obtaining a sufficient amount of synechan for usability verification remains a challenge. Thus, we optimized culture and purification conditions, successfully achieving further dozens of times the purified synechan in a short period. Additionally, by supplementing consumed medium components during cultivation, we further increased synechan production. Currently, we aim to acquire high-producing strains of synechan to boost production.

Sulfated polysaccharide, cyanobacteria, exopolysacccharide

発表責任者：大舘和真（11623006@nodai.ac.jp）

講演番号：2E5p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E5 会場

ペクチンからのポリヒドロキシアルカン酸生合成と合成菌の単離

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate from pectin and isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria

○唐渡 龍平[1,2]、久留主 理人[2]、戸田 匠紀[2]、本田 正義[3]、阿部 英喜[4]、外村 彩夏[2]、白土 英樹[1,5]
([1]熊本県大院・環境共生、[2]東海大・農、[3]東京理科大・工、[4]理研 CSRS、[5]熊本県大・環境共生)
○Ryuhei KARATO[1,2], Masahito KURUSU[2], Naruki TODA[2], Masayoshi HONDA[3], Hideki ABE[4], Ayaka HOKAMURA[2], Hideki SHIRATSUCHI[1,5] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Sch. Agri., Tokai Univ., [3]Fac. Eng., Tokyo Univ. of Sci., [4]RIKEN CSRS, [5]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【背景および目的】多くの微生物が菌体内に合成するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、環境調和型プラスチックとして期待されている。しかしながら、PHA 実用化に向けて、未利用資源を利用する等、低コスト化が求められている。本研究では、熊本県特産バンペイユ不可食部（果皮）からの PHA 生産を目指し、バンペイユ果皮に多く含まれるペクチンを唯一の炭素源として PHA を合成できる菌を単離・同定し、ペクチンからの PHA 生産を行った。
【方法および結果】イチョウ、土壌、海水をサンプルとし、Nile Red 含有寒天培地を用いて PHA 合成菌のスクリーニングを行った。単離した 155 菌株のうち、一部の菌株について形態観察および糖資化性試験、16S rRNA 解析を行い、14 菌株の PHA 合成菌を同定した。これらの菌株をペクチン含有ミネラル培地にて 30°C、72 h 培養し、PHA 生産を行った。ガスクロマトグラフィーにて分析した結果、ペクチンを炭素源として PHA の合成が確認できた。現在、ペクチンからの PHA 合成における培養条件の検討とバンペイユ果皮に含まれるペクチンの分析を進めており、バンペイユ不可食部からの PHA 生産の検討を行っている。

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), which accumulate in many microorganisms as intracellular storage materials, have recently been touted as environmentally friendly materials for their potential use as biodegradable plastics. The production of PHA from inexpensive carbon sources such as waste substrates could help to reduce the cost of PHA production. In this study, we isolated 14 strains from ginkgo, soil, and seawater capable of utilizing pectin, which was well incorporated in banpeiyu peel, as the sole carbon source for growth and PHA production, with the aim of producing PHA from banpeiyu waste. The isolated strains were identified based on morphological observation, biochemical characterization and 16S rRNA analysis, and the PHA produced by the isolated strains was analyzed by gas chromatography. By GC analysis, we found that the isolates could produce PHA from pectin as a carbon source. We are now considering the culture conditions of the strains for PHA production from pectin and banpeiyu peel.

polyhydroxyalkanoate, biodegradable plastics, pectin

講演番号：2E5p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E5 会場

8-Prenylnaringenin 生産に関する研究 (1) ヒト腸内細菌のスクリーニングと共培養による効率的生産

Study on 8-Prenylnaringenin production (1) Screening of novel-producing bacteria from human feces and efficient production by co-culture

○丹野 麻由[1]、植村 圭祐[1]、大谷 彬[2]、中島 賢則[3]、三橋 和也[2]、山本 浩明[3]、前田 智也[1]、横田 篤[1]、吹谷 智[1] ([1]北大院農、[2]株式会社ダイセル・ヘルスケア SBU、[3]株式会社ダイセル・事業創出 C)
○ Mayu TANNO[1], Keisuke UEMURA[1], Akira OTANI[2], Takanori NAKAJIMA[3], Kazuya MITSUHASHI[2], Hiroaki YAMAMOTO[3], Tomoya MAEDA[1], Atsushi YOKOTA[1], Satoru FUKIYA[1] ([1]Res. Facul. Agr., Hokkaido Univ., [2]Daicel Healthcare SBU, [3]Daicel Business Develop. C)

8-Prenylnaringenin (8PN) はホップ (*Humulus lupulus*) の二次代謝産物であり，確認されている植物由来フラボノイドの中で最も高いエストロゲン様活性を示すことが知られている[1]．エストロゲンの不足は，更年期障害や，閉経後の骨粗しょう症などの健康問題の原因の一つであり[2]，これらの症状の緩和を目指した機能性食品素材として 8PN の利用が期待される．しかしながら，ホップに含まれる 8PN は微量で，商業的な利用は困難である．そこで我々は，腸内細菌による Isoxanthohumol (IX) から 8PN への変換を期待し，ヒト糞便から高い 8PN 生産量を示す腸内細菌の分離を行った．分離されたコロニーについて詳細を調べると，2 種細菌の混合状態であると判明した．一方は *Blautia* sp.と同定され，既知の 8PN 生産菌 (*Blautia producta*) の近縁種であった．他方は *Escherichia* sp. と同定され，8PN 生産能力を持たない大腸菌の近縁種と予想された．このことから，*Blautia* sp. は大腸菌と共培養することで 8PN 生産量が増加する可能性が考えられた．そこで，*Blautia* sp. と大腸菌の単独培養/共培養での 8PN 生産量を比較したところ，共培養で 8PN 生産量が上昇することが明らかになった．今後，共培養による 8PN 生産上昇のメカニズムについて検討を進めていく．
8-Prenylnaringenin (8PN) is a secondary metabolite of hops (*Humulus lupulus*), which is known to have the highest estrogenic effect among all known plant flavonoids [1]. Estrogen deficiency is one of the causes of health problems in elder women [2]. Therefore, 8PN is expected as a functional food material to relieve these problems. However, the low amount of 8PN in hops prevents the commercial utilization of 8PN. Thus, we have screened human fecal bacteria producing 8PN using Isoxanthohumol (IX) as a substrate. Detailed examination of the isolated colonies revealed that they were a mixture of two species of bacteria. One was identified as *Blautia* sp.; a close relative of a known 8PN-producing bacterium (*Blautia producta*). The other was identified as *Escherichia* sp.; a close relative of *E. coli* without 8PN production ability. This suggests that 8PN-converting bacteria may increase 8PN production when co-cultured with *E. coli*. Therefore, we compared the 8PN production of *Blautia* sp. and *E. coli* in mono-/co-culture and verified that 8PN production increased in co-culture. Currently, we aim to elucidate the mechanism of increases in 8PN production in co-culture.
[1] Mukai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**: 207-215 (2018),
[2] Moore *et al.*, *J. Midwifery Womens Health*, **62**: 286–297 (2017)

Blautia sp., estrogenic effect, human intestinal bacteria

発表責任者：吹谷智（s-fukiya@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2E5p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 E5 会場

8-Prenylnaringenin 生産に関する研究 (2) サポート菌のスクリーニングとその活用による脱メチル化促進法

Study on 8-Prenylnaringenin production (2) Screening of bacteria to enhance demethylation and its application

○大谷 彬[1]、中島 賢則[2]、三橋 和也[1]、丹野 麻由[3]、前田 智也[3]、横田 篤[3]、吹谷 智[3]、山本 浩明[2] ([1]株式会社ダイセル・ヘルスケア SBU、[2]株式会社ダイセル・事業創出 C、[3]北大院農)
○Akira Otani[1], Takanori Nakajima[2], kazuya Mitsuhashi[1], Mayu Tanno[3], Tomoya Maeda[3], Atsushi Yokota[3], Satoru Fukiya[3], Hiroaki Yamamoto[2] ([1]Daicel Healthcare SBU, [2]Daicel Business Develop. C, [3]Res. Facul. Agr., Hokkaido Univ.)

【目的】近年、腸内細菌による食品成分の代謝物（機能性代謝物）が宿主の健康に寄与することが注目されている。腸内代謝の一種、脱メチル化反応はホップに含まれる isoxanthohumol (IX) から廃用性筋萎縮抑制機能を有する 8-prenylnaringenin (8PN) を生成するなど重要な役割を果たしている。我々は IX から 8PN を生産するヒト腸内細菌をスクリーニングする過程において、*Blautia* sp.と大腸菌の近縁種(サポート菌)を共培養することにより、*Blautia* sp.単独培養時に比較し生産性が向上することを見出した。同様の生産性向上作用をもつサポート菌を広くスクリーニングした。また、生産性向上作用が、多様な基質の脱メチル化活性を促進するか検討した。
【結果】IX から 8PN への変換反応をモデルとして、脱メチル化活性促進作用を有する微生物をスクリーニングした。82 属 406 種の腸内細菌をスクリーニングした結果、32 属 208 種に促進作用が見出された。更に、*Blautia* sp. と大腸菌との共培養において、様々な基質の脱メチル化促進活性を測定した結果、glycitein や scoparone など基質に寄らず脱メチル化を促進することが確認できた。

Recently, metabolites of food ingredients by intestinal bacteria (functional metabolites) have attracted attention for their contribution to host health. Demethylation reaction, one of the intestinal metabolites, plays an important role in the formation of 8-prenylnaringenin (8PN) from isoxanthohumol (IX) in hops, which has an inhibitory activity against disuse muscle atrophy. We screened human intestinal bacteria that produce 8PN from IX and found that *Escherichia* sp. enhanced 8PN production with *Blautia* sp. by co-culture. Support bacteria that have an enhancing activity of 8PN production by co-culture were screened extensively. We also studied the availability of “support function” using various substrates.

As a model system for the conversion of IX to 8PN, we screened microorganisms with the ability to promote demethylation activity. Eighty-two genera 406 species of intestinal bacteria were screened, and 32 genera 208 species were found to promote enhanced demethylation activity.

The enhancing activity by co-culture with *E. coli* also functioned effectively in the demethylation of various substrates such as glycitein and scoparone.

8-prenylnaringenin, co-culture, Blautia

発表責任者：大谷彬（ak_otani@jp.daicel.com）

講演番号：2E5p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E5 会場

コリネ型細菌におけるメチルアンスラニレート耐性機構の解明とバイオ生産

Analysis of methyl anthranilate resistance mechanisms and bioproduction in *Corynebacterium glutamicum*

○新居 大樹[1]、小暮 高久[1,2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Hiroki ARAI[1], Takahisa KOGURE[1,2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

目的】メチルアンスラニレート（MAT）は香料や医薬品等の原料として使われており、近年、発酵生産による天然由来品の需要が高まっている。有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* は、野生株は MAT を生産しないが、その前駆体であるアントラニル酸（ANT）の生合成経路を有している。一方で、MAT は毒性が非常に高く、微生物の増殖を阻害することから、MAT 発酵生産のためには宿主微生物が MAT 耐性を保持していることが望まれる。そこで本研究では、MAT 高耐性株の取得を介した MAT 耐性関連遺伝子の特定を目指すとともに、異種生物由来の MAT 合成酵素 (Anthranilic acid *O*-methyltransferase, AAMT)遺伝子を発現させた *C. glutamicum* を構築し、MAT 生産と AAMT 活性について検討した。

【方法と結果】MAT 耐性株の取得はミューテーター変異導入法、及び変異原処理法を用いて実施した結果、複数の MAT 高耐性株を取得した。現在、取得した高耐性株のゲノム解析による耐性関連変異遺伝子の特定を試みている。一方、MAT 生産株の構築を目的として FLAG タグを付加した AAMT を *C. glutamicum* の ANT 高生産株において異種発現させた株を構築した。構築株を試験管培養に供したところ、グルコースからの MAT 生産が確認されるとともに、酵素活性評価において AAMT 活性が確認された。現在、各生物種由来の AAMT の酵素特性の解析や MAT 生産条件の検討を進めている。

[Purpose] Methyl anthranilate (MAT) is used as a raw material of flavors and its fermentative production is gaining attention. In this study, we aimed to identify MAT resistance-related genes through the acquisition of MAT resistant mutated strains and subsequent analysis of their genomes. Moreover, heterologous MAT synthase (Anthranilic acid O-methyltransferase, AAMT) gene was expressed in the anthranilate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* strain to examine MAT production and AAMT activity.

[Methods and results] MAT resistant strains were obtained using mutator mutagenesis and mutagen treatment methods, and several MAT-resistant strains were obtained. Currently, we are attempting to identify mutated genes related to the MAT resistance by genome analysis of the obtained resistant strains. On the other hand, to obtain a MAT producing *C. glutamicum* strain, we constructed a strain in which AAMT attached with a FLAG tag was heterologously expressed in an ANT overproducing strain of *C. glutamicum*. In the test-tube experiment using constructed strains, MAT production from glucose was confirmed, and AAMT activity was also confirmed in enzyme activity measurements. We are currently analyzing the enzymatic properties of AAMTs from several organisms and examining the fermentation conditions for MAT production.

methylanthranilate, *Corynebacterium glutamicum*, bioproduction

講演番号：2E5p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E5 会場

コリネ型細菌によるスクアレン生産

Investigation on Squalene production by Corynebacterium glutamicum

○尾上 友里奈[1]、清水 崇史[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Yurina Onoue[1], Takafumi Shimizu[2], Masayuki Inui[1,2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

【目的】スクアレン（SQ）は化粧品原料や健康食品として広く利用される化合物である。しかし、供給源は天然由来に依存的であるため、微生物宿主による発酵生産が検討されている。有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* はメチルエリスリトール 4-リン酸（MEP）経路を有し、SQ 前駆体であるファルネシルニリン酸（FPP）までは生合成できるが、SQ 合成酵素（SQS）遺伝子を持たないため SQ を生産しない。本研究では、*C. glutamicum* による SQ 生産の実用化を目標に、SQS の導入による生産能の付与を検討すると共に、代謝経路改変による SQ 生産性の向上について検討した。
【方法と結果】機能既知であるヒトの SQS（HsSQS）を *C. glutamicum* 野生株に導入すると、SQ 生産が確認できた。次に、FPP 供給を強化した改変株に SQS を導入した結果、野生株に比べて SQ 生産量が大幅に増加した。また、*C. glutamicum* で機能させるのに適した SQS の探索を目的に KEGG から取得した SQS の全配列データをもとに系統樹を作成し候補遺伝子を選抜した。これらを用いた SQ 生産性評価の結果、SQ 生産に利用できる可能性のある酵素を複数見出すことができた。今後も、引き続き代謝改変と酵素探索を行い、*C. glutamicum* での SQ 生産の最適化を試みる。

[Purpose] Squalene (SQ) is a compound widely used as a cosmetic ingredient and health food. Since SQ is primarily derived from natural sources, efficient technology for SQ production such as fermentation by microbial hosts has been investigated. *Corynebacterium glutamicum*, a useful industrial microorganism, can't produce SQ due to lack of SQ synthase (SQS) gene, but has a methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway and can synthesizes farnesyl phosphate (FPP), a precursor of SQ. With the goal of practical application of SQ production by *C. glutamicum*, we investigated the effect of introduction of the SQSs into *C. glutamicum* to generate SQ producing strain, and the enhancement of SQ productivity by pathway modification.

[Methods and results] When a human SQS (HsSQS) was introduced into the wild type strain of *C. glutamicum*, SQ production was observed. Next, we evaluated productivity of SQ by introducing HsSQS into genetically modified strains that FPP production was enhanced. As a result, SQ production in the FPP enhanced strain were significantly increased compared to that in the wild type strains. To screen optimal SQS genes for SQ production by *C. glutamicum*, we performed phylogenetic tree analysis of SQS sequences based on KEGG dataset. Based on the phylogenetic tree analysis, we selected several genes as candidates of SQS and evaluated SQ productivities of them. As a result, we identified several enzymes that can be used for SQ production.

Corynebacterium glutamicum, Squalene, bioproduction

講演番号：2E5p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E5 会場

コリネ型細菌によるフェルラ酸からのバニリン生産
Production of vanillin from ferulic acid by engineered *Corynebacterium glutamicum*
○松富 優一[1]、小暮 高久[1,2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Yuichi Matsutomi[1], Takahisa Kogure[1,2], Masayuki Inui[1,2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

【研究の目的】バニリンは香料原料である他、化粧品や医薬品の原料としても需要が高まっている。現在バニリンは主に環境負荷の高い化学合成法により製造されているが、微生物を利用した天然由来品としてのバニリン生産が注目されている。そこで本研究では、*Corynebacterium glutamicum* に対して異種由来の芳香族カルボン酸還元酵素(Aromatic carboxylic acid reductase, ACAR)遺伝子を導入した菌株を複数構築し、反応条件検討を行うことで、フェルラ酸を原料とするバニリンの高生産を目指した。
【方法と結果】導入した ACAR の機能発現を検証するため、各種 ACAR 導入株をバニリン酸が含まれる培地で培養し、バニリン生産について検証した。その結果、先行研究で確認されていたバニリン生産性と比べ、約 9 倍高いバニリン生成活性を保持した ACAR 導入株が見出された。次に、フェルラ酸を基質とするバニリン生産の条件検討を行った結果、(1) フェルラ酸からのバニリン酸生産と(2) バニリン酸からのバニリン生産の 2 段階で反応を行うことでバニリン生産性が向上し、特に、2 段階目反応時にのみグルコースを添加することによりバニリン生産性が大幅に向上することが判明した。

[Purpose] Vanillin is used as a raw material of fragrances cosmetics and pharmaceuticals, and its demand is increasing. However, currently vanillin is mainly produced by chemical synthesis methods that have a high environmental impact. Therefore, the production of vanillin derived from natural products using microorganisms is attracting attention. Therefore, in this study, we engineered *Corynebacterium glutamicum* strains producing vanillin from ferulic acid by introducing heterologous aromatic carboxylic acid reductase (ACAR) genes, and examined reaction conditions to achieve high vanillin production.

[Methods and results] In order to verify the function of the heterologously expressed ACAR, the ACAR-introduced strains were cultivated in the medium containing vanillic acid to examine whether vanillin was produced from vanillate. As a result, we were able to select an ACAR-introduced strain that achieved vanillin productivity approximately 9 times higher than that obtained in previous research. Through further investigation of the reaction conditions, it was found that the vanillin productivity from ferulic acid was improved by performing production in two step reactions combining the production of vanillate from ferulic acid and that of vanillin from vanillate. It was found that the glucose addition only during the second step reaction significantly improved vanillin production.

vanillin, *Corynebacterium glutamicum*, bioproduction

発表責任者：松富優一（matsutomi0901@outlook.jp）

講演番号：2E5p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E5 会場

指向性進化法によるバニリン合成酵素の機能改変

Directed evolution of an oxygenase for the synthesis of vanillin

○藤巻 静香[1]、木野 邦器[2]、廣瀬 修一[3]、白坂 直輝[3]、牛尾 慎平[3]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大院・創域理工、[2]早大・先進理工、[3]（株）長瀬産業)
○Shizuka Fujimaki[1], Kuniki Kino[2], Shuichi Hirose[3], Naoki Shirasaka[3], Shimpei Ushio[3], Toshiki Furuya[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]NAGASE & CO., LTD)

【背景・目的】香料や食品素材として有用なバニリンは、需要の大半が化学合成法に依存しているが、その用途からバイオプロセスによる生産に期待が寄せられている。我々はこれまでに、イソオイゲノールの炭素間二重結合を酸化開裂してバニリンを生成する酸化酵素 Ado に着目し、農産廃棄物等から回収可能なフェルラ酸を基質としてバニリンを微量合成する変異型 Ado の取得に成功している[1)]。本研究では、この変異型 Ado への新たな変異導入を検討し、フェルラ酸に対して活性の向上した酵素の取得を目指した。
【方法・結果】まず、ドッキングシミュレーションにより変異導入部位を決定し、Ado 変異体ライブラリーを作製した。次に、薄層クロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーを用いて、バニリン合成量を指標として、フェルラ酸に対して活性の向上した変異酵素をスクリーニングした。その結果、元の変異型 Ado に比較して活性が飛躍的に向上した変異体を取得することができた。この変異体では、活性中心に存在する疎水性アミノ酸が塩基性アミノ酸に置換されていることが明らかになり、その結果、導入された塩基性アミノ酸とフェルラ酸のカルボキシ基との間で静電的相互作用が生じて、酵素と基質の親和性が向上したと推察した。反応速度定数の解析からも、この変異体のフェルラ酸に対する高い親和性を裏付ける結果を得た。

Vanillin is the major aroma component of vanilla, giving it a sweet and creamy odor. It has been reported that the dioxygenase Ado oxidatively cleaves the C=C bond of isoeugenol to produce vanillin. We have succeeded in obtaining an enzyme that exhibits catalytic activity for ferulic acid by introducing a mutation into Ado.[1)] In this study, we introduced further mutations and attempted to obtain an enzyme with improved activity for ferulic acid. The mutation introduction site was determined by docking simulation, and a mutant library was constructed. We used thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography to screen mutants with improved activity. As a result, we obtained a mutant with dramatically improved activity for ferulic acid compared to the original mutant.

1) 坂本紗津記、木野邦器、古屋俊樹、2022 年度日本生物工学会大会（講演要旨集 3A03-05）.

dioxygenase, directed evolution, vanillin

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2E5p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E5 会場

サトウキビバガスに由来する芳香族化合物からのバニリン酸生産に伴うシリンガ酸の分解抑制とその解消

An effective mutation to eliminate the syringate degradation inhibition observed in vanillate production from sugarcane bagasse-derived aromatics mixture.

○池田 和磨[1]、児玉 直哉[2]、大川 全[3]、樋口 雄大[1]、上村 直史[3]、政井 英司[3]、園木 和典[1]([1]弘前大農学生命、[2]弘前大院農学生命、[3]長岡技科大物質生物)
○Kazuma IKEDA[1], Naoya KODAMA[2], Zen OKWA[3], Yudai HIGUCHI[1], Naofumi KAMIMURA[3], Eiji MASAI[3], Tomonori SONOKI[1] ([1]Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [3]Mat. Sci. Bioeng., Nagaoka Univ. Technol.)

我々は，リグニン由来の芳香族化合物を資化する *Pseudomonas* sp. NGC7 株を用いて，リグニンを化学分解して生成する多様な芳香族化合物の混合物から耐熱性ポリマーの合成原料であるバニリン酸（VA）を選択的に生産する株の作出に取り組んでいる。NGC7 株の VA *O*-demethylase 遺伝子（*vanA4B4*）を破壊して VA の分解能力を低下させた NGC7Δ*vanA4B4* 株は，サトウキビバガスを化学処理して生成する芳香族化合物の混合物を利用して増殖しながら VA を蓄積した。しかし同株は，VA のアナログ化合物であるシリンガ酸（SA）の分解能を保持しているにも関わらず，VA の蓄積に伴って SA も蓄積した。ニトロソグアニジン処理を用いて，VA 蓄積条件下でも SA を分解して増殖できる変異株を作出し，それらのゲノム DNA 解析と遺伝子破壊株の解析から，VA の選択的な蓄積には，SA 分解に関わる酵素遺伝子群（*vanA2B2*-*vanA1B1* オペロン）のリプレッサーである *vanR2* への変異が有効であることを見出した。現在，*vanR2* への変異が *vanA2B2*-*vanA1B1* オペロンの発現レベル，転写制御領域への結合能に与える効果について解析を進めている。

本研究は JST 未来社会創造事業（JPMJMI19E2）の支援を受けて実施した。

We are aiming to develop an engineered *Pseudomonas* sp. NGC7-based stain capable of producing vanillate (VA), a potent chemical for thermotolerant polymer syntheses, from a variety of aromatics mixture produced by lignin depolymerization. A VA *O*-demethylase gene (*vanA4B4*) was inactivated and the resulting strain (NGC7Δ*vanA4B4*) accumulated VA while growing on the mixture of aromatics obtained via the alkaline treatment of sugarcane bagasse. The strain showed the assimilating ability of syringate, an analogue of VA, however, SA in addition to VA was accumulated when it was cultured on the mixture of aromatics. The genomic DNA sequence analyses of the mutants, which were obtained by nitrosoguanidine treatment and capable of degrading SA under the VA accumulating condition, and the gene disruption analysis revealed the mutation in *vanR2* which is a repressor gene of the genes (*vanA2B2*-*vanA1B1* operon) responsible for SA degradation was effective in accumulating VA selectively while degrading SA. The effects of the mutation in *vanR2* on the *vanA2B2*-*vanA1B1* operon expression and its binding affinity to the transcriptional regulatory region are now under investigation.

This work was supported by JST-MIRAI program (JPMJMI19E2).

Lignin, Vanillic acid, Transcriptional regulator

発表責任者：園木 和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2E5p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E5 会場

フラビン依存性酸化酵素を利用したヒドロキシダイゼインの合成

Biocatalytic synthesis of polyphenols by flavin-dependent monooxygenases

○渡部 祥智子[1]、小原 亜希子[2]、卯川 裕一[2]、松山 彰収[2]、古屋 俊樹[1]([1]東京理科大院・創域理工、[2]（株）ダイセル)
○Sachiko Watanabe[1], Akiko Kohara[2], Yuichi Ukawa[2], Akinobu Matsuyama[2], Toshiki Furuya[1]
([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]DAICEL CORPORATION)

【背景・目的】ポリフェノールには、抗酸化作用や抗炎症作用等の健康増進効果が報告されており、近年関心が高まっている。ダイゼインの水酸化体であるヒドロキシダイゼインは、味噌等の発酵食品に含まれるイソフラボンの一種であり、肥満改善作用等の有用活性を示すことが明らかにされつつある。我々はこれまでに、希少かつ有用なポリフェノールの酵素合成を目的として、フラビン依存性酸化酵素 HpaB がエクオール等のポリフェノールに対して水酸化活性を示すことを見いだしている[1)]。本研究では、HpaB を用いてダイゼインの水酸化を試みた。
【方法・結果】3 種の HpaB ホモログ酵素、*Pseudomonas aeruginosa* 由来 PaHpaB、*Rhodococcus opacus* 由来 RoHpaB、*Escherichia coli* 由来 EcHpaB をそれぞれ大腸菌内で発現させ、各菌体をダイゼインと反応させた。反応後、HPLC および LC-MS により分析し、変換産物の同定と定量を行った。その結果、PaHpaB と RoHpaB は変換活性を示したが、EcHpaB では変換産物が検出されなかった。興味深いことに PaHpaB と RoHpaB は、異なる位置選択性を示し、ダイゼインから 6 位水酸化体と 3′位水酸化体をそれぞれ生成することが明らかとなった。さらに、フラスコスケールで PaHpaB 発現大腸菌と RoHpaB 発現大腸菌をダイゼインと反応させたところ、0.6 mM の 6 位水酸化体と 0.5 mM の 3′位水酸化体をそれぞれ選択的に合成することができた。

Hydroxydaidzeins are a type of isoflavone contained in fermented foods such as miso, and they reportedly exhibit useful activities such as a body fat reducing effect. We have found that the flavin-dependent monooxygenase HpaB exhibits hydroxylation activity toward polyphenols such as equol.[1)] In this study, we attempted to hydroxylate daidzein using HpaB. Three HpaB homolog enzymes, PaHpaB from *Pseudomonas aeruginosa*, RoHpaB from *Rhodococcus opacus*, and EcHpaB from *Escherichia coli* were each expressed in *E. coli*, and the recombinant *E. coli* cells were incubated with daidzein. As a result, PaHpaB and RoHpaB showed conversion activity, but conversion products were not generated by EcHpaB. Interestingly, PaHpaB and RoHpaB exhibited different regioselectivities, and produced 6- and 3'-hydroxydaidzeins, respectively.

1) Hashimoto T, Nozawa D, Mukai K, Matsuyama A, Kuramochi K, Furuya T, RSC Adv, 9, 21826 (2019).

hydroxylation, monooxygenase, polyphenol

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2E5p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E5 会場

Shewanella oneidensis MR-1 株を用いた 1,6-ヘキサンジオールの合成
Production of 1,6-hexanediol using *Shewanella oneidensis* MR-1

○長谷川 優希[1]、富田 啓介[1]、中島 雄次[2]、半澤 敏[2]、高妻 篤史[1]、渡邉 一哉[1] ([1]東薬大生命、[2]東ソー株式会社)
○ Yuki HASEGAWA[1], Keisuke TOMITA[1], Yuji NAKASHIMA[2], Satoshi HANZAWA[2], Atsushi KOUZUMA[1], Kazuya WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., [2]Tosoh Corporation)

1,6-ヘキサンジオール（1,6-HDO）はポリウレタンの原料であり、再生可能資源からの製造が望まれている。1,6-HDO は高還元物質であるため通常の発酵法では生産が難しいが、電気制御発酵法（電極によって微生物細胞内の酸化還元バランスを制御し、発酵生産を促進させる手法）によって高収率での生産が可能になると期待される。本研究では電気制御発酵法による 1,6-HDO の生産に向けて、電極から電子を受容可能な *Shewanella oneidensis* MR-1 株をホスト株とし、前駆物質（アジピン酸）から 1,6-HDO への生産が可能な遺伝子改変株を構築した。

グルコース資化性を付与した MR-1 株に、アジピン酸から 1,6-HDO の合成（図 1）に必要な遺伝子を導入した。本遺伝子改変株を好気条件下においてアジピン酸を基質、グルコースを共基質として培養すると、24 時間以内に 7.2 mM の 1,6-HDO が生成し、収率は 95.8 %に達した。MR-1 株では Entner-Doudoroff (ED) 経路によってグルコースが代謝され、効率的に NADPH が供給されるため、本株は 1,6-HDO 生産におけるホストに適している可能性が示唆された。今後は電気制御発酵による 1,6-HDO の生産を行う予定である。

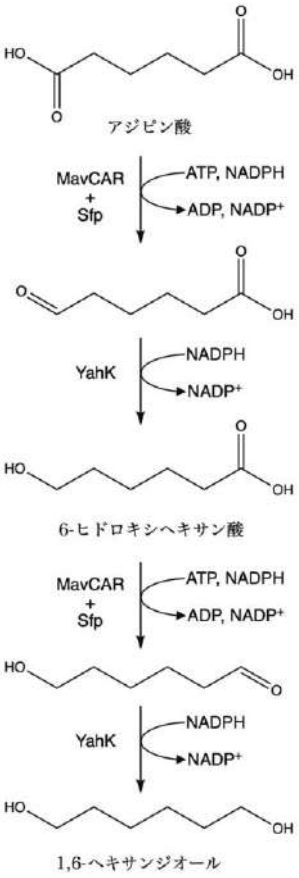


図 1 アジピン酸から 1,6-HDOの合成経路

Shewanella oneidensis MR-1 is an electrochemically active bacterium capable of utilizing electric energy for intracellular metabolism, making it a potential host for electro-fermentation. This study aims to engineer MR-1 to produce 1,6-hexanediol (1,6-HDO) from adipic acid, contributing to the development of an electro-fermentation process for 1,6-HDO production. Bioconversion using adipic acid as the substrate and glucose as the co-substrate (energy source) resulted in the production of 1,6-HDO at a rate of 11.3 mmol/L/day with a yield of 95.8 %. Future work includes the electro-fermentation production of 1,6-HDO using the engineered strain developed in this study.

Shewanella oneidensis MR-1, 1,6-hexanediol, adipic acid

発表責任者：高妻篤史（akouzuma@toyaku.ac.jp）

講演番号：2E6a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E6 会場

Identification of plant signals inducing the *hrp* regulon in a plant pathogen *Ralstonia solanacearum* and the cognate receptor proteins

○Gyokuchiku SOU[1], Masayuki Tsuzuki[2], Akinori Kiba[2], Yasufumi Hikichi[2], Kouhei Ohnishi[2]
([1]Ehime Univ., [2]Kochi Univ.)

Genes encoding a type III secretion system in *Ralstonia solanacearum* are regulated by HrpB as a *hrp* regulon, which is induced only in the plant. This study aims to identify plant signals inducing the *hrp* regulon and confirm the recognition mechanism of signals.

Signal molecules inducing the *hrpB* expression were screened with an assay system using resting cells of the *hrpB-lacZ* reporter strain. The soluble and insoluble fractions were prepared from tobacco seedlings. Only the soluble fraction induced the *hrpB* expression. The heated soluble fraction retained the *hrpB*-inducing activity, indicating that active compounds were not proteins. When the soluble fraction was fractionated into acidic, neutral, and basic components, the acidic and neutral fractions induced the *hrpB* expression. Among organic acids in the acidic fractions and sugars in the neutral fractions, malic acid and sucrose mainly induced the *hrpB* expression.

The sucrose-induced *hrpB* expression was significantly reduced in a *prhA* mutant, suggesting that sucrose might be perceived with the outer membrane protein PrhA. This result agrees that the *hrpB* expression is controlled by a signal cascade, PrhA-PrhI/R-PrhJ-HrpG.

We constructed a mutant library of histidine kinase genes in the two-component system. The malic acid-induced *hrpB* expression was reduced in the mutant of one of the histidine kinase genes, *rsc1598*. Rsc1598 could perceive malic acid, and the signal might be transferred to a response regulator, HrpG.

We are trying to verify the direct binding or the signaling molecules to the receptor proteins by using the purified membrane receptor proteins.

Ralstonia solanacearum, Plant signaling molecules, Receptor proteins

発表責任者：SOU Gyokuchiku（Caoyuzhu694815765@outlook.com）

講演番号：2E6a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E6 会場

Regulation mechanism of two master regulator genes *hrpG* and *prhG* in *Ralstonia solanacearum hrp* regulon

○Ki CYO, Akinori Kiba, Yasufumi Hikichi, Kouhei Ohnishi (Kochi Univ.)

The type III secretion system (T3SS) is necessary for infection of a plant pathogen, *Ralstonia solanacearum*. Genes in the *hrp* regulon encode component proteins of T3SS. The entire *hrp* regulon is activated by a transcriptional regulator, HrpB. The *hrpB* expression is positively regulated by two response regulators, HrpG and PrhG. This study aims to elucidate how the expressions of *hrpG* and *prhG* are regulated.

PrhJ has been demonstrated to regulate the *hrpG* expression. Transposon mutagenesis was applied to the *prhG-lacZ* reporter strain to isolate genes regulating the *prhG* expression. One mutation was mapped to an *rsc2734* gene encoding a response regulator among isolated mutants. PrhJ and Rsc2734 were overexpressed in *E. coli* and purified to homogenicity. Purified proteins were applied to EMSA (electrophoretic mobility shift assay) using the promoter regions of *hrpG* and *prhG*. The purified PrhJ bound to two sites of the *hrpG* promoter region. Rsc2734 bound to the promoter region of *prhG*.

To determine the protein binding sites, we constructed the deletion series of the promoter regions. We used a *popA-lacZ* fusion strain to monitor the *hrpB* expression in the wild type, *prhJ*-deletion, and *rsc2734*-deletion background. As a result, the binding sites of PrhJ on the *hrpG* region and the binding site of Rsc2734 on the *prhG* region were fixed.

Ralstonia solanacearum, hrp regulon, promoter

発表責任者：CYO Ki（1654649610@qq.com）

講演番号：2E6a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E6 会場

アミノ酸代謝グローバルレギュレーターGcvB small RNA を制御するスポンジ RNA

Sponge RNAs regulating GcvB small RNA global regulator of amino acid metabolism

○宮腰 昌利（筑波大医）
○Masatoshi MIYAKOSHI (Univ. Tsukuba)

細菌の遺伝子発現制御において、small RNA（sRNA）による転写後調節は重要な役割を果たしている。sRNA は転写開始および終結の段階で発現が制御されるだけでなく、スポンジ RNA との塩基対形成によって安定性や機能が調節されうる。γ-プロテオバクテリアに広く保存されるアミノ酸輸送・生合成のグローバルレギュレーターGcvB は、転写制御因子 GcvA/GcvR によってグリシンに応答して転写が誘導される。大腸菌やサルモネラなど腸内細菌科細菌では、グルタミン酸・アスパラギン酸 ABC トランスポーターをコードする *gltI* mRNA の 3'UTR から生成するスポンジ RNA SroC が GcvB との塩基対形成を介して GcvB の RNase E による分解を促進する（Miyakoshi et al., 2015 EMBO J.）。コレラ菌の RNA-RNA 相互作用の網羅解析により、GcvB が VC0784（Na^+/アラニンシンポーター）、*ilvC*（ケトール酸レダクトイソメラーゼ）の 3'UTR から生成するスポンジ RNA AlaZ、IlvZ と塩基対を形成することが明らかになった。AlaZ、IlvZ は GcvB の安定性には影響を与えないが、GcvB による標的 mRNA の抑制を解除することが示された。

Small RNAs (sRNAs) play important roles in regulating gene expression in bacteria. The expression of sRNA is regulated at the levels of transcriptional initiation and termination, while the stability and activity of sRNA can be modulated through base-pairing with sponge RNAs. GcvB is one of the most highly conserved sRNAs among γ-Proteobacteria and globally regulates amino acid transporter and biosynthetic genes. The transcription of GcvB is regulated by GcvA/GcvR transcriptional regulators in response to glycine. In *E. coli* and *Salmonella*, the stability of GcvB is regulated by SroC sponge RNA, which is processed from 3'UTR of *gltI* mRNA. Directly base-pairing between SroC and GcvB facilitates the degradation of GcvB by RNase E (Miyakoshi et al., 2015 EMBO J.). In *Vibrio cholerae*, the RNA-RNA interactome analysis revealed that GcvB base-pairs with AlaZ and IlvZ sponge RNAs generated from 3'UTR of VC0784 and *ilvC*, respectively. Both AlaZ and IlvZ antagonized the repression of target mRNAs by GcvB through direct base-pairing with no effect on the stability of GcvB.

small RNA, sponge RNA, bacteria

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2E6a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E6 会場

adiA mRNA 3'UTR から生成する新規 sRNA による大腸菌酸耐性の発現制御
A new sRNA derived from 3'UTR of *adiA* mRNA regulates acid resistance in *Escherichia coli*.
○神田 健、宮腰 昌利（筑波大医）
○Takeshi KANDA, Masatoshi MIYAKOSHI (Univ. of Tsukuba)

一部の腸内細菌は、経口感染の過程で胃酸（pH<2.5）に曝されるが、酸耐性機構を発現し生残する。特にグルタミン酸脱炭酸酵素 GadA/B およびアルギニン脱炭酸酵素 AdiA に依存した機構が強力である。本研究では、大腸菌を含む一部の腸内細菌科細菌において、*adiA* mRNA の 3'UTR（非翻訳領域）が non-coding small RNA（sRNA）として単独で機能することを解明し、AdiZ と命名した。まず、ノーザンブロット解析により、AdiZ は、*adiA* が転写される弱酸性（pH 5.5）かつ嫌気性条件下において RNase E 依存的に発現することを見出した。この結果から、AdiZ は、RNase E が *adiA* mRNA の 3'UTR を切断することで生成されると考えられた。次に、RNA-seq 解析により、大腸菌において AdiZ を高発現させると *gadA*/*B* mRNA 量が顕著に減少することを見出した。レポーター解析等により、AdiZ は、*gadA*/*B* のマスターレギュレーターをコードする *gadE* mRNA と塩基対を形成し、その翻訳を抑制している可能性が示唆された。以上より、AdiZ は、*adiA* の転写と同時に GadA/B に依存した酸耐性機構の発現を速やかに抑制する新規制御因子であり、大腸菌は二つの主要な酸耐性機構を巧妙に使い分けている可能性が示唆される。

Acid resistance (AR) is one of the most important properties for enterobacteria to survive the stomach acid (<pH2.5) during oral infection. Among six AR systems found so far, glutamate decarboxylase (GadA/B)- and arginine decarboxylase (AdiA)-dependent systems are effective under severe acidic stress. This study shows that the 3'-untranslated region (UTR) of the *adiA* mRNA functions as a stable non-coding small RNA (sRNA) designated as AdiZ conserved in several species among the *Enterobacteriaceae* including *Escherichia coli*. First, we revealed that AdiZ is produced via RNase E cleavage of the 3'UTR of the parental *adiA* mRNA under moderately acidic (pH 5.5) and anaerobic conditions. We also found that the AdiZ expression reduced the GadA/B-dependent AR by possible direct base-pairing with *gadE* mRNA encoding master regulator of *gadA/B*, which represses its translation. From this study, it is suggested that AdiZ is a new regulator to repress the GadA/B-dependent AR system immediately after transcription of *adiA*, and this regulation enables *E. coli* to differentially exhibit two main AR systems.

Escherichia coli, acid resistance, sRNA

発表責任者：神田健（tkanda@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2E6a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E6 会場

細菌 CSD タンパク質の標的 RNA 特異性を定義する分子基盤
Molecular basis for target RNA specificity of bacterial CSD proteins

○森田 鉄兵[1,2]、長谷川 智[2,3]、猪瀬 礼璃菜[2] ([1]慶大院政メ、[2]慶大先端研、[3]慶大環境情報)
○Teppei MORITA[1,2], Satoshi HASEGAWA[2,3], RERINA INOSE[2] ([1]Grad. Sch. Media&Governance, Keio Univ., [2]IAB, Keio Univ., [3]Environment & Info. Studies, Keio Univ.)

mRNA 上に仕組まれた発現制御（転写後制御）には、多くの場合、RNA 結合タンパク質が関与する。Cold-shock domain（CSD）タンパク質は、緩和な配列特異性を持つ RNA 結合タンパク質である。CSD タンパク質をコードする遺伝子（*csp*）は細菌間で広く分布しており、大腸菌では 9 つの *csp* 遺伝子が存在する。最近、我々は、大腸菌 CSD タンパク質の 1 つである CspD が、他とは異なり、small RNA の転写終結の抑制や、RNA 構造に起因する転写終結制御の破綻をもたらすことを見出した。このような CSD タンパク質の固有の機能に関する報告が蓄積される一方、その特異性がどのように定義されているかは不明である。本研究では、個々の CSD タンパク質が標的 RNA を認識する分子基盤の解明を目的として、CSD タンパク質の特異性に関与するアミノ酸領域を探索した。大腸菌 CspD と CspA のキメラ体や点変異体を用いた機能解析により各標的認識に必須の領域を明らかにし、これらの領域を交換することで特異性が入れ替わることを示した。さらに、分子系統解析により、同定した領域が CSD タンパク質の細分類に有効であると示唆された。細菌間での CSD タンパク質の分布傾向をもとに、制御因子としての CSD タンパク質の役割を考察する。

Posttranscriptional regulation of gene expression is often completed with RNA-binding proteins (RBPs). Cold-shock proteins (Csps) share the cold shock domain, at which they bind RNA with relaxed sequence specificity. Widespread distribution of *csp* genes among bacteria suggests that Csps have a biological role in fundamental processes. Recently, our multicopy screen in *E. coli* identified CspD, but not the other eight Csps, as a novel attenuator of transcription termination for small RNAs. An RNA-Seq analysis demonstrated global effects of CspD, promoting transcription elongation across a couple of regulatory RNA structural elements. However, we have limited understanding of how the Csp specificities are defined. Here we identify the molecular basis for the differences in the Csp proteins that allow recognition of cognate RNA targets. Functional analyses with chimeras and point mutants of *E. coli* CspD and CspA found the regions each involved in the target specificity. Their specificities were successfully swapped by exchanging these regions. A phylogenetic tree of Csps further suggested that the identified regions are effective in subclassification of Csps. Our findings provide a definition of Csps, which will be useful for understanding the functional specialization of Csps.

Posttranscriptional regulation, RNA binding protein, Cold shock domain

発表責任者：森田 鉄兵（morita-t@ttck.keio.ac.jp）

講演番号：2E6a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E6 会場

Shewanella oneidensis の電極バイオフィルム形成制御における鞭毛の関与
Involvement of flagella in the control of electrode biofilm formation in Shewanella oneidensis.
○出水 智樹、松元 陽歩、高妻 篤史、渡邉 一哉（東京薬科大学院生命）
○Tomoki DEMIZU, Akiho MATSUMOTO, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

微生物電気化学技術（MET）における電流生成には、電気化学活性細菌（EAB)が電極上に形成するバイオフィルム（電気化学活性バイオフィルム; EABF）が重要な役割を果たす。我々は EABF の形成機構を明らかにするため、モデル EAB である *Shewanella oneidensis* MR-1 株の EABF を観察し、その構造が培地流動の有無により変化することを発見した（Kitayama et al., 2017, AEM 83:e00903-17)。また、培地流動条件では c-di-GMP の合成酵素遺伝子（*dgcS*）の発現が上昇し、これにより EABF 形成と電流生成が促進されることを明らかにした（Matsumoto et al., 2020, AEM 87:e00201-21)。しかし、MR-1 株がどのように培地流動を感知し、*dgcS* の発現を制御しているのかは未解明である。そこで本研究では MR-1 株における EABF 形成制御機構を解明するため、*dgcS* の発現に影響を与える制御因子を探索した。

dgsS 上流には σ^{54} の結合モチーフが存在すること、および培地流動条件では *dgcS* とともに鞭毛合成遺伝子の発現が誘導されることから、鞭毛合成に関与する σ^{54} 依存性転写因子である FlrA が *dgcS* の発現に関与すると予想された。そこで *flrA* の破壊株（Δ*flrA*）を作製した結果、Δ*flrA* では野生株と比べて *dgcS* の転写量が著しく減少すること、および EABF 内の菌体密度が低下することが示された。次に、鞭毛が培地流動の感知と *dgcS* の発現に関与するかを検証するため、鞭毛構造タンパク質の欠損株（FFM）を作製した。その結果、FFM では野生株と比べて培地流動の有無に関わらず *dgcS* の転写量が著しく上昇することが明らかになった。以上の結果から、培地流動の感知と *dgcS* の発現に鞭毛と FlrA を介したシグナル伝達系が関与していることが示唆された。

This study aims to elucidate how a model electrochemically active bacterium, *Shewanella oneidensis* MR-1, regulates the formation of electrochemically active biofilms (EABF) through the expression of the c-di-GMP synthase gene, *dgcS*. We have previously reported that MR-1 activates the expression of *dgcS* under medium-flow conditions, resulting in the facilitation of EABF formation (Matsumoto et al., 2020, AEM 87:e00201-21). In the present study, we found that the expression of this gene was impaired by the loss of FlrA, the σ^{54}-dependent transcriptional regulator that activates the transcription of flagellar biosynthesis genes. We also revealed that the loss of the flagellar filament proteins, FlaA and FlaB, resulted in the activation of *dgcS* expression, regardless of the presence or absence of medium flow. These results suggest that flagella play a key role in sensing the extracellular environment and signaling for EABF formation in *S. oneidensis* MR-1.

Shewanella oneidensis, biofilm, flagellum

講演番号：2E6a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E6 会場

Shewanella oneidensis MR-1 株における c-di-GMP シグナルによる電気化学活性バイオフィルムの活性化
Activation of electrochemically active biofilms by c-di-GMP signaling in *Shewanella oneidensis* MR-1
○岩波 奈那江、松元 陽歩、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Nanae IWANAMI, Akiho MATSUMOTO, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】微生物電気化学技術（MET）は電気化学活性細菌（EAB）と電極との電気化学的相互作用を利用したシステムであり、廃水処理や有用物質生産などへの応用が期待されている。MET の高性能化には EAB が効率よく電極上にバイオフィルム（電気化学活性バイオフィルム; EABF）を形成することが鍵となる。これまでの研究により、我々は EAB のモデル生物である *Shewanella oneidensis* MR-1 株の EABF 形成において、c-di-GMP 合成酵素（DgcS; SO_1646）が重要な役割を果たすことを明らかにした（Matsumoto et al., 2021, AEM 87:e00201-21）。本研究では、MR-1 株の EABF 形成を促進させるため、*dgcS* 過剰発現株（*dgcS*-OE 株）を作製し、細胞内 c-di-GMP 濃度、遺伝子発現、および EABF の活性に与える影響を評価した。
【結果】電気化学フローセルにおいて *dgcS*-OE 株を培養した結果、本株では野生株よりも細胞内 c-di-GMP 濃度、EABF 形成量、および電流生成量が顕著に増加しており、c-di-GMP の合成促進によって MR-1 株の EABF 形成と電流生成を活性化できることが示された。また、トランスクリプトーム解析の結果、*dgcS*-OE 株においては type IV pili 合成遺伝子や細胞外シトクロム *c* 遺伝子（mt*rCAB* および *omcA*）の発現量が有意に増加していることが明らかになった。これらの結果は、*dgcS* の過剰発現と細胞内 c-di-GMP レベルの上昇が電極への付着および電子伝達に関与する遺伝子の発現を誘導し、これにより EABF の形成と電流生成が促進されたことを示している。今後は MR-1 株における c-di-GMP シグナル伝達カスケードの解明を目指す予定である。
Microbial electrochemical technology (MET) has attracted attention as a sustainable biotechnology. In MET, biofilms formed by electrochemically active bacteria (EAB) on electrodes (electrochemically active biofilms; EABF) facilitate electron transfer between microbial cells and electrodes, contributing to the enhancement of target bioelectrochemical reactions. We have previously reported that a diguanylate cyclase, DgcS (SO_1646), plays an important role in EABF formation by a model EAB, *Shewanella oneidensis* MR-1 (Matsumoto et al., 2021, AEM 87:e00201-21). In the present study, we showed that the overexpression of *dgcS* led to increased intracellular c-di-GMP levels, resulting in enhanced EABF formation and current generation in electrochemical flow cells (EFCs). Furthermore, we found that *dgcS* overexpression upregulated genes related to type IV pili synthesis and extracellular electron transfer. These results suggest that c-di-GMP-associated signaling activates the expression of genes involved in attachment and electron transfer to electrodes.

Shewanella oneidensis MR-1, c-di-GMP, biofilm

発表責任者：高妻篤史（akouzuma@toyaku.ac.jp）

講演番号：2E6a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E6 会場

Ideonella sakaiensis における MHETase と TPA 代謝遺伝子の発現解析

Regulation of the expressions of MHETase and TPA metabolizing genes, which is involved in the degradation of PET, in *Ideonella sakaiensis*

○田中 裕也[1]、平賀 和三[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Yuya TANAKA[1], Kazumi Hiraga[1], Masayuki Inui[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST・BIO)

【目的】我々は海洋生分解性プラスチックの生分解研究開発に取組んでいる。近年ポリエチレンテレフタレート(PET)を分解、資化する細菌として *Ideonella sakaiensis* 201-F6 が見出され分解酵素の研究が進められているが、発現制御の研究は進んでいない。そこで *I. sakaiensis* 201-F6 における PET 分解酵素関連遺伝子の発現制御を研究し、プラスチック分解への応用を目指す。
【方法と結果】PET 代謝酵素遺伝子のプロモーター領域と結合する転写因子を探索し、MHETase プロモーターDNA と結合する転写因子として MRP を見出した。*mrp* 遺伝子の破壊により MHETase、テレフタル酸 (TPA)代謝遺伝子の発現誘導が消失したが、PETase の発現誘導に影響は見られなかった。*In vitro* 解析で MRP タンパクは MHETase、TPA 代謝オペロンのプロモーターDNA と結合したが、PETase プロモーターDNA には結合しなかった。また、MRP の結合は TPA により促進された。以上の結果から MRP は MHETase、TPA 代謝オペロンの転写アクチベーターとして機能することが示唆された。

[Purpose] *Ideonella sakaiensis* 201-F6 is a bacterium that can use polyethylene terephthalate (PET) as its major energy and carbon source. The degradation of PET requires two enzymes, PETase and MHETase. Previous studies have focused on the enzymatic properties, structure, and mechanism of action of PETase and MHETase. However, the regulation of these gene expression has not been investigated. Therefore, we investigated the regulation of PET metabolizing gene expression in *I. sakaiensis*.
[Methods and results] We identified a protein that binds to the MHETase promoter DNA, MHETase gene-regulating protein (MRP). The induction of the MHETase gene was abolished by deletion of the *mrp* gene, while the expression of the PETase gene was maintained. The genes involved in terephthalate (TPA) metabolism were also not induced in the *mrp* mutant. MRP bound to the promoter regions of the MHETase gene and TPA metabolizing genes, but not to the PETase promoter. These results suggest that MRP is a transcription factor that activates MHETase and TPA-metabolizing genes in response to the cell TPA levels.

Ideonella sakaiensis, PET, regulation

講演番号：2E6a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E6 会場

大腸菌における機能未知転写因子 YegW による新規グリコーゲン代謝制御

Novel regulation of glycogen metabolism by function unknown transcription factor YegW in *Escherichia coli* K-12

○齋藤 駿介[1]、小林 一幾[1]、保科 元気[2]、島田 友裕[1] ([1]明治大農、[2]法政大生命)
○Shunsuke SAITO[1], Ikki KOBAYASHI[1], Motoki HOSHINA[2], Tomohiro SHIMADA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Hosei Univ.)

多くのバクテリアにおいて、グルコースの貯蔵形態であるグリコーゲンは、過剰な炭素源の存在下において増殖の停止に伴って蓄積することが知られている。本研究では大腸菌の機能未知転写因子 YegW の結合部位を同定した結果、*yegTUV* オペロンが大腸菌ゲノム上の単一標的であることが明らかになった。*yegV* がグリコーゲンの前駆体である ADP-グルコース（ADPG）への関与が示唆されていたため、YegW のグリコーゲン代謝への関与を検証した。様々な *in vivo* および *in vitro* 実験による検証の結果、YegW は恒常的に細胞辺り約 10 分子程度発現し、*yegTUV* のリプレッサーとして働くこと、また、エフェクターとして ADPG を感知する単一標的転写因子であることが示された。さらなる解析の結果、YegW は増殖相非依存的にグルコース濃度に応じてグリコーゲンの蓄積を抑制することが明らかになった。グルコース最少培地では、*yegW* 欠損株はグリコーゲン蓄積を促進したが、その代償として細胞増殖は不良であった。これらの結果から、YegW は ADPG を感知し、細胞に利用可能なグルコースの量に応じてグリコーゲンの蓄積を抑制する単一標的転写因子であると結論づけた。我々は、YegW を GgaR（repressor for glycogen accumulation）と命名することを提案する。

Glycogen, the storage form of glucose, accumulates upon growth arrest under the presence of excess carbon source in *Escherichia coli* as well as many other bacteria. Chromatin immunoprecipitation screening for the binding site of a function unknown transcription factor, YegW, revealed the *yegTUV* operon is its single-target on the *E. coli* genome. The previous study suggests *yegV* involvement in ADP-glucose (ADPG), the precursor of glycogen. Validation through various *in vivo* and *in vitro* experiments show that YegW is a single-target transcription factor that acts as a repressor for *yegTUV*, with an intracellular concentration of about 10 molecules through cell growth, and senses ADPG as an effector. Further analysis revealed that YegW repressed glycogen accumulation in response to glucose concentration, not accompanied by a change in growth phase. In glucose minimal medium, *yegW* deficient strain promoted glycogen accumulation, but at the expense of poor cell proliferation. Taken together, we conclude that YegW is a single-target transcription factor that senses ADPG and represses glycogen accumulation in response to the amount of glucose available to the cell. We propose renaming YegW as GgaR (repressor for glycogen accumulation).

Gyocogen, *Escherichia coli*, Transcription factor

講演番号：2E6a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E6 会場

The phosphorylation status of the three-component phosphoprotein TcmV is responsive to the light reaction electron transfer in a cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

○Xuan HUANG[1,2], Hitomi IMAMITSU[1,2], Ying LUO[1,2], Kan TANAKA[2] ([1]Life. Sci. Tech., Tokyo Tech, [2]Chem. Life. Sci., Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

A regulatory module PSRS (Partner-Switching Regulatory System) is composed of a phosphoprotein (RsbV), a cognate kinase (RsbW), and a phosphatase (RsbU), which is known to regulate an alternative sigma factor SigB activity in *Bacillus subtilis*. Although the presence of the corresponding module, TcmV/W/U, as well as the regulatory target sigma factor SigF1 were identified in a cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, whether these factors function similarly or not remains largely elusive. In this study, we analyzed the phosphorylation status of the phosphoprotein TcmV by phos-tag-SDS-PAGE analysis and found that the phosphorylated TcmV accumulated under illumination and disappeared under dark. DCMU and DBMIB, which inhibit the photosynthetic electron transfer, as well as the membrane uncoupler CCCP resulted in the TcmV dephosphorylation, suggesting the involvement of the light reaction process in the regulation. On the other hand, the *pilA* transcript accumulation that is under the control of SigF1 correlated with the TcmV phosphorylation status, suggesting the interrelationship. In the meeting, we will present lines of evidence supporting the regulatory connection.

cyanobacteria, phosphorylation, signal transduction

発表責任者：Xuan HUANG（xyeah777@gmail.com）

講演番号：2E6a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 E6 会場

大腸菌における翻訳促進新生ペプチドの網羅的探索

Screening of translation enhancing nascent peptides in *Escherichia coli*

○加藤 晃代[1]、西河 佑馬[1]、中野 秀雄[1]、横山 源太朗[2,3]、浜田 道昭[2,3]、本野 千恵[2,4] ([1]名大院生命農、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大院先進理工、[4]産総研細胞分子)
○ Teruyo KATO[1], Yuma NISHIKAWA[1], Hideo NAKANO[1], Gentaro YOKOYAMA[2,3], Michiaki HAMADA[2,3], Chie MOTONO[2,4] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ, [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ, [4]CMB,AIST)

微生物や動植物細胞によるタンパク質生産は、バイオ研究のみならず産業の発展に欠かせない基盤技術の一つであり、生産効率の向上は最も重要な課題のひとつである。SKIK ペプチドタグは、大腸菌や酵母の翻訳効率を向上し生産困難な難発現タンパク質の生産量を増大させることのできる配列として当研究グループにより見出されたものであるが、その翻訳促進機構の解明を進める中で、最近、リボソームの停滞を引き起こす新生鎖アレストペプチドによる翻訳停滞効果を打ち消せることが明らかとなった。そこで、本研究では、アレストペプチドによるリボソームの翻訳停滞を打ち消せるペプチドを翻訳促進新生ペプチド（Translation Enhancing nascent Peptide, TEP）と称し、大腸菌 in vivo の系における TEP の網羅的探索を行った。その結果、10 の 5 乗以上のランダムペプチドライブラリから SKIK 以外の新規かつ強度の異なる TEP に加え、アレストペプチドの翻訳停滞効果を強めると考えられる配列を複数取得した。現在、得られた配列データの特徴を解明すべく、インフォマティクス解析を進めている。

Protein production by microorganisms or some other eucaryotic cells is a fndemental technology not only for biotechnology research but also for industrial development. The SKIK peptide tag was discovered by our research group as a sequence that can increase the production of difficult-to-express proteins in *E. coli* and yeast by improving translation efficiency of the target genes. While elucidating the mechanism, we recently have found that SKIK peptide can counteract the effect of the arrest peptides (APs) which cause ribosomal stalling as the nascent state. In this study, we defined such peptides as Translation Enhancing nascent Peptides (TEPs) and conducted a comprehensive screening for TEPs in an *E. coli* in vivo system. As a result, we obtained new and various TEPs with different enhancing strength from more than 10^5 of random peptide libraries, in addition to the peptides which strengthen the effect of APs. Now the bioinformatics characterization of the obtained sequences is in progress.

Protein production, Translation, *Escherichia coli*

発表責任者：加藤　晃代（teruyo@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2E6a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 E6 会場

Role of *Ke*-GroESL Chaperonin in Acetic Acid Bacterium *Komagataeibacter europaeus*: Stress Response and Heterologous Protein Stabilization

○Princessa Aulia Rahmayuliana[1], Yuya Tanakura[1], Soichiro Ikuta[2], Shinsuke Fujiwara[1,2] ([1]Dept. of Biosci., Grad. Sch. of Sci. and Technol., Kwansei-Gakuin Univ., [2]Dept. of Biosci., Sch. of Biol. and Environ. Sci., Kwansei-Gakuin Univ.)

[Research Objective] Acetic acid bacteria grow in a low pH environment and its intracellular pH decreases during growth. Molecular chaperonins (GroESL) are considered crucial for maintaining intracellular proteins across a wide pH range, stabilize the protein in its native form. To characterize the stress response of the groESL gene in the acetic acid bacteria *Komagataeibacter europaeus*, the expression profile of the *Ke-groESL* gene was examined through a reporter assay. Additionally, the *Ke-groESL* gene of this bacterium was expressed in *E. coli*, and its impact on stabilizing heterologous proteins was assessed.
[Experimental Methods] Induction profiles of the *Ke-groESL* in response to stress were monitored using the GFP gene as a reporter. The effect of the *Ke*-chaperonin (*Ke*-GroESL) on the solubilization of co-expressed heterologous proteins in *E. coli*, under the control of an arabinose-inducible promoter, was also examined.
[Results and Discussion] The *Ke-groESL* promoter in *K. europaeus* exhibited increased induction with higher concentrations of ethanol and acetic acid, as well as temperature stress. The combined effect of these stressors further pronounced the induction, indicating that *Ke-GroESL* plays a crucial role in maintaining intracellular protein stability in *K. europaeus*. When comparing the expression levels of *Ke*-GroESL and *E. coli Ec*-GroESL in *E. coli* cells, *Ke*-GroESL showed a lower expression level, likely due to codon usage differences. Co-expression of *Ke*-GroESL was examined for low pH dependent arginine decarboxylase from *Aspergillus oryzae* in *E. coli*, resulting in a slight promotion in the amount in the soluble fraction.

acetic acid bacteria, chaperonin, protein solubilization

発表責任者：Fujiwara Shinsuke（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：2E6a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 E6 会場

ポリシストロニック遺伝子の短鎖連結発現に影響する配列因子の解析
Sequence factors that effect on expression of short spacer-linked polycistronic genes
大﨑 南美[1]、戸下 侑大[2]、大城 隆[2,3]、○鈴木 宏和[2,3] ([1]鳥取大院・持続創生、[2]鳥取大・工、[3]鳥取大・GSC)
Minami Osaki[1], Yudai Toshita[2], Takashi Ohshiro[2,3], ○Hirokazu Suzuki[2,3] ([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ., [3]GSC, Tottori Univ.)

我々は，ポリシストロニック遺伝子を高効率かつ調節しながら発現させる方法を研究している。モデル配列（*lacZ-gfp*）を用いた大腸菌の実験では，シャイン・ダルガノ（SD）配列を含む 11 塩基の短鎖配列で遺伝子間を連結すると，下流の *gfp* 遺伝子も効率よく発現することを見出した。その際の *gfp* 発現量は，*gfp* 遺伝子を単独で発現させた場合の約 80%であった。この現象を詳細に解析することを目的とし，本研究では連結配列を変えた場合，またはモデル遺伝子を変更した場合に，下流遺伝子の発現がどのように変化するかを調べた。連結配列中の SD 配列と *gfp* の開始コドンまでの塩基数には最適数があり，それより長くすると長さに応じて *gfp* 発現効率が低下した。短くても効率は下がり，直結するとほとんど発現しなくなった。*lacZ* の終止コドンと SD 配列までの塩基数は，あまり影響しなかった。上流遺伝子を *lacZ* から mCherry 遺伝子に変えると，*gfp* の発現量は単独発現の場合の約 2 倍になった。本結果は，連結配列の工夫により様々な下流遺伝子を効率よく発現させられることを示唆する。さらに無作為な連結配列で *lacZ* と *gfp* を連結すると，各場合によって *gfp* 発現量が大きく異なった。よって下流遺伝子の発現量は連結配列によって調節できる可能性がある。現在，gfp 遺伝子を上流にした場合などを解析している。

We have studied short linker sequences that are arranged between polycistronic genes and cause efficient and/or modulated expression of downstream genes. Model experiments were previously examined using *lacZ-gfp* polycistronic genes, which were expressed in *Escherichia coli*. The experiment revealed that *gfp* was efficiently expressed when the genes were linked with an eleven-nucleotide sequence that contained the Shine-Dalgarno (SD) sequence. *gfp* expression was 80% of that in a monocistronic manner. In this study, we analyzed more diverse short linkers with another model gene. When the length of short linkers between the SD sequence and the start codon of *gfp* were varied, *gfp* expression was strongly affected with an optimal length. Longer linkers decreased *gfp* expression; direct linkage caused slight *gfp* expression. In contrast, the length between the stop codon of *lacZ* and SD sequence had negligible effects. We also examined expression of mCherry-*gfp* polycistronic genes that were linked with the eleven-nucleotide sequence. In this case, *gfp* was expressed with an efficiency of 200%, suggesting that the linker can express diverse downstream genes. We further analyzed *lacZ-gfp* polycistronic genes linked with random linker sequences. The clones expressed *gfp* with diverse efficiency, suggesting that expression of downstream genes may be modulated by linker sequences.

expression, linker, polycistronic

発表責任者：鈴木 宏和（hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2E6a14
講演日時：3 月 25 日 12:09～ 1 号館 E6 会場

大腸菌 BasS/BasR-CsgD カスケードを介する Fe^{3+}依存的な curli 合成と Fe^{3+}-シデロフォア輸送系の発現制御機構

Regulatory mechanism involved in gene expression of Fe^{3+} dependent Curli systhesis and Fe^{3+}-siderophore transport system via BasS/BasR-CsgD cascade in *Escherichia coli*

○松吉 志[1,2]、小笠原 寛[2,3,4,5] ([1]信州大院・総理工、[2]信州大・基盤研究セ、[3]信州大・総合人間科学、[4]RCAM、[5]IFES)
○ Nozomi MATSUYOSHI[1,2], Hiroshi OGASAWARA[2,3,4,5] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shinshu Univ., [2]Division of Gene Research, Shinshu Univ., [3]Academic Assembly School of Humanities and Social Sciences Institute of Humanities, Shinshu Univ., [4]RCAM, [5]IFES)

大腸菌やサルモネラ菌が生産するアミロイド線維 Curli は、バイオフィルム形成初期の固体表面への付着や細菌同士の凝集において重要な役割を果たす。Curli の形成には *csgBAC* および *csgDEFG* から構成される *csg* 遺伝子群が関与し、それらの発現には転写因子 CsgD が必須である。以前の研究で我々は、Fe^{3+}-エンテロバクチン輸送体をコードする *fepDGC* が、CsgD の支配下遺伝子であることを見出し、バイオフィルム形成過程における Fe^{3+}取り込み機構と Curli 形成機構との関連性が示唆された。本研究では、CsgD による *fepDGC* 発現制御の詳細を明らかにすることを目的とした。

fepD プロモーターをプラスミド上で *lacZ* に融合し、*fepD* 発現を調べたところ、1mM $FeCl_3$ 存在下において観察される野生株での *fepD* 発現誘導が、*csgD* 欠損株で著しく低下し、その発現は、*csgD* の Fe^{3+}依存的な発現誘導に関与する二成分制御系 BasS/BasR 依存的であることが確認された。Gelshift assay において、CsgD は *fepD* プロモーターに特異的に結合し、1mM $FeCl_3$ 存在下で観察される野生株での Curli 形成量、およびバイオフィルム形成量の増加は *basS, basR, fepD* の各欠損株で著しく減少した。以上の結果より、BasS/BasR-CsgD カスケードによる *fepDGC* 発現制御が、Fe^{3+}存在下における大腸菌のバイオフィルム形成において重要な役割を担っていることが明らかになった。

Amyloid curli fibrils produced by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* play an important role in bacterial adhesion to solid surfaces and in bacterial aggregation during the early stages of biofilm formation. *csg* genes are involved in curli formation and CsgD is essential for its expression. FepDGC is inner membrane transporter protein involved in the uptake of Fe^{3+}-enterobactin complexes from the outside of the bacterial cells into the cytoplasm. In this study, we aimed to analyze the interaction between CsgD and the *fepD* promoter region and to analyze CsgD-dependent *fepDGC* gene expression.

The *fepD* promoter was fused to the *lacZ* gene of plasmid pRS551 to create pRSfepDp, which was transformed into wild-type *E. coli* (BW25113) and a *csgD* -deficient strain. The *fepD* promoter activity in the *csgD* -deficient strain was significantly reduced compared to that in the wild-type strain. Also, the *fepD* promoter activity was decreased in the *basS* - and *basR* -deficient strains, suggesting that BasS/R, a two-component regulatory system that senses Fe^{3+}, is involved in *fepDGC* gene expression as an factor in the upstream of the cascade. All three mutant (*basS*, *basR* or *fepD* -deficient strains) showed significantly decreased Curli formation and biofilm formation, respectively.

Escherichia coli, biofilm, curli

講演番号：2E6p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 E6 会場

急性脳症事件を引き起こしたスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）の子実体および菌糸体の RNA-Seq 解析

RNA-Seq analysis of the fruiting bodies and the mycelia of *Pleurocybella porrigens*, angel-wing mushroom causing acute encephalopathy

○渡邊 望[1]、佐藤 匠[1]、三ッ國 佳祐[1]、小野 晶子[1,2]、鈴木 智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ、[2]森林総合研究所）
○ Nozomu WATANABE[1], Takumi SATO[1], Keisuke MITSUKUNI[1], Akiko ONO[1,2], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]FFPRI)

Pleurocybella porrigens（スギヒラタケ）は、キシメジ科スギヒラタケ属に属するキノコであり、主に北半球の温帯地域に広く分布し、スギ、マツ等の針葉樹の切り株や倒木に発生する。またその子実体は、古くから世界中で食されてきたが、2004 年に *P. porrigens* の摂取による食中毒が日本で 59 件報告され、そのうち 17 名が急性脳症で死亡した。我々は、2013 年に Illumina Genome Analyzer（GAIIx）を用いて *P. porrigens* のゲノムデータおよび子実体と菌糸体のトランスクリプトームデータを報告した [1)]。また、2023 年には、スギヒラタケレクチン（PPL）とプレウロサイベリン（PC）の複合体が血液脳関門に障害を引き起こすこと、*P. porrigens* 由来の新規低分子化合物であるプレウロサイベルアジリジン（PA）がマウスに脳障害を引き起こすことを明らかにした [2)]。本研究では、*P. porrigens* の子実体および菌糸体のトランスクリプトームデータの再取得・精度の向上を目的とし、次世代シーケンサー（Illumina NovaSeq 6000）を用いた解析を行った。Trinity によるアセンブリの結果、N50 値は 2013 年の報告と比較して、子実体では 3.2 倍の 3,384 bp、菌糸体では 5.0 倍の 3,154 bp と上昇した。また、子実体および菌糸体の発現差解析の結果、子実体では 1,937 個、菌糸体では 1,555 個の発現変動遺伝子が検出された（LogFC>|1|, FDR<0.05）。

The mushroom, *Pleurocybella porrigens* belongs to the family Tricholomataceae and is widespread throughout the temperate regions of the world. However, in autumn 2004, 59 incidents of food poisoning were reported, and 17 people among them died from acute encephalopathy in Japan. To date, we reported genome and transcriptome data of the fruiting bodies and mycelia by Illumina Genome Analyzer (GAIIx). In addition, in 2023, we proved three components of this mushroom, a lectin (PPL) and pleurocybelline (PC), and pleurocybellaziridine (PA), causes damage to the mice brain. In order to reacquire highly accurate transcriptome data of this mushroom, we conducted next-generation sequencing by Illumina NovaSeq 6000 on its fruiting bodies and mycelia in the present study. The results of *de novo* assembly using Trinity indicated that the N50 value of the fruiting bodies (3,384 bp) and the mycelia (3,154 bp) were increased compared with our previous report. Differential expression analysis revealed that 1,937 and 1,555 genes were significantly up-regulated in the fruiting bodies and the mycelia, respectively.

1) Suzuki, T*, et al, PLoS One*, 8(7):e69681 (2013), 2) Suzuki T, *et al, Toxicon*, 221, 106958 (2023)

Pleurocybella porrigens, RNA-Seq, acute encephalopathy

発表責任者：渡邊 望（dc237123@s.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2E6p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E6 会場

サナギタケのレクチン遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis of lectin gene-knockout strains of the mushroom *Cordyceps militaris*.

○松田 里菜[1]、張 吉麗[1]、佐藤 匠[1]、三ッ國 佳祐[1]、茅谷 佳祐[1]、小野 晶子[2]、鈴木 智大[1]([1]宇都宮大・バイオ、[2]森林総合研究所)
○Rina MATSUDA[1], Jili ZHANG[1], Takumi SATO[1], Keisuke MITSUKUNI[1], Keisuke KAYATANI[1], Akiko ONO[2], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]FFPRI)

冬虫夏草は昆虫などから生じる昆虫病原性真菌類で、その一種であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*）は鱗翅目昆虫の蛹に寄生する。本研究室の先行研究の結果から、サナギタケ由来のレクチン（CmLec4 と命名）が昆虫表皮に存在するキチンを特異的に認識すること、本レクチンが宿主であるカイコ蛹への感染・宿主認識に重要な役割を担っている可能性が示唆された[1)]。また、これまでの報告で、昆虫病原性真菌類はその宿主範囲が広くなるほど遺伝子数が増加することが明らかになっており、レクチン遺伝子数も増加することが報告されていることから[2)]、これらレクチン遺伝子が昆虫病原性真菌類の宿主範囲の決定に寄与しているのではないかと推察している。

そこで本研究では、*cmlec4* の遺伝子破壊に伴う発現変動遺伝子を決定するため、野生株と先行研究で作成済みの *cmlec4* 遺伝子破壊株を用い、カイコ蛹への接種実験と子実体形成能評価を行うとともに、野生株および遺伝子破壊株の各生育段階（感染初期としてサナギタケの分生子を接種後 2 週間後のカイコ蛹と子実体形成期としてサナギタケ接種後 6 週間のカイコ蛹）の検体から RNA を抽出し RNA-Seq 解析を行った。現在、詳細な解析を行っている。

To date, we found that novel *C. militaris* lectin, named CmLec4, specifically recognizes chitin oligosaccharides and plays an important role in host infection of this fungus[1)]. Furthermore, Xiao G et al. reported that the number of genes of entomopathogenic fungi, including lectin genes, increases as the host range expands[2)]. From our findings and previous study, it is possible that lectin genes might contribute to the determination of the host range of entomopathogenic fungi. To investigate the function of the *cmlec4* gene, knockout strains were constructed in this study. The results of fruiting bodies formation of wild-type and knockout strains indicated that *cmlec4* gene knockout strains produced markedly lower amounts of fruiting body than the wild-type strain. Furthermore, RNA-seq analysis was performed on wild and knockout strains at two growth stages (early stage of infection; the pupae cultured for 2 weeks after inoculation of conidia, fruiting body formation; the fruiting bodies developed from pupae at 6 weeks after inoculation of conidia) in order to identify differentially expressed genes between these two strains.

1) Ono A et al. *Int. J. Biol. Macromol.* 215, 303-311(2022),
2) Xiao G et al., *Scientific reports*, 2, 483 (2012)

Cordyceps militaris, lectin, RNA-Seq

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2E6p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E6 会場

エリスリトールの誘導性プロモーター及び資化性低減株を組み合わせた糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるタンパク質生産技術の構築

Development of protein production technology by combination of erythritol-inducible promoter and erythritol metabolic engineered strain in *Trichoderma reesei*

○一瀬 桜子、柴田 望、高橋 史員、小山 伸吾（花王）
○Sakurako ICHINOSE, Nozomu SHIBATA, Fumikazu TAKAHASHI, Shingo KOYAMA (Kao Corp.)

糖化酵素の生産宿主として利用されている糸状菌 *Trichoderma reesei* は、その高いタンパク質生産能力を活かして、多様なタンパク質生産の宿主としての利用が期待されている。我々はこれまでに、エリスリトール誘導性プロモーターを獲得し、本プロモーターを用いてタンパク質生産を検討した(1)。その結果、*T. reesei* はエリスリトールを資化できるため、誘導プロモーターの発現が持続せず、タンパク質の生産量が低くなることが分かった。そこで、エリスリトールによって誘導される遺伝子である *Tr*122079、*Tr*68466、*Tr*68606、*Tr*68585 の遺伝子欠損株を構築し、エリスリトールの資化性を解析した。その結果、親株と比較して全ての欠損株でエリスリトールの消費速度の低下及び菌体内でのエリスリトールの蓄積が観察されたことから、これらの欠損させた遺伝子はエリスリトール代謝に関わっていることが明らかになった。さらに、これらの遺伝子欠損株において、エリスリトール誘導発現遺伝子の発現量が親株と比較して高い値を示すことに加えて、発現の持続性が著しく向上していた。そこで、遺伝子欠損株においてエリスリトール誘導性プロモーター用いてタンパク質生産を検討した結果、親株と比較してタンパク質生産性が著しく向上した。以上の結果から、エリスリトール代謝遺伝子欠損株とエリスリトール誘導性プロモーターを組み合わせることで、単一タンパク質を高生産できる可能性が示唆された。(1) 一瀬ら、第 75 回日本生物工学会大会、1Jp13

Filamentous fungi *Trichoderma reesei* is widely used as a host for cellulase production and it also has potential for various protein production. Previously, we have acquired erythritol-inducible promoters and examined protein production using the erythritol-inducible promoters(1). Then, we found that *T. reesei* can utilize erythritol as a carbon source, so the expression of the inducible promoter is attenuated, resulting in low protein production. To elucidate the metabolic pathway of erythritol, we constructed deletion strains of genes induced by erythritol and found that the strains showed lower erythritol utilization and lasting expression. When using the metabolic engineered strains with the erythritol-inducible promoter, protein production were significantly improved compared to the parent strain. The combination of erythritol metabolic engineered strains and erythritol-inducible promoter has potential for high yield protein production.
(1) Ichinose *et al.*, 75th SBJ Annual Meeting, 1Jp13

Trichoderma reesei, Erythritol

発表責任者：小山 伸吾（koyama.shingo@kao.com）

講演番号：2E6p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E6 会場

担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* のキシラナーゼプロモーターを活性化する制御因子（スイッチ）の同定

Identification of a regulator that activate xylanase promoter in basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*

○三浦 敦宏[1]、田中 拓未[1]、坂井 寛章[2]、田中 瑞己[3]、森田 友岳[4]、北本 宏子[1] ([1]農研機構・農環研、[2]農研機構・高分析研、[3]農工大院・農、[4]産総研・機能化学)
○Atsuhiro MIURA[1], Takumi TANAKA[1], Hiroaki SAKAI[2], Mizuki TANAKA[3], Tomotake MORITA[4], Hiroko KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]NAAC, [3]TUAT, [4]AIST)

担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* は、キシロース存在下でキシラナーゼ(Xyn)とエステラーゼ(PaE)を分泌する。PaE は、生分解性プラスチック分解活性を示し、寒天培地に混合した PBSA エマルジョンを分解して透明にし、野菜の生産に用いる生分解性プラスチック製フィルムも分解する。我々は、今までに Xyn プロモーター下流に PaE 遺伝子を接続した断片を導入した PaE を高生産するレポーター株を作出した。本研究では、Xyn プロモーターの転写活性化因子（スイッチ）を見出し、その遺伝子増幅による PaE の生産向上効果を報告する。
P. antarctica ゲノム配列情報を基に、子嚢菌の多糖分解酵素のスイッチでよくみられる Zn(II)2Cys6 ドメインを指標に 109 個の遺伝子候補をリスト化した。レポーター株を親株に、ゲノム編集技術で候補遺伝子を網羅的に破壊した菌株セットを作出した。このうち遺伝子 X を破壊した株だけが、PBSA エマルジョン培地上で、透明領域を作らなくなり、PaE 分泌能を失った。レポーター株に遺伝子 X を導入した株は、コピー数増加に伴い、PaE の転写量、酵素活性共に向上した。遺伝子 X は、担子菌で初めて見出された Xyn の転写活性化因子であり、子嚢菌で報告されているものと相同性が無い。

The basidiomycetous yeast Pseudozyma antarctica secretes xylanase (Xyn) and the biodegradable plastic-degrading enzyme PaE in the presence of xylose. We have generated a reporter strain that produces high levels of PaE by introducing a fragment of the PaE gene downstream of the Xyn promoter. In this study, we searched for a transcriptional activator (switch) gene of the Xyn promoter of P. antarctica. Based on the genomic sequence information of P. antarctica, 109 candidate genes with Zn (II) 2Cys6 domain were listed. The reporter strain was used as the parent strain, and a strain set in which candidate genes were comprehensively disrupted was generated. Only the strain in which gene X was disrupted stopped secreting PaE. On the other hand, the strain in which gene X was introduced into the reporter strain improved both the transcript level and the enzyme activity of PaE as the copy number increased.

basidiomycetous yeast, transcription factor, enzyme production

講演番号：2E6p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E6 会場

ウシグソヒトヨタケに保存されている光受容体の分光特性

Characterization of photoreceptors conserved in *Coprinopsis cinerea*

○伏見 圭司[1]、深澤 茉愛[2]、星野 宏季[2]、村口 元[3]、坂本 裕一[4]、成川 礼[2]([1]神戸大・イノベ、[2]都立大・理学、[3]秋田県大・生物資源、[4]岩手生工研・生物資源)
○ Keiji FUSHIMI[1], Mana FUKAZAWA[2], Hiroki HOSHINO[2], Hajime MURAGUCHI[3], Yuichi SAKAMOTO[4], Rei NARIKAWA[2] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Metropolitan Univ., [3]Akita Pref. Univ., [4]IBRC)

キノコは胞子、菌糸体、子実体（いわゆるキノコと呼ばれる生殖器官）の形態を繰り返す生活環をもち、子実体の形成には光が必須とされている。光は生物の生存に重要な要素の１つであり、多くの生物は光受容体の働きによって光の色（波長）や量（強度）を感知することができる。この光感知が生命現象を制御する分子機構の引き金となる。

キノコには短波長光感知型と長波長光感知型の光受容体が存在し、遺伝学的研究によって青色光が子実体の形成に重要であることが知られている。しかし、キノコの光受容体の分子機能は確認されておらず、決定的な分化誘導制御分子は未だ特定されていない。本研究では、モデルキノコのウシグソヒトヨタケ・一核性子実体形成株（#326 株）を対象にキノコの光受容体の分光特性を明らかにし、子実体の形成の謎を紐解くための糸口を掴むことを目的とした。

#326 株の短波長光感知型（CcDst1（CcWC-1）、CcDst2、CcWC-2）および長波長光感知型（CcFphA）の光受容体の配列情報を取得し、各々の構造と機能について検討したところ、いくつかの光受容体は光感知を示すことが確認された。また、#326 株の各生育段階の遺伝子発現量（Muraguchi, Hajime *et al.*, *PLOS ONE*, **10**(10), e0141586, 2015）から各光受容体の動態について考察した。

Light is necessary to form fruiting bodies in mushroom life cycle. Mushrooms conserve short- and long-wavelength-type photoreceptors (i.e., blue- and red-light sensors, respectively). It has been known that blue-light, not red-light, is involved in the formation of the fruiting bodies. However, the photobiological functions of the mushroom photoreceptors have not been analyzed *in vitro*. Furthermore, definitive active molecules that induce the formation of the fruiting bodies have not been found. To understand the molecular mechanism of the differentiation in fungi, we characterized the spectral properties of photoreceptors of the homokaryotic *Coprinopsis cinerea* strain *A43mut B43mut pab1-1* #326, known as a model mushroom.

We analyzed the structures and the functions of the short-wavelength-type (CcDst1 (CcWC-1), CcDst2 and CcWC-2) and long-wavelength-type (CcFphA) photoreceptors from the *C. cinerea* strain #326. As the results, some photoreceptors absorbed light. Furthermore, we considered the dynamics of the photoreceptors from their gene-expression levels at each developing stage of the mushroom (Muraguchi, Hajime *et al.*, *PLOS ONE*, **10**(10), e0141586, 2015).

mushroom, differentiation, photoreceptor

講演番号：2E6p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E6 会場

麹菌における CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を利用した多コピー遺伝子導入方法の確立
Establishment of a method for introducing multiple copies of genes into the genome with CRISPR/Cas9 in *Aspergillus oryzae*
○張 斯来、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農）
○Silai Zhang, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani (Tohoku Univ. Agri.)

【背景及び目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は組み換えタンパク質生産の宿主として利用されている。生産性向上の手段の一つとして、導入遺伝子の多コピー化がある。しかし、麹菌では導入 DNA 断片が染色体の 1 箇所にタンデムに挿入されることで多コピー化されるため、相同組み換えを介して繰り返し配列が脱落するリスクがある。そこで、本研究では一度の形質転換操作で染色体上の複数箇所に DNA 断片を挿入する方法の開発を試みた。
【実験方法・結果】 麹菌の染色体上には、DDE1 トランスポゾン様配列が 13 箇所存在する。この配列を標的として、CRISPR/Cas9 システムを用いて、目的遺伝子を多コピー導入できるか検討した。トランスポゾン様配列の中央付近を切断するように gRNA を設計し、切断点の上下 300 bp を含む配列をキシラナーゼ F1 遺伝子（xynF1）の発現カセットの両端に融合した DNA をドナーDNA として作製した。キシロース誘導性発現プロモーターの下流に融合した Cas9 遺伝子、ｇRNA 発現カセット、ドナーDNA、複製開始点 AMA1、選択マーカー遺伝子を含む一つのプラスミドとして構築した。このプラスミドを麹菌に導入し、Cas9 発現抑制条件（グルコース培地）でプロトプラストの再生を行った。得られた形質転換体を Cas9 発現誘導条件（キシーロス寒天培地）で 5 日培養した。その結果、xynF1 遺伝子が 13 箇所全てのトランスポゾン様領域に挿入されたことが確認された。
【今後の展望と考察】 今後は複数の遺伝子を同時に導入できるか検討する。複数導入できれば、一連の代謝経路の強化・導入株やタンパク質複合体の生産株、バイオマス分解酵素群の生産株などの作製を簡便に行えるようになると期待される。

The *A. oryzae* has been used as a host for recombinant protein production. One way to increase productivity is to create multiple copies of the transgene. However, in *A. oryzae*, since the transgene is multi-copied by tandem insertion of the transgene DNA fragments into one chromosomal location, there is a risk that repetitive sequences may be removed through homologous recombination. Therefore, in this study, we attempted to develop a method to insert DNA fragments at multiple locations on a chromosome in a single transformation operation.

A. *oryzae* has 13 transposon-like on its chromosome. We investigated the possibility of introducing multiple copies of the target genes to targeting these sequence using the CRISPR/Cas9 system.

Aspergillus oryzae, CRISPR/Cas9, multiple copies

講演番号：2E6p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E6 会場

麹菌における N-end rule の検証
Verification of N-end rule in *Aspergillus oryzae*
○田中 瑞己[1]、大庭 麻緒[2]、河原崎 泰昌[2]、山形 洋平[1] ([1]農工大院農応生化、[2]静県大食栄養)
○Mizuki TANAKA[1], Mao OHBA[2], Yasuaki KAWARASAKI[2], Youhei YAMAGATA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]Univ. of Shizuoka)

細胞内のタンパク質の安定性は、N 末端のアミノ酸に依存することが知られている。この機構は N-end rule と呼ばれ、ユビキチンリガーゼである UBR が中心的に働く。N-end rule は、様々な細胞機能の制御に関わり、生物種によってルール（分解を受けやすい N 末端アミノ酸）が異なることが知られている。麹菌 *Aspergillus oryzae* においても、UBR オーソログ（UbrA）を遺伝子破壊することでジ・トリペプチドトランスポーター遺伝子やペプチダーゼ遺伝子の発現が影響を受けることから、N-end rule が窒素代謝制御において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、糸状菌における N-end rule についてはこれまでに全く情報がない。そこで、本研究では麹菌における N-end rule の存在を明らかにすることを目的として検証を行った。
N-end rule の検証には、ユビキチン-GFP 融合タンパク質を用いた。この癒合タンパク質を細胞内で発現させると、ユビキチンが切断されて除去されるため、GFP の N 末端に異なるアミノ酸を露出されることが可能である。これまでに、チロシンを除く 19 種のアミノ酸について検証を行った結果、アルギニン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジンが N 末端である GFP が極めて不安定であることが示唆された。このことから、麹菌における N-end rule の存在が示された。
本研究は、公益財団法人前川報恩会学術研究助成の支援を受けて行われたものである。
The stability of intracellular proteins depends on their N-terminal amino acid residues. This mechanism is called the N-end rule, in which the ubiquitin ligase UBR plays a central role. N-end rule is involved in various cellular processes, and it is known that the rule (N-terminal amino acids susceptible to degradation) differs among species. In *Aspergillus oryzae*, the expression level of di/tri-peptide transporter and peptidase genes was affected by disruption of the UBR ortholog gene, suggesting that the N-end rule plays an important role in the regulation of nitrogen metabolism. However, there have been no reports on the N-end rule in filamentous fungi.
To examine whether the N-end rule is applicable in *A. oryzae*, we expressed ubiquitin-fused green fluorescent proteins (GFPs), which can express GFP with different N-terminal amino acids. We have verified 19 amino acids, excluding tyrosine, suggesting that GFP is extremely unstable when N-terminal with arginine, aspartic acid, phenylalanine, histidine, and lysine. This indicates that the N-end rule is applicable to *A. oryzae*.

Aspergillus oryzae, N-end rule, Ubiquitin

発表責任者：田中瑞己（mizuki-tanaka@go.tuat.ac.jp）

講演番号：2E6p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E6 会場

Pseudomonas sp. NGC7 株におけるフェルラ酸代謝系遺伝子群の転写制御システム
Transcriptional Regulation of the Ferulate Catabolism Genes in *Pseudomonas* sp. Strain NGC7

○大川 全[1]、樋口 雄大[2]、園木 和典[2]、上村 直史[2]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・物質生物、[2]弘前大・農学生命)
○Zen OOKAWA[1], Yudai HIGUCHI[2], Tomonori SONOKI[2], Naofumi KAMIMURA[2], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Hirosaki Univ.)

Pseudomonas sp. NGC7 株はフェルラ酸（FA)等のリグニン由来芳香族化合物の代謝能を持ち、リグニン分解物からポリマー原料を生産するプラットフォーム微生物として期待される。*Pseudomonas* 属において FA は Fcs、Ech、及び Vdh によって代謝される（Fig. 1A)。これらの遺伝子は MarR 型リプレッサーの *ferR* と共にクラスターを形成し、本遺伝子群は FerR に制御される。一方、NGC7 株では、推定 *ferR* (PSN_2461)は FA 代謝遺伝子群から離れて存在し、近傍には GntR 型制御因子の PSN_3323 が存在する（Fig. 1B)。本研究では NGC7 株における FA 代謝系遺伝子群の転写制御システムの解明を目的とした。転写解析の結果、*ech*、*vdh*、*fcs* は推定 FA トランスポーター遺伝子の *hcnK* 等と共にオペロンを構成し、本オペロンの転写は FA 培養時に誘導されることが示された。また本オペロンの転写は、PSN_3323 破壊株では野生株と同様の挙動であったが、*ferR* 破壊株では FA 非存在下で野生株の FA 誘導時と同等であった。以上の結果から、FA 代謝オペロンは FerR により負に制御されることが示された。本研究は JST 未来社会創造事業（JPMJMI19E2)の支援を受けて実施した。

Pseudomonas sp. strain NGC7 is expected to be a platform bacterium capable of producing building blocks for bio-based polymers from lignin degradation products. In *Pseudomonas*, ferulate (FA) is catabolized by Fcs, Ech, and Vdh. These three genes form a cluster with the MarR-type repressor gene *ferR* and are regulated by FerR. In NGC7, the putative *ferR* (PSN_2461) is located away from the FA catabolism genes, however, a GntR-type regulator PSN_3323 was found in their vicinity. This study aimed to elucidate the transcriptional regulatory system of the FA catabolism genes in NGC7. Transcriptional analyses showed that *ech, vdh,* and *fcs* constitute an operon, and expression of this operon was induced during growth in FA. The transcription behavior of this operon in the PSN_3323 mutant was similar to that of the wild type. However, the transcription level of the PSN_2461 mutant grown without FA was comparable to that of the FA-induced wild type. These results indicate that the FA catabolism operon is negatively regulated by FerR. This study was supported by JST-MIRAI program (JPMJMI19E2).

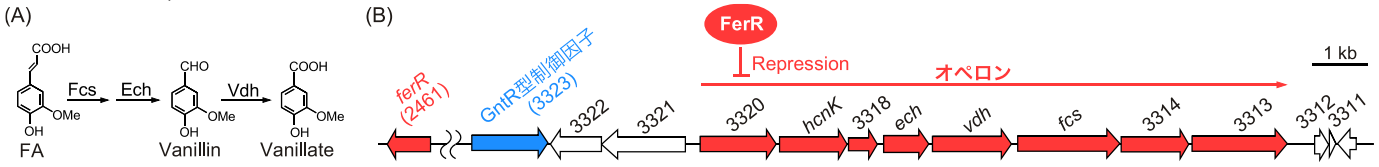


Fig. 1 (A) *Pseudomonas* sp. NGC7 株の FA 代謝経路、(B) 遺伝子マップ及び転写制御システム.

lignin, transcriptional regulator, *Pseudomonas*

発表責任者：政井英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2E6p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E6 会場

細菌におけるリグニン由来二量体芳香族化合物代謝系を包括的に制御する LigS の転写制御システム
Characterization of LigS, a comprehensive transcriptional regulator of lignin-derived dimer catabolic genes, in *Sphingobium lignivorans*

○加藤 諒[1]、Bleem Alissa[2]、Kuatsjah Eugene[2]、片平 類[2]、菱山 正二郎[3]、Beckham Gregg T.[2]、上村 直史[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・物質生物、[2]National Renewable Energy Laboratory、[3]森林総合研究所 森林資源科学研究領域)
○Ryo Kato[1], Alissa Bleem[2], Eugene Kuatsjah[2], RUI KATAHIRA[2], Syojiro HISHIYAMA[3], Gregg T. Beckham[2], Naofumi KAMIMURA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]National Renewable Energy Laboratory, [3]Department of Forest Resource Chemistry,Forestry and Forest Products ResearchInstitute)

Sphingobium lignivorans SYK-6 株は、様々なリグニン由来芳香族化合物を代謝可能であり、代謝中間体には機能性ポリマーの原料となる 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC)が存在する。そのため、本株を基盤としたリグニン由来芳香族化合物からの PDC 生産系の開発が期待される。SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系の大半が解明されてきたが、β-O-4 結合及びβ-1 結合を持つ二量体化合物(guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether [GGE], 1,2-diguaiacylpropane-1,3-diol [DGPD])の代謝酵素遺伝子の転写制御系は不明である。本研究では GGE 及び DGPD 代謝酵素遺伝子の転写制御系の解明を目的とした。今までに、TetR 型と MarR 型のモチーフを持つ転写制御因子 LigS が GGE と DGPD 代謝に関わる 13 遺伝子のうち 12 遺伝子を負に制御することを明らかにした。本研究では、LigS 制御下の 12 遺伝子の転写に関わる 8 つの推定プロモーター領域のうち、調査した 6 つの領域に LigS が直接結合することを明らかにした。さらに LigS の結合配列を明らかにした。現在、PDC 蓄積株の *ligS* を破壊することで GGE と DGPD からの PDC 生産速度が向上するのかを評価している。本研究の一部は、JST 共創の場形成支援プログラム JPMJPF2104 の支援を受けて実施した。

Sphingobium lignivorans SYK-6 is the best-characterized bacterium capable of degrading lignin-derived aromatic dimers and monomers. SYK-6 is a promising platform bacterium for producing a bio-based polymers building block , 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC), from lignin-derived aromatic compounds. To date, most SYK-6 catabolic systems of lignin-derived aromatic compounds have been clarified; however, the transcriptional regulatory system of the catabolism genes for dimeric compounds with β-O-4 and β-1 linkages (guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether [GGE] and 1,2-diguaiacylpropane-1,3-diol [DGPD], respectively) is unknown. Here, we aimed to elucidate the transcriptional regulatory system for the GGE and DGPD catabolism genes. We previously showed that LigS, a transcriptional regulator with TetR- and MarR-type motifs, negatively regulates 12 of the 13 genes involved in GGE and DGPD catabolism. In this study, we examined the binding of LigS to six of the eight putative promoter regions involved in the transcription of the 12 genes. The results showed that LigS binds to all of these promoter regions. The binding sequence of LigS was also identified. We are currently evaluating whether disruption of *ligS* in an SYK-6-derived PDC accumulating strain will promote PDC production from GGE and DGPD.

lignin, aromatic compounds, transcriptional regulator

講演番号：2E6p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E6 会場

メタン生成アーキアにおけるセレンタンパク質の転写はセレンによって制御される
Transcription of genes encoding selenoproteins in methanogenic archaea is regulated by selenium
○青野 陸[1]、小野田 幹久[1]、井上 真男[1,2]、越智 杏奈[1]、三原 久明[1] ([1]立命大・生命、[2]立命大・R-GIRO)
○Riku AONO[1], Mikihisa ONODA[1], Masao INOUE[1,2], Anna OCHI[1], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

セレンは第 16 族に属するカルコゲン元素であり、同族元素である硫黄と良く似た性質を示す。生体内においてセレンは、主にシステイン（Cys）の硫黄がセレンに置き換わったセレノシステイン(Sec) として存在し、機能している。セレンは全生物ドメインにおいて利用されており、アーキアにおいては、生命の起源に近いとされるメタン生成アーキアから、真核生物の祖先と考えられているアスガルドアーキアに至るまで、様々な生物がセレンを利用している。しかし、アーキアの生命活動にセレンがどのような影響を与えるかは不明な点が多い。本研究ではメタン生成アーキア *Methanococcus maripaludis* をセレン存在下で培養し、その影響を検討した。

まず、*M. maripaludis* の増殖に対するセレンの影響を検討したところ、セレン添加条件においても、本菌の最終到達濁度や比増殖速度に大きな差は見られなかった。メタン生成アーキアにおいて、Sec を含むタンパク質の多くは､唯一のエネルギー獲得手段であるメタン生成経路において機能する。一方、本菌には Sec が Cys に置換された Cys 型酵素群も重複して存在する。そこで、セレン添加による Sec 型および Cys 型酵素群の転写変動解析を行ったところ、セレン添加条件では Sec 型酵素群の細胞内 RNA 量が増加したのに対し、Cys 型酵素群は減少していた。セレノール基はチオール基に比べて、pK_a が低く求核性が高いことが知られている。そのため、今回の条件では増殖への影響は見られなかったが、セレン存在下においては、Cys 型と比べて求核性の高いセレノール基を有する Sec 型酵素群を優先的に利用することが示唆された。

Selenocysteine (Sec), an analog of cysteine (Cys), whose sulfur is substituted by selenium. Selenoprotein, which contains Sec residues, is distributed in all three domains including archaea. In this study, we examined whether *Methanococcus maripaludis*, a methanogenic archaea, respond to selenium. We did not observe difference in the growth phenotype of the microorganism even in the presence of selenium. In *M. maripaludis*, there are many proteins homologous to selenoproteins, whose Sec is substituted to Cys (Cys counterparts). When we added selenium to the medium, intracellular RNA levels of the selenoproteins increased, whereas those of the Cys counterparts decreased. Although difference in the growth phenotype was not observed, in the presence of selenium, *M. maripaludis* was suggested to utilize selenium as selenoprotein.

Selenium, Archaea, Gene expression

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2E6p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E6 会場

大腸菌の硫化水素応答性転写因子 YgaV は内在性硫化水素合成に依存して鉄の取り込みを制御する。

The H_2S-responsive transcriptional regulator YgaV regulates iron uptake in response to intracellular H2S.

○野々山 翔太[1]、前野 慎太朗[3]、林 哲也[2]、増田 真二[1] ([1]東工大・生命理工、[2]九州大・院医、[3]山口大・農)
○Shouta NONOYAMA[1], Shintaro MAENO[3], Tetsuya HAYASHI[2], Shinji MASUDA[1] ([1]Tokyo Inst. Tech., [2]The Univ. of Kyushu, [3]The Univ. of Yamaguchi)

硫化水素は一般的に毒ガスとして知られる。しかし硫化水素は多くの生物の細胞内で一定量生合成され、NO・CO に次ぐ第三のガス状シグナル分子として働くことが見出されてきた。細菌における硫化水素の機能については、大腸菌を用いた研究が先行しており、3-メルカプトピルビン酸を基質に硫化水素を合成する MstA の欠失が、抗生物質耐性を低下させることことから、硫化水素合成が抗生物質耐性に寄与していることが明らかとなった。しかしその分子機構は不明な点が多い。本研究では、大腸菌内の硫化水素合成が駆動する生命現象を全細胞的にその詳細を理解し、硫化水素の細胞内機能を解明することを目的とした。

まず、*mstA* を高発現し硫化水素を過剰産生する大腸菌株のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、硫化水素過剰産生大腸菌株において、約 500 の遺伝子の転写量が有意に増加し、特に鉄の獲得に関与する遺伝子が多く含まれていた。そこで、これら鉄獲得に関わる遺伝子の一つである *fepA* 遺伝子と硫化水素応答性転写因子 YgaV との関連性を調査した。その結果、*ygaV* 破壊株では、硫化水素を過剰産生させても *fepA* の転写が活性化されないことがわかった。この結果は、硫化水素依存的な YgaV の転写制御機構が、*fepA* をはじめとした鉄獲得に関わる遺伝子の転写活性化に必要であることを示唆している。得られた結果を総合し、本発表では大腸菌の硫化水素を介した鉄獲得系の発現調節機構について議論する。

H_2S is generally known as a toxic gas. However, H_2S has been recently shown to exhibit as an intracellular and intercellular signaling molecule in many organisms. In *E. coli*, 3-mercaptopyruvate sulfur transferase MstA is responsible for synthesizing H_2S, which is required for exhibiting tolerance to antibiotics. The proposed mechanism of how intracellular H_2S contributes to the antibiotics tolerance is that it could react with free iron in the cells to suppress Fenton reaction under antibiotic stress conditions that enhances protection of cellular components against oxidative stress produced by antibiotics. However, it is unknown exactly how H_2S behaves in whole cells. In this study, we aimed to understand physiological function of H_2S in *E. coli*. We identified several genes whose specific expressions are significantly increased in the *mstA* over-expression mutant. Moreover, we obtained results showing that the transcriptional regulator YgaV partially contributes to the phenotype of the *mstA* over-expression mutant. Together with other results, the H_2S -mediated transcriptional regulation of the iron uptake system in *E. coli* will be discussed.

Hydrogen sulfide, Transcriptional regulation

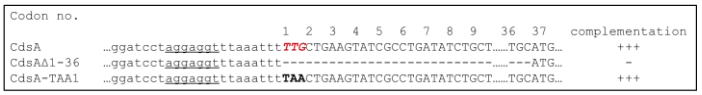
講演番号：2E6p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E6 会場

リン脂質および糖脂質 MPIase 生合成に関わる CDP-ジアシルグリセロール生合成酵素をコードする *cdsA* 遺伝子の翻訳開始領域の解析

Analysis of region for translational initiation of *cdsA* encoding CDP-diacylglycerol synthase involved in phospholipid and glycolipid MPIase biosynthesis

○日景 瑠那[1]、関谷 優晟[1]、沢里 克宏[2]、西山 賢一[1] ([1]岩大農、[2]テキサスヒューストン大)
○Runa HIKAGE[1], Yusei Sekiya[1], Katsuhiro Sawasato[2], Ken-ichi Nishiyama[1] ([1]Iwate Univ., [2]Univ. of Texas-Houston)

CdsA は、リン脂質生合成やタンパク質膜挿入反応を触媒する MPIase の生合成に関与する。*cdsA* 遺伝子が同定されたとき、開始コドンと考えられた配列以降の領域では *cdsA* 欠損変異を抑制できず（CdsAΔ1-36）、このコドンの上流に開始コドンが存在する可能性が示唆される。上流の *ispU* 遺伝子の下流で最初に出現する開始コドン候補 TTG が CdsA の開始コドンとして登録されているが、これを終止コドン TAA に変化させても *cdsA* 欠損変異が抑制されたことから、これ以外にも開始コドンとして機能する配列が存在すると考えられる。本研究では、*cdsA* 遺伝子の 5'領域側に変異を導入し、CdsA 欠損株、高 pH 感受性の CdsA8 変異株の生育が相補されるかどうか調べた。その結果、2 番目の CTG、5 番目の CTG、6 番目の ATA までが CdsA 欠損株の生育を相補した。一方、CdsA8 変異株は 22 番目の CTG まで生育した。さらに、CdsAΔ1-36 も CdsA8 変異を抑制した。これらの結果は、CdsA には開始コドンとして可能な配列が数多く存在することを示している。さらに、*cdsA* 遺伝子の染色体での制御が観察できる条件を構築しても、2 番目の CTG が開始コドンとして機能した。以上のことから、CdsA には開始コドンとして機能し得るコドンが複数存在することが判明した。



CdsA is involved in biosynthesis of both phospholipids and MPIase that catalyzes membrane protein insertion. The CdsA ORF originally reported (CdsAΔ1-36) could not complement the *cdsA* knockout, suggesting that initiation codons exist upstream. While codon TTG that appears first after the upstream gene *ispU* is assigned as the initiation codon for CdsA, substitution of it with TAA, a termination codon, did not affect the ability to complement the CdsA knockout, indicating that the other codon(s) can function as an initiation codon. In this study, to determine the initiation codons for CdsA, we examined if the *cdsA* mutants at the 5' region complement the CdsA knockout and CdsA8 mutation, a high pH-sensitive mutant. We found that mutants starting from codons 2 (CTG), 5 (CTG) and 6 (ATA) can complement the CdsA knockout. On the other hand, mutants starting from up to codon 22 (CTG) could suppress the CdsA8 mutation. CdsAΔ1-36 also suppressed the CdsA8 mutation. Moreover, under the conditions where the *cdsA* expression could be analyzed at the chromosomal level, it was found that codon 2 (CTG) could function as an initiation codon. We concluded that CdsA has multiple codons that function as an initiation codon.

CdsA, Translational initiation, Biomembrane biogenesis

発表責任者：日景　瑠那（g0422035@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2E6p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E6 会場

枯草菌における tRNA レパートリーの解析

Identification of the minimum set of B. subtilis tRNA repertoire

○相馬 亜希子、山川 律穂、高地 司、河村 富士夫、大久保 雄馬（千葉大園芸院）
○Akiko SOMA, Ritsuho Yamakawa, Tsukasa Kouchi, Fujio Kawamura, Yuma Okubo (Graduate School of Horticulture, University of Chiba)

According to the orthodox base-pairing and wobbling theory, it is generally assumed that 35-50 species of anticodon are involved in the translation of non-parasitic bacteria. On the other hand, knowledge of tRNA repertoires that are essential for translation and viability is limited to some specific organisms and systems. To identify the minimum set of tRNA species and to understand the decoding property of *B. subtilis*, we attempted to construct tRNA deletion mutants. The *B. subtilis* genome encodes tRNA genes for 35 species of the anticodon. By replacing each tRNA gene with an antibiotic-resistance gene, single-deletion mutants for eight species of the anticodon were constructed. The growth of the mutants was not affected under the typical laboratory growth condition. The beta-galactosidase reporter assay revealed that the translational activity was not impaired by the tRNA deletions. In addition, we constructed multi-gene deletion mutants by combining selected tRNA genes; the resulting strains were viable and showed efficient beta-gal activities. These results suggested the robustness of the *B. subtilis* cells to the tRNA deletions. *B. subtilis* cells respond to a range of stress by sporulation, development of competence, and biofilm formation. These processes are regulated by a complex and sophisticated signal transduction network that involves the expression of hundreds of genes. Our analysis of the tRNA deletion mutants indicated that some specific tRNAs, which are not crucial for the decoding of corresponding codons contribute to the stress response in *B. subtilis*.

tRNA, anticodon, B. subtilis

講演番号：2E7a01
講演日時：3 月 25 日 09:30～ 1 号館 E7 会場

多価不飽和脂肪酸の酸化は刺激味受容体 TRPA1 活性を増強させる

Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids Enhances Activity of the Pungency Receptor, TRPA1

○金子 晏生[1]、松山 南[1]、山本 紘義[2]、須﨑 健太[2]、笹原 亮[2]、木原 明彦[2]、小林 英明[2]、伊藤 圭祐[1]、寺田 祐子[1] ([1]静岡県大院薬食、[2]キユーピー株式会社)
○Anna KANEKO[1], Minami MATSUYAMA[1], Hiroyoshi YAMAMOTO[2], Kenta SUSAKI[2], Ryo SASAHARA[2], Akihiko KIHARA[2], Hideaki KOBAYASHI[2], Keisuke ITO[1], Yuko TERADA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Kewpie Corporation)

【背景・目的】多価不飽和脂肪酸（PUFA）は植物油や魚油の主要な構成成分であり、代表的な物としてリノール酸、リノレン酸、ドコサヘキサエン酸が代表的である。PUFA は、サプリメントやドレッシングなど幅広い食品の製造に用いられる重要な食品成分である。一方で、PUFA は食品の製造過程において酸化を受けやすく、酸化に伴うピリピリとした刺激味などのオフフレーバーは、大きな課題となっている。本研究では PUFA 酸化に伴う刺激味発生メカニズムの解明とその制御を目的として、リノール酸（LA）をモデルとし、刺激味に寄与する酸化物の特定および、刺激味の受容メカニズムの解析を実施した。
【方法・結果・考察】酸化 LA のモデルとして、40℃にて 5 日間酸化処理したリノール酸（酸化 LA）を用いた。刺激味受容体（TRPA1, V1, V3, V4）の活性を測定した結果、酸化 LA は LA に比べて、顕著に強い TRPA1 活性を有することが明らかとなった。続いて、TRPA1 活性の増強に寄与する酸化物の特定を行った。酸化 LA 中に含まれる各酸化物を LC/MS で定量し、またそれら酸化物の TRPA1 活性を測定した。その結果、酸化による LA の TRPA1 活性増強は、酸化物 2 種（9-HpODE、13-HpODE）で十分に説明できることが明らかとなった。
以上より、LA の酸化により TRPA1 活性が増強されることを初めて明らかとし、さらに活性増強に寄与する酸化物の特定に成功した。本研究は、PUFA の酸化による刺激味発生の分子メカニズムを新たに提案し、その刺激味制御に寄与するものである。

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) like linoleic acid (LA) are essential in food production but prone to oxidation, causing off-flavors such as pungency. This study investigated the pungent taste mechanism from PUFA oxidation, using oxidized LA as a model. Enhanced TRPA1 receptor activity was observed in oxidized LA compared to LA. The study identified two oxidants (9-HpODE, 13-HpODE) responsible for this increase, using LC/MS for quantification and activity measurement. This research is the first to link LA oxidation with increased TRPA1 activity and pinpoint specific oxidants contributing to this effect. It offers a new understanding of the molecular mechanism behind pungent taste due to PUFA oxidation and insights for controlling it.

Fatty acid, Off-flavor, TRPA1

発表責任者：寺田　祐子（yukoterada@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E7a02
講演日時：3 月 25 日 09:41～ 1 号館 E7 会場

近赤外分光分析で挑むオリーブオイルの酸化度予測
Prediction of olive oil oxidation through near-infrared spectroscopy analysis
○楠本 惟吹[1]、加藤 俊治[1,2]、乙木 百合香[1]、境野 眞善[3]、青木 亮輔[1,3]、齋藤 三四郎[3]、佐藤 俊郎[2,3]、今義 潤[3]、仲川 清隆[1,2] ([1]東北大院・農・食品機能分析、[2]東北大院・農・J-オイルイノベ、[3]（株）J-オイルミルズ)
○Ibuki Kusumoto[1], Shunji Kato[1,2], Yurika Otoki[1], Masayoshi Sakaino[3], Ryosuke Aoki[1,3], Sanshiro Saito[3], Toshiro Sato[2,3], Jun Imagi[3], Kiyotaka Nakagawa[1,2] ([1]Tohoku Univ. Lab. Food Function Analysis, [2]Tohoku Univ. J-OIL Innovation Lab., [3]J-Oil Mills, INC.)

脂質酸化は食用脂質の品質低下において重要な要因であるが、脂肪酸組成に加えて様々な微量成分（抗酸化物質など）が関与するため非常に複雑である。このような因子情報を網羅的に取得できれば、脂質食品の将来の酸化度を「予測」できる可能性がある。一方、近赤外分光（NIR）分析は水素を含む結合情報が一挙に得られるため、脂質酸化の広範な因子情報を得るのに有用と考えられた。我々は微量成分を多く含むと予想される、エクストラバージンオリーブオイルを用い、酸化前の NIR 分析結果から短期熱酸化（1.5 mL、90°C、12 時間）による過酸化物価（POV）変化量がどの程度予測可能か検証を行った。部分最小二乗回帰（PLSR）を行ったところ、検量線の R^2 値が 0.6 程度、Root Mean Square Error（RMSE）が 6 程度と、POV を大まかに予測できるモデルが作成できた。本回帰モデルの主成分においては、水に特異的な領域や OH 結合に関する情報を有する領域の寄与が観察され、水分や抗酸化物質などの微量成分も酸化度の予測に重要であると示唆された。こういった微量成分の酸化度の予測における重要性をさらに検討するため、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成分析を行い、同様に POV 変化量の回帰モデル作成・予測精度の比較に取り組んでいる。

Lipid oxidation is one of the important factors of food quality deterioration. While fatty acid composition is known as the major contributor to lipid oxidation, a variety of minor components (e.g., natural antioxidants) are also involved, making the progression of lipid oxidation complex. If the information of such wide-ranging factors could be comprehensively obtained, it might be possible to “predict” the progression of lipid oxidation. Near-infrared (NIR) spectroscopy analysis was expected to be useful for this approach as it allows the rapid acquisition of information on chemical bonds containing hydrogen. We explored to what extent the NIR spectra before oxidation could predict peroxide value (POV) change after short-term heating (1.5 mL, 90°C, 12 hrs) of extra virgin olive oil, which would contain various minor components. Partial least squares regression (PLSR) gave a regression model with moderate correlation and error (R^2: ~0.6 and Root Mean Square Error (RMSE): ~6). Possible influences from H_2O and OH bonds were exhibited in the latent variables, thus indicating the involvement of minor components. Further investigation into the importance of minor components is underway through the analysis of fatty acid composition with gas-chromatography and the following construction of a regression model for the POV change.

NIR, Olive oil, Oxidation

発表責任者：楠本惟吹（ibuki.kusumoto.s1@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2E7a03
講演日時：3 月 25 日 09:52～ 1 号館 E7 会場

オリーブオイルの香りの生成経路の解明

Elucidation of the pathway of olive oil aroma

○加藤 俊治[1,2]、境野 眞善[3]、青木 亮輔[2,3]、斎藤 三四郎[3]、佐藤 俊郎[1,3]、今義 潤[3]、仲川 清隆[1,2]
([1]東北大院・農・J-オイルイノベ、[2]東北大院・農・食品機能分析、[3]（株）J-オイルミルズ)
○Shunji Kato[1,2], Masayoshi Sakaino[3], Ryosuke Aoki[2,3], Sanshiro Saito[3], Toshiro Sato[1,3], Jun Imagi[3], Kiyotaka Nakagawa[1,2] ([1]Tohoku Univ. J-OIL Innovation Lab., [2]Tohoku Univ. Lab. Food Function Analysis, [3]J-Oil Mills, INC.)

オリーブオイル（EVOO）の独特な香りの生成にはα-リノレン酸（ALA）の酵素酸化が寄与していると言われるが、意外にもその起源となるエステル脂質は未だ明確になっていない。我々はオリーブ果実の主要なエステル脂質であるトリアシルグリセロール（TG）が ALA に乏しいことから、ALA の起源として植物特有のエステル脂質である糖脂質を想定した。さらにオリーブ果実は未だにガラクトリパーゼが見つかっていないことから、EVOO の香りの生成経路として、オリーブ糖脂質に直接リポキシゲナーゼ（LOX）などの酵素が作用している経路を予想した。

本研究ではこの証明のため、オリーブ果実（コロネイキ種）を 20℃で粉砕し 30 分ゆっくりと攪拌したペースト、コントロールとして-80℃で粉砕したペーストを調製し、糖脂質ヒドロペルオキシドやキラリティー、糖脂質アルデヒドなどの解析を行った。なお ALA を含む糖脂質として MGDG 18:3_18:3 を、TG としては少ないながらも存在する TG 18:1_18:1_18:3 を解析対象とした。

その結果、20℃で調製したペーストは MGDG 18:3_18:3 がコントロールに比べ約半分に減少した一方で、TG 18:1_18:1_18:3 にほとんど変化は無かった。そこで次に MGDG 18:3_18:3 の代謝を調べるため、MGDG 18:3_18:3;OOH 異性体を解析した。意外にも、15-LOX 産物である MGDG 18:3_18:3;13OOH の極端な蓄積は見られなかったものの、13 位のヒドロペルオキシ基のキラリティーはほぼ *S* 体であることがわかった。そしてリアーゼの産物である MGDG 18:3_12:1;12oxo の増加が認められたことから、オリーブ果実の糖脂質に直接 15-LOX が作用すると、直ちに MGDG 18:3_12:1;12oxo およびヘキセナールへと分解され、オリーブ特有の香りが生成される可能性が示唆された。

The distinctive aroma of olive oil (EVOO) is said to be derived from enzymatic oxidation of α-linolenic acid (ALA). However, interestingly, it is still unclear which ester lipid the ALA is derived from. Therefore, we hypothesized glycolipid, a unique ester lipid of plants, is the origin of ALA, since olive triacylglycerol is poor in ALA. Furthermore, since no galactosidase has been found in olive fruit to date, we hypothesized that enzymes such as lipoxygenase directly react with olive glycolipids. To prove this, we analyzed glycolipid hydroperoxide isomers, their chirality, and glycolipid aldehydes. As we expected, it was suggested that the pathway of 15-lipoxygenase and lyase acting directly on glycolipids in olive fruit would be involved in the generation of EVOO aroma.

Olive oil, Flavor, Lipid oxidation

発表責任者：加藤俊治（shunji.kato.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E7a04
講演日時：3 月 25 日 10:03～ 1 号館 E7 会場

BODIPY の誘導体化によるハイブリッド蛍光色素合成および疎水性相互作用を利用したオリゴ糖の定量
Oligosaccharide determination harnessing hydrophobic interactions with BODIPY-based hybrid fluorescent dyes

○住田 真利奈[1]、柏﨑 玄伍[1]、渡辺 凌[1]、中 亮太[1]、西川 晃弘[1]、日幷 隆雄[2]、北山 隆[1]([1]近畿大院農、[2]福井県大生物資)
○Marina Sumida[1], Gengo Kashiwazaki[1], Ryo Watanabe[1], Ryota Naka[1], Akihiro Nishikawa[1], Takao Hibi[2], Takashi Kitayama[1] ([1]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kindai Univ., [2]Fac. Biosci. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

オリゴ糖は，腸内の微生物叢に代謝されることで，腸内環境を整え，健康の促進に重要な役割を果たす。本研究では，オリゴ糖を選択的に認識する基盤となる化学構造を調査するために，蛍光色素である BODIPY に種々の官能基を導入可能にしたオリゴ糖感知蛍光色素 (BOliFluor) を戦略的に設計し合成した。

具体的には，オリゴ糖の疎水性を識別するために疎水性のヘキシルまたはフェニル基を含む BOliFluor **1–3** を調製し，疎水性空洞をもつ環状のβ-シクロデキストリンの濃度を定量分析した。その結果，BOliFluor **1–3** は 0–1.5 mM の範囲で直線的な蛍光応答性を示し，BOliFluor **2** は 0.06 mmol/L と最も小さな検出限界を示した。

また，多様な立体配座をとり，β-シクロデキストリンと比較して疎水性に劣る直鎖状オリゴ糖を用いて，1–5 mmol/L の範囲での蛍光応答を同様に評価した結果，BOliFluor **2** のみマルトヘキサオースの濃度に比例し，蛍光強度が増加した。

Oligosaccharides play in an important role in modulating the intestinal environment and enhancing health through metabolism by the intestinal microflora. In order to investigate the chemical structure serving as the foundation for selectively recognizing oligosaccharides, we strategically devised and synthesized an oligosaccharide-sensing fluorescent dye (BOliFluor), allowing for the introduction of various functional groups into the BODIPY-based fluorescent dye. To identify the hydrophobicity of oligosaccharides, BOliFluor **1–3**, incorporating hydrophobic hexyl or phenyl groups were synthesized, and quantitatively determined the concentration of cyclic β-cyclodextrin with a hydrophobic cavity. Consequently, BOliFluor **1–3** exhibited a linear fluorescence response within the 0–1.5 mM range, with BOliFluor **2** notably achieving the lowest detection limit of 0.06 mmol/L. In addition, the fluorescence response was evaluated in the range of 1–5 mmol/L using linear oligosaccharides with diverse conformations and less hydrophobicity compared to β-cyclodextrin. As a result, only BOliFluor **2** exhibited an increase in fluorescence intensity proportional to the concentration of maltohexaose.

BODIPY, fluorescent probe, click chemistry

講演番号：2E7a05
講演日時：3 月 25 日 10:14～ 1 号館 E7 会場

ガラクトオリゴ糖の加熱による 3-デオキシグルコソン形成要因の解明

Elucidation of factors for the formation of 3-deoxyglucosone by heating of galacto-oligosaccharides

○安達 志哉、松本 均、能見 祐理（新潟薬大応生科）
○Yukiya ADACHI, Hitoshi MATSUMOTO, Yuri NOMI (Niigata Univ. Pham. Med. Life Sci.)

食品の加工・貯蔵中の成分間反応によって生じるα-ジカルボニル化合物(α-DCs)は、食品の色や香り、風味に関わる嗜好性物質や変異原性物質などの前駆体となることから、食品の品質に重大な影響を及ぼす。ガラクトオリゴ糖(GOS)は 4'-ガラクトシルラクトース(4'-GL)を主成分とするプレバイオティクスであり、様々な飲食品に添加されている。GOS 溶液の加熱によりα-DCs の一種である 3-deoxyglucosone(3-DG)が多量に生じるが、その形成要因は明らかになっていない。GOS の大部分はβ1→4 結合で構成されているが、β1→3、β1→6 結合も少量含まれていることから、本研究では GOS を構成する糖の結合様式に着目し、3-DG 形成要因の解明を試みた。
αおよびβ1→3、1→4、1→6 結合をもつ二糖(glucosyl glucose)の加熱処理によって生成されたα-DCs の継時変化を解析した結果、α1→3 結合をもつ nigerose およびβ1→3 結合をもつ laminaribiose は他の二糖に比べ非常に多量のα-DCs、特に 3-DG を生じさせることが明らかとなった。また、GOS 溶液の加熱に伴い 4'-GL 以外の三糖の顕著な減少と 1,4-β-galactobiose の増加が確認されたことから、還元末端側のβ1→3 結合の存在が 3-DG 形成に大きく寄与したことが示唆された。

α-Dicarbonyl compounds (α-DCs), produced during thermal processing and storage of foods, have a strong impact on food quality because they are precursors of taste- and mutagenic substances related to food color, aroma and flavor. Galacto-oligosaccharide (GOS) is a prebiotics consisting mainly of 4'-galactosyllactose (4'-GL). Heat treatment of GOS solutions resulted in the production of a large amount of 3-deoxyglucosone (3-DG), a type of α-DCs, however the factors responsible for its formation remain unclear. We focused on the linkage patterns of monosaccharides constituting GOS and attempted to elucidate the factors for the formation of 3-DG.
We analyzed the changes over time of α-DCs generated by heat treatment of disaccharides with α- and ß1→3, 1→4, and 1→6 linkages. The results showed that nigerose with α1→3 linkage and laminaribiose with ß1→3 linkage produced a much larger amount of α-DCs, especially 3-DG, than other disaccharides. We also observed the significant decrease of trisaccharides other than 4'-GL and increase of 1,4-ß-galactobiose by heating of the GOS solution, suggesting that the presence of a ß1→3 linkage at the reducing end contributed to the formation of 3-DG.

α-dicarbonyl compounds, Galacto-oligosaccharides

発表責任者：能見祐理（ynomi@nupals.ac.jp）

講演番号：2E7a06
講演日時：3 月 25 日 10:33～ 1 号館 E7 会場

多重変異系統の固体 NMR による澱粉構造と米粉特性の評価

Evaluation for starch structures and rice flour characteristics by solid state NMR in multiple mutant lines in rice.

○堀 清純[1]、永松 大輝[2]、飯島 健[1]、朱 紅加[1]、藤田 直子[3]、加藤 悦子[4]([1]農研機構、[2]東大・新領域創成科学、[3]秋田県立大・生物資源、[4]東洋大・食環境科学)
○Kiyosumi HORI[1], Daiki Nagamatsu[2], Ken Iijima[1], Koka Shu[1], Naoko Fujita[3], Etsuko Katoh[4] ([1]NARO, [2]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, [3]. Facult. Biores., Akita Pref. Univ., [4]Facult. Food Nutr. Sci., Toyo Univ.)

固体 NMR は、結晶構造に加えて、非晶質な領域や短周期的な結晶構造の違いを同時に解明することができる。また、少量の米粉サンプルから評価可能な手法であり、品種や変異系統間の澱粉構造の差異を検出できることが報告されている。本研究では、*GBSSI*（*Wx*）、*SSIIa*（*Alk*）、*SSIIIa* および *SSIVb* の 4 つの澱粉合成遺伝子の機能欠損型を組み合わせた多重変異系統群について、固体 NMR を用いて澱粉構造を評価するとともに、米粉特性との関係を調査した。

24 系統の多重変異系統群の固体 NMR 解析では、野生型と比較して、非晶構造の割合に差がない、割合が少ない、割合が多い等の 5 つのグループに分けることができた。*GBSSI* の遺伝子機能が欠損すると非晶領域の割合が減少し、*SSIIa*、*SSIIIa*、*SSIVb* の遺伝子機能が欠損すると非晶領域の割合が増加する傾向が観察された。*SSIIIa* と *SSIVb* の二重欠損変異をもつ系統では、米粉の平均粒度は小さくなり損傷澱粉量も減少していた。非晶領域の多い澱粉を含む米粉が優れた製粉適性を示したことから、固体 NMR による澱粉高次構造の評価から、各系統の米粉特性を予測できる可能性が示唆された。

Solid-state NMR can simultaneously investigate both amorphous lamellae structure and crystalline lamellae structure in rice starch. The Solid-state NMR has another advantage that this method can evaluate for the starch structures from small amounts of rice flour samples. In this study, we used multiple mutant lines having four loss-of-function alleles of starch biosynthesis genes, *GBSSI*（*Wx*), *SSIIa* (*Alk*), *SSIIIa*, and *SSIVb*, for evaluating their starch structures and rice flour characteristics.

24 multiple mutant lines were divided into five groups based on ^{13}C CP/MAS NMR spectrums by the Solid-state NMR analysis: no difference, less percentages and more percentages in the percentage of amorphous structure compared to the wild-type line. Loss of function allele of the *GBSSI* gene decreased the percentage of amorphous regions, while loss of function alleles of the *SSIIa*, *SSIIIa*, *SSIVb* genes increased decreased the percentage of amorphous regions. In the mutant lines with loss of function allele of the *SSIIIa* and *SS4IVb* genes showed small average grain size of rice flour and the small amounts of damaged starch. In this study, rice starch with more amorphous regions showed superior flour characteristics.

rice, starch, Solid-state NMR

発表責任者：堀　清純（horikiyo@naro.affrc.go.jp）

講演番号：2E7a07
講演日時：3 月 25 日 10:44～ 1 号館 E7 会場

低アミロース米品種「スノーパール」から作出された高アミロース米変異体の澱粉特性

Starch properties of novel high-amylose rice mutants derived from ‘Snow Pearl’, a low-amylose variety

○佐々木 朋子[1]、鈴木 保宏[2] ([1]農研機構、[2]JATAFF)
○Tomoko Sasaki[1], Yasuhiro Suzuki[2] ([1]NARO, [2]JATAFF)

本課題では、低アミロース米品種「スノーパール」から作出された高アミロース米変異体と既存の高アミロース米品種を含む多種多様な品種系統の澱粉特性を比較し、米澱粉の構造特性と物理特性および澱粉消化性との関連性を明らかにすることを目的とした。新しく作出された変異体については、アミロペクチンの短鎖の比率が、他の品種系統と比べて顕著に低いことが明らかになった。また、精製した澱粉から高濃度ゲルを調製し、1、3および5日間冷蔵保存したゲルの物性を測定したところ、見かけのアミロース含量が最も高かった「夢十色」よりも有意に高い圧縮応力値を示し、硬化速度も速い結果となった。次に、精製した澱粉と1日間冷蔵保存した高濃度ゲルについて澱粉の消化性を評価し、消化酵素液を添加して2時間後の未消化画分の澱粉比率を比較したところ、高アミロース米変異体は他の品種系統よりも極めて高く、50%以上の値を示した。なお、生澱粉よりも澱粉ゲルが高い消化抵抗性を示した。以上のように、新しく作出された高アミロース米変異体はその特異的なアミロペクチンの構造特性と強固なゲルの形成能によって、極めて高い消化抵抗性をもつことが明らかになった。

The objective of this study was to explore the impacts of apparent amylose content and amylopectin structure on the physical and digestive properties of rice starch by comparing novel high-amylose rice mutants derived from ‘Snow Pearl’, a low-amylose variety with conventional rice varieties. The rice mutants demonstrated a specific amylopectin characteristic, indicating an extremely lower portion of short chains than the other rice varieties. The hardness of starch gels stored for 1, 3, and 5 days were also determined using compression test. The starch gel prepared from the rice mutant exhibited significantly higher compressive stress than the other high-amylose rice variety with a higher apparent amylose content, ‘Yumetoiro’. The rice mutant demonstrated a significantly higher content of undigested starch after 120 min of digestion in raw starch and starch gel than the other rice varieties. Moreover, the undigested starch content in gel showed a higher value than that in raw starch. The starch from newly developed rice mutants were found to have markedly high resistance to digestion due to its amylopectin structure and formation of harder gel.

rice starch, high-amylose, starch digestibility

講演番号：2E7a08
講演日時：3 月 25 日 10:55～ 1 号館 E7 会場

山田錦の醸造適性にかかわる麹特性と醪の分解性について
Koji characteristics and moromi degradability of Yamada-nishiki in relation to its suitability for brewing.
○大塚 正睦[1]、辻井 良政[2]、数岡 孝幸[3] ([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]東京農大応生・醸造)
○Masamu OTSUKA[1], Yoshimasa TSUJII[2], Takayuki KAZUOKA[3] ([1]Dept. Agric. Chem., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Ferm. Sci., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

酒造適性品種である山田錦は酒米生産量の約 40%を占め、トップブランドを長年維持している。しかし、その醸造適性は米麹の酵素力価の高さ、醪でゆっくり分解できるなど、杜氏の職人技に依存しており、科学的な解明は進んでいない。本研究では山田錦の醸造適性を明らかにするために、製麹過程や醪の分解性に焦点を当て、その要因の解明を目的とした。

山田錦、五百万石、吟のさとおよび渡船を用いて製麹試験を行った。走査型電子顕微鏡（SEM）による米粒の表面画像は太さの異なる菌糸が観察され、酒蔵で製麹された麹と比較して大きな差異がないと推察された。麹のα-amylase 活性量は山田錦と渡船が大きい傾向となった。生米、蒸米および麹米のアミロペクチン鎖長分布では、麹米が a 鎖（DP5-12）の比率が高くなった。各品種の麹米鎖長分布では、山田錦が親系統の渡船と異なる分布だった。加えて、醪中での山田錦の分解挙動についても検討しており、山田錦の酒造適性の要因の解明を目指している。

Yamada-nishiki, an aptitude variety for sake brewing, accounts for about 40% of sake rice production and has long been the top brand. However, its suitability for brewing depends on the craftsmanship of the toji (master brewer), such as the high enzymatic potency of the rice koji and its ability to slowly decompose in moromi, and scientific clarification has not progressed. This study focused on the koji-making process and the degradability of moromi to clarify the brewing aptitude of Yamada-nishiki, to elucidate the factors involved.

Koji-making tests were conducted using Yamada-nishiki, Gohyakumangoku, Ginnosato, and Watabune. Scanning electron microscopy (SEM) surface images of rice grains showed mycelia of different thicknesses, and it was inferred that there were no significant differences compared to koji made in a sake brewery. The amount of α-amylase activity of koji tended to be higher in Yamada-nishiki and Watafune. In the amylopectin chain length distribution of raw rice, steamed rice, and koji rice, the proportion of a chain (DP5-12) was higher in koji rice. In the koji rice chain length distribution of each variety, Yamada-nishiki had a different distribution from the parental Watafune strain. In addition, the degradation behavior of Yamada-nishiki in moromi is also being investigated, to elucidate the factors that contribute to Yamada-nishiki's suitability for sake brewing.

Yamada-nishiki, brewing suitability, koji

発表責任者：辻井　良政（96tsujii@nodai.ac.jp）

講演番号：2E7a09
講演日時：3 月 25 日 11:06～ 1 号館 E7 会場

粘質系焼きいもに分類されるサツマイモのβ-アミラーゼ活性と澱粉の性質との関係

Relationship between ß-amylase activity and starch in sweet potatoes classified as sticky baked sweet potatoes

○本多 裕司[1]、小野 花月[1]、坂本 知昭[1]、高木 宏樹[1]、濵田 達朗[1]、大西 知子[2]、林 美央[2]([1]石川県大・生資環、[2]石川農総研セ)
○Yuji Honda[1], Kaduki Ono[1], Tomoaki Sakamoto[1], Hiroki Takagi[1], Tatsuro Hamada[1], Tomoko Ohnishi[2], Mio Hayashi[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Agric. For. Res. Center For. Exp. Station)

【諸言】焼きいもの味質が「粘質系（ねっとり系）」に分類されるサツマイモから分離した澱粉の糊化開始温度（T_o）や糊化エンタルピー変化（ΔH）は、「粉質系（ほくほく系）」や「中間質（しっとり系）」のサツマイモと比較して低い事が明らかにされている（齋藤 & 本多, 応用糖質科学 11巻 87-93 (2021)）。また、「粘質系」のサツマイモはβ-アミラーゼの耐熱性が高いと言われているが、一部の品種でしか調査されていない。

本研究では、中間質の代表的な品種である「高系14号」と「粘質系」に分類される様々なサツマイモのβ-アミラーゼ活性を測定するとともに、澱粉の性質や構造（糊化、アミロペクチンの鎖長分布）とβ-アミラーゼ活性の関係を解明する事を目的とした。

【方法】2022年10月に砂丘地農業研究センターで収穫されたサツマイモ11種類を試料とした。β-アミラーゼ活性はBETAMYL-3（メガザイム）を用いて測定した。澱粉の糊化に関する性質は示差走査熱量計を用いて調べた。

【結果】各試料の40℃におけるβ-アミラーゼ活性を「高系14号」と比較してみると、「ひめあやか」は高いβ-アミラーゼ活性を示した。各澱粉のT_oを「高系 14号」と比較してみると、「兼六」、「安納芋」、および「あいこまち」は低い値を示した。一方、「べにまさり」は「高系 14号」よりも高い値を示した。また、ΔHを比較してみると、「高系 14 号」とその他の品種間に大差はみられなかった。アミロペクチンの鎖長分布については分析中である。

We reported that the onset temperature (T_o) of starch gelatinization and the enthalpy change of gelatinization (ΔH) isolated from sweet potatoes classified as having a "sticky" taste were lower than those of sweet potatoes classified as "floury" or "moist" (BAG, Vol. 11, 87-93 (2021). In addition, sweet potatoes classified as "sticky" are said to have high thermostability of ß-amylase, but this has only been investigated in a few varieties. In the present study, we investigated the ß-amylase activity of various sweet potatoes to elucidate the relationship between starch properties and the activity.

Comparing the ß-amylase activity of each sample at 40°C with that of "Kokei No. 14," "Himeayaka" showed higher ß-amylase activity. Compared to "Kokei No. 14," T_o of the starch of "Kaneroku," "Annou-imo," and "Aikomachi" were lower. On the other hand, "Benimasari" showed a higher value than that of "Kokei No. 14. In addition, ΔH showed no significant difference between "Kokei No. 14" and the other varieties. The chain length distribution of amylopectin is still under analysis.

Sweet potato, ß-amylase, Starch

発表責任者：本多裕司（honda@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2E7a10
講演日時：3 月 25 日 11:17～ 1 号館 E7 会場

澱粉から得られる短直鎖糖質の諸性質と食品への応用
Properties and food applications of short linear carbohydrates from starch
○河野 敦、山本 智大、吉田 洋則 (昭和産業株式会社)
○Atsushi KAWANO, Tomohiro YAMAMOTO, Hironori YOSHIDA (Showa Sangyo Co., Ltd.)

酵素の組み合わせ技術により、澱粉に由来する短い直鎖状の糖質（短直鎖糖質）を工場スケールで製造する方法を開発したため、その諸性質を解析し、食品への応用を検討した。澱粉液化液に対して枝切り酵素を含む複数の酵素を作用させ、精製した後に噴霧乾燥することで粉末水あめを得た。得られた粉末水あめは 8～19 糖が主成分で、7 糖以下や高分子の含有量が少なかった。β-アミラーゼ処理によって大部分が 3 糖以下に分解され、短い直鎖状の糖質から構成されることが示された。冷水への溶解性が高く、また少量の水に溶くと一度溶解し直ちに結晶化により固形状になるという性質を示し、澱粉から分離される長直鎖のアミロースや 7 糖以下が主成分のマルトオリゴ糖といった従来から知られている澱粉糖とは異なる特徴を持つことが分かった。短直鎖糖質の結晶化能は食品の物性改変に応用可能で、液状油と短直鎖糖質水溶液を混合するとファットスプレッド状のものが製造された。またヨウ素によって青紫色に染色することから、短直鎖糖質は包接性も有することが分かった。

We developed a method to produce short linear carbohydrates (SLC) from starch on an industrial scale using a combination of enzymes, analyzed its properties, and investigated food applications. SLC was obtained by treating the liquefied starch with multiple enzymes including debranching enzyme, purifying it, and spray drying it. The main components of SLC were carbohydrates with DP (degree of polymerization) 8-19, with low content of carbohydrates less than DP7 and high molecular weight carbohydrates. When treated with ß-amylase, most of SLC were hydrolyzed into DP3 or less. SLC had high solubility in water, and once dissolved in a small amount of water, it immediately crystallized and the solution became solid. These facts indicated that SLC was distinguished from amylose or maltoorigosaccharides. The capability of SLC to form crystals can be applied to modifying the physical properties of foods, and when liquid oil and an aqueous solution of SLC were mixed, a fat spread was produced. The iodine solution turned blue by SLC, indicating that SLC has capability to form inclusion complexes.

maltodextrin, crystallizing, inclusion complexes

発表責任者：吉田　洋則（hironori_yoshida@showa-sangyo.jp）

講演番号：2E7a11
講演日時：3 月 25 日 11:36～ 1 号館 E7 会場

ホエー蛋白質の変性および凝集特性

Whey protein denaturation and aggregation properties

○山川 忠則（株式会社明治）
○Tadanori YAMAKAWA (Meiji Co., Ltd.)

蛋白質が多く含まれる飲料などの製造工程では、加熱、pH、他成分の影響などによって原料溶液中のタンパク質が変性・凝集し、粘度上昇や凝集体の生成等の物性変化を引き起こすことが課題である。

蛋白質を塩析させる能力が大きな順にイオンを並べたものをホフマイスター系列と呼ぶ。これらのイオンを単一もしくは 2 種類程度の蛋白質溶液へ添加することで、添加剤が蛋白質の変性に与える影響と蛋白質が持つ変性・凝集特性が今までに評価されてきた。一方で、複数の蛋白質および蛋白質以外の成分を含む商業的に利用される原料を用いた変性・凝集特性の評価技術は確立されておらず、ホフマイスター系列のイオンを含む添加剤の影響も明らかになっていないことが多い。そこで、本研究では複数の蛋白質が含まれる原料として粉末ホエイ蛋白質を対象とした。その溶液にホフマイスター系列の複数のイオン種と蛋白質の安定性に関与することが知られる尿素やアルギニンなどの変性剤を添加し、異なる温度、pH の条件で一定時間加熱した際の蛋白質の凝集特性を評価した。本発表では、粉末ホエイ蛋白質原料の凝集特性とその評価技術の構想について報告する。

The challenge in the manufacturing process of such as protein-rich beverages lies in the denaturation and aggregation of proteins within the raw material solution, influenced by factors such as heating, pH, and the effects of other ingredients. The Hofmeister series, which ranks ions based on their impact on protein solubility, plays a crucial role in understanding these dynamics. The characteristics and effects of additives on protein solubility, as well as the denaturation and aggregation of proteins, have been evaluated by adding these ions to either a single protein or a limited set of proteins. However, the evaluation techniques of denaturation and aggregation for raw materials containing multiple proteins and other ingredients remain undeveloped. Consequently, the effect of additives in such complex formulations are not fully elucidated. This study focuses on powdered whey protein as a representative multi-protein raw material. Multiple ionic species and denaturing agents, including urea and arginine, recognized for their role in protein stability, were added to the solution. The aggregation characteristics of the protein were evaluated under different temperatures and pH conditions. This presentation aims to bridge this gap by discussing the aggregation characteristics of powdered whey protein and proposing conceptual frameworks for their comprehensive evaluation.

powdered whey protein, the Hofmeister series, additives

発表責任者：山川　忠則（tadanori.yamakawa@meiji.com）

講演番号：2E7a12
講演日時：3 月 25 日 11:47～ 1 号館 E7 会場

脱脂粉乳における凝乳性低下の要因解明
Investigation of the factor of poor rennet-induced gelation in reconstituted skim milk powder
○安藤 浩貴[1]、小野 航[2]、岡 大貴[3]、野口 智弘[2] ([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・農化)
○Hiroki ANDO[1], Wataru ONO[2], Daiki OKA[3], Tomohiro NOGUCHI[2] ([1]Dept. Agric. Chem., Grad. Sch. Tokyo Univ. Agric., [2]FPC, Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】脱脂粉乳のレンネットによる凝乳性は、熱変性度を可能な限り抑えて製造した脱脂粉乳であったとしても、一般的にナチュラルチーズの原料乳に用いられる低温殺菌乳の凝乳性と比べ、劣る事が知られており、脱脂粉乳は産業的なチーズ製造に利用されていない。本研究では脱脂粉乳の粉体化における工程である濃縮や噴霧乾燥によるタンパク質の変質およびミネラルの形態変化が、レンネットによる凝乳性を損なうものと推察し、その影響について検討を行った。
【方法】本学富士農場より入手した生乳から脂質を除去し脱脂乳を調製した。同脱脂乳を 65 °C、30 分間熱処理を行った加熱脱脂乳、加熱脱脂乳を減圧加熱濃縮（-0.09 MPa、90 °C）した濃縮乳、濃縮乳を噴霧乾燥（熱風温度 120 °C、排風温度 80 °C）した脱脂粉乳をそれぞれ試料とした。各試料からチーズカードを調製し、クリープメータを用いた物性測定及び、カード加温時の離水量を測定することで凝乳性の評価を行った。また、タンパク質の変性は HPLC 分析や WPNI の測定をそれぞれ行い評価した。ミネラルは ICP-AES、カルシウムイオンメータを用いてそれぞれ分析した。
【結果】濃縮乳と脱脂粉乳から調製したチーズカードは加熱脱脂乳と比べて破断強度と離水量が低下した。また、濃縮、噴霧乾燥によってホエイタンパク質のわずかな変性と可溶性 Ca 及び P の不溶化が確認された。粉体化によってホエイタンパク質の変性がわずかに進行していたものの、脱脂粉乳の凝乳性は粉体化時に不溶化したミネラルを補うことで加熱脱脂乳と同程度まで回復した。

It is known that rennet-induced gelation of skim milk powder is poorer than that of low-heat pasteurized milk. Therefore, it is considered difficult to utilization of skim milk powder for cheese making in dairy industry. In this study, we investigate the effect of powderization process, a concentration and a spray-drying, on rennet-induced gelation. In particular, our experiments were conducted on physical properties of cheese curd, thermal denaturation of protein and behavior of mineral. As a result, cheese curd prepared from concentrated milk and skim milk powder were brittle than that of low-heat pasteurized skim milk. In addition, slightly thermal denaturation of whey proteins and insolubilization of soluble Ca and P were observed in concentrated milk and skim milk powder. Rennet-induced gelation of skim milk powder was restored to the same level as that of low-heat pasteurized skim milk by adjusting soluble minerals.

skim milk powder, rennet, milk protein

発表責任者：安藤浩貴（10322003@nodai.ac.jp）

講演番号：2E7a13
講演日時：3 月 25 日 11:58～ 1 号館 E7 会場

Specific release of opioid peptide CM-12 from A2-type casein with *Aspergillus oryzae* alkaline protease that cleaves at the C-terminus of Ser-Leu-Xaa

○Yingjie CUI, Nobuhiro Hayashi, Naoyuki Yamamoto (Tokyo Institute of Technology)

Aspergillus oryzae protease extract (ASD protease) has the ability to release the opioid peptide, casomorphine, with anti- anxiety effects from bovine milk protein; however, the yield of the active peptide is low, and the key enzyme involved in processing is unclear.

In the present study, opioid peptide levels of the sequence ^{60}YPFPGPIPNSLP^{71} (CM-12) from A2-type casein peptide ^{53}AQTQSLVYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPV^{82} were significantly increased after fractionation of *A. oryzae* protease with DEAE-Sepharose. In the active fraction, a 34-kDa protein was purified from ASD protease as a key enzyme in the production of CM-12 and identified as an alkaline protease (Alp) via proteome analysis. The fractionated enzyme also produced CM-12 from bovine A2-type casein but not from bovine A1 casein. The yield of CM-12 from A2 casein was also significantly improved when fractionated Alp was used instead of ASD protease. Motif prediction for the Alp cleavage site by multiple Em for motif elicitation analysis revealed preferable cleavage at the C-terminal end of Ser–Leu–Xaa to release CM-12.

A2-type casein hydrolysate by Alp exhibited similar levels of opioid activity to that of synthetic CM-12 in cAMP-Glo assays with μ opioid receptor-expressing HEK293 cells. These results suggest that CM-12 is a major opioid peptide in the A2 casein hydrolyste and the hydrolysate containing CM-12 has the potential to be a commercial bioactive peptide material with opioid activity.

Aspergillus oryzae, alkaline protease, opioid peptide

講演番号：2E7p01
講演日時：3 月 25 日 13:50～ 1 号館 E7 会場

乾熱処理オボアルブミンに存在する可溶性凝集体および部分断片の形成段階検討

Investigation of the formation phase of soluble protein aggregates and partial fragments in dry-heated ovalbumin

○小山 翔大[1,2]、児玉 大介[3]、半田 明弘[1,4]、辻井 良政[1,2]([1]東京農大キユーピーエッグイノベーション、[2]東京農大応生・農化、[3]キユーピー（株）、[4]東京電機大学)
○Shota KOYAMA[1,2], Daisuke KODAMA[3], Akihiro HANDA[1,4], Yoshimasa TSUJII[1,2] ([1]Kewpie Res. Div. Egg Innov., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Kewpie Corp., [4]Tokyo Denki Univ.)

乾熱処理は実用的な卵白タンパク質の物性機能向上法である。乾熱処理した卵白タンパク質において、リジノアラニン架橋を介したタンパク質可溶性凝集体の形成およびオボアルブミン（OVA）のホスホセリン残基を切断部位とした部分断片化が認められた。これら特有の反応（乾熱変性）は微量の水分下で生じるため、乾熱処理の過程では中間体のデヒドロアラニン形成に留まり、十分な水分が供給される溶解時に反応が完了する可能性もある。そこで我々は、乾熱処理および溶解時のどちらの段階にて乾熱変性が生じるか検証した。

陰イオンクロマトグラフィーにて精製した OVA を凍結乾燥し乾熱処理（120℃, 9 h）した。その乾熱 OVA を純水または 1 M リジン塩酸塩溶液にて溶解後、静置（2 h, 25℃）し、還元 SDS-PAGE に供したところ、リジンの有無による可溶性凝集体のバンドへの影響は認められなかった。乾熱 OVA を H_2O および $H_2{}^{18}O$ 溶液にそれぞれ溶解後、凍結乾燥し、H_2O ベースの溶媒系にて Trypsin 消化後、LC-Q/TOF にて MS/MS 分析に行った結果、加水分解による断片化部位への ^{18}O の取り込みは認められなかった。すなわち、乾熱変性は溶解時ではなく乾熱処理の過程で完了していることが示された。

Dry-heating is one of the practical methods for improving the physical properties of egg white. Dry-heating induces specific reactions to egg white proteins, including the formation of soluble protein aggregates through lysinoalanine bonds and phosphoserine-specific fragmentation of ovalbumin (OVA). Those reactions may have remained in the formation of intermediates by only dry-heating and completed by dissolution in water since the dry-heat condition lacks water, a field of chemical reactions. Thus, the formation phase of the soluble aggregates and the fragments were investigated. OVA powder was prepared using anion exchange resin followed by dry-heating at 120℃ for 6 h. After dissolving the dry-heated OVA to H_2O or 1.0 M lysine HCl solution, no significant differences were observed in the SDS-PAGE patterns of soluble aggregates. Before trypsin digestion, the dry-heated OVA was dissolved to a normal H_2O and $H_2{}^{18}O$ and freeze-dried. MS/MS analysis using LC-Q/TOF showed that the mass shift by hydrolysis with $H_2{}^{18}O$ was not observed at the fragmentation sites. Therefore, the data demonstrate that the unique reactions have been completed just during dry-heating.

egg white, non-enzymatic cleavage, dry-heat treatment

発表責任者：小山翔大（sk207738@nodai.ac.jp）

講演番号：2E7p02
講演日時：3 月 25 日 14:01～ 1 号館 E7 会場

疎水性相互作用によるゲル形成における脂肪酸種類の影響

Effect of fatty acid type on gel formation by hydrophobic interaction

○神田 玲奈、山川 忠則（株式会社 明治）
○Reina KANDA, Tadanori YAMAKAWA (Meiji Co., Ltd.)

ヨーグルトやチーズなどの乳タンパク質溶液を酸性化させて作られる酸乳ゲルは、加熱温度、均質化、酸性化等の調製条件が物理特性に及ぼす影響に着目した研究結果に基づき、カゼインミセルの凝集・会合、乳清タンパク質の変性、乳タンパク質と乳脂肪の相互作用等の構造形成メカニズムが明らかにされている。一方で、乳タンパク質と乳脂肪以外の油脂との化学的な相互作用と物理特性について検証した研究は少ない。油脂の選択は、酸乳ゲルの物理特性をコントロールする要因になる可能性があると考え、本研究では還元脱脂乳と脂肪酸組成の異なる油脂を組み合わせた溶液にグルコノデルタラクトンを酸性化剤として添加して酸性ゲルを調製し、その物理特性を評価した。その結果、油脂の種類によって酸乳ゲルの物理特性が変化することを見出した。本発表では、乳タンパク質と油脂を組み合わせた際の物理特性の変化と、その構造形成の要因を推察し報告する。

The acid-induced milk gel, produced by acidifying a milk protein solution, as seen in the manufacture of yogurt and cheese. Based on research results focusing on the effects of preparation conditions such as heating temperature, homogenization, and acidification on physical properties, the structure formation mechanisms of acid-induced milk gels, including the aggregation and association of casein micelles, denaturation of whey proteins, and interaction between milk proteins and milk fat, have been elucidated. However, research on the chemical and physical properties of the interaction between milk protein and fats other than milk fat is limited, despite fats offering the potential for nutritional interactions with milk protein. We hypothesized that the selections of fats may affect the physical properties of acid-induced milk gels. To evaluate these physical properties, we prepared acid-induced milk gels by adding glucono-delta-lactone as an acidifying agent to reconstituted skim milk containing various fatty acid compositions of fats. We found the physical properties of acid-induced milk gels changes by the type of fats. In the presentation, we will discuss how physical properties change based on the type of fats and infer and report on the factors influencing the structural formation.

milk protein, fatty acid chain length, hydrophobic interaction

講演番号：2E7p03
講演日時：3 月 25 日 14:12～ 1 号館 E7 会場

ゴマ由来化合物による phenol 生成酵素の阻害試験

Inhibition assays for the enzyme related to phenol production by sesame-derived compounds

○及川 大樹[1]、阿部 高明[2]、片山 高嶺[1]、中山 亨[3] ([1]京大院生命、[2]東北大院医、[3]東北大院工)
○Daiki OIKAWA[1], Takaaki ABE[2], Takane KATAYAMA[1], Toru NAKAYAMA[3] ([1]Grad. Sch. of Biost., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Med., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Eng., Tohoku Univ.)

Phenyl sulfate は腎臓の糸球体上皮細胞や基底膜への障害などにより、慢性腎臓疾患の進行の原因となることが知られている。Phenyl sulfate の前駆体である phenol はヒト腸内細菌由来の酵素；tyrosine phenol-lyase (TPL)の作用により、食餌由来の L-tyrosine から生成すると考えられているため、同酵素の活性を阻害することにより phenyl sulfate のヒト腸内での生成を抑制し、腎機能低下を予防できると考え、TPL の阻害活性を有する生理活性物質の探索を実施した。植物性ポリフェノール化合物のうち、ゴマに含まれる(+)-sesamin や sesamol 等の化合物は TPL 精製酵素の活性を阻害することが明らかになり、速度論解析の結果、TPL に対して混合型阻害剤として作用することが予想された．同化合物は TPL の粗酵素に対して投与量依存的に作用しただけでなく、*TPL* の相同遺伝子を保有する細菌の phenol 生成活性の抑制にも成功したことから、同疾患の新たな予防・治療への応用が期待される。

Phenyl sulfate is known as a kind of uremic toxin, which damages to renal podocyte or basement membrane, resulting in exacerbation of chronic kidney dysfunction. Phenol, the precursor of phenyl sulfate, is thought to be produced from dietary L-tyrosine by gut bacterial enzyme; tyrosine phenol-lyase (TPL) in human gut. Thus, we screened potent inhibitors of bacterial TPL from plant phenolics for addressing the disease. As a result of enzyme assays, (+)-sesamin and sesamol, derived from sesame seeds, inhibited TPL enzyme, and the inhibition mode was presumed to be mixed-type inhibition. These sesame-derived compounds succeeded in suppression of phenol production by the gut bacteria encoding *TPL*-homologues, in addition to inhibition of crude enzymes of TPL in dose-dependent manners. Based on the obtained results, these sesame-derived compounds can be applied for prevention and treatment for the disease.

tyrosine phenol-lyase, sesame, chronic kidney dysfunction

講演番号：2E7p04
講演日時：3 月 25 日 14:23～ 1 号館 E7 会場

ペプチド制御による発泡酒のマウスフィール向上

Improvement of mouthfeel by controlling polypeptides in low-malt beer

○森下 あい子、望月 マユラ、加藤 優（キリン HD 飲料未来研）
○Aiko MORISHITA, Mayura Mochizuki, Masaru Kato (Institute for Future Beverages, Kirin Holdings Co., Ltd.)

ビールにおけるマウスフィール（炭酸感、フルネス、後味（渋味を含む））は、香味設計において重要な項目である。糖質がマウスフィールの一要素であるフルネスに影響している報告はある（Ｇａｓｔｌら、２０１３年ＥＢＣ）。一方で高分子ペプチドはフルネスと相関があるとの報告（石塚ら、２０１４年ＭＢＡＡ）はあるが、分画物の添加試飲による評価は報告されていない。我々は、低麦芽比率ビール（発泡酒）における高分子ペプチド、及び低分子ペプチドの制御によるマウスフィールへの影響について、１０－２０ｋＤａポリペプチド画分によるスムースさやマウスフィールの向上（２０１６年ＷＢＣ、２０１７年ＭＢＡＡ）、３３０－１０４０Ｄａの低分子ペプチド画分における渋味制御によるマウスフィールの向上（２０１８年ＡＳＢＣ）を報告してきたので、取組み全体について報告する。これら技術は、ビール醸造の香味設計における基礎技術になることが期待される。

Mouthfeel is an important parameter in designing the taste of beer. Low- and high-molecular-weight (HMW) maltodextrins were reported to contribute to the body and mouthfeel of beer (Gastl et al., 2013, EBC). On the other hand, despite the absence of supporting spiking sensory test data, it was reported that the concentration of HMW polypeptides correlates to the fullness of beer (Ishizuka et al., at 2014, MBAA). In this report, we introduce new research on the influence of polypeptides on the mouthfeel of low-malt beer conducted since our recent studies presented at 2016 WBC, 2017 MBAA, and 2018 ASBC. This “peptide modification technology” will be used to further improve the quality of beer in the future.

beer, polypeptides, Mouthfeel

講演番号：2E7p05
講演日時：3 月 25 日 14:34～ 1 号館 E7 会場

バリン欠乏がマウスの腸管に及ぼす影響
Effect of valine deficiency on the intestine of mice
○田島 由梨花[1]、香西 歩[1]、東 侑里[1]、岩槻 健[1]、美谷島 克宏[1]、清水 誠[2]、小西 良子[1]、只石 幹[1]、服部 一夫[1] ([1]東農大・応生、[2]東農大)
○Yurika TAJIMA[1], Ayumi KOZAI[1], Yuri AZUMA[1], Ken IWATSUKI[1], Katsuhiro MIYAJIMA[1], Makoto SHIMIZU[2], Yoshiko SUGITA-KONISHI[1], Miki TADAISHI[1], Kazuo KOBAYASHI-HATTORI[1] ([1]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

我々の以前の研究（2022 年度日本農芸化学会大会）において、24 時間のバリン（Val）欠乏が特異的に腸管オルガノイドの細胞増殖能や幹細胞の自己複製を抑制すること、細胞死を引き起こすことを示した。しかし、これらの結果が in vivo においても反映されるかは不明である。そこで本研究では、in vivo での腸管に及ぼす Val 欠乏の影響を検討し、in vitro 系である腸管オルガノイドにおける Val 欠乏の結果と比較することにより、腸管オルガノイドを用いた評価系の有用性を示すことを目的とした。10 週齢 Lgr5-EGFP マウス（♂3 匹, ♀2 匹）に対して、全アミノ酸含有食あるいは Val 除去食を 3 週間与えた。その後、採取した空腸における幹細胞のマーカー分子の mRNA レベル、幹細胞数の変化、アポトーシスの有無を qPCR や組織染色、フローサイトメトリーにより評価した。その結果、in vivo において Val 欠乏は、腸管の幹細胞の細胞増殖能や自己複製能を抑制していたが、幹細胞に細胞死を引き起こしていなかった。 以上より、in vivo の結果は in vitro の結果を反映していたが、部分的に異なる点も確認された。これは、Val 欠乏を補完する生体内のバックアップ機構が存在するからと考えられる。

We previously showed that 24 h of valine (Val) deficiency specifically suppressed cell proliferative capacity and stem cell self-renewal in intestinal organoids and caused cell death in stem cells. However, whether these results could be applied to intestinal stem cells in vivo has not been examined. Therefore, the aim of this study is to investigate the effects of Val deficiency using mice and demonstrate intestinal organoid system is comparable to in vivo studies. The mRNA level of stem cell markers, the stem cell numbers, and apoptosis evaluated by qPCR, tissue staining, and flow cytometry were investigated using Lgr5-EGFP mice (10 week-old, 3 ♂ and 2 ♀) fed with a diet with or without Val for 3 weeks. The results showed that the Val deficiency suppressed the proliferative and self-renewal abilities but did not cause cell death in stem cells. In conclusion, in vivo studies reflected our previous in vitro results but with partial differences. These differences may be due to backup or feedback systems which are induced by Val deficiency.

valine, intestine, organoid

講演番号：2E7p06
講演日時：3 月 25 日 14:53～ 1 号館 E7 会場

大豆多糖との複合体化による β-コングリシニンの機能改変

Functional improvements in β-conglycinin by conjugation with soybean soluble polysaccharide

○田中 希実、若生 悠希、好田 正、服部 誠（東農工大院・応生化）
○Nozomi TANAKA, Yuki WAKO, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

大豆の主要タンパク質である β-コングリシニンは、高い栄養価と、乳化性など様々な機能特性を備えている。しかし、大豆アレルゲンであり、食品に多い酸性条件下での機能低下から、その利用は制限されている。本研究では、メイラード反応を用いて β-コングリシニンを大豆多糖（SSPS）と複合体化させ、これらの課題の克服を目指した。SSPS を蒸留水に溶解した後、60 分間および 120 分間オートクレーブ処理し、2 種類の加水分解した SSPS 溶液を調製した。β-コングリシニンと SSPS 溶液を 1:5（重量比）で蒸留水に溶解・混合し、凍結乾燥した。この混合物を 50℃、相対湿度 79%で 24 時間メイラード反応を行った後、硫酸アンモニウムによる塩析を用いて、複合体を精製した。濁度法により乳化性を評価したところ、複合体化による有意な改善が認められた。β-コングリシニンおよび 2 種類の複合体を BALB/c マウスに免疫し、血清中の β-コングリシニン特異的抗体価を ELISA 法により評価したところ、β-コングリシニンの免疫原性は SSPS との複合体化により有意に低下した。本研究の結果、SSPS との複合体化は β-コングリシニンの機能改変に有効であると考えられた。

β-conglycinin, a major soy protein, has high nutritional value and its various functional properties such as emulsifying properties. However, its use is limited because it is a soybean allergen and its functional properties decrease under acidic conditions. In this study, β-conglycinin was conjugated with soybean soluble polysaccharide (SSPS) by the Maillard reaction to improve its problem. SSPS was dissolved in distilled water and autoclaved for 60 and 120 min to prepare two hydrolyzed SSPS solutions. β-conglycinin and SSPS dissolved/mixed in distilled water at 1:5 (weight ratio) and then lyophilized. The mixture was incubated at 50°C at a relative humidity of 79% for 24 h. Purified conjugates were obtained by salting-out with ammonium sulphate. Emulsifying property was evaluated using turbidity method and improvement by conjugation with SSPS was observed. Immunogenicity of β-conglycinin and the two conjugates were evaluated by immunizing BALB/c mice with them and measuring value of β-conglycinin-specific antibodies in the serum by ELISA. We found that immunogenicity of β-conglycinin was reduced by conjugating with SSPS. The results of this study indicate that conjugation with SSPS is effective for functional improvement of β-conglycinin.

β-conglycinin, protein conjugation, functional improvement

発表責任者：服部　誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2E7p07
講演日時：3 月 25 日 15:04～ 1 号館 E7 会場

タンパク質食品に対し凍害保護効果を示す大豆ホエー由来タンパク質の分画

Fractionation of protein derived from soybean whey that suppresses the freeze-damaging effect on protein foods.

○南部 美貴[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[2]（[1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・農化）
○Miki Nambu[1], Daiki Oka[2], Yoshimasa Tsujii[2] ([1]Dept. Agric. Chem., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

大豆中の後期胚発生蓄積タンパク質であるデハイドリンにはタンパク質への変性抑制効果があることから、我々がタンパク質性食品に対する添加効果を検証したところ、牛肉パテの加熱時の歩留まり向上効果、冷凍エビのドリップ抑制効果があることを見出した。しかし、リコンビナント体を使用した検証であったことから、食品利用を目指すためには大豆からのデハイドリンの抽出方法を確立する必要がある。これまで、大豆ホエーをクロスフロー式限外濾過にて脱糖・脱塩処理後、酸性下（pH4.0）で加熱（100℃, 30min）することで多くの夾雑タンパク質を除去することができ、乳酸脱水素酵素（LDH）への凍害変性抑制効果も確認された。しかし、分画物中にはまだ複数のタンパク質が存在しどのタンパク質が LDH 凍害変性抑制効果に関わっているのかが不明であったため、さらに各種クロマトグラフィーにて分画を行った。その結果、デハイドリン以外の 10kDa 以下の低分子タンパク質にも LDH 凍害変性抑制効果が示された。また、同タンパク質を LC-MS/MS で解析したところ、Lys リッチな未知のタンパク質が同定された。

Dehydrin, a late embryogenesis abundant protein in soybeans, has a suppressing effect on protein denaturation. We verified the effect of adding dehydrin to protein-based foods and found that it improved the yield of beef patties when heated and inhibited the dripping of frozen shrimp. However, a method for extracting dehydrin from soybeans must be established to use it in food products, since the verification was done with recombinant forms.

Previously, it has been possible to remove many contaminant proteins by treating soybean whey with tangential flow filtration to remove sugars and minerals, and then heating it (100°C, 30 min) under acidic conditions (pH 4.0). The effect of suppressing the inactivation of lactate dehydrogenase (LDH) due to freezing was also confirmed. However, since multiple proteins were still present in the fractionated product, it was unclear which protein was responsible for the freeze-denaturing suppressed effect on LDH. So, we further fractionated using various chromatography techniques. As a result, it was shown that low molecular weight proteins of 10 kDa or less, other than dehydrin, also suppress the freeze-damaging effect on LDH. Furthermore, when the same protein was analyzed by LC-MS/MS, an unknown protein containing a large number of Lys was identified.

Soybean, Protein, Separation

発表責任者：岡　大貴（d3oka@nodai.ac.jp）

講演番号：2E7p08
講演日時：3 月 25 日 15:15～ 1 号館 E7 会場

プラントベースミートを目指した新たな植物タンパク質「ムクナ豆分離タンパク質」の可能性
Potential of Mucuna Bean Isolate Protein (MPI) for Plant-Based Meat
○岡 大貴、中川 莉歌、伊藤 あかり、辻井 良政（東京農大応生・農化）
○Daiki OKA, Rika Nakagawa, Akari Ito, Yosimasa Tsujii (Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

プラントベースミートを目指し、大豆、エンドウ豆に次ぐ植物タンパク質を探索したところ、L-DOPA を豊富に含むムクナ豆（八升豆）から分離したタンパク質（MPI）が大豆（SPI）、エンドウ豆（PPI）同様に加熱凝固性を示した。本研究では MPI の加熱凝固性を解析するため、pH の影響および L-DOPA の影響について検討した。ムクナ豆を粉砕し 10 倍量の純水を加え pH 8.0 にて抽出した溶液を pH 4.0 に調整し沈殿物を回収後、pH 7.0 に調整、透析、凍結乾燥を行い MPI とした。純水にて溶解した MPI 溶液（10 mg/mL）に塩酸を徐々に加えたところ、pH 6.0 から徐々にタンパク質が沈殿し pH 5.0 付近で殆どが沈殿した。pH 5.2 ~ 6.0 において加熱（100 mg/mL, 100 °C, 30 min）しゲル強度を測定したところ、どの pH も大豆分離タンパク質（SPI）よりも 5 ~ 10 倍高い値を示し、pH が低いほどゲル強度が高くなった。ポリビニルポリピロリドン（PVPP）を終濃度 1%となるように加え同様に MPI を抽出したところ PVPP 無添加と比較し抽出液の色が薄くなった。また、加熱ゲル強度は 40%程度まで低下した。

In the search for plant proteins next to soybeans and peas for plant-based meat, protein (MPI) isolated from Mucuna bean, which is rich in L-DOPA, exhibited the same heat coagulability as SPI and PPI. In this study, the effects of pH and L-DOPA were examined to analyze the heat coagulability of MPI. Mucuna beans were crushed and extracted with 10 times the volume of water (pH 8.0). The solution was adjusted to pH 4.0, the precipitate was separated, adjusted to pH 7.0, dialyzed, and freeze-dried to obtain MPI. When hydrochloric acid was gradually added to the MPI solution (10 mg/mL) dissolved in water, the protein was gradually precipitated from pH 6.0, and most of the protein was precipitated at around pH 5.0. After heating (100 mg/mL, 100 °C, 30 min) at pH 5.2 ~ 6.0, the gel strength was measured and was 5 ~ 10 times higher than that of SPI at all pH values, and the lower the pH, the higher the gel strength. When MPI was extracted with polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) at a final concentration of 1%, the color of the extract became lighter than that without PVPP. In addition, the heating gel strength decreased to about 40%.

Plant-Based Food, Heat coagulation, Gel

発表責任者：岡　大貴（d3oka@nodai.ac.jp）

講演番号：2E7p09
講演日時：3 月 25 日 15:26～ 1 号館 E7 会場

培養肉の風味向上のための細胞内アミノ酸分析

Intracellular amino acid analysis for the enhancement of cultured meat flavor

○古橋 麻衣[1,2]、澤山 淳[3]、竹内 昌治[1,2,3] ([1]東大院工、[2]東大生研、[3]東大院情報理工)
○Mai FURUHASHI[1,2], Jun SAWAYAMA[3], Shoji TAKEUCHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo, [2]IIS, The Univ. of Tokyo, [3]Grad. Sch. of Inf. Sci., The Univ. of Tokyo)

近年、世界人口の増加や食生活の変化に伴い、食肉の需要が増大しており、従来の畜産だけでは食肉の需要を満たせなくなる可能性が懸念されている。そこでこの問題に対処するための新たな食肉生産法として、培養肉が注目されている。培養肉は家畜の細胞を培養して作られる肉であり、その普及には味や栄養素の特性理解が不可欠である。しかし、培養肉の培養条件による味や栄養素の変化に関する知見はまだ少ない。そこで本研究では、培養肉の主原料となる細胞の呈味成分に焦点を当て、培養に伴う細胞内アミノ酸の変化を調査した。
牛肉から採取したウシ筋芽細胞を 10% FBS を含む培地で継代培養し、継代時の細胞内アミノ酸を LC-MS/MS で測定した。また、同時に採取した細胞について 2% HS を含む培地で分化培養を行い、分化後の細胞内アミノ酸を測定した。その結果、原料となる牛肉と比較して細胞内ではうま味を呈するアミノ酸であるグルタミン酸の比率が高く、甘味を呈するアミノ酸であるアラニンが少ないことが分かった。また、分化に伴い細胞内アミノ酸の総量が増加する傾向が見られ、培養条件によって呈味成分が変化する可能性が示唆された。今後は三次元培養した筋組織を用いて、培地組成や力学的負荷などによる影響を呈味成分解析により明らかにし、より牛肉に近い培養肉を作る方法を探索する。

The global rise in population and dietary shifts have led to an increased demand for meat, raising concerns about the sustainability of traditional livestock farming. Cultured meat, produced by cultivating livestock cells, has emerged as a potential alternative. Our study examined how cultivation conditions affect the flavor components, specifically amino acids, in these cells. We found a higher level of umami-related glutamic acid and a lower level of sweet-tasting alanine in cultured cells compared to original beef. Additionally, the total amino acid content within the cells tended to increase with differentiation. These results suggest that cultivation conditions can influence the taste profile of cultured meat. In future studies, we will analyze the amino acid composition in various 3D tissue culture condition to replicate the composition of beef more closely.

Bovine cells, Amino Acid Profile, Taste

講演番号：2E7p10
講演日時：3 月 25 日 15:37～ 1 号館 E7 会場

新しい食品材料としての納豆菌
Bacillus subtilis natto as a novel food material
○升水 友太[1]、深瀬 寛太[4]、佐々木 伸啓[2]、髙橋 栄子[4]、荒川 和晴[3]、大橋 由明[2]、斎藤 菜摘[4] ([1]鶴岡高専　専攻科、[2]フェルメクテス(株)、[3]慶大先端生命研、[4]鶴岡高専　創造工)
○ Yuta MASUMIZU[1], Kanta FUKASE[4], Nobuhiro SASAKI[2], Eiko TAKAHASHI[4], Kazuharu ARAKAWA[3], Yoshiaki OHASHI[2], Natsumi SAITO[4] ([1]Dept. Adv. Eng., NIT, Tsuruoka College, [2]Fermecutes, Inc., [3]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [4]Dept. Creative Eng., NIT, Tsuruoka College)

環境負荷、健康、人口増大などによる食糧需給の課題により代替タンパク質の需要が急速に高まっている。我々は、枯草菌の一種である納豆菌の菌体を新たなタンパク質性食品材料として利用するための研究開発に着手した。本大会では、食品としての納豆菌粉の特性と使用実施例、ならびに資源循環的な納豆菌粉の製造法の検討について発表する。

胞子形成欠損納豆菌株を、合成培地を用いてジャーファメンターで培養し、培養物を凍結乾燥後に粉砕することで納豆菌粉を得た。納豆菌粉のタンパク質含量は重量分率で約 73%と既存の高タンパク質性食材と比較しても高い値を有しており、納豆菌粉を食品に含有させることで高栄養価を付与できる可能性を見出した。納豆菌粉の物理化学的性状を分析した結果、吸水率が約 350%で、小麦粉と比較すると 5 倍程度の値を示した。納豆菌粉を含有した食品について特性を評価したところ、菌粉の添加により食品の保水性向上などの新たな機能が付与されることが明らかになった。さらに、資源循環的な納豆菌粉の製造に向けた、大豆ミールなど食品副生物を培地とした納豆菌の培養方法についても紹介したい。

The demand for alternative proteins is increasing due to food supply problems. We have started research on the use of *Bacillus subtilis* natto as a novel protein food material. We will present the properties and applications of using *B. subtilis* natto powder as a food and a resource-recycling method for producing *B. subtilis* natto powder.

B. subtilis natto powder was obtained by lyophilization and grinding of vegetative cells cultured in a jar fermenter. *B. subtilis* natto powder was found to be a highly nutritious food with a protein content of approximately 73%. The water absorption rate of *B. subtilis* natto powder is approximately 350%, which is equivalent to about five times that of wheat flour. Evaluation of the characteristics of food products containing *B. subtilis* natto powder showed that *B. subtilis* natto powder provides functions, such as improving the water retention properties of food products. We also introduce a culture method of *B. subtilis* natto using food by-products such as soybean meal as a culture medium in a resource-recycling manner.

Bacillus subtilis natto, alternative protein, food by-products

発表責任者：斎藤菜摘（natsumi@tsuruoka-nct.ac.jp）

講演番号：2E7p11
講演日時：3 月 25 日 15:56～ 1 号館 E7 会場

小麦リポキシゲナーゼアイソザイムのグルテニンサブユニット構成変化に与える影響
Effect of wheat lipoxygenase isoenzyme on changes in glutenin subunit composition
○高 悦、宮城 怜奈、高橋 俊介、椎葉 究（東京電機大院）
○YUE GAO, RENA MIYAGI, SHUNSUKE TAKAHASHI, KIWAMU SHIIBA (Tokyo Denki Univ.)

小麦リポキシゲナーゼ(LOX)は、小麦粉中に含まれる分子量 90～100kDa の酸化酵素であり、活性メチレンを持つ不飽和脂肪酸を酸化し、ペルオキシドラジカルを発生させる作用をもつ。小麦 LOX には大きくの 3 種のアイソザイムがあり、アイソザイムごとに生成物の脂肪酸酸化物の分子種が異なる。反応の際に発生したラジカルは、連鎖的に酸化反応を引き起こし、グルテンの構造や物性に影響を与えると考えられている。椎葉らは小麦胚芽から LOX の 3 種のアイソザイムを精製し、それらの酵素学的な性質と小麦ドウ発酵中グルテニンの構造変化に与える影響などを報告しているが、それらはグルテニンの表面疎水性を減少し、可溶性と不溶性グルテニンサブユニット画分の構成を変化させることを報告している。その中で 9 位に酸素分子を導入されたリノール酸ペルオキシドを生成する小麦 LOXⅢが、グルテニンサブユニットの構成変化を最も強く引き起こし、結果的に製パン性にプラスの影響があることを報告しているが、その機構については、不明な点が多い。本研究では、組換え酵母により大量発現させた小麦 LOX アイソザイムⅢを小麦粉と反応させたときの不溶性グルテニンの高分子量と低分子量サブユニットを構成するタンパク質を RP-HPLC により分画し、LOXⅢのグルテニン高次構造に与える影響について機構解析を行った。

Wheat lipoxygenase (LOX) is an oxidase with a molecular weight of 90-100 kDa contained in wheat flour and has the effect of oxidizing unsaturated fatty acids with active methylene and generating peroxide radicals.LOX has three major isozymes, and each isozyme produces a different molecular species of fatty acid oxidant. It has been reported that these radicals generated would cause a chain reaction of oxidation and affect the structure and physical properties of gluten. Shiiba *et al.* purified three LOX isoenzymes from wheat germ and reported their enzymatic properties and its effects on structural changes of glutenin during wheat dough fermentation. They also reported the decreasing in the surface hydrophobicity on glutenin causes to alter the composition of subunits in soluble and insoluble glutenin. In this study, using RP-HPLC the effect of the wheat LOX isoenzyme Ⅲ (rLOXⅢ) that expressed in large quantities by recombinant yeast on the change in glutenin subunit composition (HMW and LMW subunits) extracted from wheat flour reacted with rLOXⅢ was investigated.

lipoxygenase, glutenin subunit, insolubility

発表責任者：GAO YUE（23udb01@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：2E7p12
講演日時：3 月 25 日 16:07～ 1 号館 E7 会場

小麦リポキシゲナーゼアイソザイムの可溶性グルテニンサブユニット構成変化に与える影響
Effect of wheat lipoxygenase isoenzyme on changes in soluble glutenin subunit composition

○宮城 怜奈、高 悦、高橋 俊介、椎葉 究（東京電機大学）
○Reina MIYAGI, Etu KOU, Syunsuke TAKAHASHI, Kiwamu SHIIBA (Tokyo Denki Univ.)

小麦リポキシゲナーゼ(LOX)は、小麦粉中に含まれる分子量 90～100kDa の酸化酵素であり、活性メチレンを持つ不飽和脂肪酸を酸化し、ペルオキシドラジカルを発生させる作用をもつ。小麦 LOX には大きく 3 種類のアイソザイムがあり、アイソザイムごとに生成物の脂肪酸酸化物の分子種が異なる。反応の際に発生したラジカルは、連鎖的に酸化反応を引き起こし、グルテンの構造や物性に影響を与えると考えられている。椎葉らは小麦胚芽から LOX のアイソザイムを 3 種類精製し、それらの酵素学的な性質と小麦ドウ発酵中グルテニンの構造変化に与える影響などを報告しているが、それらはグルテニンの表面疎水性を減少し、可溶性と不溶性グルテニンサブユニット画分の構成を変化させることを報告している。その中で 9 位に酸素分子を導入されたリノール酸ペルオキシドを生成する小麦 LOXⅢが、グルテニンサブユニットの構成変化を最も強く引き起こし、結果的に製パン性にプラスの影響があることを報告しているが、その機構については、不明な点が多い。本研究では、組換えパン酵母により大量発現させた小麦 LOX アイソザイムⅢを小麦粉と反応させたときの可溶性グルテニンの高分子量と低分子量サブユニットを構成するタンパク質を RP-HPLC により分画し、LOXⅢのグルテニン高次構造に与える影響について機構解析を行った。

Wheat lipoxygenase (LOX) is an oxidase with a molecular weight of 90-100 kDa contained in wheat flour, and it catalyzes unsaturated fatty acids with active methylene to generate peroxide radicals. LOX has three major isozymes, and each isozyme produces a different molecular species of fatty acid oxidant. It has been reported that these radicals generated would cause a chain reaction of oxidation and affect the structure and physical properties of gluten. Shiiba *et al.* purified three LOX isoenzymes from wheat germ and reported their enzymatic properties and its effects on structural changes of glutenin during wheat dough fermentation. They also reported the decreasing in the surface hydrophobicities on glutenin causes to alter the composition of subunits in soluble and insoluble glutenin.

In this study, using RP-HPLC the effect of the wheat LOX isoenzyme Ⅲ (rLOXⅢ) that expressed in large quantities by recombinant yeast on the change in glutenin subunit composition (HMW and LMW subunits) of soluble glutenin extracted from wheat flour reacted with rLOXⅢ was investigated.

lipoxygenase, glutenin subunit, solubility

発表責任者：宮城怜奈（23rmb19@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：2E7p13
講演日時：3 月 25 日 16:18～ 1 号館 E7 会場

ω-5 グリアジンを分解するマイタケ由来酵素の同定

Identification of enzymes that degrades ω-5 gliadin from maitake

○大小田 直史、平野 真衣、川端 真由、陸 鵬、伊藤 英晃、岡本 研、鈴木 道生、奥田 傑、永田 宏次（東大院農）
○Naofumi OKODA, Mai HIRANO, Mayu KAWABATA, Peng LU, Hideaki ITOH, Ken OKAMOTO, Michio SUZUKI, Suguru OKUDA, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

小麦に含まれるω-5 グリアジンは食物運動誘発性アナフィラキシーの主要アレルゲンであり、その主要エピトープとなるアミノ酸配列として QQFPQQQ が知られている。このエピトープを分解するプロテアーゼを、自然界において分解者として働き多様なプロテアーゼを有しているキノコから探索した。５種類のキノコ（マイタケ、エリンギ、エノキダケ、ブナシメジ、シイタケ）から粗精製したプロテアーゼ溶液と化学合成したエピトープペプチドを反応させ LC-MS で分析したところ、マイタケが最も効率よくエピトープペプチドを分解し、その切断部位はプロリンの C 末端側であることが明らかになった。そこで、マイタケの粗精製プロテアーゼ溶液を硫安分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの手法で分画を進めたところ、少なくとも３種類の異なるプロテアーゼがマイタケに含まれていることが示唆された。これらのプロテアーゼと、大腸菌で発現させて精製したω-5 グリアジンを反応させた結果、３種類のプロテアーゼがグリアジンを分解することが確認された。現在これらのプロテアーゼの同定を進めており、同定後に大腸菌で発現したプロテアーゼを精製し、小麦粉に含まれるω-5 グリアジンやその他のグリアジンの分解への応用を検討する。

The ω-5 gliadin in wheat is a major allergen of food dependent exercise induced anaphylaxis, and QQFPQQQ is known as its major epitope sequence. We searched for proteases that degrade this epitope sequence in mushrooms, which are known to act as degraders in nature and possess a variety of proteases. The maitake mushroom was found to degrade the substrate most efficiently, cleaving it at the C-terminus of proline. We then fractionated the crude protease solution purified from maitake by ammonium sulfate fractionation, anion exchange chromatography, and gel filtration chromatography. As a result, three different types of proteases were thought to be present in maitake. Analysis of samples obtained by reacting these proteases with full-length ω-5 gliadin expressed in *E. coli* by SDS-PAGE confirmed that the three proteases degrade gliadin. At present, we are in the process of identifying two of the three proteases by LC-MS/MS and Edman degradation, after identification, we plan to purify the protease expressed in *E. coli* and investigate whether it can be applied to the degradation of ω-5 gliadin and other gliadins in flour.

gliadin, protease, mushroom

講演番号：2E7p14
講演日時：3 月 25 日 16:29～ 1 号館 E7 会場

種々の溶液中での米タンパク質の溶出

Soluble proteins of rice in various solutions

○大能 俊久、児玉 一馬（福井工大）
○Toshihisa OHNO, Kazuma KODAMA (Fukui Univ. of Tech.)

米のタンパク質は栄養成分として重要なだけではない。総タンパク質量が多いと米飯テクスチャーが劣化するなど米飯の物性やおいしさの点からも重要な成分である。演者らは還元剤溶液を使用して米飯テクスチャーに関わる要因を調べ、難溶性タンパク質とされるグルテリンの脱離、溶出が増えると米飯テクスチャーが改良するという米飯テクスチャーのメカニズムの仮説を立てた。これらのことから、米において可溶化するタンパク質の量と質を把握することは重要だと考える。そこで、界面活性剤溶液中での米タンパク質の溶出挙動を調べた。

40℃で 1 か月貯蔵した精米 0.5 g を試料とし、ミリ Q 水、10 mM、または 30 mM の界面活性剤溶液を 1 ml 加えて 1 時間浸漬した。その後、浸漬液を遠心分離して上清液を得た。この上清中のタンパク質量をローリー法で定量して可溶化タンパク質量とした。なお、標準溶液としてウシ血清アルブミン溶液を使用した。また、上清中のタンパク質について SDS-PAGE を行った。

ミリ Q 水に比べてドデシル硫酸ナトリウム溶液とドデシル硫酸リチウム溶液では可溶化するタンパク質量が 2 倍以上に増加した。ドデシル硫酸ナトリウム溶液とドデシル硫酸リチウム溶液では SDS-PAGE においてグルテリンと推測されるタンパク質が認められた。

The proteins of rice are important as the nutritional ingredients. And high content of proteins causes the deterioration of cooked rice texture. We think that it is important to observe the quantity and quality of soluble proteins in rice. So we examined the soluble proteins in several detergent solutions.

The polished rice grains stored for one month at 40°C were soaked in various solutions for one hour. Then soluble proteins were measured by Lowry method. In sodium dodecyl sulfate solution and lithium dodecyl sulfate solution the quantities of soluble proteins increased more than doubled compared to that of milli-Q water. We observed the bands which were estimated to be glutelin in SDS-PAGE.

rice, soluble protein, Lowry method

発表責任者：大能俊久（ohno@fukui-ut.ac.jp）

講演番号：3B1p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 B1 会場

培養肉生産に用いる資源と市販肉とのトランスクリプトーム解析

Differences between muscle stem cells for producing cultured meat and broiler chicken from the perspective of transcriptomics

○田村 倫子[1]、樗澤 怜[1]、輿石 雄一[2]、清水 達也[3]、五十君 靜信[4]([1]東農大・応生物、[2]東農大・ゲノム解析セ、[3]東女医・先端生命医研、[4]東農大・食品安全研究セ)
○Tomoko TAMURA[1], Ryo Bunazawa[1], Yuichi Koshiishi[2], Tatsuya Shimizu[3], Shizunobu Igimi[4] ([1]Appl. Biosci., Tokyo Agric. Univ., [2]NODAI Genome Res. Center, [3]Advanced Biomed. Engineering Sci., Tokyo Women's Med. Univ., [4]FSRC, Tokyo Agric. Univ.)

【背景・目的】海外では、細胞培養技術を用いたいわゆる培養肉が市場に出まわる国が出はじめている。我が国においては、当該食品の開発が急速に進められており、市販に向けて安全性の議論が必要である。しかし培養肉が従来の食肉に比較しどのような特徴があるのか、情報が乏しい。そこで、培養肉生産の初段階に用いる筋肉細胞と市販肉とを比較して、基礎的知見を得ることを目的とする。まずはじめの検討として、トランスクリプトーム解析により遺伝子発現パターンの違いに着目した。
【方法】鶏胚もも肉から線維芽細胞と筋芽細胞を単離し、継代 3～5 代目の細胞を 3 サンプルずつ得た。市販肉は、精肉店から山梨県産の飼育約 40 日の鶏 3 羽のもも肉を購入した。全 RNA を抽出し次世代シークエンサーに供した後、トランスクリプトーム解析を行った。
【結果・考察】繊維芽細胞と市販もも肉を比較すると、発現量が 5 倍以上異なる遺伝子数は解析に用いた全 25440 遺伝子のうち約 18%の 1438 遺伝子あった。GO エンリッチメント解析を行うと、線維芽細胞で発現量が増加した遺伝子には、細胞接着に関わる遺伝子や、細胞周期の調節に関わる遺伝子が含まれた。一方、市販もも肉で発現量が増加した遺伝子には、筋肉の収縮や重合、分化に関わるものが含まれた。筋芽細胞と市販もも肉との比較においても、ほぼ同じ結果が得られた。

Cultured meat has recently been on the market in some countries. In Japan, the development of cultured meat products is proceeding rapidly. It is important to assess the safety of the novel food before its introduction to the market. However, little information is available on the characteristics of the final production compared to conventional meat. In this study, we performed transcriptome analysis to compare differentially expressed genes between stem cells which is used in the former step in the process of production of cultured meat and commercially available meat.

Fibroblasts and myoblasts were isolated from embryo thigh muscle in chicken eggs. Three aliquots of cells at passage three to five were used as samples. Chicken thigh meat from 40-day-old broiler chicks were purchased from a local store. Total RNA was extracted and applied next-generation sequencing.

A total of 1438 differentially expressed genes (DEGs) out of 25440 genes were found between fibroblasts and broiler chicks. GO enrichment analysis revealed that DEGs associated with negative regulation of cell adhesion and cell cycle regulation were up-regulated in fibroblasts. In contrast, DEGs related to muscle cell metabolisms were down-regulated in fibroblasts. The same tendency was shown between myoblasts and broiler chicks.

cultured meat, chicken thigh, transcriptome analysis

発表責任者：田村倫子（t3tamura@nodai.ac.jp）

講演番号：3B1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 B1 会場

高度α化小麦粉の添加による小麦粉二次加工品の硬化抑制とその機序解析

Hardening prevention of secondary processed wheat products by blending high-degree pre-gelatinized flour and its analyzed mechanism

○丸田 草太[1]、木元 絵梨[1]、南部 優子[1]、谷 史人[1]、佐藤 開[2]、松村 康生[3]、松宮 健太郎[1]([1]京大院農、[2]（株）日清製粉グループ本社・基礎研究所、[3]京大生存研)
○ Sota MARUTA[1], Eri KIMOTO[1], Yuko NANBU[1], Fumito Tani[1], Hiraku SATO[2], Yasuki MATSUMURA[3], Kentaro MATSUMIYA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Center for Basic Science, Nisshin Seifun Group Inc., [3]RISH, Kyoto Univ.)

小麦粉二次加工品は保存によって経時的に硬化する。本研究は、食品添加物を使わずに物理的処理で改変した小麦粉を原料の一部として添加することで系全体の硬化を抑えられることを示した上で、その発現メカニズムを分子レベルで分析した。小麦粉の懸濁液を 100°C 超で糊化させた後、凍結乾燥・粉砕して高度α化小麦粉を得た。これを添加した小麦粉二次加工品モデルは保存後も硬くなりにくく、その効果は従来のα化小麦粉以上であった。硬化耐性を発現させる本体が高度α化された澱粉であることを確認したうえで、モデル食品に含まれる澱粉を X 線回折法に供したところ、高度α化澱粉を加えたモデル食品の硬さの違いは、その老化抑制効果が従来品を上回ることにより説明できた。

また、高度α化された澱粉は冷水に分散させると粘稠な溶液になった。この変化は、糊液をヨウ素呈色させたときの吸光波長の違いや走査型電子顕微鏡法での観察結果から、アミロペクチン分子の可溶性が高まったことに帰属できた。高度α化澱粉に含まれるアミロペクチン分子は従来のα化処理を超える高温・多加水によって、さらに水和が進んでおり、かさ高いハイドロコロイドとしてふるまったと解釈できる。この分子が澱粉粒の間隙に滲出したアミロース同士の凝集や再結晶化を防ぎ、従来のα化処理を施した場合よりも硬化を抑制したと推察される。

Secondary processed wheat products periodically harden depending on the storage. This study revealed that an addition of flour modified by physical treatment as part of the ingredients can prevent the hardening of the whole product and analyzed its molecular mechanisms. A flour suspension was gelatinized at above 100°C, then freeze-dried and ground to prepare high-degree pre-gelatinized (HPG) flour. The flour added to a modeled product prevented hardening of the product during refrigeration than a conventional pre-gelatinized flour. This result can be explained by retrogradation of starch in the modeled product by X-ray diffraction measurement.

The suspended starch with high viscosity probably included highly solubilized amylopectin, proved via the iodine staining and electron microscopy. The amylopectin molecules in HPG starch may have been highly hydrated with more improved gelatinization than the conventional modified starch and behaved as a hydrocolloid with expanded shape. These molecules probably blocked aggregation/recrystallization of amylose molecules leaked in the gap of starch granules, leading to the enhanced prevention of hardening than the conventional pre-gelatinization.

high-degree pre-gelatinized wheat flour, retrogradation, hydrocolloid

講演番号：3B1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 B1 会場

国産強力品種「夏黄金」の小麦粉生地の強力性を決定する理化学的要因の解析
Analysis of physicochemical factors determining the dough strength of a Japanese strong wheat cultivar “Natsukogane”

○石塚 貴大[1]、松宮 健太郎[1]、池永 幸子[2]、南部 優子[1]、中村 俊樹[2]、松村 康生[3]([1]京大院農、[2]東北農研、[3]京大生存研)
○Takahiro ISHIZUKA[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Sachiko IKENAGA[2], Yuko NANBU[1], Toshiki NAKAMURA[2], Yasuki MATSUMURA[3] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Tohoku Agricultural Research Center, NARO, [3]RISH, Kyoto Univ.)

国産コムギ品種「夏黄金」は、発現するグルテンサブユニット組成やタンパク質含有量が同じでありながら栽培条件によって強力から超強力粉へと変化し、異なる製パン性を示すことが知られている。超強力粉は、「ゆめちから」に代表されるように国産中力粉と混合利用によりグルテンを強力化できることから「夏黄金」は、強力と超強力の２つのタイプでの利用可能性を有する特異な小麦品種である。その利点を最大限利用するためには、その変化の原因を解明し制御することが求められる。そのような制御を行うための基礎的知見を得ることを目的として、本研究では、製パン性を特徴づける生地特性を明らかにし、グルテンの微細構造観察を行った。生地中のグルテンの分子間結合を解析して、化合物の添加試験により分子間結合を左右する要因を探索した。その結果、製パン性はミキシング直後の生地の硬さと伸展性によって特徴づけられた。走査型電子顕微鏡法により、硬くて伸展性の低い生地のグルテンは、ネットワーク構造が高度に発達し、澱粉粒子に絡みついていることがわかった。グルテンを含むタンパク質を SDS によって抽出し、2-ME により部分還元を行った後、SDS-PAGE を用いて調べたところ、グルテンネットワークの発達度合いはその分子間結合の多さによって説明できるものであった。添加試験の結果からは、この分子間結合の形成に金属塩とリン酸の混合物が関与することが示唆された。

A wheat cultivar “Natsukogane,” is known to exhibit different bread-making quality depending on growing conditions, changing from strong to extra-strong flour, even though the expressed gluten subunit composition and protein content are the same. To maximize the advantage of this cultivar, the causes of these changes must be identified and controlled.

To gain fundamental knowledge for such control, this study clarified dough characteristics and microstructure of gluten. The intermolecular bonding of gluten in dough was analyzed, and factors affecting the bonding were explored through an addition test. The results showed that bread-making quality was characterized by dough hardness and extensibility immediately after mixing. Gluten in dough with high hardness and low extensibility had a highly developed network structure. SDS-PAGE showed that the degree of development of gluten network could be explained by the amount of intermolecular bonding. An addition test suggested that a mixture of metal salts and phosphoric acid might be involved in the formation of intermolecular bonding.

Natsukogane, dough strength, bread-making quality

発表責任者：石塚貴大（hi_zuka717@icloud.com）

講演番号：3B1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 B1 会場

Alkaline treatment of soy protein isolate improves foaming capacity of egg-free cakes via increased starch gelatinization

○VARISARA VARANURANGSEE[1], HIROYUKI KANATANI[2], YUKO NANBU[1], YOSHIHIKO SAITO[2], FUMITO TANI[1], KENTARO MATSUMIYA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Fuji Oil Co., Ltd.)

Cakes with a growing global market are widely manufactured from techno-functional egg and milk. These materials are, however, increasingly causing environmental issues, therefore should be replaced by eco-friendly soybean materials. There have been several papers trying to formulate the low functional soybean with partial replacement and food additives, but they are still challenging. In this study, effects of physical and chemical modifications on the volume of egg-free SPI cakes were investigated.

SPI powder was suspended in water and modified with heat treatment, Maillard reaction with sugar, alkaline treatment and their combinations[1),2),3)]. Modified SPI suspension was then blended with cake mixes to make cake batter. The batter was baked in a convection gas oven to obtain a cake. Sampled batter and cake were analyzed by height and temperature measurements, dynamic mechanical analysis (DMA), cryo-scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC).

Between all the modification methods, alkaline treated SPI (ASPI) cake presented the optimum in height, 90% of egg cake. The ASPI cake was followed by heat-alkaline treated, heat treated, Maillard reacted ones, respectively. An analytical approach revealed that the ASPI batter behaved more similarly to egg batter, compared to SPI batter in temperature dependent mechanical properties by DMA. These differences were likely attributed to an increased foaming capacity of the batter based on improved gelatinization of starch particles via cryo-SEM and DSC. The obtained results in this study suggest that alkaline treatment of SPI reduced its interfering effect, probably by altering the temperature of SPI gelation competing with starch gelatinization in water absorption. These findings will contribute to further improvement of SPI in cake making.

[1] Y. Y. Shao, K. H. Lin, and Y. J. Kao, *J Food Qual*, vol. 39, no. 6, pp. 695–706, Dec. 2016

[2] R. Li *et al.*, *J Food Sci Technol*, vol. 52, no. 9, pp. 6067–6072, Sep. 2015

[3] J. Jiang, J. Chen, and Y. L. Xiong, *J Agric Food Chem*, vol. 57, no. 16, pp. 7576–7583, 2009

Soy protein isolate, Egg-free cake, Alkaline treatment

発表責任者：ワラヌランシーワリサラー（varanurangsee.varisara.25f@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B1p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 B1 会場

液中に液体を描画する技術に基づく 3D デザイン飲料の開発
Development of 3D designed beverage based on the technique of liquid drawing
○井之上 一平[1]、花崎 逸雄[2] ([1]サントリーグローバルイノベーションセンター（株)、[2]農工大)
○Ippei Inoue[1], Itsuo Hanasaki[2] ([1]Suntory Global Innovation Center, [2]Tokyo Univ. Agriculture and Tech.)

３D 印刷技術は食品製造にも応用され、ペースト化食材をインクとして従来製造法では実現できない複雑な構造の食品を実現している。しかし、液体中に液体を３D 造形できる技術は存在せず、固形食品で示された新しいコンセプトの飲料商品の開発検討はされていない。我々は新しい飲料商品を生み出すことを目的に、液体中に別の液体で３D パターンを形成する液体描画技術を開発した。

液中の液体３D パターンの拡散、浮遊沈降を抑制するため、拡散の遅いサイズの粒子を含有し、キャンバス飲料と同じ比重となるインク飲料を調整した。インク内の微粒子は Stokes-Einstein の式で予測できる拡散挙動を示し、少なくとも直径 0.1μm から 100μm 程度の微粒子は液体描画に適していることが示唆された。また、対流の抑制にはレイノルズ数を低く抑えたノズル運動が効果的であり、レイノルズ数が 10 以下で比較的安定な線状の液体パターンが得られた。これらの結果をもとに、ロボットアーム運動と連動してインク吐出できる液体描画装置を試作し、市販飲料をベースとしたキャンバス飲料中に可食性微粒子を含むインク飲料でイラストを描くことにも成功した。

Although 3D printing technology is also promising for food manufacturing, there has been no technology to create 3D liquid patterns in liquids. As a consequence, there has been no beverage product based on 3D printing, in contrast to the solid foods. We have developed liquid drawing technology to create 3D liquid patterns in beverage that can meet diverse product needs. To create a liquid pattern in the liquid, we designed conditions to suppress diffusion and sedimentation/floating of liquid pattern based on fluid dynamics. To suppress diffusion, sedimentation and floating, a suitable ink beverage should contain particles with slow diffusion rates and have the same mass density as the canvas beverage. The behavior of particles in the ink can be predicted by the Stokes-Einstein equation, suggesting that particles with diameters between 0.1 μm and 100 μm are feasible for liquid drawing. To suppress convection, nozzle motion with low Reynolds number was effective. Relatively persistent line-shaped liquid pattern was experimentally obtained when the Reynolds number was below 10. Based on these results, we created a liquid drawing device that contained a head part capable of ejecting ink synchronized with the robot arm. Using this device, we successfully drew pictures in a canvas beverage consisting of commercial beverages using ink beverages that contained edible particles.

3D food printer, Microparticles, Liquid

発表責任者：井之上一平（ippei_inoue@suntory.co.jp）

講演番号：3B1p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 B1 会場

米麹の配合によりフィチン酸分解・イノシトール生成を促進する玄米甘酒の製法開発

Enhancement of dephosphorylation of phytic acid to inositol in brown rice *amazake* by utilizing *rice-koji* varieties

○丸井 淳一朗[1]、白石 洋平[2]、竹浦 澪[2]、シリナン ションプーセン[3]、パティナン ワリチャナン[3]、サイビセン ブロム[4] ([1]国際農研、[2]ビオック、[3]カセサート大食品研、[4]ラオス大農)
○Junichiro MARUI[1], Yohei SHIRAISHI[2], Mio TAKEURA[2], Sirinan SHOMPOOSANG[3], Patthinan VARICHANAN[3], Sayvisene BOULOM[4] ([1]JIRCAS, [2]Bioc, [3]IFRPD, [4]FAG-NUoL)

麹甘酒はコメと米麹で作る日本の伝統食品な栄養食品である。我々は、日本の米麹を利用した東南アジアでの麹甘酒の製造と普及を通じ、生活習慣病の予防や開発途上地域における栄養不良の改善に寄与することを目指している。近年、タイ、ラオスなど東南アジアの国々でも玄米の栄養や機能性成分への関心が高まり、現地の多様な有色米の色素・有用成分は糠層に多いことからも、玄米の栄養・機能性成分を効率よく摂取できる加工技術の開発が望まれる。そこで本研究では、米麹と玄米でつくる麹甘酒（玄米甘酒）の栄養価を高めるため、キレート作用でミネラルと結合する玄米のフィチン酸（イノシトール 6 リン酸）を脱リン酸化し、ビタミン様物質、発育因子として知られるイノシトールを生成する酵素活性に着目した米麹の選抜と配合による製法の最適化に取り組んだ。

一般的な麹甘酒用とされる黄麹菌の米麹による玄米甘酒では発酵前に比べ約 8 割のフィチン酸が残存したが、クエン酸を含む白麹の場合には約 2 割まで低減され、イノシトール生成量は 5 倍に増加した。評価した黄麹菌株からは、糖化発酵を酸性に調整することでフィチン酸分解・イノシトール生成が促進されるものも見出された。白麹の使用は玄米甘酒の糖化の程度や酸味による嗜好性への影響もあり、味覚センサ分析、官能評価の結果にもとづく黄麹・白麹の配合比の検討についても報告する。

This study aims to contribute to the prevention of lifestyle-related diseases and the improvement of malnutrition in SE Asian countries such as Thailand and Laos by disseminating amazake, a traditional nutrition food made from rice and rice-*koji* from Japan. We here attempted to evaluate and optimize the use of rice-*koji* varieties to enhance nutritional value of amazake made from brown (unpolished) rice by strengthening dephosphorylation of phytic acid which chelates minerals. The dephosphorylated product namely inositol is also known as a vitamin-like / infant growth factor compound. Dephosphorylation of phytic acid and production of inositol in brown rice *amazake* made by citrate-containing white-*koji* were markedly higher compared to the product made by a yellow-koji strain that generally used for *amazake*. Some yellow-*koji* strains can enhance the dephosphorylation in artificially acidified fermentation condition, suggesting diversity of phytase and acid phosphatase expressions between yellow-koji strains. Testing results of blending ratio of yellow- and white-*koji* varieties considering preference will also be presented.

amazake, koji, phytic acid

発表責任者：丸井淳一朗（jmarui@affrc.go.jp）

講演番号：3B1p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 B1 会場

経皮電気刺激によって食品の味を調節する新しい呈味調節技術の検証
Verification of a novel technique that modulates the taste of food using transcutaneous electrical stimulation.

○松本 凌[1]、船水 拓実[1]、藤本 典大[1]、菅野 京子[1]、林 和寛[1]、伊地知 千織[1]、小野 信和[1]、暦本 純一[2]、中村 裕美[2] ([1]味の素株式会社、[2]東京大学大学院 情報学環・学際情報学府)
○Ryo MATSUMOTO[1], Takumi FUNAMIZU[1], Norihiro FUJIMOTO[1], Kyoko KANNO[1], Kazuhiro HAYASHI[1], Chiori IJICHI[1], Nobukazu ONO[1], Junichi REKIMOTO[2], Hiromi NAKAMURA[2] ([1]AJINOMOTO CO., INC., [2]The University of Tokyo III / GSII)

塩分の過剰摂取は高血圧、慢性腎臓病、循環器疾患、脳卒中など様々な疾患の原因となるため「減塩」が重要である。減塩手段としてグルタミン酸ナトリウムや塩化カリウムなどが活用されているが、世界保健機構（WHO）が推奨している食塩摂取量 5g/日未満を満たすためには、新たな減塩手段が必要とされている。近年、フォークやスプーンなどの電気カトラリーおよび食品を介して舌に電気刺激を加えることにより、食品の味を増強させる技術が報告されている。しかし舌電気刺激による味増強は、電気カトラリーが食品を介して舌に接触している間のみ有効であるため、食品が口腔内に存在する全ての時間の味増強、すなわち経時的な味増強を可能とする技術が必要であった。

今回本発表では、下顎前部および後頚部に電気刺激を加えて味増強を引き起こす「経皮電気刺激」を活用し、0.5%塩化ナトリウム水溶液の経時的な塩味増強が可能かを検証した。また経皮電気刺激によって、味噌汁などの液体食品だけでなく咀嚼を必要とする食品でも味増強できることも検証したため、これら実験結果について報告する。

Excessive salt intake can lead to various diseases such as hypertension, chronic kidney disease, cardiovascular disease, and stroke, making 'salt reduction' crucial. Monosodium glutamate and potassium chloride are utilized as means of salt reduction, but new salt reduction methods are needed to meet the World Health Organization (WHO) recommendation of less than 5 g/day of salt intake. In recent years, technologies have been reported to enhance the taste of food by applying electrical stimulation to the tongue via cutlery-shaped device such as forks and spoons and food products. However, taste enhancement by electrical stimulation to the tongue is effective only while the cutlery-shaped device is in contact with the tongue through the food, so a technology was needed to enable taste enhancement during eating, i.e., taste enhancement over time. In this presentation, we utilized 'transcutaneous electrical stimulation', which induces taste enhancement by applying electrical stimulation to the anterior part of the lower jaw and the posterior neck, to verify whether it is possible to enhance the salty taste of 0.5% sodium chloride solution over time. In addition, we also verified whether transcutaneous electrical stimulation could enhance the taste not only in liquid foods such as miso soup, but also in foods that require chewing, so, we report on these experimental results.

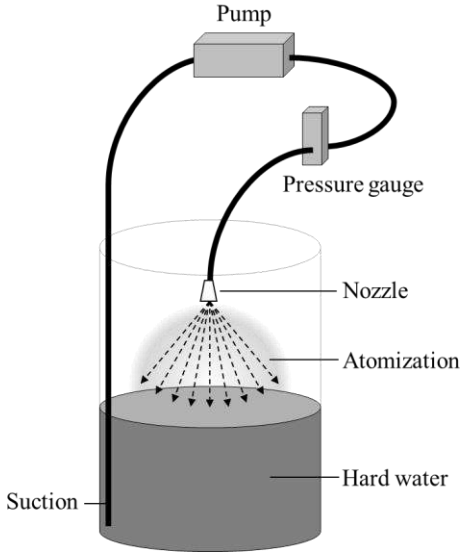
salt reduction, electric taste, transcutaneous electrical stimulation

発表責任者：松本 凌（ryo.matsumoto.zp9@asv.ajinomoto.com）

講演番号：3B1p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 B1 会場

硬水は噴霧化により軟化できる
Hard water can be softened by atomization
○久保 和弘[1]、春見 真柚[1]、山下 貴敏[2] ([1]岐阜大教育、[2]株式会社 TKS)
○Kazuhiro KUBO[1], Mayu KASUMI[1], Takatoshi YAMADSHITA[2] ([1]Gifu Univ., [2]TKS Co., Ltd.)

硬水は，日常生活での使用により生活環境にさまざまな問題を引き起こす可能性があるため軟化処理が行われる場合がある。しかしながら，現存する軟化方法にはいくつかの欠点がある。そこでは，我々は，噴霧化を用いた新しい軟化方法を検討した。カルシウムベースの 3 つの濃度の合成硬水と商業的な天然硬水を準備した。各硬水を 1MPa で噴霧化ノズルから大気に噴霧し，その後収集した。収集された水の一部は再循環され，噴霧化処理が継続された。処理後，白い沈殿物とファインバブルが生成され，Ca^{2+}濃度と電気伝導度が低下し，pH が上昇した。その後，時間の経過とともに，白い沈殿物は徐々に増加し，Ca^{2+}濃度が低下し，最終的には推奨範囲内にほぼ収まった。この軟化現象は，気液界面積の拡大と噴霧化によるファインバブルの発生に起因すると考えられた。この方法は非常にシンプルであり，高い汎用性を示すことが期待される。



Hard water is softened because its use in everyday life can cause various problems in the living environment. However, existing water-softening methods have a number of drawbacks. Here we examined a new water-softening method involving atomization. Three concentrations of calcium-based synthetic hard water and a commercial natural hard water were prepared. Each hard water was sprayed into the atmosphere at 1 MPa from a atomization nozzle and then collected. Part of the collected water was recirculated, and the atomization treatment was continued. After the treatment, a white precipitate and fine bubbles were generated, the Ca^{2+} concentration and electrical conductivity decreased, and the pH increased. Then over time, the white precipitate increased slowly and the Ca^{2+} concentration decreased until finally it almost fell within the recommended range. This water-softening phenomenon was thought to be due to expansion of the gas-liquid interfacial area and generation of fine bubbles with atomization. This method is extremely simple and expected to show high versatility.

Water-softening, Hard water, Fine bubbles

発表責任者：久保和弘（kubo.kazuhiro.d0@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B1p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 B1 会場

乳酸菌を用いたジカウイルスに対する経口粘膜ワクチン開発の検討

Development of an Oral Mucosal Vaccine against Zika Virus using Lactic Acid Bacteria

○川﨑 淳矢[1]、西埜 菜津紀[2]、阪上 仁頌[1]、正木 秀幸[1,2]、芦田 久[1,2]([1]近大院生物理工、[2]近大生物理工)
○Junya Kawasaki[1], Natsuki Nishino[2], Masanobu Sakaue[1], Hideyuki Masaki[1,2], Hisashi Ashida[1,2]
([1]Grad. Sch. B.O.S.T., Kindai Univ., [2]Faculty. B.O.S.T., Kindai Univ.)

乳酸菌はワクチン抗原を小腸の免疫細胞に効率的に運ぶためのキャリアーとして注目されている。未だワクチンが存在しないジカウイルスをターゲットにして、感染予防効果が高いと期待される乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチンの開発を検討した。抗原としてジカウイルスのエンベロープタンパク質(ZIKVE)を選択し、これを乳酸菌の細胞表面に発現させることを試みた。経口粘膜ワクチンへの研究例があり、分泌シグナルと細胞壁アンカー配列(LPXTG モチーフ)を含むシャトルベクター pSGANC332 を使用し、全化学合成した ZIKVE 遺伝子を挿入することで pSGANC332-ZIKVE を構築し、これを Electroporation 法により *Lacticaseibacillus casei* JCM 1134 に導入した。抗 ZIKVE 抗体を用いたウェスタンブロットにより、弱いながらも ZIKVE の発現を確認することができた。ZIKVE を発現させた *L. casei* の加熱死菌体を用いて、BALB/c マウスへの経口投与試験を実施したところ、血清から抗 ZIKVE IgG を、糞便から抗 ZIKVE IgA を ELISA で検出することができた。現在、抗体産生をより高めるために、アジュバント効果が知られているコレラトキシン B サブユニットを共発現、あるいは ZIKVE 融合タンパク質として発現させることを試みている。

Lactic acid bacteria (LAB) have attracted attention as the carriers for transporting vaccine antigens efficiently to immune cells in small intestine. Targeting the Zika virus, for which no vaccine exists yet, we investigated the development of an oral mucosal vaccine using LAB, which are expected to be highly effective in protecting against the infection. We selected the Zika virus envelope protein (ZIKVE) as an antigen and attempted to express it on the cell surface of LAB. We employed pSGANC332 vector containing cell wall anchoring sequence (LPXTG motif) to express the recombinant protein on the cell surface of LAB. Chemically synthesized ZIKVE gene was inserted into the plasmid to construct pSGANC332-ZIKVE and *Lacticaseibacillus casei* JCM 1134 was transformed by electroporation. The expression of ZIKVE was confirmed by Western blotting using anti-ZIKVE antibody. The heat-killed *L. casei* expressing ZIKVE was tested for oral administration to BALB/c mice, and anti-ZIKVE IgG from sera and anti-ZIKVE IgA from feces were detected by ELISA. In order to enhance antibody production further, we are currently attempting to co-express cholera toxin B subunit (CTB), which is known to have adjuvant effect, or to express CTB-ZIKVE fusion protein.

Lactic Acid Bacteria, Zika virus, pSGANC332

発表責任者：川崎淳矢（2344710001f@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3B1p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 B1 会場

水素/重水素交換質量分析によるヒト血清アルブミンの泡沫表面での構造解析
Structural analysis of human serum albumin at a foam surface by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry
○鳥巣 哲生、榎本 敢太、水口 潤哉、田之上 凌佑、内山 進（阪大院工）
○ Tetsuo TORISU, Kanta ENOMOTO, Junya MIZUGUCHI, Ryosuke TANOUE, Susumu UCHIYAMA (Osaka University)

タンパク質は界面活性作用をもち、食品産業において泡沫の形成に寄与する。タンパク質の界面での構造変化はよく知られた現象であり、界面におけるタンパク質の構造は起泡性に密接に関係している。しかしながら、泡表面の気液界面におけるタンパク質の構造変化について詳細に研究した例はない。我々は、水素/重水素交換質量分析法（HDX-MS）を用いて、泡状態におけるタンパク質の構造評価法を開発した。モデルタンパク質としてヒト血清アルブミン（HSA）を用いて、HSA の吸着部位と構造変化をペプチドレベルの分解能で同定した。N 末端とループ（E492-T506）が吸着部位として同定され、構造変化は構造全体に広くみられた。消泡後の円偏光二色性分光法と HDX-MS による分析から、泡表面の気液界面における構造変化は可逆的であることが示唆された。構造の柔軟性と疎水性の両方が、泡表面の気液界面における HSA の吸着にとって重要な因子であると考えられた。

Proteins are amphiphilic molecules. Surface activity of proteins has been utilized as foaming agents in the food industry. The interfacial structural change of proteins is a well-known phenomenon, and the structure of a protein at an interface is closely related to the foaming properties. However, how this structural change of proteins at the foam air-water interface (AWI) occurs has not been clarified. We developed a novel method for the structural assessment of proteins in the foam state using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS). Human serum albumin (HSA) was used as a model protein and analyzed by the developed method. Adsorption sites and structural changes were identified in situ at peptide-level resolution: the N-terminus and a loop (490-506) including hydrophobic amino acids was identified as adsorption sites and structural changes were spread throughout the structure. Circular dichroism spectroscopy and HDX-MS analysis after defoaming indicated that the structural changes at the foam AWI were reversible. Both structural flexibility and hydrophobicity were considered to be critical factors for the adsorption of HSA at the AWI.

Foam, Mass spectrometry, Protein

発表責任者：鳥巣哲生（tetsuo.torisu@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3B1p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 B1 会場

卵白アルブミンとリゾチームの相互作用および構造と泡沫特性の解析

Analysis of interaction and structure of egg white albumin and lysozyme with foam properties

鳥巣 哲生、○水口 潤哉（大阪大学工学研究科）
Tetsuo TORISU, ○Junya MIZUGUCHI (The Univ of Osaka)

泡立ちや泡持ちといった泡沫特性は、メレンゲやビールのような食品の重要な品質の一つである。溶液中でのタンパク質の相互作用や、泡沫の気液界面に吸着した食品タンパク質の構造変化が泡沫特性に関連している。しかしながら、泡沫特性や泡沫特性に関わる界面特性および溶液物性に関連するタンパク質の相互作用や、気液界面での構造変化についての知見は限られており、理論に基づいた泡沫特性の制御は実現していない。本研究では、卵白アルブミンとリゾチームの相互作用および泡沫状態での構造変化と泡沫特性の関連について検討した。界面特性の測定結果から、卵白アルブミン溶液へのリゾチームの添加が泡沫特性を変化することが示された。さらに、水素/重水素交換質量分析法（HDX-MS）を用いた解析から、卵白アルブミンの P163-M172、R84-L105 が気液界面での構造変化部位であり、溶液中でリゾチームがこの部位と相互作用することで泡沫特性を変化させることが示唆された。

Foam properties such as foamability and foam stability, which are one of important qualities of food products such as meringue and beer, are related to interactions and structural changes of food proteins adsorbed at the air-liquid interface of foam. However, information on the interaction and the structural changes at the air-liquid interface, are remain elusive, and therefore foam properties cannot be controlled based on theory. We used the egg white proteins, ovalbumin and lysozyme. An addition of lysozyme to an ovalbumin solution changed interfacial properties of the solution. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) was employed to evaluate the interaction with lysozyme and conformational changes of ovalbumin. The result indicated that structural changes occurred in two peptides of ovalbumin, P163-M172 and R84-L105, at the air-liquid interface, and lysozyme changed the foam properties by interacting with the two peptides.

Foam, Mass spectrometry, Egg white protein

発表責任者：水口潤哉（junya.mizuguchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3C1p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C1 会場

脱 Mg 海水を用いた炭酸カルシウム合成系への有機物の影響評価

The Effect of Organic Matter on Calcium Carbonate Synthesis System Using De-Magnesium Seawater

○永野 湧貴[1]、安元 剛[2]、森安 賢司[3]、吉馴 太一[3]、鈴木 道生[1]（[1]東大院農、[2]北里大海洋生命、[3]日本海水）
○Yuki NAGANO[1], Tsuyoshi YASUMOTO[2], Kenji MORIYASU[3], Taichi YOSHINARE[3], Michio SUZUKI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kitasato Univ., [3]Nihonkaisui Co., Ltd.)

喫緊の課題である CO_2 の削減に対して、我々は海水を用いて CO_2 を $CaCO_3$ へと変化させ固定する手法に着目した。しかし通常の海水を用いた場合、高 pH 下では Mg^{2+} が反応を阻害する。そこで我々は、通常の海水より Mg^{2+} 濃度が低く Ca^{2+} 濃度が高い脱 Mg 海水と、CO_2 と誘導体を形成し pH の上昇を抑制する putrescine を用いた CO_2 固定法を開発した。本研究では、上記の $CaCO_3$ 合成法の際に様々な有機化合物および無機物を加え $CaCO_3$ の多型・形態・粒径への影響を評価した。ICP-MS (誘導結合質量プラズマ分析) により溶液上清の Ca 濃度を測定し、反応速度定数を算出した。得られた粉末を硝酸に溶解させ、ICP-MS で粉末中の Mg・Sr 比率を測定した。生成した $CaCO_3$ は XRD (X 線回折) により多形を特定し、その定量を行った。また SEM (走査型電子顕微鏡) で形状の観察を行った。高分子有機物を添加した場合には、概して aragonite 比率の増加と反応速度低下が見られ、同時に Mg 混入率の低下が確認された。特に、両性高分子であるアロンフロック添加では多量の aragonite が生成され、クエン酸・CMC (carboxymethyl cellulose) 添加では高い精度での形状制御が認められた。先行研究で、PVA (polyvinyl alcohol) 存在下での aragonite ナノファイバー生成が確認されているが、その独特な形状と人体への無害性から産業への応用が期待される。本研究では、生成機序の解明と、脱 Mg 海水を用いた aragonite ナノファイバー生成法の確立を試みた。経時変化を確認したところ、始めは ACC (不定形 $CaCO_3$) として存在しその後 aragonite への相転移が起こり、9 日間でファイバー化が完了した。また Ca 源として脱 Mg 海水を用いたものの、ファイバー化しなかった。海水中イオンを独立して添加し、Mg^{2+} により阻害が生じることを突き止めた。阻害は Sr^{2+}, Ba^{2+} といった他のアルカリ土類金属イオン添加でも生じ、Ca^{2+} の 1/100 の濃度での阻害が確認された。

We focused on a method that uses seawater to transform and fix CO_2 into $CaCO_3$. However, Mg^{2+} in the seawater inhibits the reaction under high pH. Therefore, we developed a CO_2 fixation method using Mg^{2+} removed seawater and putrescine. In this study, various organic and inorganic compounds were added during the above CaCO3 synthesis method to evaluate their effects on CaCO3 polymorphism, morphology, and particle size. When polymers of organic materials were added, the aragonite ratio generally increased and the reaction rate decreased. At the same time, the Mg incorporation rate decreased. Aragonite nanofiber was produced under the presence of PVA, its unique shape and non-toxicity to the human body are expected to find industrial applications. We found that nanofibers initially existed as ACC and changed into aragonite, and Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+} inhibited the synthesis of aragonite nanofiber.

Calcium Carbonate, Nanofiber, CO2 fixration

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C1 会場

ウニの硬組織の Mg の取り込み機構に関する解析
Analysis of Mg incorporation to hard tissues in sea urchins
○小川 紗里奈[1]、浪川 勇人[2]、川野 潤[3]、加藤 由悟[2]、鈴木 道生[2] ([1]東大農、[2]東大院・農、[3]北大院・理)
○Sarina OGAWA[1], Yuto NAMIKAWA[2], Jun KAWANO[3], Yugo KATO[2], Michio SUZUKI[2] ([1]Faculty of Agriculture, The Univ. of Tokyo, [2]The Univ. of Tokyo, [3]Hokkaido Univ)

現在大気中の CO_2 濃度の上昇のために、地球温暖化が深刻化している。我々は CO_2 を $CaCO_3$ に固定して、CO_2 濃度を下げることに着目した。常温常圧下で反応が進行する生物による石灰化反応を参考にすることで実用化を目指している。しかし CO_2 から $CaCO_3$ へ合成する際の課題の一つとして、Ca の代わりに Mg が入り込んで産業価値が低下するということが挙げられる。合成した $CaCO_3$ を有効活用するために、Mg 含有率を制御する必要があり、Mg が $CaCO_3$ へ入り込む機構の解明を目的とした。バイオミネラルの中でもウニは $CaCO_3$ の calcite 骨格中に高濃度に Mg を含むことが知られているため、ウニを利用して実際のバイオミネラル中の Mg の形態の解析を行った。

6 種類のウニの骨格を部位ごとに解剖し、Mg 含有率や $CaCO_3$ の多形を調べた。その結果 Mg 含有率はトゲでは比較的小さく 5~10%であるのに対し、他の部位では多くは 10~20%の値をとり、特にカシパン類の橋脚のみ 25%近い値をとることがわかった。また多形は全て calcite であった。多くのサンプルは Vegard の法則に則っており、Mg が Ca と置換する形で結晶格子中に取り込まれていることがわかった。しかしカシパン類の橋脚は calcite の{104}面のピークが 2 つ表れたことから、通常の calcite に magnesian calcite が一部に含まれていると思われた。SEM-EDS（走査型電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分析）で橋脚表面の元素イメージングを行ったところ、表面の Mg 分布は一様であると思われたため、magnesian calcite は橋脚の内部に満遍なく含まれていると考えられた。

Global warming is currently becoming more serious due to the increasing concentration of CO_2 in the atmosphere. We have focused on the fixation of CO_2 to $CaCO_3$. We refer to the calcification reaction of living organisms. However, one of the problems is contamination of Mg during synthesis, which reduces its industrial value. In order to utilize the synthesized $CaCO_3$, it is necessary to control the Mg content. We aim to elucidate the mechanism of Mg incorporation. We used sea urchins since they are known to contain high concentrations of Mg in their calcite skeletons.

The skeletons of six different sea urchins were dissected to investigate Mg content and $CaCO_3$ polymorph. Most of the samples are in accordance with Vegard's law, indicating that Mg is incorporated into the crystal lattice in the form of substitution of Ca. However, a part of the cake urchin may contain some magnesian calcite since the peak of the {104} was shifted.

magnesian calcite, sea urchin, Mg incorporation

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C1 会場

琵琶湖水圏のオオカナダモ付着微生物によるマンガン除去能

Mn removal by epiphytic bacteria of *Egeria densa* (Brazilian waterweed) from Lake Biwa basin

○原田 英美子[1]、北川 博翔[1]、黒沢 高秀[2]、所 雅人[3]、保倉 明子[4]([1]滋賀県大環境、[2]福島大共生システム理工、[3]東京電機大院工、[4]東京電機大工)
○Emiko Harada[1], Hiroto Kitagawa[1], Takahide Kurosawa[2], Masato Tokoro[3], Akiko Hokura[4] ([1]Sch. of Environ. Sci., The Univ. of Shiga Pref., [2]Fac. of Symbiotic Syst. Sci., Fukushima Uni., [3]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Uni., [4]Sch. of Eng., Tokyo Denki Uni.)

琵琶湖水圏で採取されるトチカガミ科の沈水植物オオカナダモ(*Egeria densa*)からは高濃度のマンガン(Mn)が検出される。その現象には植物体表面に付着する Mn 酸化物が関与していることが示されており、複数の付着細菌株から Mn 酸化能が検出されている。本研究ではオオカナダモが関与するバイオミネラリゼーション現象の詳細を明らかにし、また、付着細菌叢の有効利用法を開発する目的で、*Priestia* 属と判別された付着細菌株を用いて、Mn を添加した液体培地を用いて振とう培養実験を行った。5 週間培養を行うと、培地上清中の Mn 濃度は大きく低下し、沈殿物中には Mn 酸化物が検出された。沈殿物に含まれる Mn の化学形態を明らかにするために、放射光蛍光 X 線法の一種である XANES（X 線吸収端近傍構造）解析を行った。また、琵琶湖のオオカナダモの菌叢の特徴を調査するため、同じ水圏で生育する沈水植物コカナダモ（*Elodea nuttallii*）および福島県で採取したオオカナダモと比較した。表面にバイオフィルムが確認された植物組織を用いてゲノム DNA を抽出し、植物由来の遺伝子の増幅を抑制する条件で微生物群集解析を行ったところ、同じ水圏のコカナダモ、別の地域のオオカナダモのいずれも異なっていた。同一の水圏であっても別種の沈水植物の付着細菌叢には差異が見られ、また、同種であっても地域によって異なることも明らかになった。

The authors previously reported that the accumulation of manganese (Mn) in a submerged freshwater macrophyte *Egeria densa* (Brazilian waterweed, Hydrocharitaceae) in Lake Biwa basin. Biomineralization on the plant surface might be mediated by the production of Mn oxide by epiphytic bacteria. In this work, an epiphytic strain of *Priestia* sp. was cultured in liquid medium supplemented with Mn. After 5-week culture, Mn concentrations in supernatants were drastically reduced and Mn oxide was detected in the precipitates. The oxidation states of Mn in the precipitates were investigated by synchrotron radiation-based X-ray absorption near edge structure (XANES). To characterize the bacterial flora in *E. densa* in Lake Biwa, *Elodea nuttallii* (western waterweed, Hydrocharitaceae) plants were harvested in Lake Biwa basin, and *E. densa* plants were collected in waterways in Fukushima Prefecture. Genomic DNA was extracted from plant tissues with biofilms, and the microbial community analysis was performed under conditions that inhibited the co-amplification of plant DNA. Even among the related plants growing in the same hydrosphere, differences in flora were observed, which were also influenced by the environment.

Egeria densa, microbial community analysis, Mn oxidizing bacteria

発表責任者：原田英美子（harada.e@ses.usp.ac.jp）

講演番号：3C1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C1 会場

ウコン粉末からのクルクミノイドの高純度抽出回収システムの開発
Development of a high-purity extraction and recovery system for curcuminoids from turmeric powder
○仲井 拓真、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Takuma NAKAI, Kazuya KOUMOTO (FIRST, Konan Univ.)

ウコン中に含まれる機能成分として、抗酸化活性を持つクルクミノイド（CNs）がある。CNs の抽出溶媒として、従来は有機溶媒が、また最近では深共晶溶媒も用いられているが、環境負荷や抽出特性、毒性の観点から課題も残っている。最近、我々の研究室で開発したベタイン誘導体を高濃度水溶液にすると、クルクミンの飽和溶解度が 950 万倍も上昇することが確認された。本研究ではこの溶解特性を利用して、ウコン粉末からの CNs の抽出を検討した。ウコン粉末に 2.0 M ベタイン誘導体水溶液を添加後、ボルテックスミキサーで攪拌すると速やかに CNs 由来の着色が確認され、UV スペクトルで CNs に特徴的な吸収が確認された。この抽出はベタイン濃度が 0.3 M 以上で起こり、濃度上昇とともに指数関数的に抽出量が増大した。この抽出はベタイン濃度に依存するため、抽出液を蒸留水で希釈すると抽出した CNs を沈殿として回収することができた。沈殿を LC で分析したところ、CNs 以外のピークはなく、高純度で回収できたことが示唆された。発表では、このベタイン水溶液を用いた繰り返し抽出に関する結果についても報告する。

Turmeric contains functional compounds known as curcuminoids (CNs) with antioxidant activity. While organic solvents have been traditionally used as extraction solvents for CNs, recently, deep eutectic solvents have also been utilized. However, challenges remain regarding environmental impact, extraction characteristics, and toxicity. Recently, we found that a highly concentrated aqueous solution of a betaine derivative synthesized in our lab can increase the saturation solubility of curcumin by an astounding 9.5 million times. Leveraging this solubility characteristic, this study aimed to explore the extraction of CNs from turmeric powder. Upon adding 2.0 M betaine derivative aqueous solution to the turmeric powder and vertexing, prompt coloration from CNs was observed, and UV spectrum analysis confirmed the characteristic absorption of CNs. This extraction occurred at betaine concentrations of 0.3 M or higher, exhibiting exponential increases in extraction yield with increasing concentration. As the extraction is concentration-dependent, diluting the extract with distilled water precipitated the extracted CNs. Analyzing the precipitate using LC revealed only CNs-related peaks, suggesting high-recovery. We will also introduce the results concerning repeated extractions using this betaine aqueous solution.

turmeric, extraction, betaine

発表責任者：仲井拓真（s2191030@s.konan-u.ac.jp）

講演番号：3C1p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C1 会場

Generation of disease-suppressive soil capable of inhibiting the growth of Ralstonia solanacearum and Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis by immobilizing multiple-parallel-mineralization microorganisms

○Meeboon Jamjan[1], Akinori Ando[2,3], Jun Ogawa[2,3], Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Makoto Shinohara[1] ([1]NARO, [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

We immobilized microorganisms from the MPM culture solution in non-soil substrates, including rice husk charcoal, rockwool, and vermiculite. Subsequent inoculation with *Ralstonia solanacearum* or *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* demonstrated that these pathogens couldn't thrive within the substrates. Tomato seeds planted in the MPM-culture microbe-immobilized substrates and then inoculated with either pathogen exhibited suppressed tomato diseases. These substrates, immobilized with MPM microorganisms, showcased the ability to degrade organic substances into inorganic nutrients, such as nitrate, mimicking natural soil. Our study highlights the creation of disease-suppressive soil-like media from non-soil substrates by immobilizing the microbial ecosystem from the MPM culture solution.

Disease suppressive soil, Organic hydroponics, Probioponics

発表責任者：Makoto Shinohara（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3C1p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C1 会場

月面での食料生産を想定した無機肥料製造法の検討

Examining inorganic fertilizer production methods assuming food production on the moon

○中島 英理夏、篠原 信、田中 章浩 (農研機構)
○Erika Nakashima, Makoto Shinohara, Akihiro Tanaka (NARO)

【背景・目的】月面で人間が継続的に活動する場合、食料の持続的な供給が課題となる。月面での食料生産を行う場合、肥料の確保が必要だが、確保できる肥料は、食品残渣や生活排水（人糞尿）に限られる。しかしこれらは有機物であり、土壌がない地球外の場所では肥料として使用できない。土壌以外の媒体では有機物を無機養分化することが困難だからである。篠原らは 2005 年、水中で有機質肥料を無機養分化する技術（並行複式無機化法 multiple parallel mineralization、以下 MPM）の開発に成功した。そこで本研究では、月面でも入手可能な排せつ物をメタン発酵しその上で、MPM で無機養分化する検討を行った。
【方法・結果】市販のヒト由来糞便検体は 1g あたり 20 万円以上と高価で実験が困難なため、食品残渣を飼料とする養豚農家のメタン発酵消化液を検討材料とした。1%メタン消化液 200L に微生物源としてサンヨーバークを加え、エアーポンプで曝気したところ、有機態窒素の 70%以上を無機態窒素（硝酸態窒素、アンモニア態窒素）に変換することができた。大腸菌群の検出を試みたところ、メタン消化液および無機化養液のいずれも検出限界以下（<10 cfu/ml）であった。無機化養液を用いてサラダナの水耕栽培を行ったところ、化学肥料での栽培と比べ収量・品質ともに有意差は認められなかった。以上の結果から、糞尿をメタン発酵させた後の消化液を材料に MPM 法で無機養分化すれば、水耕栽培により食料生産が可能であることが示された。

Fertilizers available on the moon include food residue and human waste. However, organic matter is difficult to degrade into inorganic nutrients suitable for plants in media other than soil. However, organic matter is difficult to decompose into inorganic nutrients suitable for plants in media other than soil. In 2005, Shinohara developed a technology to mineralize organic matter into inorganic nutrients such as nitrate nitrogen in water (multiple parallel mineralization, MPM). In this study, we attempted to transform manure into inorganic nutrients using the MPM method. We used methane digested solution from pig farms that feed on food residue instead of human waste. More than 70% of the nitrogen contained in the methane digestive solution could be converted into inorganic nitrogen. No coliform bacteria were detected in either the methane digestion fluid or the mineralized nutrient solution. Salad vegetables were grown using mineralized nutrient solution on a par with chemical fertilizers.

methane digested solution, multiple parallel mineralization, moon

発表責任者：篠原　信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3C1p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C1 会場

ポリビニルアルコール担体を用いた乳酸資化性メタン発酵系の構築

Construction of lactate-utilizing methane fermentation system using polyvinyl alcohol carrier

○上村 太起[1]、鈴木 いぶき[1]、西山 辰也[1]、松林 未理[2]、片岡 直明[2]、上田 賢志[1]([1]日大院生物資源、[2]水 ing エンジニアリング（株））
○Taiki KAMIMURA[1], Ibuki SUZUKI[1], Tatsuya NISHIYAMA[1], Miri MATSUBAYASHI[2], Naoaki KATAOKA[2], Kenji UEDA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Swing Engineering Corporation)

本研究では、プロバイオティクスとしての有用性が注目される乳酸菌の工業培養廃液を対象とする効率的な浄化システムを構築することを目的として、乳酸を単一基質とするメタン発酵試験系を構築、解析した。特に、ポリビニルアルコール（PVA）樹脂製の微生物担体の添加がメタン発酵に及ぼす効果について着目した。120 ml 容バイアル瓶に、乳酸を単一基質とする合成培地 60 ml を嫌気的に調製し、そこに別途馴養した乳酸資化性メタン発酵液 50 ml 添加し、さらに乳酸資化性メタン発酵槽で馴養した PVA 担体の量を変えて添加した。担体非添加区を対照とした。37℃静置培養を行い、ガスクロマトグラフによってメタン生成量を測定した。その結果、PVA 担体の添加量に伴いメタン生成が早まることが観察された。次に、PVA 担体について、PCR-DGGE 法による菌叢構造解析を行ったところ、メタン発酵槽で馴養した PVA 担体にシントロフである *Syntrophomonas* 属が安定的に存在したが、新品の PVA 担体では観測されなかった。一方、水素資化性メタン生成アーキアは両方の担体に認められた。また、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて PVA 担体の内部を観察したところ、複雑な多孔質構造が認められ、この構造を利用して様々な菌が付着していることが推測された。

The purpose of this study was to develop and analyze an efficient purification system targeting the industrial cultivation waste of lactic acid bacteria, which is a probiotic. A methane fermentation test system using lactic acid as the sole substrate was specifically constructed and analyzed, with a focus on the effects of adding polyvinyl alcohol (PVA) resin-based microbial carriers to the methane fermentation process. In 120 ml vials, medium containing 60 ml of lactic acid as the sole substrate was prepared. Additionally, 50 ml of preculture and varying amounts of PVA carriers, previously cultured in a lactic acid-utilizing methane fermentation tank, were added. A control group without carrier addition was also established. The cultures were subjected to 37°C static incubation, and methane production was measured using gas chromatography. The results showed that methane production accelerated with an increasing amount of added PVA carriers. Subsequently, PVA carriers were analyzed using the PCR-DGGE method to assess the microbial community structure. The analysis revealed the stable presence of *Syntrophomonas*, known as syntrophic bacteria, in PVA carriers conditioned in the methane fermentation tank, while this genus was not observed in new PVA carriers. Hydrogenotrophic methanogens were identified in both types of carriers. Furthermore, SEM was employed to observe the internal structure of PVA carriers, revealing a complex porous structure where various microorganisms were presumed to be attached.

methane fermentation, lactate, microbial carrier granule

発表責任者：上田賢志（ueda.kenji@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C1p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C1 会場

北海道・天北炭田褐炭層の原位置環境を活用したバイオメタン生成の取り組みについて

Evaluation of biomethane production potential in the in-situ groundwater of Tempoku Coalfield, Hokkaido, Japan

○上野 晃生[1]、佐藤 聖[1]、玉村 修司[1]、村上 拓馬[1]、猪股 英紀[1]、青山 秀夫[2]、酒井 智生[2]、長沼 毅[3]、五十嵐 敏文[1,4,5]([1]幌延地圏環境研究所、[2]UBE 三菱セメント株式会社、[3]広島大院統合生命科学研究科、[4]旭川高専、[5]北海道大学工学研究院)
○Akio UENO[1], Kiyoshi Sato[1], Shuji Tamamura[1], Takuma Murakami[1], Hidenori Inomata[1], Hideo Aoyama[2], Tomoo Sakai[2], Takeshi Naganuma[3], Toshifumi Igarashi[1,4,5] ([1]H-RISE, [2]MUCC, [3]Hiroshima University, [4]Asahikawa KOSEN, [5]Hokkaido University)

幌延地圏環境研究所は、地下の原位置環境を利用し未利用資源である褐炭をバイオメタンへ変換しエネルギー資源として回収する方法「バイオメタン鉱床造成/生産法(SCG 法)」を提唱し[1,2]、2020 年度より、北海道・天北炭田、小石露天鉱の現場で実証試験を行っている。本法は原位置地下水中の微生物群がバイオメタン生成能を持つかどうかが重要となる。本研究では、上記地域において SCG 法が適用可能かどうかを実験室内での培養試験によって評価した。小石露天鉱に孔井を設置し、褐炭層由来の地下水を採水できる仕様とした。本孔井より嫌気的に地下水を採取後に実験室に持ち帰り、嫌気条件下での培養試験を行った。培養試験の結果、ギ酸もしくは水素/二酸化炭素を添加した培養実験群よりメタン生成が確認されたことから、メタン生成に関与する微生物群が存在することが示され、小石露天鉱において SCG 法を適用できる可能性が高いことが分かった。本発表では、培養試験後の微生物群集構造解析の結果や、実際の原位置環境を利用した現場試験の進捗についても紹介する予定である。

Horonobe Research Institute for the Subsurface Environment (H-RISE) proposed the Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) method[1,2], which converts lignite, an unused resource, utilizing the underground *in-situ* environment, to biomethane and recovers it as an energy resource. We have conducted on-site experiments in the Koishi area of Tempoku Coalfield, Hokkaido, Japan since 2020. The success of the SCG method depends on whether or not there are microorganisms capable of producing methane in the *in-situ* groundwater. We examined the methane production ability of microorganisms in the groundwater of Koishi area through laboratory cultivation tests. Cultivation tests using the groundwater as microbial inocula showed that methane was produced from formate or H_2/CO_2, indicating the existence of microorganisms involved in methane production, and the SCG method would be highly applicable to the Koishi area. We will show the results of microbial community structure analysis and the recent progress of on-site experiments.

Reference:[1]特許第 6396068 号（2018 年）「地層中に含まれる石炭および／または珪藻岩からメタンガスを地層中において製造する方法」、[2]Aramaki *et al.* (2017) *Energy Convers. Manag.* **153**: 566-575.

Subsurface Cultivation and Gasification (SCG), lignite, methanogens

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

講演番号：3C1p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C1 会場

下水汚泥中の有機物評価と好気性高温発酵による分解促進

Review of organic matter in sewage sludge and acceleration of decomposition by aerobic high temperature fermentation

○添田 紗也加、矢野 紘子、吉井 貴宏、大島 泰郎（共和化工・環境微生物研）
○Sayaka SOEDA, Hiroko YANO, Takahiro YOSHII, Tairo OSHIMA (Inst. of Environ. Microbiol., Kyowa Kako Co., Ltd)

堆肥化は生ゴミや下水汚泥、家畜糞尿などの有機性廃棄物を肥料へと再利用する技術として古くから用いられている。昨今の化学肥料高騰に伴い、有機性廃棄物の資源化が期待されており、特に下水汚泥は、国土交通省から「肥料としての利用を最優先し、最大限の利用を行うこととする」と、方針が示されている。このような国の動きもあることから、下水汚泥の堆肥化は、さらに需要が増えることが予想される。我々は鹿児島県の株式会社山有が開発した発酵温度が 90℃以上に達する好気性高温堆肥発酵に着目し、本堆肥化処理による下水汚泥の迅速な分解について検討している。一括りに汚泥と言っても、水処理の方法や消化の有無、凝集剤の種類等で性状が異なる。特にメタン発酵残渣となる消化汚泥は、易分解性有機物量が少なく、発酵が難しい堆肥化原料であることが知られている。

下水汚泥の水分や有機物量は、発酵原料としての質を評価する指標として用いられているが、それだけで良し悪しを判断するには不十分である。本研究では、より詳細に評価するため、汚泥中の易分解性有機物量を炭酸ガス発生量により調査した。全体の有機物量を全有機炭素とし、炭酸ガスに変換される有機物を易分解性有機物、炭酸ガスに変換されず残存する有機物を難分解性有機物と仮定して算出した。また、高温発酵にて堆肥化処理をしていることから、高温による分解促進について検討した。その結果、消化汚泥は標準活性汚泥と比べて易分解性有機物が少ないこと、高温環境は分解に有利なことが明らかとなった。

Composting has been used to decompose organic waste and to make fertilizer. With the recent rise of the price of chemical fertilizers, it is expected to make fertilizer from organic waste. The government requests us to use sewage sludge as much as possible. Therefore, we focused on aerobic high temperature compost and investigated the decomposition of sewage sludge. There are various types of sewage sludge because of differences in water treatment and flocculants. Digested sludge, which is the residue of methane fermentation, is known to be difficult to ferment because it contains little readily biodegradable organic matter. We investigated the amount of readily biodegradable organic matter in sewage sludge by measurement of the amount of CO_2 generation and the acceleration of decomposition due to high temperatures. As a result, we found that digested sludge contains less readily biodegradable organic matter than activated sludge, and that high temperatures are advantageous for decomposition.

sewage sludge, compost, readily biodegradable organic matter

講演番号：3C1p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C1 会場

大豆ホエーのバイオスティミュラント効果に関する研究

Research on the biostimulant effects of soy whey

○長底 正悟、久保 幹（立命館大学生命科学部）
○Shogo NAGASOKO, Motoki KUBO (The Univ. of Ritsumeikan)

本研究では大豆ホエー及び *Bacillus circulans* HA12 を用いた大豆ホエー分解液を用いて、植物の成長促進効果を調査することを目的とした。

pH 7.5 に調整した大豆ホエーに、*Bacillus circulans* HA12 を接種して 48 時間培養することで大豆ホエー分解液を作製した。また pH 7.0 に調整した大豆ホエーと大豆ホエー分解液をそれぞれ 100 倍、500 倍、1,000 倍に希釈した。次に有機土壌を用いてワグネルポット（1/5,000 a）にコマツナを定植し、これらの溶液を添加して 4 週間栽培を行った。その結果、水のみを与えて栽培したコマツナに比べて 500 倍、1,000 倍希釈した大豆ホエー希釈液、大豆ホエー分解液を施肥した条件において地上部重量と地下部重量が増加した。

また寒天培地を用いたコマツナの根の観察では、大豆ホエー分解液を加えることで主根の長さが短くなり、側根、根毛の数が増加したことが確認された。このため、大豆ホエーには植物生育を促進する効果がある。

The objectives of this study were to investigate the growth-promoting effects of soy whey solution and degraded soy whey solution by *Bacillus circulans* HA12 on plant growth.

Soy whey solution adjusted to pH 7.5 was inoculated with *Bacillus circulans* HA12, then incubated for 48 hours, and finally considered as degraded soy whey solution. Soy whey and degraded soy whey solutions were diluted to100, 500 and 1,000 times. Komatsuna plants were planted in Wagener pots (1/5,000 a) using organic standard soil for 4 weeks. Soy whey and degraded solutions at different dilution times were applied in soil amended with organic fertilizers. As a result, shoot and root weight of Komatsuna in soy whey and degraded solutions (500 and 1,000 times of dilution) were higher than those in water added treatment. In addition, the numbers of lateral roots and root hairs of Komatsuna planted in agar medium with degraded soy whey solution were much more than those in water. Therefore, the soy whey solution can be used as a plant promoting solution at 500 and 1,000 times of dilution.

biostimulant, soy whey, root hair

講演番号：3C2a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 C2 会場

新規ペプチドグリカン生合成経路阻害剤の探索
Searching for Specific Inhibitors of the Alternative Peptidoglycan Biosynthetic Pathway
梅津 秀平[1]、角田 毅[2]、鬼柳 春花[1]、稲橋 佑起[3,4]、野中 健一[3,4]、○小笠原 泰志[2]、大利 徹[2]（[1]北大院総化、[2]北大院工、[3]北里大大村研、[4]北里大院感染制御）
Shuhei UMETSU[1], Takeshi TSUNODA[2], Haruka KIYANAGI[1], Yuki INAHASHI[3,4], Kenichi NONAKA[3,4], ○Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Omura Inst., Kitasato Univ., [4]Grad. Sch. Infection Cont., Kitasato Univ)

ペプチドグリカンは細菌の生命維持に必要な細胞壁の構成成分である。その生合成中、大腸菌では中間体 UDP-MurNAc-L-Ala に D-Glu が付加し、UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu が生成する（既知経路）。しかし当研究室では、植物病原菌の *Xanthomonas* 属細菌を含む一部の微生物が利用する新規生合成経路を見出した[1]。本経路では、MurD2 が UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を付加した後に、MurL による L-Glu 残基のエピメリ化で UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu が生合成される。有用土壌細菌は既知経路を用いるため、新規経路の阻害剤は植物病原菌の農薬になると期待される。そこで本研究では、放線菌培養液ライブラリーから新規経路特異的な阻害剤を探索した。似たゲノム配列を持つが、ペプチドグリカンの生合成に既知経路を利用する *Streptomyces lividans* と新規経路を利用する *Micromonospora* sp.の 2 種の菌を被検菌とした阻止円検定により *Micromonospora* sp.のみの生育を阻害する 1 サンプル（*Micromonospora* sp. K18-0097 由来）を得た。このサンプルから活性本体を単離構造決定した結果、新規オリゴマイシン類縁体を見出した。また、*in vitro* アッセイにより本化合物が MurD2 を阻害することを明らかとした[2]。

Peptidoglycan is an indispensable macromolecule in bacterial cell walls to maintain the cell integrity, and its biosynthesis has been well studied. Recently, we demonstrated that some bacteria such as *Xanthomonas oryzae*, a pathogen causing bacterial blight of rice, used an alternative pathway of peptidoglycan biosynthesis.[1] In this pathway, MurD2, a MurD homolog, catalyzed the attachment of L-Glu to UDP-MurNAc-L-Ala and MurL, which did not show homology to known protein, catalyzed epimerization of the terminal L-Glu of the MurD2 product to generate UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu. Because the alternative pathway is also operating in some other plant pathogens, specific inhibitors of the alternative pathway can function as pesticide specific to plant pathogen. In this study, we searched for specific inhibitors of the alternative pathway from metabolites produced by actinomycetes and identified a new oligomycin-like polyketide from *Micromonospora* sp. K18-0097 and showed that the compound inhibited the MurD2 reaction.[2]

[1] R. Feng, Y. Satoh, Y. Ogasawara, T. Yoshimura, T. Dairi, *J. Am. Chem. Soc.* 238, 4243 (2017).
[2] S. Umetsu, T. Tsunoda, H. Kiyanagi, Y. Inahashi, K. Nonaka, T. Dairi, Y. Ogasawara, *J. Antibiot. in press*.

pathway specific inhibitor, peptidoglycan, polyketide

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C2a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 C2 会場

新規メナキノン生合成経路阻害剤の探索
Searching for Specific Inhibitors of the Alternative Menaquinone Biosynthetic Pathway
○鬼柳 春花[1]、菊池 麻里江[1]、角田 毅[2]、野中 健一[3,4]、稲橋 佑起[3,4]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2]([1]北大院総化、[2]北大院工、[3]北里大大村研、[4]北里大院感染制御)
○ Haruka KIYANAGI[1], Marie KIKUCHI[1], Takeshi TSUNODA[2], Kenichi NONAKA[3,4], Yuki INAHASHI[3,4], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Omura Inst., Kitasato Univ., [4]Grad. Sch. Infection Cont., Kitasato Univ)

メナキノン (MK) はヒトにとっては血液凝固に関わるビタミンであり、微生物にとっては電子伝達体として機能する生育に必須な補酵素である。大腸菌や乳酸菌ではコリスミ酸から *o*-スクシニル安息香酸を中間体として MK を生合成することが知られている。しかし、当研究室では、胃がんの原因菌であるピロリ菌などの一部の微生物が既知経路とは異なる経路 (フタロシン経路) で MK を生合成することを見いだした[1)]。乳酸菌などの有用腸内細菌は既知経路で MK を生合成することから、フタロシン経路の阻害剤はピロリ菌特異的な抗生物質になると期待される。本研究では、放線菌や糸状菌の培養液ライブラリーからフタロシン経路特異的な新規阻害剤を探索した。互いに近縁な 2 種の *Bacillus* 属細菌である *Bacillus subtilis* (既知経路保有株) と *Bacillus halodurans* (フタロシン経路保有株) を被検菌にしたペーパディスクアッセイで、*B. halodurans* の生育のみを阻害するサンプルを選別した。さらに、最終産物である MK 添加による生育回復アッセイによる絞り込みを行った。高活性を示した糸状菌由来の 1 サンプルについて、逆相カラムを用いた中圧分取と HPLC で活性本体を単離、構造解析した結果、類縁な 4 つの新規ペプチド化合物が得られた。

Menaquinone (MK) is an essential cofactor as an electron mediator in respiratory chain for microorganisms. In *Escherichia coli*, menaquinone is biosynthesized using the well-studied canonical pathway. However, we revealed that some microorganisms including *Helicobacter pylori*, a pathogen causing stomach cancer, utilize an alternative pathway (futalosine pathway) for MK biosynthesis.[1)] Because some useful intestinal bacteria such as lactobacilli utilize the canonical pathway, the futalosine pathway is an attractive target for developing specific anti-*H. pylori* drugs. We have developed a screening method to identify specific inhibitors of the futalosine pathway using two *Bacillus* species which are genetically close with each other but utilize the different pathway for MK biosynthesis. In this study, we searched for specific inhibitors of the futalosine pathway from a culture broth library of actinomycete and fungi and identified four new peptide compounds from a fungal sample as specific inhibitors.

[Reference]
1) T. Hiratsuka *et al*. *Science,* **2008**, 321, 1670.

pathway specific inhibitor, peptide, menaquinone

発表責任者：大利　徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C2a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 C2 会場

シグナル分子 A-factor に類似するγ-ブチロラクトン化合物の化学-酵素合成と放線菌からの迅速同定
Concise chemo-enzymatic synthesis of γ-butyrolactone compounds similar to the signaling molecule A-factor, and their identification in actinomycetes

○工藤 雄大[1,2]、此木 敬一[2]、山下 まり[2] ([1]東北大学際研、[2]東北大院農)
○Yuta Kudo[1,2], Keiichi Konoki[2], Mari Yotsu-Yamashita[2] ([1]Tohoku Univ. FRIS, [2]Tohoku Univ. Agri.)

数多の有用二次代謝産物を生産する放線菌は、シグナル分子を用いて自身の二次代謝を制御する。*Streptomyces griseus* の A-factor (**1**, Fig. 1)[1]に代表されるγ-ブチロラクトン(GBL)型のシグナル分子がよく知られる一方、明確な同定が成されている菌種は限られている。これはシグナル分子の生産が極微量で、構造解析に数百 L もの培養物を要することに起因する。演者らは放線菌のシグナル分子の生産量を増大させる培養法を用い、新規天然物として含 GBL 化合物を単離、構造決定した[2,3]。本研究では、GBL のさらなる迅速同定を目指し、連続酵素反応による GBL の簡便合成法を構築した。得られた GBL を用いて、各種放線菌における GBL の同定を行ったので報告する。

合成酵素 A-factor synthase (AfsA) 2 種、Butenolide phosphate reductase (BprA) 4 種を異種発現により調製した。有機合成したβ-ketoacyl-SNAC (**2**)と DHAP (**3**)に対し、AfsA、BprA、phosphatase をワンポットで段階的に反応させ、計 11 種の GBLs (**6**)を得た (Fig. 2)。これら GBL を標品として、9 属 30 種の放線菌抽出物を LCMS で分析した。その結果、*Nocardia* 属など GBL が未報告の属を含め、調査した約半数の放線菌から GBL を同定できた。キラルカラム分析により、検出された GBL の絶対立体化学を決定した。本研究により GBL が広範な放線菌に分布することが明確に示された。

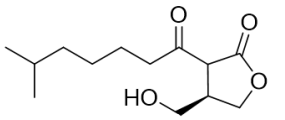


Fig.1. Structure and function of A-factor (**1**).

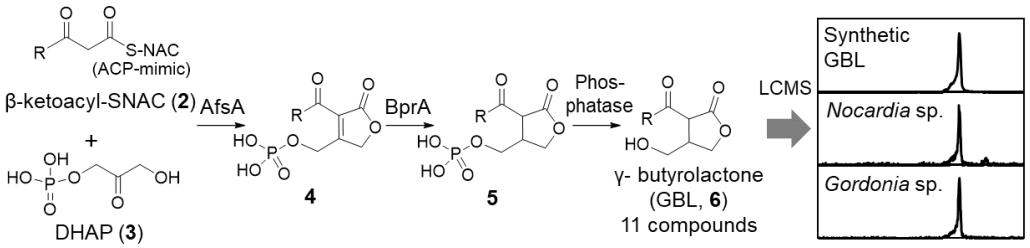


Fig. 2. One-pot chemo-enzymatic synthesis of GBLs and GBL identification using LCMS.

Actinomycetes regulate their secondary metabolism using a γ-butyrolactone (GBL) signaling molecule (i.e., A-factor (**1**, Fig. 1)). Only a few natural signaling molecules have been identified due to the low production (ng/L) in actinomycetes. In this study, we established a concise chemo-enzymatic synthesis of GBLs (**6**, Fig. 2). LCMS analysis of actinomycete extracts (30 species, 9 genera) confirmed the widespread GBLs in actinomycetes.

[References] (1) Horinouchi, S. and Beppu, T., *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2007**, *83*, 277. (2) Kudo, Y., Moore, B. S., et al., *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 3253. (3) Kudo, Y., Yotsu-Yamashita, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2022**, *86*, 1333.

actinomycete, signaling molecule, chemo-enzymatic synthesis

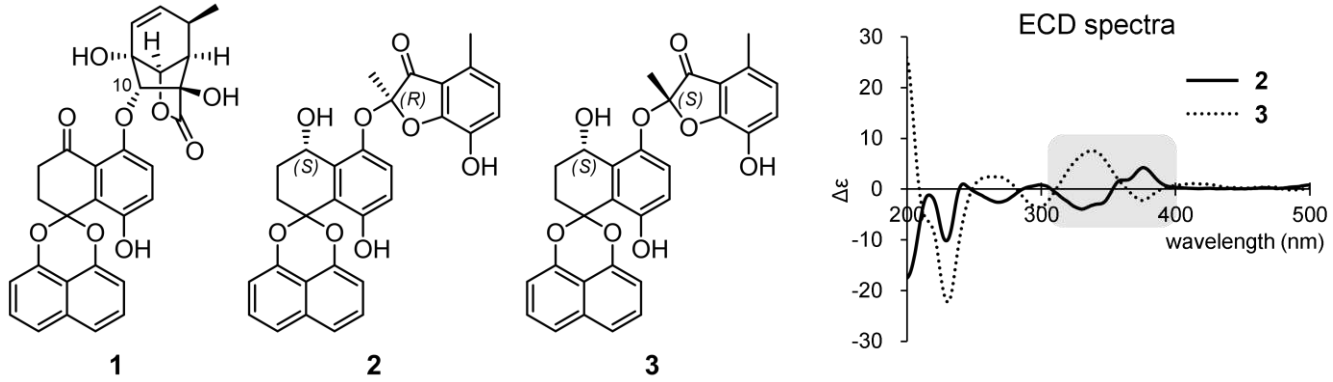
発表責任者：工藤雄大（yuta.kudo.d5@tohoku.ac.jp）

講演番号：3C2a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 C2 会場

Paraphaeosphaeria sp. KT4192 が生産する新規スピロビスナフタレン誘導体
Structures of Spirobisnaphthalene Derivatives from *Paraphaeosphaeria* sp. KT4192
○金原 龍飛、生沼 悠希、前多 隼人、田中 和明、橋本 勝 (弘前大農生)
○Ryuhi Kanehara, Yuki Oinuma, Hayato Maeda, Kazuaki Tanaka, Masaru Hashimoto (Hirosaki Univ.)

真菌 *Paraphaeosphaeria* sp. KT4192 培養液より、paraphaeolactone 及び enalin 構造を有する新規スピロビスナフタレン誘導体 (**1**–**3**) を単離した。

スペクトル解析から、**1** は palmarumycin CP_{17} と演者らが先に報告した paraphaeolactone A2 が 10 位で結合した構造を有すると推定した。**2** と **3** は CJ-12,372 と enalin A がアセタールで結合したジアステレオマーであると推定した。**1**–**3** の推定構造について DFT 法による化学シフト計算を行った。いずれも良い一致を示したが、**2** と **3** の NMR スペクトルは酷似しており、DP4 解析では区別できなかったものの、CP3 解析では両者を明瞭に区別することができた。両者は電子円二色性 (ECD) スペクトルにおいて、300-400 nm 付近でほぼ鏡像のプロファイルを示した。DFT 計算はこのプロファイルを再現することに成功し、CP3 解析で推定した構造を確認した。本講演では **1**–**3** の生物活性についても言及する。



1 **2** **3**

Three new polyketides (**1**–**3**) were isolated from the fungus *Paraphaeosphaeria* sp. KT4192. The analysis revealed that **1** consisted of palmarumycin CP_{17} and paraphaeolactone A2. Compounds **2** and **3** were deduced to be a pair of diastereomers composed of CJ-12,372 and enalin A linked by an acetal functionality. Despite unclear results from the DP4 analysis, CP3 analysis evidently distinguished between them as depicted. This conclusion was verified by DFT-supported ECD spectral analysis. The biological properties of these compounds will also be discussed in my presentation.

spirobisnaphthalene derivative, ECD spectral analysis, DFT calculation

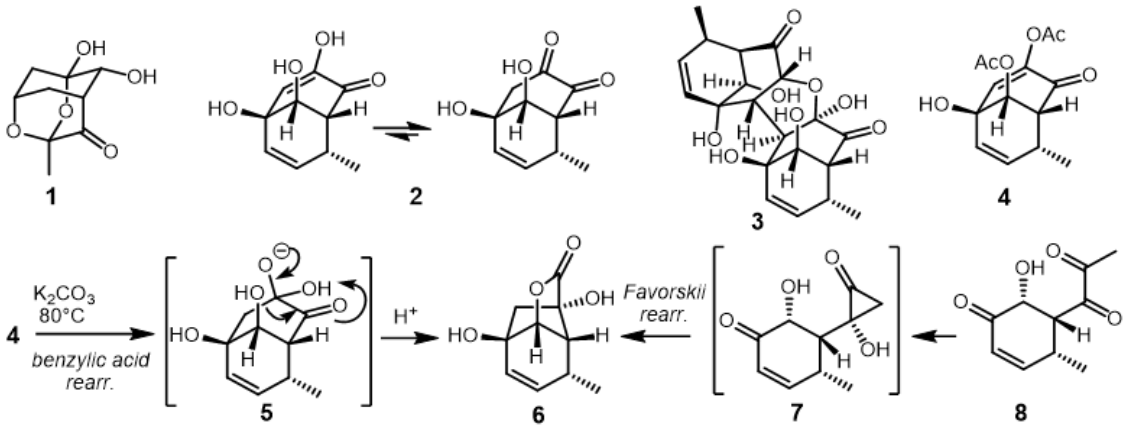
発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3C2a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 C2 会場

paraphaeoketone 類の単離と paraphaeolactone 類生合成の再検討
Isolation of paraphaeoketones and reconsideration of paraphaeolactone biosynthesis
○生沼 悠希[1]、金原 龍飛[1]、兼平 類[1]、西川 俊夫[2]、田中 和明[1]、橋本 勝[1] ([1]弘大農生、[2]名大生命農)
○Yuki Oinuma[1], Ryuhi Kanehara[1], Rui Kanehira[1], Toshio Nishikawa[2], Kazuaki Tanaka[1], Masaru Hashimoto[1] ([1]The Univ. of Hirosaki, [2]The Univ. of Nagoya)

真菌 *Paraphaeosphaeria*.sp KT4192 培養液から、paraphaeoketones A-C (**1-3**) を単離した。更に、これらの構造を基に先に報告した同菌生産物 paraphaeolactone A2 (**6**) の生合成経路を再考察した。

1-3 は、NMR 解析により平面構造及び相対立体配置を決定し、推定構造を DFT 法による化学シフト計算により確認した。**2** は平衡混合物であったためアセチル化により構造を収束させた **4** を用いて構造を解析した。絶対立体配置は円二色性スペクトルにより決定した。同菌は lactone **6** も生産するが、当初我々は **1** と等価な **8** のアルドール反応によって生成する cyclopropanone **7** の Favorskii 転位による **6** の生合成を提唱した。しかし、**2** の単離は acetal **5** のベンジル酸転位による **6** の生合成を示唆した。 実際、**5** を塩基性含水メタノール中で加熱後、酸処理をすることより **6** が生成した。



Paraphaeoketones A-C (**1-3**) were isolated from the fungus *Paraphaeosphaeria* sp. KT4192, which enabled us to reconsider the biosynthesis pathway of previously suggested paraphaeolactone A2 (**6**).

Relative structures of **1-3** were determined through NMR analysis. The proposed structures were confirmed through DFT-based chemical shift calculations. Their absolute configurations were elucidated based on ECD spectral analysis. We previously proposed the biosynthesis of lactone **6** through Favorskii rearrangement of **7**. However, isolation of **2** suggested that biosynthesis of **6** occurs through a benzylic acid rearrangement of acetal **5**, which is supported by chemical transformation of **4** to **6**.

benzilic acid rearrangement, favorskii rearrangement, *paraphaeosphaeria* sp.

発表責任者：生沼 悠希（h23ga206@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3C2a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 C2 会場

ゲノムマイニングによる新規プレニル化 lasso peptide の発見
Discovery of novel prenylated lasso peptide by genome mining

○堤 隼馬[1,2]、稲橋 佑起[1,2] ([1]北里大院・感染制御科学府、[2]北里大・大村智記念研究所)
○Hayama Tsutsumi[1,2], Yuki Inahashi[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Omura Inst., Kitasato Univ.)

Lasso peptide は投げ縄構造を有するリボソーム翻訳後修飾ペプチドであり、これまで様々な lasso peptide が発見されてきている。しかし、lasso peptide が直接修飾された化合物は報告例が極めて少なく、現在までに、メチル化、リン酸化、グリコシル化された lasso peptide などが報告されているのみである (Wang, M. *et al*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 9, 741364)。*Streptomyces* sp. SK1071 株のゲノムを解析した結果、我々はプレニル基転移酵素をコードする遺伝子と lasso peptide の合成に関与する遺伝子がオペロンを形成していると予想された生合成遺伝子クラスターを見出した。このクラスターにより生合成される化合物が前例のないプレニル化 lasso peptide であることを期待し、この化合物の同定を試みた。まず、このオペロンを pIJ6902 の *tipA* プロモーターの制御下にクローニングし、*Streptomyces albidoflavus* J1074 に導入した株を構築した。この構築した株の代謝解析を行ったところ、クラスター導入株は *m/z* 1658 を示す化合物を生産していた。*Streptomyces* sp. SK1071 株の培養液の解析結果を精査したところ、この株も同じ化合物を生産していることが明らかになった。そのため、*Streptomyces* sp. SK1071 から目的天然物を各種クロマトグラフィーにより精製し、NMR、MS/MS フラグメント解析、部分加水分解などによる構造決定を試みた。構造解析の結果、本化合物が新規プレニル化 lasso peptide であることが明らかになった。本講演では詳細な構造決定の結果や活性、生合成経路についての議論を行いたい。

Lasso peptide is a subfamily of Ribosomally synthesized Post-translationally modified Peptide. To date, many lasso peptides were isolated but modified lasso peptide were rarely observed in nature (Wang, M. *et al*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 9, 741364). We discovered putative gene operon containing genes required for the synthesis of lasso peptide and encoding a prenyltransferase by genome mining in *Streptomyces* sp. SK1071. We speculated that this operon is responsible for the production of novel prenylated lasso peptide. Initially, this operon was cloned into pIJ6092, in which the operon is under the control of the thiostrepton-inducible *tipA* promoter. This constructed plasmid was introduced into *Streptomyces albidoflavus* J1074. Metabolic analysis of *S. albidoflavus* harboring plasmid and SK1071 strain revealed that both produced same compound (*m/z* 1658). Thus, we purified and determined its structure. As a result, we discovered novel lasso peptide with prenyl moiety. We will discuss about the detailed structural analysis, its activity and biosynthetic pathway.

Natural products, Streptomyces, lasso peptide

発表責任者：堤隼馬（htsuhtsu@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3C2a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 C2 会場

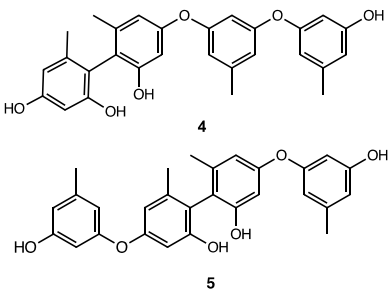
分離糸状菌 *Neohendersonia kickxii* 749 株の生産するフェニルエーテル誘導体について

Phenyl ether derivatives produced by isolated filamentous fungus *Neohendersonia kickxii* strain 749

○高橋 怜央、小関 卓也、塩野 義人（山形大農）
○Reo TAKAHASHI, Takuya KOSEKI, Yoshihito SHIONO (Yamagata Univ.)

【目的】微生物の生産する代謝産物に新規な生理活性物質を求めて、スクリーニングを実施し、山形県内の月山に群生するブナの枝から *Neohendersonia kickxii* 749 株を分離した。

【方法と結果】分離菌 *N. kickxii* 749 株を玄米培地で培養し、得られた培養物を MeOH で抽出し、濃縮後、溶媒分画や各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、化合物 **1** - **5** を単離した。次に、単離された化合物 **1** - **5** について、NMR を中心としたスペクトルデータ分析により、構造解析を行なった。化合物 **1**, **2**, **3** はそれぞれ、ジフェニルエーテル誘導体の diorcinol, *O*-methyl-diorcinol, ジベンゾフラン類であった。また、化合物 **4** は、^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータより、ジフェニルエーテルとビフェニルに帰属されるシグナルを有していた。それらを HMBC スペクトルにより結合させ、**4** の化学構造を明らかにした。次に、化合物 **5** についても、同様に ^{1}H, ^{13}C-NMR スペクトルデータを元に解析したところ、**4** と類似の構造であることが分かり、さらに、マススペクトルデータより得られた分子式より、分子内に対称性を有することが判明した。次に、HMBC データを解析し、化合物 **5** の構造を明らかにした。なお、化合物 **4**, **5** の軸不斉については、検討中である。



[Aim] Our group screened metabolites produced by microorganisms for new biologically active compounds, and isolated fungal *Neohendersonia kickxii* 749 strain from the branches of a beech tree in Mt. Gassan in Yamagata Prefecture.

[Methods and Results] The isolated *N. kickxii* strain 749 was cultured in brown rice medium, and the resulting culture was extracted with MeOH, concentrated, and purified using solvent fractionation and various column chromatography to obtain compounds **1** - **5** were isolated. The structures of isolated **1** - **5** were analyzed by spectral data analysis mainly using NMR. Compounds **1**, **2**, and **3** were diphenyl ether derivatives diorcinol, O-methyl-diorcinol, and dibenzofurans, respectively. Compound **4** also had signals attributed to diphenyl ether and biphenyl from ^{1}H, ^{13}C-NMR spectrum data. They were combined using HMBC spectroscopy, to determine the structure of **4**. Compound **5** was similarly analyzed based on NMR spectral data, and it was found that it had a similar structure to **4**. Furthermore, the molecular formula obtained from mass spectral data showed that there was a symmetry in the molecule. Next, they analyzed the HMBC data and clarified the structure of compound **5**. In addition, the axis chirarity of **4** and **5** is under consideration.

Neohendersonia kickxii, diorcinol, Phenyl ether derivatives

発表責任者：高橋怜央（a201240@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3C2a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 C2 会場

物理化学的手法による放線菌の選抜および放線菌 24R005 の生産する新規 DPPH ラジカル捕捉物質: 24R005A および 24R005B

Selection of actinomycetes by physicochemical methods and new DPPH radical scavengers produced by *Streptomyces* sp. 24R005: 24R005A and 24R005B

○阿部 真夕、菰田 俊一 (宮城大食産業)
○Mayu ABE, Toshikazu KOMODA (Miyagi Univ.)

本研究では、物理化学的スクリーニング法(PC スクリーニング法)により、24R005 株を見出し、この菌株の培養液から、新規 DPPH ラジカル捕捉物質、24R005A(**1**, $C_{13}H_{14}O_4$)および 24R005B(**2**, $C_{13}H_{13}ClO_4$)を得ることに成功した。

はじめに、約 300 の土壌放線菌をスクリーニングに供した。各々の菌株は、培養上清を DAD 検出器付きの HPLC で分析することにより評価を行い、新たな化合物を生産する菌株放線菌 24R005 株を得た。

次に、選抜された 24R005 株を 9.6L の大量培養した。24R005 株は、グルコース、乾燥ブイヨン、ニボシ粉末を含む培地中で 7 日間の回転培養を行った。培養後、培養ろ液はダイアイオン HP20、ODS オープンカラムおよび分取 HPLC により精製し、DPPH ラジカル捕捉能をもつ、**1**(12mg)および **2**(64mg)を得た。**1** および **2** は、共通の骨格を有し、共に新規の化合物であった。Trost 法を用いて解析で **1** については絶対立体化学が明らかになったが、**2** については解析中である。

In this study, two new DPPH radical scavengers, 24R005A (**1**, $C_{13}H_{14}O_4$) and 24R005B (**2**, $C_{13}H_{13}ClO_4$), were obtained from the culture medium of the *Streptomyces* sp. 24R005 strain by physicochemical screening (PC screening method).

First, about 300 soil actinomycetes were subjected to screening. Each culture filtrate was subjected to HPLC analysis with a DAD detector to select strains that produced new compounds. Then we obtained 24R005 strain.

Next, the selected 24R005 strain was cultured in large quantities of 9.6 L. The strain 24R005 was innoculated in a medium containing glucose, nutrient broth, and fish (sardine) powder and rotational culture was performed for 7 days. After culture, the culture filtrate was purified by using Diaion HP20, open ODS column and preparative HPLC to obtain two DPPH radical scavengers, **1** (12 mg) and **2** (64 mg). The compounds **1** and **2** had a common backbone, and both **1** and **2** were found to be novel compounds. For **1**, the absolute stereochemistry has been clarified by using the Trost method, but for **2**, it is still being analyzed.

DPPH, PC screening, *Streptomyces* sp.

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：3C2a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 C2 会場

薬剤超感受性出芽酵母を基盤としたスクリーニングによる抗植物病原性真菌物質の発見

Discovery of anti-plant pathogenic fungal compound by screening based on multidrug-sensitive budding yeast.

○本間 颯太[1,2]、君嶋 葵[1,2]、本庄 雅子[1,2]、小島 裕貴[1,2]、常盤 俊之[1,2]、西冨 あつか[1]、加藤 聡[1]、近藤 直純[1]、藤 晋一[3]、知念 拓実[4]、荒木 康子[5]、高橋 理[5]、臼井 健郎[6]、伊藤 考太郎[5]、浅見 行弘[1,2] ([1]北里大感染制御、[2]北里大大村研、[3]秋田県大生資、[4]東大院薬、[5]キッコーマン(株)、[6]筑波大生命環境)

○Sota HONMA[1,2], Aoi Kimishima[1,2], Masako Honsho[1,2], Hiroki Kojima[1,2], Toshiyuki Tokiwa[1,2], Atsuka Nishitomi[1], Satoshi Kato[1], Naozumi Kondo[1], Shin-ichi Fuji[3], Takumi Chinen[4], Yasuko Araki[5], Osamu Takahashi[5], Takeo Usui[6], Kotaro Ito[5], Yukihiro Asami[1,2] ([1]Kitasato Univ., [2]Omura Satoshi Memorial Inst., [3]Akita Pref Univ., [4]The Univ. of Tokyo, [5]Kikkoman Corp., [6]Tsukuba Univ.)

農作物に対する植物病原性真菌の感染規模が拡大しており、耐性菌の急速な拡大が効率的な防除を妨げている。さらに、過剰な化学農薬使用により環境破壊も進行している。従って、効率的な植物病害防除のために、天然物から環境に優しい新規抗真菌剤候補を継続的にスクリーニングする必要がある。我々はスクリーニングのモデル真菌として知られている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を利用しているが、本菌の ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターを介した薬剤排出により、抗真菌活性を示す新規化合物が見落とされていた。この課題を解決するために、*S. cerevisiae* の薬剤排出系を欠損させた薬剤超感受性株が作製され、これにより微生物由来の抗真菌活性化合物を新たに見出すことに成功してきた。本研究では、薬剤超感受性株を基盤としたスクリーニング系により、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤として報告されていた *Aspergillus* sp.由来化合物 MS-347a (**1**)を見出した。興味深いことに、**1** は広範な植物病原性真菌に対して強い活性を示した一方で、高い薬剤感受性を示すカイコに対して殺虫活性を示さなかった。これらの結果から、広範な植物病原性真菌を標的とする選択的農薬としての **1** の可能性が示された。本講演では、**1** の構造活性相関研究についても紹介したい。

Plant pathogenic fungal diseases on crops have been increasing in scale, and the rapid expansion of resistance to fungicides have prevented efficient infection control of pathogenic fungi. Moreover, the reckless use of chemical pesticides destroys our ecosystem. Therefore, a continuous screening for new ecofriendly fungicide candidates from natural products is needed for efficient plant disease prevention. Although we have used the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is known as a model fungus for biological screening, the drug efflux via ATP-binding cassette (ABC) transporters in *S. cerevisiae* has prevented the discovery of new fungicides. Recent our study established a screening method using multidrug-sensitive yeast, which has identified new fungicides produced by microorganisms. In this study, MS-347a (**1**), myosin light chain kinase inhibitor, was isolated from *Aspergillus* sp. using antifungal screens based on multidrug-sensitive yeast. Interestingly, **1** showed strong inhibition of growth in broad plant pathogenic fungi, while it showed little insecticidal activity against drug-susceptible worm, silkworms. These results indicate the potential of **1** as a selective pesticide targeting broad plant pathogenic fungi. We will also present the structure-activity relationship studies of **1** in this symposium.

Multidrug-sensitive budding yeast, Screening, Anti-plant pathogenic fungal compound

講演番号：3C2a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 C2 会場

放線菌門細菌の細胞融合による二次代謝産物の探索

Screening for Secondary Metabolites from Fusion Cells of Actinobacteria

○黒川 航志[1]、西本 一貴[1]、辻 瑞紀[1]、北川 航[2]、澄本 慎平[1]、岡田 正弘[1]([1]神奈川大学、[2]国立研究開発法人産業技術総合研究所)
○Koshi KUROKAWA[1], Kazuki NISHIMOTO[1], Mizuki TSUJI[1], Wataru KITAGAWA[2], Shimpei SUMIMOTO[1], Masahiro OKADA[1] ([1]Kanagawa University, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

これまで微生物由来の有用二次代謝産物が数多く発見されてきたが、研究が進むに連れて探索源は枯渇していく。一方、二次代謝産物の生合成遺伝子群の多くは通常の生育条件では発現していないことが明らかとなっている。そこで、我々は細胞融合により融合した融合株を探索源に用いることで新規二次代謝産物が発見できるのではないかと考えた。今回、ストレプトミセス属細菌とロドコッカス属細菌を電気細胞融合法を用いた融合操作を行い、両親株の特徴を併せ持つ細胞融合株を 8 株得た。それぞれの株は両親株が二次代謝産物をわずかしか産生しない培養条件下においても、多くの二次代謝産物を産生すること、両親株とは代謝産物プロファイルが異なることを明らかにした。その中で、最も顕著な二次代謝産物を単離・構造決定したところ、aurachin RE の前駆体である preaurachin RE を野生株からは初めて見出すことができた (Figure 1)。

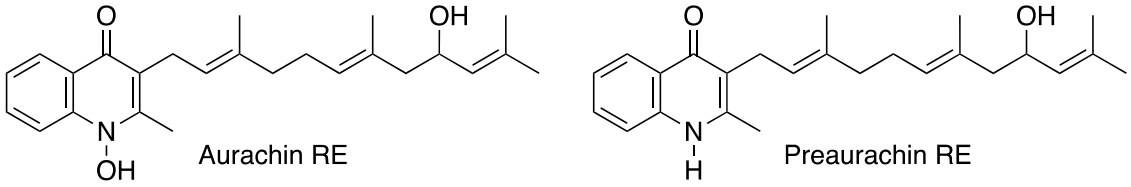


Figure 1. Aurachin RE と preaurachin RE の化学構造

Many useful secondary metabolites have been discovered from microorganisms, but unexplored microbial resources for the screening are depleted as research progresses. However, recent genetic analysis revealed that most biosynthetic genes cluster for secondary metabolites in microorganisms are silenced under normal fermentation conditions. We hypothesized that fusion cells are attractive resources for novel secondary metabolites. *Streptomyces* and *Rhodococcus* bacteria were selected as parent cells for the fusion, and eight cells were obtained that possessed the characteristics of both parental strains in just one operation of the electrical cell fusion. Notably, each fusion cell produced several secondary metabolites and showed a different profile of the metabolites even under the conditions where the parent strains produce little secondary metabolite. Preaurachin RE was identified from the fusion cells as the main product, which is an precursor of the oxidation product aurachin RE but is not secreted in the wild microorganisms at all.

fusion cell, *Streptomyces*, *Rhodococcus*

講演番号：3C2a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 C2 会場

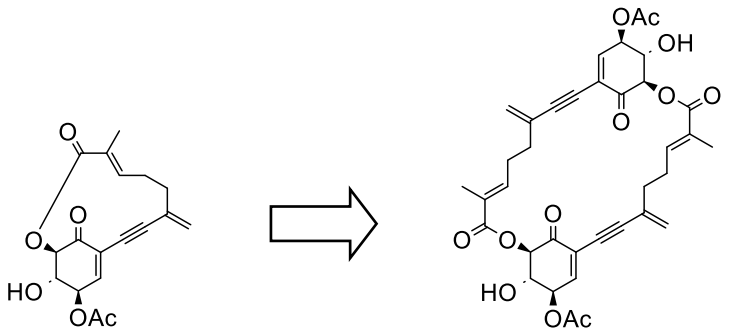
Structure revision of tricholomenyn B

○Md. Julkar Nime, Yuna Oguri, Naoya Oku, Yasuhiro Igarashi (Toyama Pref. Univ.)

Mushrooms are rich source of bioactive metabolites. *Tricholoma japonicum,* called "**shiro-shimeji**" (白占地), is an edible species found in colonies on the ground of two-needled pine forests at late autumn. It has a bitter taste and is reported to cause gastrointestinal symptoms depending on the physical constitution. To investigate whether this mushroom is safe as food stuff, a chemical investigation was attempted.

Frozen fruiting bodies (303 g) were extracted with 70% EtOH, and the combined extract was fractionated by solvent-partitioning into water-, 50% aqueous MeOH-, $CHCl_3$-, and *n*-hexane-soluble fractions. The antimicrobial and bitter $CHCl_3$-soluble fraction was fractionated by ODS and silica gel column chromatography, followed by two steps of HPLC purification to yield 7.5 mg of a pure active compound.

Interpretation of NMR data and database search retrieved an antimitotic macrolide, tricholomenyn B previously isolated from *T. acerbum*. However, the molecular weight of our compound was two-fold of that proposed with deduced polyketide structure by ESI-HRQTOFMS analysis reviling that it has a macrodiolide structure. Comparison of NMR, UV, $[\alpha]_D$, and IR data, we concluded that our compound is tricholomenyn B and its previously proposed structure was found to be wrong.



proposed revised

Tricholomenyn B was perceived bitter as low as 37.5 μg/tongue, and antimicrobial against *Kocuria rizhophila* at 12.5 μg/disk and *Staphylococcus aureus* at 50 μg/disk, and also cytotoxic against P388 murine leukemia cells with an IC_{50} value of 2.6 μM.

In conclusion, *T. japonicum* is revealed to be bitterness and toxicity are due to its ingredient. The structure of which was corrected to have a macrodiolide structure in this research.

Tricholoma japonicum, edible, mushroom

講演番号：3C2a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 C2 会場

インドネシア由来放線菌における二次代謝産物の広範なスクリーニング

Extensive screening of secondary metabolites in Indonesian *Actinomycetes*

○大垣 翔[1]、むすりみん るくまん[1]、あり ありむでぃん[2]、荒川 賢治[1] ([1]広島大院・統合生命、[2]マカッサル州立大学)
○Sho OGAKI[1], Rukman MUSLIMIN[1], Alimuddin ALI[2], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ, [2]Makassar State Univ)

【目的】
放線菌は抗生物質を含む数多の生理活性物質を生産し、微生物由来の抗生物質の約 7 割が放線菌由来と言われている。地球温暖化に伴う熱帯特有感染症の出現に備えて、我々は熱帯地域の生物資源から天然生理活性物質の取得を目指している。
【方法・結果】
インドネシア由来放線菌が抗菌物質を生産するかを検討するため、酢酸エチル抽出物の抗菌活性試験(検定菌: *Micrococcus luteus*)を行った。32 株中、15 株が抗菌活性物質を生産することが確認された。抗菌活性をもつ RM001 株に着目し、酢酸エチル抽出物を、LH-20（溶出溶媒:MeOH）を用いて 20 画分集めた。スポットが最も多い画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：$CHCl_3$:MeOH=50:1）で精製を行った。得られた画分から最も極性が低いスポットをさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：Hexane:EtOAc=1:2）で精製を行い 2 つのスポット（RM001-SO-1、RM001-SO-2）を単離した。質量分析を行ったところ、それぞれの分子式は $C_{13}H_{22}O_3$ および $C_{12}H_{20}O_3$ であり、また各種 NMR 解析を行い、いずれも 4-一置換ブテノライド骨格を持つことが分かった。現在は抗菌活性を持つ代謝産物の単離・構造決定を行っており、本発表ではこれらの経緯について報告する。

Antimicrobial activity test was performed to determine whether actinomycetes from Indonesia could produce antimicrobial substances, and 15 of the 32 strains showed considerable antimicrobial activity. Among them, the ethyl acetate extract of strain RM001 was purified to obtain two spots (RM001-SO-1 and RM001-SO-2). Their molecular formulae are $C_{13}H_{22}O_3$ and $C_{12}H_{20}O_3$, respectively, and NMR analysis confirmed that they have a 4-monosubstituted butenolide skeleton. Currently, we are performing the isolation and structure determination of metabolites with antimicrobial activity in strain RM001. In this paper, we will discuss details.

Actinomyces, Secondary metabolites, Indonesia

発表責任者：荒川　賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

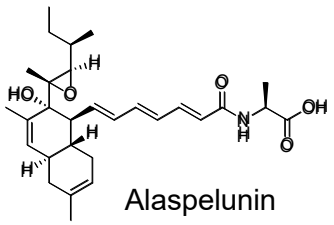
講演番号：3C2a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 C2 会場

Talaromyces 属由来の新規アラニン結合ポリケチドの単離、構造決定及び抗ウイルス活性評価
Isolation, structural determination, and antiviral activities of a novel alanine-conjugated polyketide from *Talaromyces sp.*

○模素 希[1]、安河内 美月[1]、中嶋 章悟[2,3,4]、中村 洸[1]、小方 雅也[1]、井口 恵太[1]、菅野 和紀[1]、杉田 和俊[1]、村上 裕信[1,5]、倉持 幸司[6]、竹田 志郎[1,5]、渡士 幸一[2,3,6]、藤野 寛[1,5]、紙透 伸治[1,5]([1]麻布大獣医、[2]感染症研 ウイルス第二部、[3]感染症研 治療薬・ワクチン開発研究センター、[4]福祉村病院 長寿医研、[5]麻布大ヒトと動物の共生科学センター、[6]東理大理工)
○Nozomi MOSU[1], Mitsuki YASUKOCHI[1], Shogo NAKAJIMA[2,3,4], Kou NAKAMURA[1], Masaya OGATA[1], Keita IGUCHI[1], Kazuki KANNO[1], Kazutoshi SUGITA[1], Hironobu MURAKAMI[1,5], Kouji KURAMOCHI[6], Shiro TAKEDA[1,5], Koichi WATASHI[2,3,6], Kan FUJINO[1,5], Shinji KAMISUKI[1,5] ([1]School of Veterinary Medicine, Azabu Univ., [2]Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, [3]Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases, [4]Choju Medical Institute, Fukushimura Hospital, [5]Center for Human and Animal Symbiosis Science, Azabu Univ., [6]Tokyo Univ. of Science)

近年新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)が世界的に甚大な被害をもたらし、今後もこのような新興・再興ウイルス感染症が発生する可能性が高い。新興・再興ウイルス感染症対策として、複数のウイルスに効果を示す抗ウイルス薬が第一選択薬として有効であると考えられる。

本研究では、東京都東府中で採取された弱酸処理した砂から *Talaromyces speluncarum* FMR 16671 を単離した。培養液を抽出・精製し、代謝物の NMR 及び MS 分析を行った結果、アラニンが結合した新規のデカリン型ポリケチドであることが明らかになり、alaspelunin とした。alaspelunin の生理活性を明らかにするため、各種抗ウイルス活性を評価した。その結果、alaspelunin は用量依存的に SARS-CoV-2 のウイルス RNA を減少させ、IC_{50} 値は 11.9 μM、IC_{90} 値は 40.0 μM であった。また、ブタ腎臓由来の PK-15 細胞を用いたプラークアッセイにより抗オーエスキー病ウイルス（PRV）活性を評価した結果、10 μM で PRV プラークサイズが有意に縮小した。以上のように alaspelunin は、細胞ベースの評価系では複数のウイルスに効果を示すことが明らかになった。



Alaspelunin

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection has resulted in enormous damage worldwide. It is possible that such emerging and re-emerging viral diseases may occur in the future. To combat emerging and reemerging viral infections, broad-spectrum antivirals that target multiple viruses are effective.

In the present study, we isolated the fungus *Talaromyces speluncarum* FMR 16671 from weak acid-treated sands collected at Higashi-fuchu, Tokyo, Japan. NMR and MS analyses revealed that the fungal metabolite was a novel decalin-type polyketide that was condensed with alanine, and the compound was named alaspelunin.

To elucidate the bioactivity of alaspelunin, its antiviral activities against various viruses were evaluated. Alaspelunin reduced the viral RNA of SARS-CoV-2 in a dose-dependent manner, and the IC_{50} and IC_{90} values were 11.9 and 40.0 μM, respectively. The anti- pseudorabies virus (PRV) activity of alaspelunin was assessed via plaque assays using porcine kidney-derived PK-15 cells. Treatment with 10 μM of alaspelunin significantly reduced PRV plaque size.

Antiviral activity, Aujeszky's disease, polyketide

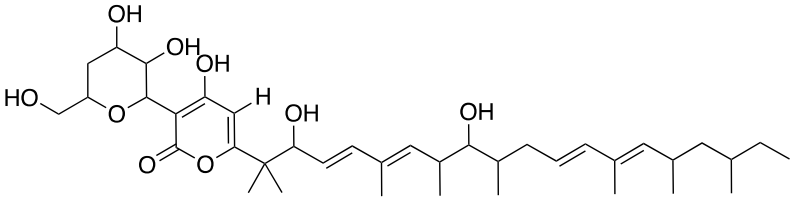
発表責任者：紙透伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：3C2a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 C2 会場

糸状菌 F8203 株が生産する抗真菌活性物質の単離および構造決定
Isolation and characterization of antifungal compound from filamentous fungal strain F8203

○大塚 みゆき、矢野 考汰、高見澤 花（玉川大学農）
○Miyuki OTSUKA, Kota YANO, Hana TAKAMISAWA (Tamagawa Univ.)

植物病原糸状菌の形態変化を指標としたスクリーニングによって，イネごま葉枯病菌 *Cochliobolus miyabeanus* に形態異常を引き起こす糸状菌 F8203 株を見出した。本菌株が生産する活性物質を各種クロマトグラフィーで精製し，単離を試みた．その結果，本活性物質は分子式 $C_{38}H_{60}O_9$ の化合物であり，各種 NMR スペクトルから長鎖側鎖を有する α-pyrone 配糖体であることが示された．この化合物の平面構造は S 39163/F-I に一致しているが，絶対立体配置は不明である．本化合物はバクテリア（*B. subtilis, S. aureus, M. luteus, E. coli*）には活性を示さないが，イネごま葉枯病菌には 強い活性を示し，胞子に作用させると発芽した菌糸の膨潤を引き起こし，菌糸伸長を阻害する．発表では他の真核微生物に対する活性についても報告する．



Structure of S 39163/F-I

We found filamentous fungal strain F8203 by screening program for microorganisms producing bioactive compounds on phytopathogenic fungi. The strain F8203 produced a compound which induced abnormal morphological changes of rice brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus*. Chromatographic purification gave a pure active compound, and their planar structure was established through extensive spectroscopic analyses including 1D and 2D NMR and HR-ESIMS. The active compound was α-pyrone glycoside with a long side chain and the planar structure is consistent with S 39163/F-I, which absolute stereo configuration has not been elucidated. The compound is not active against bacteria (*B. subtilis, S. aureus, M. luteus, E. coli*), but is highly active against the spore of *Cochliobolus miyabeanus*, causing swelling of germinating mycelia and inhibiting mycelial elongation. The activity against other eukaryotic microorganisms will be also discussed.

antifungal agent, polyketide, brown spot of rice

発表責任者：大塚みゆき（motsuka@agr.tamagawa.ac.jp）

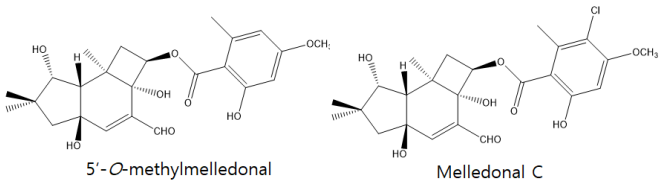
講演番号：3C2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C2 会場

培養条件に依存するナラタケが産生する二次代謝産物の探索

Search for secondary metabolites produced by Armillaria sp. depending on culture conditions

○金 都会[1]、崔 宰熏[1,2,3,4,5]、ウ ジン[4,5]、平井 浩文[1,2,3,4,5]、河岸 洋和[4,5] ([1]静大院創造、[2]静大グリーン研、[3]静大共創、[4]静大農、[5]静大キノコ科研)
○Dohoe KIM[1], Jaehoon CHOI[1,2,3,4,5], Jing WU[4,5], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4,5], Hirokazu KAWAGISHI[4,5] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ., [4]Fac. Agr., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. Mushroom Sci., Shizuoka Univ.)

世界中に広く分布しているナラタケ（*Armillaria mellea*）はタマバリタケ科ナラタケ属のキノコであり、美味な食用菌として古くから愛されてきた。その一方で、ナラタケ属のキノコは生きている植物に対する寄生性、病原性が非常に強く、ナラタケ菌の寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている[1)]。また、ナラタケは植物だけではなく、他の菌類に対する影響も強く、いくつかのキノコは近傍にナラタケの菌糸があると、奇形の子実体を形成することが報告されている[2)]。前本大会では静置培養のナラタケ 543 株の菌糸体から単離した D-トレイトールの菌糸体及び植物成長調節活性について報告した[3)]。本大会では①静置培養で産生される二次代謝産物、②コムラサキシメジとの共培養で産生される化合物の探索を目的とした。各条件で培養したナラタケ 543 株の菌糸体を n-ヘキサン、酢酸エチル、エタノールにより抽出した後、HPLC を用いて各可溶部の二次代謝産物の比較を行った。その結果、静置培養では、振盪培養より D-トレイトールの産生量が増加した。共培養では、単独培養より melleolide 類の産生量が大幅に増加した。現在、他の二次代謝産物の探索も行っている。



Armillaria mellea is a member of the family Gramineae and has long been loved as a tasty edible fungus. On the other hand, *Armillaria* are highly parasitic and pathogenic to living plants, and the disease caused by *Armillaria* is known as "Naratake disease"[1)]. *Armillaria* also have a strong effect on other fungi, and some mushrooms have been reported to form malformed fruiting bodies when *Armillaria* mycelium is present in the vicinity[2)]. In the previous conference, we reported on the mycelial and plant growth regulating activity of D-threitol isolated from the mycelia of 543 strains of *Armillaria* in static culture[3)]. In this conference, we aimed to search for (1) secondary metabolites produced in static culture and (2) compounds produced in co-culture with *Lepista sordida*. Mycelia of 543 strains of *Armillaria* cultured in each condition were extracted by *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol, and the secondary metabolites of each soluble part were compared using HPLC. The results showed that the production of D-threitol increased in the static culture compared to the shaking culture. In co-culture, the production of melleolides was much higher than in monoculture. We are currently searching for other secondary metabolites.

1) Cox, K.D., *et al.*, *Biol. Control,* **37**, 291-300 (2006)
2）Hajime, K., *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **78**, 163-167 (2015)
3）Dohoe, K., et al., 2023 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Armillaria, Armillaria root rot, OSMAC

講演番号：3C2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C2 会場

ヒメマツタケ（*Agaricus blazei*）菌糸体由来の新規化合物の構造決定

Structure Determination of New Compounds from the Mycelium of *Agaricus blazei*

○王 俊紅[1]、呉 静[2,3]、小椋 隆平[2]、小堀 一[4]、崔 宰熏[1,2,3,5]、平井 浩文[1,2,3,5]、河岸 洋和[2,3]（[1]静大院・創造、[2]静大・農、[3]静大・キノコ科学研究所、[4]岩出菌学研究所、[5]静大・共創）

○ JUNHONG WANG[1], JING WU[2,3], RYUHEI OGURA[2], HAJIME KOBORI[4], JAEHOON CHOI[1,2,3,5], HIROFUMI HIRAI[1,2,3,5], HIROKAZU KAWAGISHI[2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Fac. of Agri.,Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Mushroom Sci., Shizuoka Univ., [4]Iwade Research Institute of Mycology CO., Ltd., [5]Japan Fac. Glob. Int. Sci. Inno., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】ヒメマツタケ (*Agaricus blazei*) はハラタケ科ハラタケ属のキノコである。当研究室では、過去にヒメマツタケ子実体から抗腫瘍活性を有する β-(1→6)-D-グルカンや HeLa 細胞増殖抑制活性を持つステロイド類化合物を単離している。しかし、研究されているのは子実体が多く、菌糸体の研究例が少ない。以前にヒメマツタケ菌糸体酢酸エチル可溶部から 2 種類の新規化合物 (**1**, **2**) の単離を本学会で発表した[1]。化合物 **1** と **2** は分子式が一致し、平面構造が同一であるが、一部の NMR ケミカルシフトが異なるため、ジアステレオマーの関係にあることが示唆された。本研究では、化合物 **1** と **2** の絶対配置の決定を目的とした。

【結果・考察】新規化合物（**1**, **2**）の化合物の平面構造は、 MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定している。立体配置を決定するため、アゼライン酸と meso-2, 3-butandiol, (2*R*, 3*R*)-butandiol, (2*S*, 3*S*)-butandiol を基質としてエステル化反応を行った(Fig.1)。結果として、合成物 **2** の分光学的データおよびその旋光度は、単離されたものと一致し、**2** の絶対配置は Fig. 1 のように決定した。化合物 **1** は結晶化し、X 線結晶構造解析によって絶対配置を決定する予定である。化合物 **1**—**7** を植物病原菌に対する抗菌活性試験に供したところ、化合物 **4** がかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* に対して阻害作用を示した。

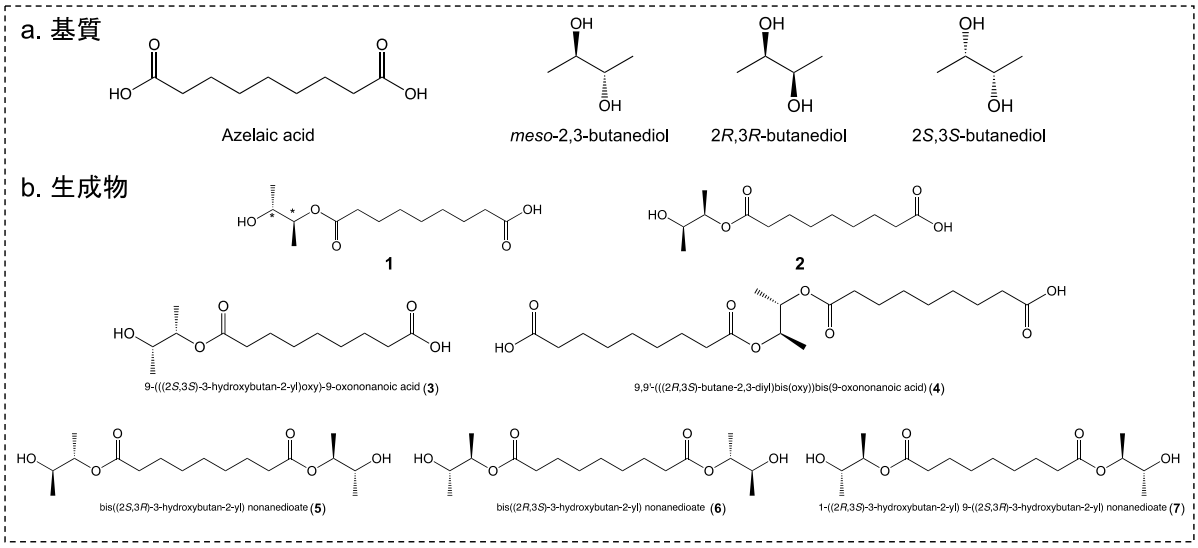


Fig.1 Chemical structures of azelaic acid, *meso*-2, 3-butandiol, (2*R*, 3*R*)-butandiol, (2*S*, 3*S*)-butandiol and compounds **1**-**7**.

Agaricus blazei (Japanese name: Himematsutake) is an edible and medicinal mushroom that belongs to the family Agaricaceae. Two new compounds (**1**, **2**) have been isolated from the mycelia of the fungus. These compounds have the same molecular formula and planar structure, but some NMR chemical shifts were different from each other, suggesting that these two compounds were in a diastereomeric relationship. The purpose of this study was to determine the absolute configuration of compounds **1** and **2**.

To determine the absolute configuration of compounds **1** and **2**, esterification of azelaic acid with meso-2, 3-butandiol or (2*R*, 3*R*)-butandiol were performed (Fig.1). As a result, the spectroscopic data for the synthetic **2**, as well as its optical rotation, were in agreement with those of the isolated one. The absolute structure of **2** was determined as shown in Fig. 1. Crystallization of **1** is now in progress to afford X-ray crystal analysis. In the bioassay examining growth inhibitory activity against phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis*, only compound **4** showed inhibition effects.

1) 呉静 ら，日本農芸化学大会, 2022 年度大会講演要旨集, 29 (2022).

Agaricus blazei, structure determination, synthetic chemistry

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C2 会場

New Oxazole type alkaloids from the roots of Oxytropis trichophysa grown in Mongolia

○ Buyankhishig Buyanmandakh[1,2], Murata Toshihiro[1], Delgermaa Chinbat[3], Gantumur Baasandorj[4], Byambajav Tseesuren[5], Undarmaa Otgonbaatar[3], Bertsetseg Dalaijargal[3], Davaapurev Bekh-Ochir[2,3], Sasaki Kenroh[1], Batkhuu Javzan[2,3] ([1]Tohoku Medical and Pharmaceutical University, [2]Graduate School, National University of Mongolia, [3]School of Engineering and Technology, National University of Mongolia, [4]Khovd School, National University of Mongolia, [5]Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences)

Oxytropis trichophysa Bunge is a Fabaceae perennial plant distributed in Central Asia. It is observed that livestock eat roots of *Oxytropis trichophysa* frequently during severe winter in Mongolia and rodents hoard their aerial parts as food in their nests. Furthermore, this plant is known to be a medicinal plant and has been used for centuries to treat a variety of illnesses, such as wounds, inflammation, and bone fractures. In our prior investigation, an acetone-water (4:1) extract and some fractions of this plant showed anti-plasmodium, antibacterial, and quorum sensing activities. The current study intends to extract the chemical components of *O. trichophysa*, determine chemical structure of the isolated compounds, and evaluate their anti-bacterial and anti-plasmodium activity.

The roots of *O. trichophysa* were collected from the Duut soum area of the Hovd province, Mongolia, in winter of 2021. The dried roots (275 g) were macerated with 3.6 L of acetone - water (4:1) and then evaporated *in vacuo*. The extract was suspended in water and subjected on an open column and preparative HPLC to isolate compounds (**1**-**10**). The chemical structures of the obtained compounds were elucidated mainly by MS, 1D, and 2D NMR. Additionally, the anti-bacterial and quorum sensing activity of extracts, fractions and some compounds were investigated with disc-diffusion assay by using bacterial strains such as *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, and *Chromobacterium violaceum*.

A chemical examination of an extract from the roots of *O. trichophysa* led to the isolation and identification of 10 compounds, including oxazoles and isoflavonoids. Among them, 2-phenyl-5-(2″-methoxy-3″-hydroxyphenyl)oxazole (**1**) and 2-(4′-Hydroxyphenyl)-5-(2″-methoxy-3″-hydroxyphenyl)oxazole (**2**) were obtained for the first time from the natural source. The known compounds were identified as 2-phenyl-5-(2″-hydroxyphenyl)oxazole (**3**), isomucronulatol (**4**), 5′-hydroxyisomucronulatol (**5**), (6a*R*, 11a*R*)-3,8-dihydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan (**6**), isoliquiritigenin (**7**), 4,2′-dihydroxy-4′-methoxychalcone (**8**), isosakuranetin (**9**), and butin (**10**). These known compounds were obtained for the first time in this plant. For antibacterial and quorum sensing assay, the diethyl ether fractions significantly inhibited *S. aureus* (16.2 mm), *M. luteus* (19.0 mm), and *C. violaceum* (22.4 mm) at conc.0.5 mg/disc. Among the isolated compounds, **4** showed 20.3 mm inhibition zone against *Chromobacterium violaceum* at conc.0.05 mg/disc.

Mongolian livestock, Oxytropis trichophysa, Oxazole

発表責任者：Buyanmandakh BUYANKHISHIG（bbuyaa1717@gmail.com）

講演番号：3C2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C2 会場

モンゴル国産マメ科植物アルカロイド: *Oxytropis lanata* 由来オキサゾールと *Astragalus melilotoides* 由来インドール

Alkaloids of Mongolian Fabaceae Plants; oxazoles isolated from *Oxytropis lanata* and indoles from *Astragalus melilotoides*

○村田 敏拓[1]、BATBOLD Badarch[2]、黒澤 七海[1]、BUYANKHISHIG Buyanmandakh[2]、菅沼 啓輔[3]、BANZRAGCHGARAV Orkhon[4]、DAVAAPUREV Bekh-Ochir[2]、BATKHUU Javzan[2]、佐々木 健郎[1] ([1]東北医薬大薬、[2]モンゴル国立大、[3]帯畜大原虫病研究セ、[4]モンゴル生命科学大獣医研)

○ Toshihiro MURATA[1], Badarch BATBOLD[2], Nanami KUROSAWA[1], Buyanmandakh BUYANKHISHIG[2], Keisuke SUGANUMA[3], Orkhon BANZRAGCHGARAV[4], Bekh-Ochir DAVAAPUREV[2], Javzan BATKHUU[2], Kenroh SASAKI[1] ([1]Tohoku Medical and Pharmaceutical University, [2]School of Engineering and Technology, National University of Mongolia, [3]Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, [4]Institute of veterinary medicine, Mongolian University of Life Sciences)

モンゴル国には3,000種を超える高等植物が生育する。同国では牧畜業が重要産業の一つであり、牛・駱駝・馬・羊・山羊の 5 畜を中心に 5,000 年を超えて遊牧が行われてきた。遊牧地の植物は常に家畜動物の放牧圧にさらされており、動物との植物成分を介した相互作用に興味が持たれる。ゆえに動物に強い影響を及ぼす成分や、医薬シーズなどヒトにとって有用な化合物を見出すことを目的に、モンゴル国植物の成分機能性解析を進めている。一般的にマメ科植物は貧栄養状態でもよく育ち、タンパク質含量が高い。よって家畜動物の嗜好性が高い種が多く知られ、現地でも貴重な牧草が多い。一方で、お互いに近縁の *Oxytropis* 属植物や *Astragalus* 属植物には、食べた動物が狂ったように苦しむ様子から狂い草（Locoweed）と呼ばれる種も知られる。今回、モンゴル国で自生する *Oxytropis lanata* から抗原虫活性オキサゾール類を得た成果と、比較的家畜嗜好性がある *Astragalus melilotoides* から単離した新規インドール配糖体の構造決定ついて述べる。また、同属植物との含有成分の違いを踏まえて、上記植物の動物への影響や、応用可能性について考察する。

More than 3,000 species of higher plants grow in Mongolia. One of the main sectors of Mongolia's economy is traditional pastoral livestock, which has a history of at least 5,000 years, with 5 kinds of animals: cow, camel, horse, sheep, and goat. Nomadic animal husbandry is still practiced in Mongolia. The plants in nomadic areas are constantly exposed to grazing pressure from livestock animals, and interactions with animals through their plant chemicals are of interest. Therefore, we focus on plant constituents that have strong effects on animals and compounds that are useful for humans, such as pharmaceutical seeds. In general, Fabaceae plants are known to be highly palatable to livestock animals because high protein content. On the other hand, some species of the genus *Oxytropis* and *Astragalus* are known as "locoweed" due to abnormal behavioral effects observed in animals consuming them. In this report, we present the results of obtaining antiprotozoan oxazoles from *Oxytropis lanata* and the structure determination of new indole glycosides isolated from *Astragalus melilotoides* which has a relatively high preference for domestic animals. The effects of the above plants on animals and their potential applications will be discussed with the differences in their constituents from related plants.

Natural Product Chemistry, Alkaloids, Mongolia

講演番号：3C2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C2 会場

ヒノキ精油に含まれるヒアルロン酸産生促進効果を示す成分の探索

Exploration of components in Hinoki essential oil demonstrating the promotion of hyaluronic acid production

○前川 実優[1]、勝崎 裕隆[1]、早川 琢也[2]、奥村 克純[1]、安藤 純子[2]、籠谷 和弘[2] ([1]三重大院生資、[2]辻製油株式会社)
○Miyu MAEGAWA[1], Hirotaka KATSUZAKI[1], Takuya HAYAKAWA[2], Katsuzumi OKUMURA[1], Junko ANDO[2], Kazuhiro KAGOTANI[2] ([1]Mie Univ., [2]Tsuji Oil Mills co.,Ltd.)

ヒアルロン酸（HA）は生体内に広く分布し、組織における重要な役割を担っている。また、その高い保水能力により皮膚の乾燥やシワを防ぐ効果が多数報告され、美容業界等で注目されている物質である。一方、ヒノキ（*Chamaecyparis obtusa*）は、用材源として利用されている針葉樹である。現在、ヒノキから得られる精油は主に香料としての活用に留まっており、機能性に関する報告はほとんどされていない。これまでの研究により、ヒノキ精油（辻製油(株)製）で正常ヒト皮膚線維芽細胞株 NB1RGB を処理した結果、細胞内での HA 産生促進効果を見出している。そこで本研究ではヒノキ精油に含まれる HA 産生促進作用を示す成分の探索を目的とした。

ヒノキ精油を *n*-ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、メタノールの順にシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーで溶出し分画した。それぞれの画分について細胞評価を行った結果、酢酸エチル画分で特に高い活性が確認された。この酢酸エチル画分について、*n*-ヘキサンと酢酸エチルを組み合わせてシリカゲルでさらに分画を行った。細胞評価を行った結果、*n*-ヘキサン:酢酸エチル=8:2 画分で特に高い活性が確認された。さらにこの活性画分を順相 HPLC により 5 画分に分画した。これらの細胞評価を行ったところ、Fr.1 および Fr.2 で高い活性が確認された。

Hyaluronic acid (HA) is widely distributed in the body and plays an important role in tissues. Its high-water retention capacity has been reported to prevent skin dryness and wrinkles, and it has attracted attention in the beauty industry. Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) is a conifer traditionally used as an excellent source of lumber in Japan. At present, the cypress essential oil is mainly used as a fragrance, and there are few reports on its functionality. Previous studies have shown that normal human dermal fibroblast cell line NB1RGB with cypress essential oil (Tsuji Oil Co., Ltd.) treatment promotes intracellular HA production. In this study, we aimed to explore the components in Hinoki essential oil that exhibit a HA production-promoting effect.

Cypress essential oil was fractionated to each extract of *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol by silica gel column chromatography and. Cell assay with each fraction showed that the ethyl acetate fraction was particularly active. The ethyl acetate fraction was fractionated by silica gel using a combination of *n*-hexane and ethyl acetate. The *n*-hexane: ethyl acetate=8:2 fraction showed particularly promotion of HA production in cell assay of all fractions. This active fraction was further fractionated into 5 subfractions by normal-phase HPLC. As a result, the Fr. 1 and Fr. 2 showed strong activity.

hyaluronic acid, *Chamaecyparis obtusa*

講演番号：3C2p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C2 会場

ザクロ葉に含まれる新規エラジタンニンモノマーの構造とその抗糖化活性

A new dehydroellagitannin from pomegranate leaves and its antiglycation activity.

○岩岡 裕二[1]、CHEEWAPHAN Apinya[1]、桑村 真由[1]、好村 守生[2]、天倉 吉章[1]、伊東 秀之[1]([1]岡山県大院、[2]松山大薬)
○Yuji IWAOKA[1], Apinya CHEEWAPHAN[1], Mayu KUWAMURA[1], Morio YOSHIMURA[2], Yoshiaki AMAKURA[1], Hideyuki ITO[1] ([1]Grad. Sch. of Okayama Pref. Univ., [2]Colleg. of Pharm. Sci. Matsuyama Univ.)

これまでにザクロの葉から granatin A や granatin B などのエラジタンニンが単離されているが，その他の成分やそれらの機能性の詳細については未解明な部分が多い。本研究において，ザクロの葉に含まれる新規エラジタンニンの単離・同定を行い，その抗糖化活性について明らかにした。

ザクロの葉から得た 70%含水アセトンエキスを有機溶媒抽出および各種カラムクロマトグラフィーにより精製し, 1 種の新規エラジタンニンモノマーを単離, 同定した。1D-および 2D-NMR データの結果から新規化合物は，1 分子の dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHDP)基および 3 分子の galloyl 基がそれぞれグルコースの 1,3 位および 2,4,6 位に結合した構造であることが明らかとなった。さらに CD スペクトルの結果に基づいて，DHHDP 基の 1 位の絶対立体配置を *S* 体と決定し，新規化合物を pomegranatin と命名した。また，終末糖化産物(advanced glycation endproducts: AGEs)の生成阻害活性試験および AGEs 生成前駆体の切断活性試験に対し，pomegranatin はいずれも顕著に高い活性を示した。以上から，ザクロの葉から新規エラジタンニンモノマーの pomegranatin を単離，構造解明し，顕著な抗糖化活性を示すことを明らかにした。

Ellagitannins including granatins A and B from pomegranate leaves have been isolated. However, the other components and their function in pomegranate leaves are still not cleared in detail. In the present study, we investigated the isolation and characterization of functional polyphenols from pomegranate leaves and their antiglycation activities.

The 70% acetone extract from pomegranate leaves was separated and purified by organic extraction and column chromatography to afford a new monomeric ellagitannin. The new ellagitannin was determined to have a dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHDP) group and three galloyl groups attached to *O*-1 and 3 and *O*-2,4, and 6 position at the glucose, respectively, based on 1D- and 2D-NMR data. The absolute configuration of C-1 in DHHDP was defined as *S*-series by CD data. The new compound named pomegranatin also showed remarkable inhibitory activity toward the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) and a cleaving effect on crosslink from AGEs. Our results provide the data on antiglycation activities of new ellagitannin pomegranatin isolated from pomegranate leaves.

Pomegranate, Pomegranatin, Antiglycation

発表責任者：伊東秀之（hito@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：3C2p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C2 会場

ブラックベリー葉に含まれる機能性ポリフェノールの探索

Functional polyphenols from the leaves of blackberry

○松浦 美晴、増田 雅子、岩岡 裕二、伊東 秀之（岡山県大院）
○Miharu Matsuura, Masako Masuda, Yuji Iwaoka, Hideyuki Ito (Grad. Sch. of Okayama Pref. Univ.)

ブラックベリー(*Rubus fruticosus*)の果実には，ポリフェノールが豊富に含まれており，抗酸化作用に起因した心血管疾患などの酸化関連疾患の予防に効果的であると報告されている。しかし，ブラックベリーもの葉の化学組成や機能性に関するデータは不足しているため，本研究ではブラックベリー葉に含まれるポリフェノール成分の探索とそれらの成分の抗糖化作用の評価を行った。
ブラックベリー葉の 70%含水アセトンエキスの分離，精製を行った結果，8 種の既知化合物と新規化合物 1 種を単離した。そのうち既知化合物であるエラジタンニンダイマーの chingiitannin A は，本植物からの単離は初めてで，新規化合物の構造は，NMR および MS などの各種スペクトルデータに基づいて，6-*O*-caffeoyl-1-*O*-galloyl-β-D-glucose と決定した。単離した化合物について，終末糖化産物（AGEs）生成阻害作用および AGEs 前駆体の分解作用について評価した結果，いずれもエラジタンニンダイマーの sanguiin H-6 が強力な活性を示した。以上の結果から，ブラックベリー葉エキスのアンチエイジング素材の開発に向けた基礎データを提供することができた。

Blackberry (*Rubus fruticosus*) contained abundant polyphenols with strong antioxidant activities, might contribute the prevention of heart diseases. However, the detail constituents of the leaves of blackberry and their functionality are still unknown. In this study, we investigated the isolation and characterization of the leaves of blackberry and the antiglycation properties of the isolated compounds. The 70% aqueous acetone homogenate was separated and purified by column chromatographies to furnish eight known polyphenols and a new compound. Among the known compounds, chingiitannin A, an ellagitannin dimer, was isolated and identified from this source for the first time. The structure of new compound was determined as 6-O-caffeoyl-1-O-galloyl-β-D-glucose, based on NMR and MS spectral data. The isolated compounds from the leaves of blackberry were evaluated for the inhibitory effect of advanced glycation end products (AGEs) formation and the AGE cross-link cleaving effects. Sanguiin H-6, an ellagitannin dimer, showed the strongest inhibitory effect. These findings suggested the blackberry polyphenols are good source for antiglycation effects.

Rubus fruticosus, Blackberry, Antiglycation

発表責任者：伊東　秀之（hito@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：3C2p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C2 会場

電子励起解離（EAD）を用いた殺菌剤イプフルフェノキン代謝物の構造解析

Identification of Monohydroxylated Metabolites from Fungicide Ipflufenoquin by Electron Activated Dissociation (EAD)

○岡部 脩平[1]、健田 潮[2] ([1]日本曹達株式会社、[2]株式会社エービー・サイエックス)
○Shuhei OKABE[1], Ushio TAKEDA[2] ([1]Nippon Soda CO., Ltd., [2]AB Sciex Pte., Ltd.)

農薬の安全性評価では、農薬原体だけでなくその代謝物を含めた安全性を評価するため、農薬代謝物の構造を決定する必要がある。農薬代謝物の構造解析には主に質量分析計が用いられるが、衝突誘起解離（CID）により得られた情報のみでは構造の決定に至らない事例もある。

日本曹達株式会社が開発した新規作用機構（DHODH 阻害）を有する殺菌剤イプフルフェノキンにおいて、分子内の一か所が水酸化を受けた代謝物が複数種生成した。これらの水酸化位置は、CID により得られた情報のみでは特定できなかった。そこで、ZenoTOF 7600 システム（株式会社エービー・サイエックス）が有する開裂機構である電子励起解離（EAD）を用いて、これらの代謝物のナトリウム付加イオンをプロダクトイオン分析した。その結果、CID とは異なる特徴的なフラグメントイオンを観測でき、質量分析のみで全ての代謝物の水酸化位置を特定することに成功した。

本講演では、実際の測定データを用いてイプフルフェノキンの一水酸化体の構造解析例を紹介する。

For registration of an agrochemical, it is required to determine the structure of its metabolites to ensure that safety is properly assessed for those metabolites as well as the parent active substance. Mass spectrometers serve as a chief tool for the structural elucidation of such pesticide metabolites. In some cases, however, the full structure of a metabolite cannot be successfully determined by information derived from collision-induced dissociation (CID) alone.

Ipflufenoquin is a fungicide developed by Nippon Soda Co., Ltd. with a novel mode of action (inhibition of DHODH). Several metabolites were generated by monohydroxylation at various positions in the parent molecule, but the position of hydroxylation in each metabolite could not be identified by CID. We therefore sought for another fragmentation approach, namely, electron activated dissociation (EAD), which is a cleavage mechanism installed in ZenoTOF 7600 system (AB Sciex Pte., Ltd.). As a result, EAD of sodium adduct ions of those metabolites gave characteristic fragment ions that were distinct from those obtained by CID, enabling us to identify the exact positions of hydroxylation in all of the metabolites by mass spectrometry alone.

We will present detailed data obtained in the structural analysis of those monohydroxides of ipflufenoquin to demonstrate the power of EAD for identification of challenging metabolites.

mass spectrometry, electron activated dissociation, structural determination

発表責任者：岡部 脩平（s.okabe@nissogr.com）

講演番号：3C2p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C2 会場

金時豆の種皮にカテキノピラノシアニジン A, B が含まれていた

Catechinopyranocyanidin A and B were contained in seed-coat of red kidney bean, Kintoki

○吉田 久美[1,2]、浅野 友世[2] ([1]愛工大工、[2]名大院情報)
○Kumi YOSHIDA[1,2], Tomoyo Asano[2] ([1]AIchi Insti. of Tech, [2]Nagoya Univ.)

カテキノピラノシアニジン A、B（cpcA、B）は、我々が赤小豆（*Vigna angularis*）の種皮から単離構造決定した色素で、カテキンとシアニジンが縮環した特異な構造を持ち [1, 2]、餡の紫色を担う。cpcA、B は、ほとんと水に溶けず、強酸性から中性域で紫色を示すことから、アントシアニンとは全く異なる性質を示す。これまで cpcA、B は、赤小豆に特異的な色素と考えてきたが、他の有色豆類を調べたところ、金時に含まれることがわかったので報告する。

北海道産の大正金時、新金時、および外国産のインゲン豆であるレッドキドニーに加え、新たに育種されたきたロッソを吸水後酢酸エチルで抽出し、HPLC で分析した。大正金時には cpcA、B に相当するピークは全く認められなかったが、それ以外の新金時、レッドキドニー、およびきたロッソには cpcA、B のピークが検出された。これらは、標品との比較および三次元スペクトルからも確認できた。これまで、小豆および同属のササゲでは、これら紫色色素が含まれることを報告したが、別属の金時からの検出は初めてである。そこで、cpcA、B の含有量を小豆と同様の方法で定量分析したところ、レッドキドニーときたロッソが新金時よりも多かった。大正金時の種皮色素はペラルゴニジン 3-グルコシドであることがすでに明らかになっており[3]、アントシアニンと cpc 類の含有量の違いが煮熟時の色落ちと関係することが強く示唆された。

Catechinopyranocyanidins A and B (cpcA and B) from the seed coat of red azuki beans (*Vigna angularis*) have unique fused structure of catechin and cyanidin [1, 2] and are responsible for the purple color of an past. CpcA and B are insoluble in water and show purple in the strongly acidic to neutral range. CpcA and B have been considered to be specific to red azuki beans, however, we have examined other colored beans and found that they are present in red kidney beans, kintoki. Taisho kintoki, shin kintoki and kitarosso from Hokkaido prefecture, and red kidney, a foreign kidney bean were extracted with ethyl acetate after water absorption and analyzed by HPLC. Peaks corresponding to cpcA and B were observed in the extracts from shin-kintoki, kitasorro and red kidney, but no peaks were detected in that from taisho-kintoki.

[1] Yoshida, K. *et al.*, *Scientific Reports*, **9**, 1484 (2019).
[2] Oyama, K. *et al.*, *Chirality*, **32**, 556-563, (2020).
[3] Yoshida, K. *et al., Biosci. Biotech. Biochem*., **60**, 589-593 (1996).

Catechinopyranocyanidin A and B, red kidney bean, seed-coat pigment

発表責任者：吉田久美（yoshidak58@aitech.ac.jp）

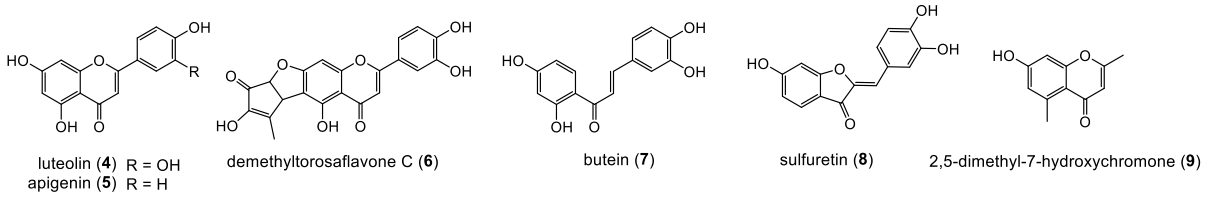
講演番号：3C2p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C2 会場

カワラケツメイ（*Cassia nomame*）の化学成分に関する研究

Study on Phytochemical constituents of *Cassia nomame*

○齊藤 哲也[1]、加藤 悦子[1]、佐藤 一[2]、細谷 孝博[1] ([1]東洋大院食環境、[2]ブルカージャパン)
○TETSUYA SAITO[1], ETSUKO KATOH[1], HAJIME SATO[2], TAKAHIRO HOSOYA[1] ([1]Toyo Univ., [2]Bruker Japan K.K.)

カワラケツメイ（*Cassia nomame*）は、マメ科カワラケツメイ属の一年草であり、乾燥した全草或いは豆果が茶として飲用される。伝統的には浮腫、腎炎、便秘、咳、眼精疲労などの効果を有する。我々はカワラケツメイの化学成分に関する研究を行っており、本発表ではこれまでに得られた化合物について報告する。本植物の地上部全草をミキサーで粉砕したのち、各種有機溶媒で抽出した分画物につき、カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ODS、Sephadex LH-20）による分離・精製を行った。その結果、14 の化合物を得た。得られた各化合物について、核磁気共鳴（NMR）及び質量分析（MS）などのスペクトル解析をした結果、それぞれアントラキノン誘導体（**1~3**）、フラボン誘導体（**4~6**）、カルコン誘導体（**7**）、オーロン誘導体（**8**）、クロモン誘導体（**9**）、フェノール性化合物（**10~12**）およびステロール誘導体（**13**, **14**）と決定した。このうち、化合物 **5**、**8**、**9**、**10**、**11** 及び **12** は、カワラケツメイより初めての単離報告である。



図．カワラケツメイ（*C. nomame*）より単離した化合物（**4~9**）

Cassia nomame, an annual herb in the Leguminosae family, has been traditionally consumed as a tea in the form of dried whole herb or beans. It has been historically applied for the treatment of edema, nephritis, constipation, cough, and eye strain. In the pursuit of advancing out understanding of the chemical constituents of *C. nomame,* our research group presents the findings of the compounds isolated from *C. nomame* in this presentation. The aerial components of *C. nomame* underwent grinding using a mixer, followed by extraction of the fractions with various organic solvents. These fractions were subsequently separated and purified by column chromatography. Our efforts resulted in the isolation of fourteen compounds, categorized as anthraquinone derivatives (**1~3**), flavone derivatives (**4~6**), a chalcone derivative (**7**), an aurone derivative (**8**), a chromone derivative (**9**), phenolic compounds (**10~12**), and sterol derivatives (**13**, **14**). Each compound's structure was elucidated through spectroscopic analyses such as NMR and MS. Compounds **5**, **8**, **9**, **10**, **11**, and **12** were successfully isolated for the first time from *C. nomame*.

Cassia nomame, flavonoid

講演番号：3C2p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C2 会場

耐熱性放線菌 AY2 が生産する熱ショック代謝物（HSM）の生産制御機構の解析

Analysis of production mechanism of heat shock metabolites (HSMs) in *Streptomyces* sp. AY2

○森 柳[1]、齋藤 駿[1]、勝山 陽平[2,3]、大西 康夫[2,3]、荒井 緑[1]（[1]慶應義塾大院理工、[2]東大院農生科、[3]東大 CRIIM）
○Yanagi Mori[1], Shun Saito[1], Yohei Katsuyama[2,3], Yasuo Ohnishi[2,3], Midori Arai[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Keio Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci, [3]CRIIM, UTokyo)

我々は、放線菌の高温培養時に特異的に生産する代謝物を発見し、「熱ショック代謝物 Heat Shock Metabolite（HSM）」と命名した[1]。これまで、*Streptomyces* sp. AY2 が生産する HSM として微生物ホルモン SCB1 やトリプトファン誘導体 3-(hydroxyacetyl)indole を同定している。他の放線菌において発見した一部 HSM の類縁体の生産が、微生物ホルモンにより制御されていることが報告されていることから、微生物ホルモンが HSM 生産のトリガー分子である可能性がある。そこで本研究では、*Streptomyces* sp. AY2 が生産する HSM の生産制御機構を解明することを目的とした。

まず、SCB1 の生産機構を明らかにするため、SCB1 生産関連因子[2]の転写量を測定したところ、高温培養時において SCB1 生合成遺伝子 *scbA* の転写上昇が見られた。一方、SCB1 のレセプターをコードする *scbR* の転写には温度による差異が見られなかった。現在、高温環境下における *scbA* の転写活性化機構の解明に取り組んでいる。一方、SCB1 生合成遺伝子・*scbA* 破壊株の代謝物を解析したところ、3-(hydroxyacetyl)indole の生産は消失しなかった。このことは、本 HSM の生産が SCB1 を介さない機構によって活性化されている可能性を示唆している。そこで現在は、本 HSM の生産制御機構の解析にも取り組んでいる。

We have discovered metabolites specifically produced by culturing actinomycetes at a high temperature, and named them “Heat Shock Metabolites (HSMs)”[1]. We have previously identified the bacterial hormone SCB1 and 3-(hydroxyacetyl)indole as HSMs produced by *Streptomyces* sp. AY2. The transcription levels of SCB1-production related genes[2] were measured, and its biosynthetic gene, *scbA*, was found to be upregulated at a high temperature. However, there was no difference in the transcription of *scbR*, which encodes the SCB1 receptor, between cultures grown at 30℃ and 45℃. We are currently analyzing how *scbA* is transcriptionally activated in high-temperature environments. We also analyzed the metabolites of the *scbA*-disrupted strain, and found that the production of 3-(hydroxyacetyl)indole did not disappear. This suggested that the production of this HSM is activated by an SCB1-independent mechanism.

[1] S. Saito *et al. J. Antibiot.* 73:203-210 (2020). [2] E. Takano *et al. Mol. Microbiol.* 41:1015-1028 (2001)

Actinomycetes, Silent gene, Heart Shock Metabolites (HSM)

講演番号：3C2p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 C2 会場

ジャスモン酸メチル処理はカイワレ茎での局所的なリグニン蓄積を誘導する
Exogenous methyl jasmonate induces lignin deposition in radish sprouts.

○野下 浩二、堀 玲司、伊藤 一志、小川 敦史（秋田県大生資科）
○Koji NOGE, Reiji HORI, Kazushi Ito, Atsushi Ogawa (Akita Pref. Univ.)

植物は，昆虫の食害に対して，トゲなど物理的障壁や防御物質の生産による化学的障壁により身を守る．食害応答に関わる植物ホルモンであるジャスモン酸のメチルエステル体（ジャスモン酸メチル，MeJA）を植物に処理すると，昆虫食害特異的な揮発成分の生産誘導など，昆虫食害に応答した植物の誘導性防御反応を観察することができる．我々は，カイワレダイコンを MeJA で 24 時間処理すると，茎の物理的な強度が増すことを見出し，その化学的要因を検討した．まず，MeJA 処理したカイワレダイコンと無処理のカイワレダイコンに含まれる食物繊維を比較したところ，MeJA 処理により不溶性の食物繊維が増加していた．次に，不溶性食物繊維のひとつであるリグニンに着目し，茎全体に含まれるリグニン量を比較したが，MeJA 処理による顕著な変化は認められなかった．そこで，茎を上部，中部，下部に三等分し，それぞれのリグニン量を測定したところ，MeJA 処理により上部でのみリグニン量が有意に増加していた．茎内部のリグニンを特異的に染色し観察した結果も，茎上部でのリグニン蓄積を支持した．もともとカイワレダイコン茎上部のリグニン量は，中部や下部に比べ少ない．MeJA 処理により，リグニン量が少ない茎上部に新たにリグニンが蓄積することで，茎全体の物理的強度が増したと考えられる．

Plants defend themselves by mechanical and chemical barriers against insect herbivory. We can observe herbivore-induced plant responses by treating plants with methyl jasmonate (MeJA). When radish sprouts were treated with MeJA for 24 h, their tensile strength increased compared to non-treated sprouts. We attempt to understand the mechanism by analyzing chemical changes in the MeJA-treated sprouts. First, insoluble dietary fiber increased when the sprouts were treated with MeJA. Lignin contents in the whole shoots did not significantly change after MeJA treatment, but when the shoots were separated into three parts, we found that lignin contents increased only in upper parts after MeJA treatment. The results were supported by the section observation of non-treated and MeJA-treated sprouts. Originally, lignin contents in upper parts of radish shoots were lower than those in the middle and lower parts. Increased tensile strength of radish sprouts induced by MeJA treatement could be explained by reinforcement of cell wall through lignin deposition in their upper parts.

Kaiware radish, mechanical defense, inducible plant defense

発表責任者：野下 浩二（noge@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3C2p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 C2 会場

従属栄養細菌の超低栄養環境での増殖を引き起こす AdhX の基質の検討

Substrates of AdhX that causes the high-yield growth under oligotrophic conditions in heterotrophic bacteria

○伊藤 蓮、Stari Leonardo、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Ren ITO, Leonardo Stari, Kouhei Kishida, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (The Univ. of Tohoku)

我々は、従属栄養細菌である有機塩素系殺虫剤分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株が alcohol dehydrogenase（ADH）をコードする *adhX* 遺伝子の高発現により有機炭素源非添加無機塩培地で CO_2 の固定を伴い活発に増殖する現象（HYGO 表現型）を見出した（Microbiology 166: 531-545, 2020)。前回大会で AdhX は様々な基質に対して ADH 活性を示すことを報告した（2023 年度農芸化学会大会)。今回は、AdhX の基質についてより詳細な解析を行った。大腸菌で発現・精製した AdhX について、これまでは基質と混ぜた際に NAD^+が還元されて生じる NADH による吸光度の上昇のみを指標に ADH 活性を定量していたが、さらに薄層クロマトグラフィー（TLC）と GC-MS により、反応産物の同定を試みた。その結果、TLC により NADH の産生が検出され、改めて AdhX は、低分子のアルコール類（エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール）だけでなく、TCA 回路の化合物（リンゴ酸、クエン酸)、糖類（D-グルコース、D-リボース)、ヌクレオチド（AMP、ATP）などに対しても ADH 活性を示すことが支持された。さらに、アルコールが変換されて生じるアルデヒド産物の同定を進めている。以上、AdhX は低栄養環境下で様々な基質から還元力を生産するだけでなく、基礎代謝系の活性強化やシグナル物質の代謝などにも寄与している可能性が示された。

A heterotrophic organochlorine pesticide degrading bacterium *Sphingobium japonicum* strain UT26 grows well with CO_2 fixation in inorganic salt medium without the addition of any organic carbon source (HYGO phenotype) by high expression of the *adhX* gene encoding alcohol dehydrogenase (ADH) (Microbiology 166: 531-545, 2020). The previous study demonstrated that AdhX shows ADH activity toward various substrates (2023 JSBBA Annual Meeting). In this study, reaction products were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and GC-MS. TLC analysis revealed that NADH was generated toward low molecular weight alcohols (ethanol, methanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol), compounds of the tricarboxylic acid (TCA) cycle (malic acid, citric acid), sugars (D-glucose, D-ribose), and nucleotides (AMP, ATP), supporting that AdhX shows ADH activity toward various substrates. Identifying aldehyde products of the above substrates is in progress using TLC and GC-MS. These results suggest that AdhX produces reducing power from various substrates under oligotrophic conditions, enhances primary metabolism, and is involved in the metabolism of signaling molecules.

oligotroph, alcohol dehydrogenase, sphingomonads

講演番号：3C2p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 C2 会場

LC/MS/MS 分析および主成分分析による虫糞茶と市販茶の比較

Comparison of Insect Frass Tea and Commercial Tea with LC/MS/MS analysis and PCA

○丸岡 毅[1]、伊藤 友紀[2,3]、渡邉 淳[2,3]、飯田 順子[2,3]、吉永 直子[1]、森 直樹[1]([1]京大院農、[2]島津製作所、[3]大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所)
○Tsuyoshi Maruoka[1], Yuki Ito[2,3], Jun Watanabe[2,3], Junko Iida[2,3], Naoko Yoshinaga[1], Naoki Mori[1] ([1]The Univ. of Kyoto, [2]SHIMADZU CORPORATION, [3]Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)



虫糞茶：葉を摂食した幼虫の糞を煎じたもの

植物葉を摂食したチョウ目幼虫の糞に熱湯を注ぐとしばしば発酵茶のような味わいを呈し（＝虫糞茶），掛け合わせる植物種と昆虫種が異なれば虫糞茶の香り・味も異なるものになる．また虫糞茶には，乾燥葉からは抽出されない独特の味わい（フルーティーな香りや発酵感）があることは嗅覚・味覚レベルで確認されている．

紅茶など発酵茶の一般的な製茶工程では，葉の組織を破壊する揉捻に続いて適切な温度・湿度の下で発酵を進める．この工程で葉のポリフェノールオキシダーゼ（PPO）によりカテキンが重合し，紅茶特有の芳醇感が生まれるとされている．一方で虫糞茶においても同様の反応が進行すると考えている．つまり，昆虫の咀嚼が揉捻に相当し，続いて昆虫の腸管内で葉由来 PPO や昆虫由来消化酵素の作用で葉の発酵が進行すると考えている．

今回，虫糞茶および市販茶（緑茶，烏龍茶，紅茶）について，両者の成分を比較する目的で LC/MS/MS 分析および主成分分析を行い，一次代謝産物と二次代謝産物の計 141 成分について調べた．さらに，サクラの葉を摂食した 9 種の昆虫（チョウ目 7 種，ナナフシ目 2 種）の虫糞茶とサクラ葉の紅茶について，同様の分析を行った．本講演では，主成分分析の結果と解釈について発表する．

The frass of Lepidoptera larvae, when steeped in hot water, often produce a fermented tea-like flavor (= insect frass tea). This tea's aroma and taste vary based on the combination of plant and insect species. It possesses a distinct taste not extracted from just dried leaves.

Similar to the fermentation process in black tea production, insect frass tea undergoes reactions driven by Polyphenol Oxidase (PPO) during insect chewing and gut processes.

In this study, LC/MS/MS analysis and principal component analysis of both insect frass tea and commercial teas (green, oolong, black) examined 141 components (including primary and secondary metabolites), with a parallel study on frass tea from nine insects consuming Sakura leave.

The presentation will discuss the principal component analysis results and interpretations.

insect frass tea, LC/MS/MS analysis, multiomics analysis

発表責任者：森 直樹（mori.naoki.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C3a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 C3 会場

共培養による新規ラン藻増殖促進細菌の発見とその増殖促進メカニズムの調査

Discovery of a novel cyanobacteria growth-promoting bacterium by co-culture and investigation of its growth-promoting mechanism

○TAN Pei-Yu[1]、石田 奨[3]、加藤 勇太[2]、邱 泰瑛[3]、小西 正朗[3]([1]北見工大院・工、[2]環境大善株式会社、[3]北見工大・工)
○ Pei-Yu TAN[1], Masashi ISHIDA[3], Yuta KATO[2], Tai-Ying CHIOU[3], Masaaki KONISHI[3] ([1]Graduate School of Engineering, Kitami Institute of Technology, [2]Kankyo Daizen Company, Ltd, [3]Kitami Institute of Technology)

光合成細菌であるラン藻は、炭素固定やバイオ燃料生産が可能で、バイオエコノミーや循環型経済への貢献が期待されている。しかし、ラン藻は従属栄養生物より増殖が遅いため、生産コストが高いことが課題である。ラン藻の増殖を促進する微生物が報告されており、これらの微生物と共培養することでラン藻のバイオマスの収量と代謝産物の生産が改善されることが期待できる。そこで、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の共培養により液体肥料から新規ラン藻増殖促進細菌をスクリーニングした結果、ラン藻 PCC7942 に対し、8.0 倍増殖促進効果のある細菌 *Rhodococcus cerastii* AF2108 を見出した。また、生理学的に共生機構を考察するため、精密ろ過膜で 2 槽に分割した別府フラスコを用いて、PCC7942 と AF2108 の非接触的共培養と通常の共培養を実施したところ、通常の共培養より 1.4 倍高い増殖促進効果を示した。この結果は、共培養および別府フラスコ培養において、AF2108 は代謝物を介して PCC7942 の増殖促進したことが示唆された。そして、細胞間の接触は PCC7942 の増殖に阻害していることが分かった。

Cyanobacteria are capable of using carbon fixation and biofuel production, have a potential for applications in bioeconomy and circular economy. However, due to their low proliferation and high production costs, it is important to improve cyanobacteria growth to develop further applications. To improve the yield of cyanobacteria biomass, co-cultivation with the cyanobacteria growth promorting bacteria (CGPB) has been described. In this study, further excellent CGPB for *Synechococcus elongatus* PCC7942, was found as *Rhodococcus cerastii* AF2108 in liquid fertilizer made from cattle urine. The isolate was promoted the cyanobacteria growth in coculture by 8.0-folds greater than that of the monoculture. To discuss the mechanism of physiological symbiosis between *R. cerastii* and *S. elongates*, the effects of the direct cell-cell contact between the two species were evaluated using two chamber flask with microfilter less than 0.2 μm, named Beppu flask. The cyanobacteria growth based on the chlorophyll contents under the separated condition was 1.4-folds larger than that under the mixed condition. The results suggested that metabolites from AF2108 promote proliferation of PCC7942 in co-culture and Beppu flask culture. It was also found that cell-cell contact inhibits the proliferation of PCC7942.

Cyanobacteria, Cyanobacterium growth-promoting bacterium (CGPB), Co-culture

講演番号：3C3a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 C3 会場

バイオマス・光・抑草の関係解析
Biomass, light, and weed suppression relationship analysis
○玉田 佑貴、久保 幹（立命館大学院生命科学研究科）
○YUKI TAMADA, MOTOKI KUBO (The Univ. of Ritsumeikan)

＜背景・目的＞本研究では、バイオマスである樹皮の遮光による抑草効果を明らかにすることを目的とした。
＜内容＞本研究では、スギの樹皮を実験資材、シロクローバーを実験植物として使用した。まず、樹皮の大きさにおける抑草効果を検証するため、シロクローバーに 2.5 cm×1.5 cm , 5.0 cm×1.5 cm , 10.0 cm×1.5 cm の 3 条件となるよう樹皮を被覆し、1 週間後の相対生育率を比較した。結果として、樹皮の大きさが 5.0 cm×1.5 cm の場合に最も強い抑草効果が確認され、相対生育率は 28%となった。次に、樹皮の量における抑草効果を検証するため、樹皮なし、1.5 kg/m^2 , 3.0 kg/m^2, 4.5 kg/m^2 の 3 条件となるよう樹皮をシロクローバーに被覆し、1 週間後の相対生育率を比較した。結果として。樹皮の被覆量が 3.0 kg/m^2 の場合に最も強い抑草効果が得られ、相対生育率は 38%となった。これらの実験結果から、抑草に樹皮 5.0 cm×1.5 cm の樹皮を 3.0 kg/m^2 被覆することで、樹皮に対して効果的であると結論付けた。

The objective of this study was to clarify utilization of bark biomass as groundcover on weed suppression In this study, cedar bark was used as groundcover material for cultivating clover as a week. Soil was covered by bark at different sizes, namely, 2.5×1.5 cm, 5.0×1.5 cm, and 10.0×1.5 cm for 1 week. the relative growth rate of week was analyzed after one week. The results showed that the highest weed suppression effect was observed in the treatment of bark size of 5.0×1.5 cm, with a relative growth rate of 28%. Also, 5×1.5 cm bark was applied in soil at three rates (1.5 kg/m^2, 3.0 kg/m^2, and 4.5 kg/m^2) for one week, and then relative growth rate was measured. As a result, The3.0 kg/m^2 treatment showed highest weed suppression with 38%. In conclusion, 3.0 kg/m^2 of bark with size of 5.0×1.5 cm as groundcover was suitable for weed suppression in soil

bark, weed suppression, shading

講演番号：3C3a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 C3 会場

孟宗竹から抽出した成分の抗炎症作用について

Anti-inflammatory action of ingredients extracted from moso bamboo

○田嶋 奈々子、刀祢 重信、平本 茂、椎葉 究（東京電機大院理工学研究科）
○Nanako TAJIMA, Shigenobu Tone, Shigeru Hiramoto, Kiwamu Shiiba (Tokyo Denki University)

孟宗竹チップを蒸気圧と胞壁崩壊酵素により処理後固液分離して回収した液体は、竹リグノヘミセルロースの加水分解物（BHH：Bamboo Hemicellulose Hydrolysate）が主成分であり、これらの生理活性として、抗酸化作用(*in vitro*、*in vivo*)、コレステロールの低下作用、免疫賦活化活性、プレバイオティクス効果について報告してきた。今回、ヒト単球性白血病細胞株(THP-1)を用い、抗炎症試験を実施した。

エタノール沈殿法から得られた BHH 上清区分(BH-SUP)を THP-1 細胞および 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(DNCB)と共に 20 時間培養後 、CD86 抗体、IgG1 抗体と反応させフローサイトメトリーの平均蛍光値から相対値を求めた。DNCB のみ添加時の蛍光値 100 とした時、濃度依存的に BH-SUP 添加時の蛍光相対値は低下したため、BH-SUP に抗炎症性活性があることが示唆された。さらに、BH-SUP 区分をゲル濾過、陰イオン交換（DEAE sepharose）法で分画したとき、同活性の強い画分が得られた。

Bamboo hemicellulose hydrolysate (BHH) was extracted from bamboo by high temperature and enzymatic treatment. BHH exhibited not only strong anti-oxidative activities, but also shown to have bioactivities such as cholesterol lowering, immunostimulatory activity, and prebiotic effect.

In this study, in order to assay anti-inflammatory effect of BHH supernatant (BH-SUP) obtained by ethanol precipitation from BHH, a human monocytic leukemia cell line (THP-1) with/without BH-SUP was incubated with 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) for 20 hours, then reacted with CD86 and IgG1 antibodies. Then, the relative values were determined from the mean fluorescence values by flow cytometry (FACS). The relative value of the fluorescence of BH-SUP+DNCB decreased more than DNCB alone was added, and the relative value was dependent on the concentration of BH-SUP. Furthermore, when the BH-SUP was fractionated by gel filtration and anion exchange (DEAE) columns, a fraction with stronger anti-inflammatory activities was obtained.

Bamboo Biomass, Anti-inflammatory, Antioxidant

発表責任者：田嶋奈々子（22rmb11@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：3C3a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 C3 会場

ヨシ分解能を持つ複合系微生物の探索
Screening of reed-degrading complex microorganisms
○三枝 和樹、高品 知典（東洋院生命科学）
○Kazuki Saegusa, Tomonori Takasina (The Univ. of Toyo)

現在、非食用バイオマスを原料とする第二世代バイオエタノールがカーボンニュートラル燃料であり、原料が食糧と競合しないという点で注目されている。研究材料として用いたイネ科植物の「ヨシ」は、世界に広く分布する未利用で非食用のリグノセルロース系バイオマスである。本研究では、「ヨシ」からのバイオエタノール生産を目指し、ヨシの分解能を持つ複合系微生物の探索を目的とした。

クビアカツヤカミキリに寄生された街路樹から、その幼虫が派出するフラス（ふんや木くずが混ざって固まったもの）を採取し、乾燥破砕したヨシを含有した液体培地で集積培養を行った。その培養液を、ヨシを含有した寒天培地へ滴下し、ヨシが分解されることによってできるクリアゾーン有無からスクリーニングし、ヨシ分解能をもつ微生物菌叢を得た。そこで得られた菌叢の継代を複数回行い、特に活性が高く、活性が維持されているものを選択した。その後、アンプリコンシーケンス解析を行い、菌叢内にどのような菌が含まれるかを調べた。その結果、*Burkholderiales* 目、*Rhodospirillales* 目、*Clostridiales* 目の順に全体に占める割合が高かった。菌叢内の菌のうち、ヨシ分解能に関わる菌を特定するために、ヨシ分解能が確認された菌叢から菌の単離、およびシーケンス解析を試みている。

Currently, second-generation bioethanol made from inedible biomass is attracting attention because it is a carbon-neutral fuel and its feedstock does not compete with food production. The grass "reed", used as a research material in this study, is an unused, inedible lignocellulosic biomass that is widely distributed in the world. The objective of this study is to search for a complex system of microorganisms that have the ability to degrade reeds, with the aim of producing bioethanol from "reeds".

The frass (a solidified mixture of feces and woody debris) from roadside trees parasitized by larvae of red-necked longhorn (*Aromia bungii*) was collected and cultured in a liquid medium containing dried and crushed reeds. The culture medium was dropped onto agar medium containing reeds, and a microbial flora capable of degrading reeds was screened by the presence of clear zones created by the decomposition of the reeds. The resulting flora was then subjected to multiple passages, and those remaining high degrading activities were selected. Amplicon sequencing analysis was performed on them to determine which bacteria were included in the flora. The results showed that the order *Burkholderiales*, *Rhodospirillales*, and *Clostridiales*, were dominant. In order to identify the bacteria within the flora, we are attempting to isolate the reed-degrading bacteria from the flora.

reed-degrading, complex microorganisms, bioethanol

講演番号：3C3a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 C3 会場

セルロース分解酵素の回収再利用方法の開発

Development of a method for recovering and reusing cellulolytic enzymes

○中井 葉子[1]、山﨑 清夏[1]、水野 正浩[2]、中島 嘉樹[1]、田中 英樹[1]、田川 聡美[2]、鮫島 正浩[2]、天野 良彦[2] ([1]セイコーエプソン、[2]信州大工)
○Yoko Nakai[1], Sayaka Yamasaki[1], Masahiro Mizuno[2], Yoshiki Nakashima[1], Hideki Tanaka[1], Satomi Tagawa[2], Masahiro Samejima[2], Yoshihiko Amano[2] ([1]Seiko epson Corp., [2]Shinshu Univ.)

ポリ乳酸などのバイオプラスチックの原料として、非可食バイオマスに含まれるセルロースが注目されている。セルロースをグルコースに変換するためには酵素糖化法が用いられるが、酵素コストが製造工程における最も大きなコスト要因となっている。本研究では、酵素コストを削減するために、酵素を効率的に回収・再利用する方法を検討した。

ノボザイムズ社の酵素 Cellic CTec シリーズを用いて、広葉樹パルプを糖化した。酵素の分離には MF 膜と NF 膜を用いた。酵素を繰り返し使用したところ、50℃に長時間さらされると酵素活性の低下が認められた。さらに、基質に対する酵素濃度が低い状態で糖化を行うと、酵素が基質に吸着し、酵素回収率が低下した。これらの結果から、以下のような糖化条件が酵素の失活を抑制し、回収効率を高めることがわかった。(1)酵素タンパク質濃度はセルロース成分に対して 0.9%以上、2)反応温度は 45℃、(3)糖化開始から 6 時間攪拌し、24 時間で糖化を終了する。回収酵素で糖化を繰り返した場合、回収酵素に未使用酵素を 30%以上添加することで糖化性能を維持できることが確認された。

Cellulose contained in inedible biomass is attracting attention as a raw material for bioplastics such as polylactic acid. Enzymatic saccharification is used to convert cellulose to glucose, but the enzyme cost is the most significant cost factor in the production process. In this study, we investigated an efficient method of recovering and reusing enzymes to reduce enzyme cost.

Hardwood pulp was saccharified using the Cellic CTec series from Novozymes. A membrane separation method using MF and NF membranes was used to separate and recover the enzymes. When the enzymes were used repeatedly, inactivation of the enzymes was observed after prolonged exposure to 50°C. Furthermore, when saccharification was performed at low enzyme concentrations relative to the substrate, the enzyme adsorbed on the substrate, resulting in lower enzyme recovery. These results indicate that the following saccharification conditions prevent enzyme inactivation and increase recovery efficiency. (1) Enzyme concentration is 0.9% or more of the cellulose, (2) reaction temperature is 45°C, and (3) saccharification is agitated for 6 hours from the start of saccharification and completed in 24 hours. When saccharification was repeated with recovered enzyme, it was confirmed that saccharification performance could be maintained by adding 30% virgin enzyme to the recovered enzyme.

Saccharification, Cellulase, Enzyme recovery process

講演番号：3C3a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 C3 会場

キトサンとカルボキシメチルセルロースからなるポリイオンコンプレックスゲルの合成と医用材料としての応用

Synthesis of poly-ion complex gels composed of chitosan and carboxymethyl cellulose and their application as medical materials.

○谷口 さくら[1]、新田 祥子[2]、岩本 博行[1,2] ([1]福山大生命工、[2]福山大 GSC)
○Sakura TANIGUCHI[1], Sachiko NITTA[2], Hiroyuki IWAMOTO[1,2] ([1]Fukuyama Univ., [2]Fukuyama Univ. GSC)

【目的】近年、環境負荷が低く、かつ安全で簡便な素材づくりが一層求められている。そこで私達は、廃棄系バイオマスのキトサン(CS)とカルボキシメチルセルロース(cmc)から触媒や有機溶剤を用いずにヒドロゲル(CS-cmc hydrogel)の合成を試みた。また、CS-cmc hydrogel の医用、環境分野での応用を目指し、たんぱく吸着能や、生体適合性について検討した。
【方法】cmc/NaCl 溶液に CS/酢酸溶液を滴下し、攪拌後一定時間静置することにより、CS-cmc hydrogel を作製した。このとき、CS/cmc 比や静置温度がヒドロゲルの物性（膨潤性、力学応力など）に与える影響を評価した。次に Bovine saline albumin（BSA）溶液中にヒドロゲルを浸し、外液の BSA 濃度を経時的に測定した。さらにヒドロゲルに対し骨芽細胞様細胞(MC-3T3)を播種し、培養後の細胞生存性を評価した。
【結果】アミノ基に由来する正電荷を持つ CS とカルボキシル基に由来する負電荷を持つ cmc 間の静電相互作用による高分子鎖の絡まりあい（ポリイオンコンプレックス）により、CS-cmc hydrogel を得た。ゲル形成の成否は、一次粒子の大きさや表面電位に依存することがわかった。また、CS/cmc 比や静置温度がゲル化率や膨潤率、ヤング率などに影響を与えた。CS-cmc hydrogel は pH に依存的なタンパク質吸着性を示すことがわかった。また、ゲル表面における細胞の接着性及び増殖性を確認した。これらの結果から、CS/cmc hydrogel のタンパク質吸着材や細胞足場としての利用が期待される。

In recent years, there has been a growing need for materials to be fabricated with biocompatible and highly safety processes. In this study, hydrogels were prepared from chitosan (CS) and carboxymethyl cellulose (cmc) by a catalyst- and solvent-free method.
Particles were first formed through electrostatic interactions (polyion complex) between positively charged CS and negatively charged cmc. Hydrogels were then obtained by the formation of flocculence between these particles.(CS-cmc hydrogel) The physical properties and gel fractions differed depending on the conditions in the gel preparation.
Protein adsorption to the hydrogel depended on the pH of the protein solution. It was also confirmed that osteoblasts on the hydrogel remained viable after 6 days of culture. These results indicate that CS-cmc hydrogel may be used in a biomedical application.

Hydrogel, Chitosan, Carboxymethyl cellulose

講演番号：3C3a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 C3 会場

ビール酵母細胞壁成分によるイネの根張り向上と鉄プラーク形成に起因する無機栄養素吸収の変化
Enhancement of rice rooting by beer yeast cell wall components and alteration of inorganic nutrient absorption due to iron plaque formation in rice plants
○小田 蓮乃[1]、落合 久美子[1]、小林 優[1]、山内 一生[2]、北川 隆徳[3]、森 直樹[1]([1]京大院農、[2]CALPIS AMERICA, Inc.、[3]アサヒバイオサイクル（株））
○ Renno ODA[1], Kumiko OCHIAI[1], Masaru KOBAYASHI[1], Kazuo YAMAUCHI[2], Takanori KITAGAWA[3], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]CALPIS AMERICA, Inc., [3]ASAHI BIOCYCLE CO., LTD.)

持続可能な社会の観点から，環境負荷の小さい農業資材の開発が注目されている．我々は，ビール酵母細胞壁成分：β-1,3/1,6-glucan を含む農業資材である CW1 がもたらすイネの根張り向上機構解明に取り組んできた．CW1 処理したイネは根張り向上に加え，地上部の鉄含有率低下および根の鉄含有率増加が生じる．そこで我々は根における鉄含有率の増加に着目し，「根の鉄含有率増加は，根表面の鉄プラーク量増加に起因し，根内部の鉄含有率は地上部と同様に減少している」と推察し，鉄プラークの量を測定した．その結果，CW1 処理区は対照区よりも鉄プラーク量が増加し，根内部の鉄含有率は地上部と同様に低下すると明らかにした．鉄プラークの形成促進に伴い，他の無機栄養素吸収の変化が予想されるため，次に「CW1 処理中に生じる栄養素吸収の変化が根張り向上に関与する」と仮説を立て，CW1 処理後のイネの養分元素含有率（N, P, K, Ca, Cu, Mg, Mn, Zn)を定量した．すると，CW1 処理により，鉄以外の金属元素含有率が概ね増加する一方で，窒素の含有率が減少すると判明した．軽度の窒素不足により根が発達すると知られることから，CW1 処理による根張りの向上は鉄プラーク形成に伴う窒素含有率の低下が一因であると示唆された．

From the viewpoint of a sustainable society, agricultural materials with a low environmental impact has been attracting attention. In our laboratory, we have been working to elucidate the mechanism by which CW1, an agricultural material containing β-1,3/1,6-glucan (a component of brewer's yeast cell wall), promotes rooting in rice plants. In addition to an increase in rooting, we have found that a decrease of iron in shoot and an accumulation of iron in root. We focused on the accumulation of iron in root, and inferred that “That was due to an increase of iron on the root surface: iron plaques, while the iron content within root decreased as in shoot.” The results showed that the CW1 treatment increased the amount of iron plaque and decreased the iron content in the inner root as well as in the shoot. Since changes in the absorption of other inorganic nutrients can be expected to accompany the accelerated formation of iron plaques, we next hypothesized that changes in nutrients would be responsible for the increased rooting. We found that CW1 treatment generally increased the amount of metal elements other than iron, while nitrogen content decreased. As it is well known that a mild nitrogen deficiency causes root development, it was suggested that the improvement in rooting by CW1 treatment was due in part to the decrease in nitrogen content resulting from iron plaque formation.

biostimulant, β-glucan, plant growth promotion

発表責任者：小田蓮乃（oda.renno.62z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C3a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 C3 会場

油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂質蓄積量と細胞周期の関係
Relationship between lipid production and cell cycle in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*
○高山 優子[1]、森本 温貴[1]、齋藤 成昭[2] ([1]帝京大学、[2]久留米大学)
○Yuko TAKAYAMA[1], Yasutaka MORIMOTO[1], Shigeaki Saitoh[2] ([1]Teikyo Univ., [2]Kurume Univ.)

油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* は細胞内に７０％もの油脂を蓄積し、食糧と競合しないバイオ燃料生産微生物として注目されているが、細胞生物学的なアプローチの研究はまだ少ない。そこでわれわれは、*L. starkeyi* が油脂蓄積に至る形態変化について顕微鏡観察から始めた。*L. starkeyi* は細胞増殖を停止した後に油脂を蓄積することがわかった。油脂蓄積した細胞は、芽を持たず細胞質のほとんどを油滴が占めてる状態であった。このときの細胞内 DNA 含有量を調べると、G1 期に細胞周期を停止していることがわかった。次に、G1 期以外で細胞周期を停止させても油脂蓄積できるかどうか調べたところ、S 期停止細胞では油脂蓄積が見られず、G2/M 期停止細胞では蓄積できることが分った。さらに、ラパマイシンによって G1 期で細胞周期を停止させたところ、より多くの油脂蓄積が観察できた。この結果は、*L. starkeyi* を G1 期で細胞周期を停止させることで、効率良く油脂蓄積できることを示している。これは、他の生物種によるバイオ燃料生産システムにおいても、細胞周期コントロールという新たな手法を利用できる可能性がある。

The oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is a powerful lipid producer with grate industrial potential as it is a useful host for efficient lipid production. Despite this industrial significance, limited information has been reported on biological processes in *L. starkeyi*, especially the cell cycle. *L. starkeyi* cells fill with a large lipid droplet almost completely lacked bud formation. In the cells, cell proliferation arrested in G1 phase. To confirm whether cell cycle arrest at a specific phase is required for lipid accumulation, cell cycle were synchronized. Lipid accumulation was repressed in S phase cells and was increased in G2/M phase cells. Furthermore, the enrichment of G1 phase cells induced massive lipid accumulation. These results indicated that *L. starkeyi* cells store lipids from G2/M phase and then arrest cell proliferation in the subsequent G1 phase, where lipid accumulation is enhanced. Cell cycle control is an attractive approach for biofuel production in other microorganisms.

oleaginous yeast, cell cycle, Lipid

発表責任者：高山優子（takayama@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：3C3a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 C3 会場

マルチストレス耐性酵母 *Pichia kudriavzevii* における耐酸・耐塩性遺伝子の高発現および破壊
Overexpression and disruption of acid and salt tolerance-related gene in a multistress-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii*

○森口 大輔、大西 寛登、重本 歩睦、松鹿 昭則（近大院・システム工）
○ Daisuke MORIGUCHI, Hiroto ONISHI, Ayumu SHIGEMOTO, Akinori MATSUSHIKA (KINDAI UNIVERSITY)

【目的】バイオマスからエタノールや乳酸等の有用物質を生産する工程は，酵母にとって非常に過酷な環境である．我々は以前，酸や高濃度塩，高温など様々な環境ストレスに対して優れた耐性を示す酵母 *Pichia kudriavzevii* から，耐酸・耐塩性に寄与する *PkGAS1* 遺伝子を単離・同定することに成功している．しかしながら，*PkGAS1* が関与するストレスへの適応応答や耐性を付与する機構は未解明な部分が多く，耐性レベルや適応範囲など，まだ知見が少ないのが現状である．そこで本研究では，*PkGAS1* 高発現株と *PkGAS1* 破壊株を作製し，これらの株を用いて各種ストレス条件下での耐性評価を行ったので報告する．
【方法と結果】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に *PkGAS1* を高発現させた株を用いて，硫酸や硫酸塩以外のストレス源に対しても耐性を獲得できるかどうか検討した．そのために，各種ストレス条件下での生育をスポットアッセイや濁度法などにより評価した。その結果，*PkGAS1* 高発現株は，塩酸や乳酸に対しても優れた耐性を示すことが分かった．また，薬剤耐性マーカーカセットを用いた相同組換え法によって，*P. kudriavzevii* において *PkGAS1* を破壊した株を構築した．現在，作出した遺伝子破壊株について，酸添加による低 pH や高濃度塩などのストレス源に対して感受性を示すかどうか検討を行っている。

The process of producing bio-products from biomass is a harsh environment for yeast. We previously succeeded in isolating and identifying the *PkGAS1* gene, which contributes to acid and salt tolerance, from the multistress-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii*. However, many aspects of the stress tolerance mechanism involving *PkGAS1* remain unclear. In this study, we generated *PkGAS1* overexpressing strain and *PkGAS1* disrupted strain, and used these strains to evaluate stress tolerance.

As a result of evaluating stress tolerance using a *Saccharomyces cerevisiae* strain in which *PkGAS1* was overexpressed, this strain exhibited excellent resistance to hydrochloric acid and lactic acid. We also constructed a *P. kudriavzevii* strain in which *PkGAS1* was disrupted by homologous recombination using a drug resistance marker cassette. We are currently investigating whether this strain is sensitive to various types of stress.

Pichia kudriavzevii, Stress tolerance

発表責任者：松鹿昭則（a-matsushika@hiro.kindai.ac.jp）

講演番号：3C3a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 C3 会場

コーヒーかす抽出液を利用した酵母によるバイオスティミュラントの生産

Biostimulant production by yeast using spent coffee grounds extract

○河智 夏希[1]、弘埜 陽子[1]、菊川 寛史[1]、袴田 雅俊[2]、高木 啓詞[2]、原 清敬[1] ([1]静県大院薬食生、[2]沼津工業技術支援センター)
○Natsuki KAWACHI[1], Yoko HIRONO[1], Hiroshi KIKUKAWA[1], Masatoshi HAKAMATA[2], Hiroshi TAKAGI[2], Kiyotaka HARA[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Numazu Technical Support Center Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture)

日本国内でのコーヒー消費量は年々増加しており、それに伴いコーヒーかす排出量も増加している。コーヒーかすの一部は堆肥化して有効利用されているが、高機能化によるさらなる活用が求められている。コーヒーかす堆肥の高機能化には、植物活性化成分（バイオスティミュラント）の添加が有効だと考えられるため、植物活性作用をもつ 5-アミノレブリン酸（5-ALA）やグルタチオンの酵母での生産にコーヒーかす抽出液を利用することを考えた。本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* NMZ-0002 株を使用し、コーヒーかす抽出液が細胞増殖とグルタチオン生産を高めることが明らかとなった。また、デカフェのコーヒーかす抽出液は通常のコーヒーかす抽出液以上に *S. cerevisiae* NMZ-0002 株によるグルタチオン生産性を向上させることがわかった。さらに、コーヒーかす抽出液には、5-ALA からポルフォビリノーゲンへの代謝を抑制するレブリン酸が含まれており、酵母の 5-ALA 生産性の向上が期待できる。そこで、コーヒーかす抽出液を添加した培地で *S. cerevisiae* NMZ-0002 株を培養し、5-ALA の生産性も評価した。

The amount of spent coffee grounds generated in Japan is increasing because of the increase in the coffee consumption in Japan year by year. The spent coffee grounds are partially used as compost, however it needs more value addition. To promote the effect of spent coffee grounds compost, it is effective to add plant-activating components (biostimulants). It is expected that coffee grounds extract could be used for yeast fermentation to produce 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and glutathione which have plant-activating effects. In this study, spent coffee grounds extract was found to enhance cell growth and glutathione production using the *S. cerevisiae* NMZ-0002 strain. Spent decaffeinated coffee grounds extract was also more effective at enhancing glutathione production by the *S. cerevisiae* NMZ-0002 strain, although a normal spent coffee grounds extract would also be valuable enough for use. It is expected to improve the 5-ALA production by yeast because spent coffee grounds extract contains levulinic acid which suppresses the metabolism from 5-ALA to porphobilinogen. Therefore, we cultured *S. cerevisiae* NMZ-0002 strain in a medium supplemented with spent coffee grounds extract and also evaluated the productivity of 5-ALA.

Saccharomyces cerevisiae, 5-Aminolevulinic acid, Glutathione

発表責任者：原清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3C3a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 C3 会場

サトウキビバガスオルガノソルブリグニン由来の多様な芳香族化合物からバニリン酸を生産する微生物株の作出

An engineered bacterial strain capable of producing vanillic acid from aromatic compounds obtained via alkaline oxidation of sugarcane bagasse.

○村木 香渚美[1]、大関 さおり[1]、入山 就[2]、増井 ゆい[2]、大川 全[3]、石丸 裕也[4]、樋口 雄大[1]、吉川 琢也[5]、吉田 曉弘[6]、上村 直史[3]、政井 英司[3]、中坂 佑太[4]、増田 隆夫[4]、園木 和典[1]([1]弘前大・農生、[2]弘前大院・農生、[3]長岡技科大・物質生物、[4]北大院・工、[5]帯広畜産大・環境農学、[6]弘前大・地域戦略研)

○ Kanami MURAKI[1], Saori OZEKI[1], Shu IRIYAMA[2], Yui MASUI[2], Zen OKAWA[3], Hiroya ISHIMARU[4], Yudai HIGUCHI[1], Takuya YOSHIKAWA[5], Akihiro YOSHIDA[6], Naofumi KAMIMURA[3], Eiji MASAI[3], Yuta NAKASAKA[4], Takao MASUDA[4], Tomonori SONOKI[1] ([1]Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [3]Dep. Mater. Sci. Bioeng., Nagaoka Univ. Technol., [4]Fac. Eng., Hokkaido Univ., [5]Div. Environ. Agric. Eng., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med., [6]Inst. Regional Innovation, Hirosaki Univ.)

本報告では，リグニン由来の多様な芳香族化合物を資化する *Pseudomonas* sp. NGC7 株を利用して，耐熱性ポリマーの合成原料となるバニリン酸（VA）を生産する微生物株の作出について発表する。実験室レベルで調製したサトウキビバガス由来のオルガノソルブリグニンを，アルカリ水酸化銅酸化分解して得たリグニン分解物中には，グアイアシル核，シリンギル核，*p*-ヒドロキシフェニル核を有する化合物を含む 9 種類の芳香族モノマーが含まれていた。NGC7 株に対して，VA *O*-demethylase 遺伝子（*vanA4B4*）と vanillin reductase 遺伝子の破壊，ニトロソグアニジン処理，そして *Sphingobium liginivorans* SYK-6 株と *Pseudomonas* sp. MHK4 株由来のアセトフェノン類変換酵素遺伝子群の導入を行うことで，芳香族化合物の混合物から VA を選択的に生産できる株を作出した。ベンチスケールで調製したオルガノソルブリグニン由来の分解物にはさらに桂皮酸類が含まれるため enoyl-CoA hydratase/lyase, feruloyl-CoA synthetase, vanillin dehydrogenase 遺伝子群の発現抑制遺伝子を破壊し，桂皮酸類の分解能を向上させた VA 生産株を作出した。本研究は JST 未来社会創造事業（JPMJMI19E2），地域中核大学イノベーション創出環境強化事業の支援を受けて実施した。

In this work, the development of an engineered *Pseudomonas* sp. NGC7-based vanillate (VA)-producing strain was reported. The sugarcane bagasse-derived organosolv lignin was depolymerized via copper hydroxide-catalyzed alkaline oxidation and it contained 9 aromatic monomers including *p*-hydroxyphenyl-, guaiacyl-, and syringyl-nuclei compounds. The disruptions of the genes responsible for VA *O*-demethylation (*vanA4B4*) and vanillin reduction, a nitrosoguanidine treatment, and the introduction of acetophenone-derivatives converting enzyme genes from *Sphingobium liginivorans* SYK-6 and *Pseudomonas* sp. MHK4 conferred NGC7 strain to produce VA selectively from the lignin-derived aromatics mixture. The organosolv lignin prepared at bench scale generated cinnamate derivatives in addition to the aromatic monomers via the alkaline oxidation. The disruption of a repressor gene for the expression of enoyl-CoA hydratase/lyase, feruloyl-CoA synthetase, and vanillin dehydrogenase was successful in increasing the converting ability of the cinnamate derivatives. This work was supported by JST-MIRAI program (JPMJMI19E2) and Project for Enhancing the Environment to Create Innovation in Regional Core Universities.

Lignin, *Pseudomonas*, Vanillic acid

講演番号：3C3a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 C3 会場

発酵工学と高分子工学の融合：同時抽出発酵重合によるバイオマスプラスチックの直接生産

ntegration of fermentation engineering and polymer engineering： Direct production of biomass plastics by simultaneous extractive fermentation and polymerization

○木下 郁心、片岡 親良、麻生 祐司（京工繊院バイオベース）
○Ikumi KINOSHITA, Chikara KATAOKA, Yuji ASO (Kyoto Institute of Technology)

【目的】バイオマスプラスチックは生物資源から作られる高分子材料である。原料であるモノマーは発酵生産されるが、培養液からの精製工程が主な CO_2 排出源となっている。よって、モノマー精製工程を省略し培養液中でモノマーを直接重合ができれば環境調和型プロセスを実現できる。そこで本研究では、糸状菌 *Aspergillus terreus* が発酵生産するビニリデンモノマーであるイタコン酸を用いて培養液中で抽出発酵しシームレスに重合する「同時抽出発酵重合」を実現することを目的とした。
【方法】イタコン酸水溶液と *A. terreus* NBRC 6123 の培養液上清を用いた。抽出溶剤として *n*-オクタノール、酢酸オクチル、シリコンオイルを選択し、吸光度計と HPLC でイタコン酸抽出効率を求めた。抽出後、ラジカル開始剤を添加し窒素雰囲気下でイタコン酸を重合し、NMR で転化率を算出した。
【結果・考察】イタコン酸水溶液を用いた場合、抽出剤には酢酸オクチルが有効（抽出効率 10%）であり、抽出剤中でイタコン酸の重合（転化率 80%）を確認した。また、抽出した培養液上清でも重合は進行した。一方、培養液上清そのままでは重合は確認されなかったことから、抽出操作は重合に必須であることが示された。今後は抽出効率を上げるための条件検討を行う予定である。

Monomers of biomass plastics derived from biomass are produced by fermentation, but excess CO_2 is emitted in the purification process from the cultures. Therefore, a simultaneous process with *in situ* purification and polymerization would realize an eco-friendly process. The aim of this study was to develop "*in situ* extractive fermentation and polymerization" with itaconic acid (IA) produced by *Aspergillus terreus*. IA solution and the culture supernatant of *A. terreus* NBRC 6123 were used for the experiments. As extraction solvents, *n*-octanol, octyl acetate, and silicon oil were used, and extraction efficiency of IA was determined using spectrophotometer and HPLC. After extraction, IA was polymerized under nitrogen gas with a radical initiator, followed by calculation of conversion using NMR. When IA solution was used, octyl acetate was more effective (10% yield and 80% conversion) for extraction and polymerization. In addition, polymerization was confirmed with the culture supernatant. Because the polymerization was not observed when the culture medium was used, the extraction is essential for the polymerization. Characterization and optimization of the reaction condition will be performed to improve the extraction efficiency.

itaconic acid, polymer synthesis, Simultaneous extractive fermentation and polymerization

講演番号：3C3a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 C3 会場

顕微鏡観察法によるポリヒドロキシアルカン酸生産過程におけるエネルギー代謝動態解析
Analysis of energy metabolism in the polyhydroxyalkanoate production process by microscopic observation method

○富士 航至[1]、梶川 彩香[1]、蜂須賀 真一[2]、冨田 宏矢[2]、菊川 寛史[2]、今村 博臣[3]、松本 謙一郎[2]
([1]北大院総化、[2]北大院工、[3]京大生命)
○ Wataru FUJI[1], Ayaka KAJIKAWA[1], Shin-ichi HACHISUKA[2], Hiroya TOMITA[2], Hiroshi KIKUKAWA[2], Hiromi IMAMURA[3], Ken'ichiro MATSUMOTO[2] ([1]CSE Hokkaido Univ., [2]Eng Hokkaido Univ., [3]Kyoto Univ.)

微生物による物質生産において、細胞内の代謝フラックスは培養系全体の物質生産量や他の代謝物濃度に基づいて推定されてきた。一方で、最近、細胞内代謝物濃度は同じ培養系内でも細胞ごとに不均一であることが報告されている。本研究では、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を生産する細菌内の代謝情報を顕微鏡観察により取得することで、物質生産と代謝物濃度の関係を明らかにすることを目的とした。PHA 合成酵素、モノマー供給酵素、およびエネルギー代謝動態の指標である ATP の濃度に応じて蛍光特性が変化するバイオセンサーQUEEN[1]を発現する組換え大腸菌をグルコース含有液体培地にて培養した。PHA 生産の有無がエネルギー代謝動態に与える影響を確認するため、基質添加の有無による PHA 生産条件と非生産条件を設定し経時的にサンプリングし、蛍光観察を行った。ATP レベル評価のために QUEEN の励起波長である 405 nm および 480 nm における蛍光像を取得し、各細胞における 2 波長の蛍光強度比から ATP レベルを算出した。ATP レベル測定の結果、PHA 非生産条件では増殖に伴って ATP レベルの低下が見られた一方で、PHA 生産条件では、培養初期から ATP レベルは低いままだった。このことから PHA 生産によって ATP 生産が抑制されたことが示唆された。

In the microbial fermentation, metabolic flux is usually estimated based on the production of the target substance and the concentration of various metabolites. However, recent studies have reported that the concentrations of intracellular metabolites are heterogeneous even in the same group of cells. In this study, we aimed to obtain metabolic information in polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria through microscopic observation. Recombinant *E. coli* expressing PHA synthase, monomer-supplying enzyme, and QUEEN [1], a biosensor with fluorescence properties that change in response to ATP concentration, was cultured in a glucose-containing liquid medium. To confirm the effect of PHA production on energy metabolism dynamics, the *E. coli* was cultured in PHA production/non-production conditions and sampled over time. While the ATP level decreased with the increased growth in the PHA non-production condition, the level remained low from the beginning in the PHA production condition. The results suggest that PHA production would suppress ATP production.

[1] Yaginuma, *et al.* Sci Rep 4, 6522 (2014)

polyhydroxyalkanoate, fluorescence microscopy, biosensor

発表責任者：富士　航至（fuji.wataru.p9@elms.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C3a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 C3 会場

ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素ブロック共重合メカニズム解析

Mechanistic analysis of polyhydroxyalkanoate block copolymerization

○柳川 謙吾[1]、冨田 宏矢[2]、蜂須賀 真一[3]、菊川 寛史[3]、松本 謙一郎[3]([1]北大院総合化学、[2]阪大生工国際セ、[3]北大院工)
○ Kengo YANAGAWA[1], Hiroya TOMITA[2], Shin-ichi HACHISUKA[3], Hiroshi KIKUKAWA[3], Ken'ichiro MATSUMOTO[3] ([1]Hokkaido Univ. CSE, [2]Osaka Univ. ICBiotech, [3]Hokkaido Univ. Eng)

微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、天然ではホモポリマーまたはランダム共重合体として合成される。人工改変型の PHA 重合酵素 $PhaC_{AR}$ は、天然基質 3 ヒドロキシ酪酸(3HB)-CoA および非天然基質 2 ヒドロキシ酪酸(2HB)-CoA を共重合したとき、それぞれのホモポリマーセグメントからなるブロック共重合体を合成する特殊な機能を有する。本研究では、$PhaC_{AR}$ の in vitro 解析により、ブロック共重合のメカニズムを解明することを目的とした。単一基質条件において、$PhaC_{AR}$ の精製タンパク質は 3HB-CoA に高い活性を示したが、2HB-CoA の消費は見られなかった。一方、2HB-CoA と 3HB-CoA を混合した共重合条件では、反応開始直後に 3HB-CoA の消費が見られた後、少し遅れて 2HB-CoA が消費された。これらの結果を踏まえ、3HB-CoA を重合した後の $PhaC_{AR}$ の機能を調べた。$PhaC_{AR}$ に一定量 3HB-CoA を反応させた後、残留基質を除去した後に 2HB-CoA を加えた。その結果、3HB-CoA が存在しない条件でも 2HB-CoA が消費された。したがって、$PhaC_{AR}$ は 3HB-CoA 重合によって酵素機能に変化が生まれ、自発的なブロック共重合反応が起こることが示唆された。

Bacterial polyhydroxyalkanoates (PHA) are normally synthesized as homopolymers or random copolymers. The artificial PHA synthase $PhaC_{AR}$ spontaneously synthesizes a block copolymer from a mixture of natural substrate 3HB-CoA and non-natural substrate 2HB-CoA. In this study, we analyzed the mechanism of the sequence regulation by $PhaC_{AR}$ in vitro. First, we analyzed the sole substrate conditions towards 2HB-CoA or 3HB-CoA using purified $PhaC_{AR}$. As a result, 3HB-CoA was rapidly consumed, but no consumption of 2HB-CoA was observed. Next, we analyzed copolymerizing condition using a mixture of 2HB-CoA and 3HB-CoA. Then, 3HB-CoA was consumed from the beginning, and 2HB-CoA was subsequently consumed later than the 3HB-CoA consumption. These results prompted us to analyze the activity of $PhaC_{AR}$ after the reaction of 3HB-CoA. After full consumption of 3HB-CoA by $PhaC_{AR}$, low-molecular-weight residuals were removed by ultrafiltration and 2HB-CoA was added. As a result, the 2HB-CoA was consumed even in the absence of 3HB-CoA. It was suggested that the functional change of $PhaC_{AR}$ during the polymerization of 3HB-CoA caused the block copolymerization.

Polyhydroxyalkanoate, Enzymatic synthesis, Biopolymer

発表責任者：松本謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C3p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C3 会場

海洋環境でのポリロタキサン生分解に関与する細菌叢の解析

Characterization of microbial community involved in the biodegradation of polyrotaxane in marine environments

○儀武 菜美子[1]、安藤 翔太[2]、伊藤 耕三[2]、笠井 大輔[1]([1]長岡技科大院・物質生物、[2]東大院・新領域)
○Namiko GIBU[1], Shota ANDO[2], Kohzo ITO[2], Daisuke KASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. of Technol., [2]The Univ. of Tokyo)

プラスチックなどのポリマー材料は、その優れた物性から広範な用途で利用されている。しかし、環境中での生分解性に乏しく、特に海洋中へのマイクロプラスチックの放出が環境汚染の深刻な問題となっている。持続可能な社会を構築するためには、環境中で易分解なポリマー材料の開発と利用が望まれる。ポリロタキサン (APR)は、軸分子のポリエチレングリコール (PEG)と環状分子の α シクロデキストリン (αCD)から構成され、従来の高分子とは異なる機能を有する。また、APR は環境中での生分解性を示すが、その分解機構は解明されていなかった。本研究では、APR 生分解機構の解明を目的として、APR の生分解に関与する微生物群の解析を行った。

APR、PEG、または αCD を添加した海水試料を培養し、生物化学的酸素要求量 (BOD)測定とメタゲノム解析を行った。BOD の測定結果から、αCD＞APR＞PEG の順で分解性が高いことが示された。αCD は炭素源として効果的に利用され、特に Alteromonadaceae 科細菌によって資化されていることが示唆された。一方、PEG では BOD の顕著な増加が観察されなかったものの、Sphingomonadaceae 科細菌の優占化が認められた。同様に APR でも Sphingomonadaceae 科細菌が優占化したことから、APR の PEG 軸分子が資化されている可能性が考えられた。

Plastics are used in a wide range of applications due to their superior characteristics. However, these characteristics make them difficult to degrade in the environment, and the release of microplastics, especially in the ocean, has become a serious environmental pollution. Therefore, it is necessary to develop and use polymer materials that are highly biodegradable in the environment. APR, which is polyrotaxane is composed of the axial molecule polyethylene glycol (PEG) and the cyclic molecule α-cyclodextrin (αCD) and has functions different from those of conventional polymers. Although APRs have been observed to be biodegradable, their biodegradation mechanism have not been elucidated. Here, the microbial communities involved in the biodegradation of APR were identified to elucidate the biodegradation mechanism.

Seawater samples supplemented with APR, PEG, or αCD were cultured, and BOD measurements and metagenomic analysis were performed. αCD was found to be more degradable than APR and PEG. The results suggest that αCD is effectively utilized as a carbon source, especially by Alteromonadaceae. On the other hand, PEG did not show a significant increase in BOD, but Sphingomonadaceae were found to be dominant in PEG. Similarly, Sphingomonadaceae became dominant in APR, suggesting that the PEG molecules of APR may be catabolized in this culture.

polyrotaxane, biodegradation, metagenome

発表責任者：笠井大輔（dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3C3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C3 会場

Alcanivorax 属細菌が海洋におけるポリプロピレンの主要な分解者である可能性ーPP の明らかな生分解の初報告
Alcanivorax bacteria as important polypropylene degraders in marine environments - First report on the obvious biodegradation of PP
小池 紘輝[1]、宮本 憲二[2]、○寺本 真紀[1] ([1]高知大農林海洋、[2]慶應大理工)
Hiroki Koike[1], Kenji Miyamoto[2], ○Maki Teramoto[1] ([1]Kochi Univ., [2]Keio Univ.)

プラスチックは海で深刻な問題を引き起こしており、深海にまで到達している。ポリプロピレン（PP）は 2 番目に一般的なプラスチック製品であるため、海のプラスチックの大部分を占めていると考えられる。これまで、PP の生分解は明確に示されておらず、PP の構造が生分解されるかどうかは不明であった。本研究は、PP の明らかな生分解の初めての報告であり、また、*Alcanivorax* 属細菌が海洋における PP の主要な分解者である可能性を示す。

中深層水に PP（液体）を添加して PP 分解菌を集積したところ、*Alcanivorax* 属細菌（主に *Alcanivorax borkumensis*）が最も多く集積された。そして分離された株の中で、*Alcanivorax* 属株（恐らく *A. borkumensis*）が最も高い PP（液体）分解活性を示した。*Alcanivorax* 属細菌は、PP（液体）分解に別の炭素源を必要とし、PP を唯一の炭素源およびエネルギー源として分解しなかった。固体の PP 分解では、分解の兆候である、PP の酸化が検出されたが、1%以上の重量減少は検出されなかった。本研究がきっかけとなり、様々な PP 分解微生物が今後明らかになることが期待できる。

Plastics are causing serious problems in the sea and settling even to abyssal depths. Polypropylene (PP) is the second most common plastic product and thus would constitute a large fraction of plastics in the sea. The biodegradation of PP has not been clearly shown (it has been uncertain whether the PP structure is actually biodegraded or not). This is the first report on the obvious biodegradation of PP. At the same time, this study shows that *Alcanivorax* bacteria could be major degraders of PP in marine environments.

Alcanivorax bacteria (mainly *Alcanivorax borkumensis*) were indicated to be enriched most abundantly on liquid PP, among the liquid PP-degrading bacteria, in mesopelagic water. An *Alcanivorax* isolate probably of *A. borkumensis* showed the highest liquid PP-degrading activity among the isolates. *Alcanivorax* bacteria required another carbon source for the PP-degrading activity and did not use liquid PP as the sole carbon and energy source. Regarding the degradation of solid PP, an initial degradation sign, oxidation, was detected, but a weight loss of at least 1% was not detected. By using this study as a model, various PP-degrading microbes would start to be clarified.

Polypropylene biodegradation, *Alcanivorax*, Marine environment

発表責任者：寺本真紀（maki.teramoto@kochi-u.ac.jp）

講演番号：3C3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C3 会場

海水中の微生物数とその挙動、樹脂の生分解活性との関係

Relationship of the number of microorganisms in seawater and their behavior with resin biodegradation activity

○中山 敦好[1,2]、日野 彰大[1]、川崎 典起[1]、山野 尚子[1]、岡村 秀雄[3]([1]産総研、[2]神戸大・院・海事、[3]神戸大・内海域セ)
○Atsuyoshi NAKAYAMA[1,2], Shodai Hino[1], Norioki Kawasaki[1], Naoko Yamano[1], Hideo Okamura[3]
([1]AIST, [2]Kobe Univ., [3]Kobe Univ)

海洋プラスチック問題の解決の一つの方策として生分解性材料が期待されている。しかしながら、海水中での樹脂の生分解性は場所、時期によって生分解速度が大きく異なる。その原因として、生分解作用の主役となる海水中の微生物数の多寡がもっとも大きな因子と考えられる。本発表では各地の海水中の微生物数、冷蔵保存下での変化、それらが生分解活性に及ぼす影響について検討した。また、海水中の微生物数を増大させるための工夫として複数海域の海水の混合、海砂による前処理、有機物添加、海水濃縮について検討し、その効果を評価した。無機栄養源添加による微生物生育環境の改善についても検討し、それらが樹脂の生分解性に及ぼす影響について調べた。これらの知見を基にした採水海水の保存、海水の活性化処理により、どこの海水を用いても同じような生分解評価を得られる海水生分解試験系を考案した。

Biodegradable materials are expected to be one way to solve the marine plastic problem. However, the biodegradation of resin in seawater varies greatly depending on location and time. The number of microorganisms in the seawater, which play a leading role in biodegradation, is thought to be the most important factor. In this presentation, we investigated the number of microorganisms in seawater from various locations, changes during refrigerated storage, and their effects on biodegradation activity. In addition, we investigated ways to increase the number of microorganisms in seawater by mixing seawater from different areas, pretreatment with sea sand, adding organic matter, and concentrating seawater, and evaluated their effects. We also investigated ways to improve the microbial growth environment by adding inorganic nutrients, and investigated their effects on resin biodegradation. Based on these findings, we devised a seawater biodegradation test system that allows us to obtain the same biodegradation evaluation no matter where seawater is used, by preserving the sampled seawater and activating the seawater.

Biodegradation, Disintegration, CFU

発表責任者：中山敦好（a.nakayama@aist.go.jp）

講演番号：3C3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C3 会場

紅藻類オゴノリ科オゴノリの成長と栄養塩吸収への培養温度と窒素化学形態の影響
Effects of culture temperature and nitrogen chemical form on the growth and nutrient absorption of the red alga *Gracilaria vermiculophylla*
○岡田 郁、黒須 泰行、本間 悠里、垣田 浩孝（日大院総合基）
○ Kaoru OKADA, Yasuyuki Kurosu, Yuri Homma, Hirotaka Kakita (Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ.)

魚類養殖場排水による海域への高濃度栄養塩負荷は赤潮発生などを引き起こす環境問題である。解決手段として薬品投与などの方法が考案されてきたが、高コストや回収率の低さが欠点である。一方、海藻は栄養塩を吸収して成長する。海藻を用いた水質浄化は低コスト、回収のしやすさなどの長所がある。我々は日本で多くの場所に分布し、高栄養塩条件下でも成長が可能な食用海藻であるオゴノリ科オゴノリ(*Gracilaria vermiculophylla*)を海藻バイオフィルター用海藻として着目した。そこで本研究では水温と窒素化学形態が *G. vermiculophylla* の成長と栄養塩吸収量に与える影響を明らかにすることを目的とした。10℃、15℃、20℃、25℃、30℃の 5 つの温度で海藻を培養し、一週間ごとに成長率と栄養塩吸収量を求めた。硝酸態窒素培地では 15℃で最も成長率が大きく、アンモニア態窒素培地では 20℃で最も成長率が高かった。栄養塩吸収量は硝酸態窒素とアンモニア態窒素とも海藻成長率の高さに比例した。以上の結果は窒素化学形態が海藻の栄養塩吸収量に影響することを示唆した。また 15℃～30℃で成長できることから広い海域での利用が可能なことが示唆された。

The high concentration nutrients loaded into the ocean by fish farm wastewater is an environmental problem. Techniques such as drug administration have been devised to solve this problem, but these techniques have drawbacks such as high cost and low recovery rate. On the other hand, seaweed absorbs nutrients and grows. Water purification using seaweed has advantages such as low cost and high recovery rate. We focused on *Gracilaria vermiculophylla*, an edible seaweed that is distributed in many places in Japan and can grow even at high nutrient concentrations. Therefore, the purpose of this study was to clarify the effects of water temperature and nitrogen chemical form on the growth and nutrient uptake of *G. vermiculophylla*. The growth rate and nutrient uptake were determined for each week at five different temperatures: 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, and 30°C. The growth rate was highest at 15°C in nitrate nitrogen medium, and the growth rate was highest at 20°C in ammonia nitrogen medium. The amount of nutrients absorbed was proportional to the growth rate of seaweed for both nitrate nitrogen and ammonia nitrogen. These results suggested that the nitrogen chemical form influences the amount of nutrient uptake by seaweed. Because *G. vermiculophylla* can grow at temperatures between 15°C and 30°C, it was suggested that *G. vermiculophylla* can be used in a wide range of oceans.

Seaweed, Nutrient, Nitrogen

発表責任者：垣田浩孝（kakita,hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C3 会場

廃棄アクリロニトリル-ブタジエンゴム（NBR）分解菌の形質転換法の構築

Construction of a method for transformation of *Gordonia* sp. bacteria capable of degrading waste nitrile rubber

○石田 拓真[1]、千葉 剛大[3]、杉森 大助[3]、山田 美和[2]（[1]岩手大院・農、[2]岩手大・農、[3]福島大・共生システム理工）
○Takuma ISHIDA[1], Takehiro CHIBA[3], Daisuke SUGIMORI[3], Miwa YAMADA[2] ([1]Iwate Uiv., [2]Fac. Agric., Iwate Univ., [3]Fukushima Univ.)

プラスチックをはじめとした石油化学製品の廃棄処理は，高い環境負荷から問題視されており，環境低負荷なリサイクル法の開発が求められている．我々の研究グループが発見した *Gordonia* sp. J1A は，合成ゴムであるアクリロニトリル-ブタジエンゴム（NBR）を生分解可能であり，本菌を用いることで環境低負荷な NBR 分解処理の実現が期待できる. 今後の NBR 分解能増強などの展開へ向けて，本菌の遺伝子組換え技術は必須である．そこで，本研究では本菌の形質転換法の構築を目指した．
J1A 株のゲノム解析により，本菌が天然プラスミドを安定的に保持していることが示唆された．そこで，推定した天然プラスミドの最小レプリコンを，広宿主域プラスミドである pBBR1 MCS-1 にクローニングし，新規シャトルベクター（pBBJ1）を構築した．pBBJ1 を使用して，エレクトロポレーションによる既報の *Gordonia* 属細菌の形質転換法を試した結果，改変を加えた以下の条件で形質転換体の取得に成功した．(1) LB 培地で生育させた J1A 培養液 1 mL を，20 g/L Tween80, 15 g/L sucrose, 10 g/L glycine, 3 mg/L isonicotinic acid hydrazide を含む 100 mL LB 培地に植菌し，OD_{600} = 0.5 に達するまで 30 °C で培養する．(2) 培養液を 10 % Glycerol で洗浄・濃縮してエレクトロコンピテントセルとする．(3) 100 µL コンピテントセルと<10 ng の pBBJ1 を混合し，MicroPulser™ (Bio-Rad) を使用して 15 kV/cm, 600 Ω, 10 µF, 4 ms の条件でパルスを与え，直ちに 1 mL LB 培地を添加して 4 時間回復培養を行い，クロラムフェニコールで形質転換体を選抜する．本技術は，廃棄 NBR の新たなケミカルリサイクル，アップサイクル法開発の基盤となり得る．
In our previous study, we have isolated *Gordonia* sp. J1A capable of biodegrading nitrile rubber (NBR). In order to enhance the NBR-degrading ability of J1A, gene manipulation technique is essential. Here, we demonstrated a transformation method for J1A by electroporation. Firstly, shuttle vector, pBBJ1, was constructed by cloning of the minimal replicon derived from the natural plasmid of J1A into pBBR1 MCS-1. Next, electrocompetent cells were prepared by growing J1A in LB media, containing 20 g/L of Tween 80, 15 g/L of sucrose, 10 g/L of glycine, and 3 mg/mL of isonicotinic acid hydrazide. The electrocompetent cells were then mixed with pBBJ1, and electroporation was performed at the following settings: 15 kV/cm, 600 Ω, and 10 µF, 4ms. Finally, pulsed cells were immediately diluted with 1 mL of LB, and recovered at 30 °C for 4 h. The transformants of J1A were obtained on selective media including chloramphenicol.

Gordonia, transformation, shuttle vector

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C3p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C3 会場

土壌細菌のシトクロム P450 を駆動させる脂肪酸アナログを用いた微生物変換手法

Microbial Biotransformation Using Fatty-Acid Analogues to Trigger Endogenous Cytochrome P450s of Soil Bacteria

○伊藤 史哉、唐澤 昌之、有安 真也、笠井 千枝、愛場 雄一郎、荘司 長三 (名大院理)
○Fumiya ITO, Masayuki KARASAWA, Shinya ARIYASU, Chie KASAI, Yuichiro AIBA, Osami SHOJI (Nagoya Univ.)

デコイ分子と呼ばれる一連の脂肪酸アナログは、*Priestia megaterium* 由来のシトクロム P450BM3 やその近縁酵素による小分子水酸化反応を誘起する。これらの反応は、デコイ分子が酵素に結合して形成する小さな反応空間により引き起こされると考えられている[1]。本研究では、これらデコイ分子を菌体内の P450 酵素へ作用させ水酸化活性を引き出し、バイオレメディエーションへ応用することを目的とした。天然で P450BM3 やその近縁酵素を有する *P. megaterium* など 12 細菌を対象とし、既存のデコイ分子数十種との組み合わせを網羅的に評価した。ベンゼン水酸化活性を指標としたスクリーニングにより *P. megaterium* のみならず、*Bacillus subtilis* など異なる P450 をもつ細菌で水酸化反応を達成した。基質範囲探索においてダイオキシン骨格分子を含む芳香族化合物に対する水酸化活性が得られ、本手法は細菌への遺伝子操作なく非天然の微生物変換を誘起する新規戦略として期待できる。

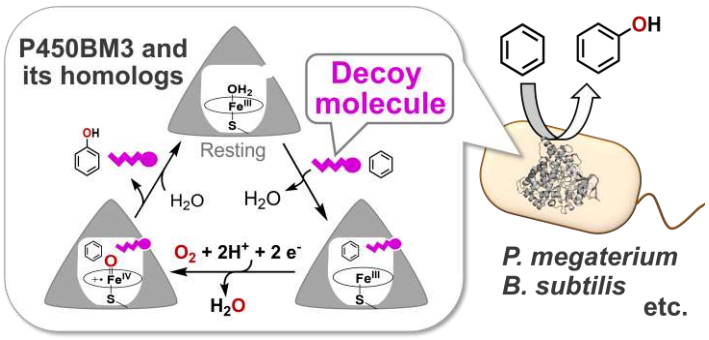


Fig. Whole-cell biotransformation triggered by decoy molecules.

Decoy molecules are mimics of fatty acids that trigger monooxygenase activity of cytochrome P450BM3 (isolated from *Priestia megaterium*) and its homologs against small organic molecules such as benzene. Decoy molecule-bound forms of P450BM3 have small reaction space, which can accommodate the small molecules to accelerate the non-native reactions.[1] In this study, we aimed to apply this unique reaction system to bioremediation by targeting endogenous P450s in native bacterial cells. To obtain bacterium-decoy molecule pairs which can catalyze benzene hydroxylation, we screened twelve bacterial strains and dozens of decoy molecules. The result shows several bacterial strains with their own P450s (e.g., *P. megaterium* and *Bacillus subtilis*) catalyzed the reaction only in the presence of the decoy molecules. Finally, we achieved hydroxylation of various aromatic compounds including dioxin-like molecules, indicating that this methodology can be a novel bioremediation strategy which does not involve genetic modification.

Ref. [1] O. Shoji *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6606-6610.

Cytochrome P450, Soil contamination, Whole-cell biotransformation

発表責任者：伊藤史哉（ito.fumiya.k9@s.mail.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C3p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C3 会場

土壌細菌による常圧蒸留残渣油中の炭化水素の生分解

Biodegradation of hydrocarbons in atmospheric distillation column residue oil by single strains of bacteria

○境 美晴、守 次朗、カナリー ロバート（横浜市大院生命ナノ）
○Miharu SAKAI, Jiro MORI, Robert KANALY (Yokohama City Univ.)

常圧蒸留残渣油（Atmospheric distillation column residue oil ; ADO）は、石油精製時に常圧蒸留装置から生産される、複雑な構造の高分子炭化水素を多量に含む非常に粘性の高い重質油である。重質油中の高分子炭化水素を分解し粘性を低下させることで、石油生産において精製・加工時に発生する問題を軽減し、生産コストを削減することができる。土壌より単離された *Sphingobium barthaii* KK22 株と *Pseudomonas aeruginosa* KK6 株の 2 つの細菌株は石油系炭化水素に対する高い生分解能を持つことが明らかになっており、これらの細菌株の ADO に対する生分解能を評価するために、ADO を用いた培養試験を行った。KK22 株および KK6 株に、唯一の炭素源として 0.3% w/v の ADO を与え、暗所でそれぞれ 10 週間培養した後、ADO の抽出とガスクロマトグラフィー分析を行った。その結果、ADO の成分のうち 2.4%が非生物的要因によって失われ、ADO の 11.4%と 41.1%がそれぞれ KK22 株と KK6 株によって生分解された。さらに、各細菌株による生分解によって、ADO 中の nC_{15} から nC_{32} までのほぼ全ての *n*-アルカンが減少していた。KK22 株と KK6 株は ADO の生分解能を持つことが示され、特に KK6 株は重質油の生分解中に形成される未解明の複雑な混合化合物をより広範囲に生分解できることから、重質油の生分解に有用であることが示唆された。

Improving the properties of heavy oils may mitigate downstream operational problems during oil production and reduce production costs. Atmospheric distillation column residue oil (ADO) is a complex and viscous heavy oil that is produced from atmospheric distillation units during petroleum refining. Two soil bacteria strains of the genera *Sphingobium barthaii* KK22 and *Pseudomonas aeruginosa* KK6 were isolated for their abilities to biodegrade hydrocarbons and were evaluated for their abilities to biodegrade ADO, 0.3% w/v, as the sole source of carbon and energy in mineral media. After 10 weeks of incubation in the dark, ADO extraction and gas chromatography analyses showed that 2.4% loss occurred through abiotic mechanisms and that 11.4% and 41.1% of ADO was biodegraded by strain KK22 and strain KK6, respectively. Nearly all *n*-alkanes from nC_{15} to nC_{32} were depleted. Strain KK6 appeared to more extensively biodegrade the unresolved complex mixture of compounds that form during the biodegradation of oils. Strain KK6 may be useful for bioupgrading heavy oils.

Heavy oil, Biodegradation, Soil bacteria

発表責任者：境　美晴（n235352f@yokohama-cu.ac.jp）

講演番号：3C3p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C3 会場

乳酸菌によるジルコニウム沈着機構の解析

Analysis of zirconium deposition mechanism by *Lactobacillus casei*

○加藤 由悟[1,2]、上原 章寛[2]、松村 大樹[3]、辻 卓也[3]、城 鮎美[2]、武田 志乃[2]、鈴木 道生[1,4]([1]東大院農、[2]量研機構、[3]原子力機構、[4]東大・微生物イノベ連携機構)
○Yugo KATO[1,2], Akihiro UEHARA[2], Daiju MATSUMURA[3], Takuya TSUJI[3], Ayumi SHIRO[2], Shino HOMMA-TAKEDA[2], Michio SUZUKI[1,4] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]QST, [3]JAEA, [4]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

ジルコニウムは耐熱性と耐腐食性に極めて優れた特性を持ち、人工骨をはじめ様々な分野で用いられている。また、化学的に合成された酸化ジルコニウムナノ粒子は抗菌剤や抗がん剤として用いられている。我々はこれまで、乳酸菌 *Lactobacillus casei* が金イオンを還元してナノ粒子を合成することを明らかにしており、ジルコニウムも同様に腸内などの環境下で乳酸菌により結晶化される可能性が考えられる。そこで、ジルコニウムの化学形態が乳酸菌によりどのように変化し、結晶化するかを解明することを目的に研究を行った。

塩化酸化ジルコニウム溶液中で振盪した乳酸菌を、透過型電子顕微鏡やエネルギー分散型 X 線分析により分析したところ、ジルコニウムが乳酸菌に取り込まれ、数十ナノメートルの粒子として凝集している様子が確認された。取り込まれたジルコニウムの結晶構造については X 線回折（XRD）により評価を行った。ジルコニウムを取り込んだ菌体の Zr-K 吸収端のエネルギーにおける X 線吸収微細構造測定（XAFS）を行った。菌体懸濁液中のジルコニウムの XAFS 測定が可能なセルを開発して測定したところ、菌体添加前と比べてスペクトルの波形が変化しており、乳酸菌の生体内成分と結合していることが考えられた。XRD と XAFS の測定結果から菌体内への濃集過程に化学形態の変化が伴うことが示唆された。

Zirconium (Zr) has been used in various fields including artificial bones because of extremely high resistance to heat and corrosion. In addition, chemically synthesized zirconium oxide nanoparticles are used as antibacterial and anticancer agents. We have previously shown that *Lactobacillus casei* reduces gold ions and synthesized gold nanoparticles. The purpose of the present study is to elucidate the chemical form changes and the crystallization of Zr by *L. casei*.

Transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis of *L. casei* shaken in $ZrOCl_2$ showed that Zr was incorporated into the cell and aggregated into particles. The crystal structure was also evaluated by X-ray diffraction analysis (XRD). X-ray absorption fine structure (XAFS) measurements at the energy of the Zr-K absorption edge were performed. The XAFS spectra indicated that the chemical form of Zrcoordinated with organic ligands in *L. casei*. XRD and XAFS results showed that the chemical form of Zr would change under the incorporation process by *L. casei*.

Lactobacillus casei, Zirconium, Nanoparticles

講演番号：3C3p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C3 会場

新規 SOFIX データベースの構築およびデータベースに基づく肥沃度向上マニュアル作成・実証

Development of a new SOFIX database and preparation and demonstration of a fertility improvement manual based on the database.

○長谷川 紘大、久保 幹（立命館大生命科学部）
○Koudai HASEGAWA, Motoki Kubo (The Univ.of Ritsumeikan)

本研究では、粒形の異なる土壌粒子を組み合わせて定常含水率を調整し、栽培する作物に適した土壌の作成を目的とした。定常含水率とは最大保水容量の土壌において、土壌からの透水が一定となり、大きく含水率が変化しないようになった状態のものを指した定義であり、20%を目標とした土壌設計を行った。

市販の粘土と真砂土を用いて様々な体積比で混合し、含水率の経時変化を確認した。300mL 容のポットを用いて実験を行い、土壌が流出しないようにキムタオルを内部に敷き詰めここに土壌を入れて実験を行った。各土壌の最大保水容量まで水を含ませ含水率の経時変化を確認した結果、2 日目の地点でほとんど含水率の変化が発生していないことが明らかとなった。そのため、この実験から定常含水率を 2 日後の含水率として以降の実験を行った。他にも全炭素量と含水率、総細菌数と含水率の間には相関関係が見られた、また、全炭素量は粒形の大きい真砂土が高い割合を占める土壌において高い含水率増加傾向が見られた。また、総細菌数は粘土が高い割合を占める土壌ほど大きな含水率推移を示すことがそれぞれ分かった。

The objectives of this study was to construct suitable soil compositions for plant by adjusting steady-state water content from different soil types. Steady-state water content is defined as the state in which water permeability from the soil is constant and does not change significantly in the soil at its maximum water holding capacity.

Commercially clay and sandy soil were mixed at various volume ratios to check changes in water content over time. A 300-mL pots was used in the experiment, and kim-towels were laid at the bottom of the pot to prevent soil runoff. The soil was added water up to its maximum water holding capacity, and the change in water content over time was monitored. As a result, the steady-state water content was decided in 2 days after water addition. A significant correlation was observed between total carbon and bacterial biomass, total carbon and water content. The proportion of clay and sandy soil strongly affected total carbon content and bacterial biomass in soil.

constant water content, total carbon content, total microorganisms

講演番号：3C3p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C3 会場

マイクロコズム試験による生物学的封じ込め株の環境生残性評価

Environmental viability assessment of a biologically contained bacterial strain using microcosm experiments

○森本 考司、西墻 佑介、石田 丈典、池田 丈、舟橋 久景、黒田 章夫、廣田 隆一（広大院統合生命）
○Takashi MORIMOTO, Yusuke NISHIGAKI, Takenori ISHIDA, Takeshi IKEDA, Hisakage FUNABASHI, Akio KURODA, Ryuichi HIROTA (Hiroshima Univ.)

遺伝子組換え（GM）微細藻類の利用は、カーボンニュートラルなど幅広い分野への展開が期待されている。しかし、GM 微生物の屋外開放条件での使用（第一種使用）は、カルタヘナ法による規制等のため承認を得ることが極めて困難である。生物学的封じ込め（BC）は、GM 微細藻類の拡散防止措置に有効であるが、第一種使用の審査で必要となる生物多様性影響評価における定量的な効果は評価されていない。本研究では、環境水・土壌を用いたマイクロコズム実験系をモデルとし、藍藻（*Synechococcus elongatus* PCC 7942）を想定した生残性評価手法の確立を行い、当研究室で開発した BC 技術の生残性に対する影響評価を行った。生菌の検出には、プロピジウムモノアジドを組み合わせた定量 PCR（PMA-qPCR）により、環境水、土壌サンプルそれぞれについて生細胞と死細胞を区別した検出法の確立を行った。一ヶ月間のマイクロコズム試験を実施し、BC 株の生残性を追跡した。その結果、水圏マイクロコズムでは PMA-qPCR による生菌追跡が可能であり、BC を適用した藍藻株は四週間で非検出となった。土壌マイクロコズムにおいては PMA 直接添加では生菌 DNA の判別は困難であったが、生理食塩水による懸濁過程の前処理を行うことで有効性が発揮された。

The use of Genetically modified (GM) microalgae is expected to apply to a wide range of fields. However, obtaining approval for the use of GM microorganisms at open environments is challenging due to restrictions by the Cartagena Act on Biodiversity. Biological containment (BC) is an emerging strategy to prevent the unintended spread of GM microalgae, but its impact on biodiversity has not been quantitatively evaluated. In this study, microcosm experiments using environmental water or soil were employed as model to establish a viability assessment of cyanobacteria (*Synechococcus elongatus* PCC 7942), and to evaluate the effect of BC on viability. Quantitative PCR, combined with propidium monoazide (PMA-qPCR), was used to distinguish between viable and dead cells in each environmental sample. A one-month microcosm experiment was conducted to monitor the viability of *S. elongatus*. The results showed that PMA-qPCR effectively track viable bacteria in the environmental water microcosm. Additionally, the cyanobacterial strain, to which BC was applied, became undetectable within four weeks. In the soil microcosm, direct addition of PMA failed to discriminate live bacteria; however, the addition of a pre-treatment of the suspension with saline solution demonstrated its effectiveness.

Biological containment, Cyanobacteria, Microcosm

発表責任者：廣田隆一（hirota@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C3p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C3 会場

嫌気性細菌が生産する中鎖脂肪酸による新規土壌消毒法の開発

Development of a new soil disinfection method using medium-chain fatty acid produced by Clostridium sp. strain E801

○天知 誠吾[1]、鈴木 ちはる[1]、三井 彩花[2]、宇佐見 俊行[1]、門馬 法明[3]([1]千葉大院園芸、[2]千葉大園芸、[3]園芸植物育種研究所)
○SEIGO AMACHI[1], CHIHARU SUZUKI[1], AYAKA MITSUI[2], TOSHIYUKI USAMI[1], NORIAKI MOMMA[3] ([1]Grad. School. Horticult., Chiba Univ., [2]Fac. Horticult., Chiba Univ., [3]Inst. Hortcult. Plant Breed.)

植物病原菌の防除法として、化学くん蒸剤を使用しない土壌還元消毒法（ASD）が注目されている。ASD では土壌環境の還元化が促進され、その過程で生じる嫌気性細菌の代謝産物が病原菌の密度を低減させると推測されている。一方、低温下では還元化が進行せず効果の不安定性が課題となっている。当研究室では、ASD 処理中に優占する嫌気性細菌 *Clostridium* sp. E801 株の分離に成功している。また、E801 株の培養上清中のカプロン酸がトマト萎凋病菌（Fol）の生育を強く抑制することが明らかになっている。そこで本研究では、低温条件下（15℃）や土壌中におけるカプロン酸の殺菌能力の検討を行った。まず、カプロン酸を添加した培地上で Fol を 15℃で培養したところ、顕著に生育が阻害された。次に Fol を接種した土壌にカプロン酸を直接添加し消毒可能か調べた。その結果、30℃で 10 mM、15℃で 30 mM の濃度で殺菌効果が認められた。また、カプロン酸は植物病原性細菌の *Ralstonia solanacearum* に対しても殺菌効果を示した。以上から、カプロン酸は様々な病原菌に対して殺菌能力を発揮し、冷涼地でも行える新たな土壌消毒法に利用できる可能性が示唆された。現在、カプロン酸処理がトマトの生育に与える影響を確認している。

Anaerobic soil disinfestation (ASD) is used as an ecofriendly alternative to chemical fumigation for eliminating soil-borne plant pathogens. In a previous study, we isolated *Clostridium* sp. strain E801 after laboratory-scale ASD and demonstrated that caproate produced by this strain has a strong biocidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). In this study, we found that andosol amended with caproate eliminated Fol conidia completely even at a low temperature (15℃). Furthermore, caproate showed bactericidal activity against *Ralstonia solanacearum*. These results suggest that direct application of caproate to soil could be a promising strategy to stabilize the effectiveness of soil disinfestation at a low temperature.

Anaerobic soil disinfestation, Caproate, Clostridium

発表責任者：天知誠吾（amachi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3C3p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 C3 会場

モエジマシダと嫌気性細菌を用いた革新的水田土壌浄化システムの開発

A novel remediation system for arsenic-contaminated paddy soils by using anaerobic microorganisms with an arsenic hyper-accumulating fern, *Pteris vittata*

○石丸 明日翔[1]、山村 茂樹[2]、中嶋 信美[2]、青木 仁孝[2]、宮内 啓介[3]、黄田 毅[4]（[1]千葉大院園芸、[2]国環研、[3]東北学院大工、[4]東北大院環境）

○ Asuka ISHIMARU[1], Shigeki YAMAMURA[2], Nobuyoshi NAKAJIMA[2], Masataka AOKI[2], Keisuke MIYAUCHI[3], Takeshi KOHDA[4] ([1]Grad. Sch. of Hort., Univ. Chiba, [2]Nati. Inst. for Environ. Stud., [3]Fac. of Eng., Univ. Tohoku-gakuin, [4]Grad. Sch. of Environ., Univ. Tohoku)

我が国の農用地土壌汚染防止法では、ヒ素濃度の基準値が 15 mg kg^{-1} と定められている。現在、水田土壌中では、間断灌水による農作物へのヒ素吸収低減で対策されているが、長期的な安全性が保証されるものではないことから、抜本的な対策手法の開発が求められている。そこで本研究では、嫌気性細菌によるヒ素可溶化プロセスと、モエジマシダによるヒ素吸収・蓄積プロセスを組み合わせた新規土壌浄化法の確立を目的として、ラボスケールでの検討を行った。ヒ素汚染土壌（20 mg-As kg^{-1}）200 g を入れたビーカーに水を添加し、モエジマシダを浮かせた。嫌気性細菌の炭素源として乳酸を 0.9 g 添加した系、稲わら、米ぬか、ふすま、ポリ乳酸をそれぞれ 2 g ずつ添加した系、無添加系の計 6 条件で実験を行った。液相のサンプリングを経時的に行い、ヒ素濃度を ICP-AES で測定した。また、実験終了時に土壌およびモエジマシダを回収し、残存および蓄積したヒ素を抽出・測定した。その結果、実験最終日において、ふすまを添加した条件では 10.9 mg kg^{-1} まで土壌ヒ素濃度が減少し、基準値を下回った。一方、液相中において、実験期間中にヒ素の一般排水基準値を上回ることはなかった。最終的にシダには 478 mg kg^{-1} のヒ素が蓄積し、系内の全ヒ素（土壌、液相、シダ）に占めるモエジマシダ中ヒ素は 31%となり、土壌からモエジマシダにヒ素が効率的に移行したと考えられた。

The Japan's Cropland Act sets the arsenic (As) concentration standard at 15 mg kg^{-1}. As-contaminated agricultural soil is commonly treated using physicochemical methods like repeated irrigation, but these methods are high costs. This study aimed to establish a new soil remediation approach by combining an As solubilization process with anaerobic microorganisms and an As absorption/accumulation process by the arsenic hyper-accumulating fern, *Pteris vittata*. In laboratory-scale experiments, fern seedlings were floated on As-contaminated soil (20 mg-As kg^{-1}) in different conditions. These conditions included a system with lactate, rice straw, rice bran, bran, or polylactic acid as carbon sources, and a system without any carbon source. As concentrations in the liquid phase were measured over time using ICP-AES. At the experiment's end, soil and *P. vittata* were collected to measure residual and accumulated As.Results showed that in the bran-added condition, soil As concentration decreased to 10.9 mg kg^{-1}, below the standard value. The liquid phase did not exceed the general effluent standard for As during the experiment. *P. vittata* accumulated 478 mg kg-1 of As, indicating efficient transfer of As from soil to *P. vittata.*

Pteris vittata, anaerobic microorganisms, arsenic

発表責任者：天知　誠吾（amachi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3C3p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 C3 会場

ヒ素超蓄積植物根圏のマルチオミクス解析による 圃場環境におけるヒ素吸収促進要因の検討

Multi-omics analysis of arsenic hyperaccumulator to investigate factors promoting arsenic uptake in field environments

○工藤 宏史[1]、韓 凝[2]、横山 大稀[1]、簡 梅芳[2]、菊地 淳[1]、井上 千弘[2]([1]理研環境資源、[2]東北大環境)

○Hiroshi Kudo[1], Ning Han[2], Daiki Yokoyama[1], Mei-Fang Chien[2], Jun Kikuchi[1], Chihiro Inoue[2] ([1]Riken CSRS, [2]The Univ. of Tohoku)

ヒ素超蓄積植物モエジマシダ（Pteris vittata）は、ヒ素を植物体地上部に高濃度に蓄積することからヒ素汚染環境の浄化への利用が期待されている植物である。近年では、土壌からのヒ素吸収を効率的に進めるために、微生物を利用した手法が提案されている。本研究では、微生物によるヒ素浄化促進の要因を植物－微生物相互作用の観点から明らかにすることを目的とし、ヒ素汚染圃場および非汚染圃場において *Pseudomonas* sp. m307 を植菌したモエジマシダの圃場栽培実験を行った。

実験の結果、ヒ素汚染圃場で m307 株を植菌した条件では未植菌条件と比較して植物地上部中ヒ素濃度が有意に増加した。菌叢と代謝産物の個別のオミクス解析からはその要因は明らかにならなかったが、菌叢と代謝産物のプロファイルは圃場ごとに有意に異なることが示された。さらに、ベイジアンネットワークにより代謝産物データと菌叢データを統合解析した結果、m307 株から生産される代謝産物が植物のヒ素蓄積に寄与することが示唆された。さらに、MND1 候補目（Betaproteobacteria 門）に属する細菌もヒ素蓄積に寄与することがネットワークから示唆された。本発表では、これらの解析から考察されたモエジマシダのヒ素吸収促進要因について報告する。

Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* is a plant that is expected to be used for the remediation of arsenic-contaminated environments because it accumulates arsenic at high concentrations in the shoot. In recent years, methods using microbes have been proposed to efficiently promote arsenic absorption from soil. In this study, we conducted field cultivation experiments of *P. vittata* inoculated *Pseudomonas* sp. m307 in arsenic-contaminated and non-polluted fields to clarify the factors that promote arsenic remediation by microbes in terms of plant-microbe interactions.

The results showed that the arsenic concentration in the shoot of *P. vittata* was significantly increased in the arsenic-contaminated field with inoculation of *Pseudomonas* sp. m307 compared to the uninoculated condition. Although individual omics analyses of the microbes and metabolites did not reveal the factors responsible for this increase, the microbial and metabolic profiles differed significantly from field to field. Furthermore, integrated analysis of microbiome and metabolome data by Bayesian network suggested that metabolites produced by strain m307 contribute to arsenic accumulation in plants. Moreover, the network suggested that bacteria belonging to the MND1 candidate order also contribute to arsenic accumulation. In this presentation, we will report the factors that promote arsenic absorption in *P. vittat*a as discussed in these analyses.

phytoremediation, multi-omics, Pteris vittata

講演番号：3C3p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 C3 会場

Investigation of clubroot disease occurrence under chemical and organic soil environments

○Zakirul Islam, Tran Quoc Thinh, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

Clubroot is a disease of cruciferous plant caused by soil born pathogen *Plasmodiophora brassicae* and can significantly limit the production through rapid spreading. The present study was designed to investigate the effect of cultivation practices (chemical and organic soils) on clubroot disease development in *Brassica rapa*. Disease index and root bacterial composition were investigated for both chemical and organic soils. The bacterial biomass and diversity in organic soil were higher than those in chemical soil. Disease severity was distinct for two different cultivation methods. The number of endophytic bacteria decreased in the infected root for both soils. The higher number of endophytic bacteria in organic plants led to reduce the proliferation of clubroot pathogen and reduced disease severity.

clubroot disease, bacterial biomass, root infection

発表責任者：Kubo Motoki（kubo@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3C4a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 C4 会場

フラボノイドライブラリーの構築に向けた合成法の開発

Development of synthetic methods for the construction of flavonoid libraries

○須貝 智也[1,2]、風間 友花[2]、高山 良明[2]、沓村 憲樹[1,2]（[1]筑波大睡眠研究機構、[2]筑波大院数理物質）
○TOMOYA SUGAI[1,2], TOMOKA KAZAMA[2], TOSHIAKI TAKAYAMA[2], NORIKI KUTSUMURA[1,2]
([1]WPI-IIIS, Univ. of Tsukuba, [2]Department of Chem., Institute of Pure and Appl. Sci., Univ. of Tsukuba)

フラボノイドは天然に約 2 万種存在することが知られているポリフェノール類縁体の総称であり、潜在的に幅広い生物活性を有する。例えばイソラムネチンとその類縁体は、非アルコール性脂肪肝炎の症状である肝臓の線維化を改善することが知られている（*Sci. Rep.* **2019**, *9,* 16210）。しかし、フラボノイド類はその膨大な種類に対して類縁体を効率よく網羅的に合成する手法がほとんどない。さらに天然から供給可能なフラボノイドには同様の反応性を有するフェノール性水酸基が多数存在するため、水酸基を区別化して官能基化を行うことは困難である。そのため、フラボノイド類は幅広い生物活性を有するにも関わらず構造活性相関研究が立ち遅れている。

本研究ではフラボノイドの構造活性相関研究に迅速にアクセス可能な網羅的合成法の開発を目的とした。酸化度の高い A 環を有した共通中間体を設計し、酸化段階を調整した環化反応によって C 環部を構築する。B 環部は合成の後半で導入することにより、効率的に様々なクラスのフラボノイドを合成することを計画した。本発表では網羅的合成法の開発の進捗について発表する。

Flavonoids are a generic term for polyphenolic analogues that have a potentially wide range of biological activities. For example, isorhamnetin and its analogues are known to ameliorate liver fibrosis, a symptom of nonalcoholic steatohepatitis. However, there are few methods for the efficient and comprehensive synthesis of analogues for the vast variety of flavonoids. Furthermore, the large number of phenolic hydroxyl groups with similar reactivity in naturally available flavonoids makes it difficult to differentiate and functionalize the hydroxyl groups. Therefore, structure-activity relationship studies of flavonoids have lagged behind despite their wide range of biological activities.

In this study, we aimed to develop a comprehensive synthetic method for rapid access to structure-activity relationship studies of flavonoids. We designed a common intermediate having a highly oxidized A ring, and constructed the C ring by cyclization reaction with adjusting the oxidation step; the B ring was introduced later in the synthesis to efficiently synthesize various classes of flavonoids. In this presentation, we will present the progress of the development of the exhaustive synthetic method.

flavonoids, library, unified synthesis

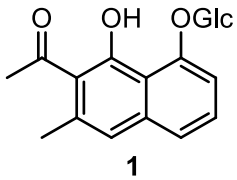
発表責任者：須貝智也（sugai.tomoya.gm@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C4a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 C4 会場

コギシギシに含まれるナフタレングルコシドの全合成
Total synthesis of naphthalene glucoside isolated from *Rumex dentatus*

○蒔田 瑞祈、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Mizuki Makita, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

ナフタレングルコシド **1** はタデ科のコギシギシ(*Rumex dentatus*)の根から単離された天然物である．しかしながら，その全合成は未だ行われておらず，構成糖の立体構造についても不明である．そこで本研究では，Diels-Alder 反応，Fries 転位および相間移動触媒(PTC)を用いたグリコシル化を鍵段階として，**1** の全合成とその完全な構造決定を行った．



1

セネシオ酸アミドと 2-ブロモアニソールとの Diels-Alder 反応により，ナフタレン誘導体を合成した．アセチル化，Fries 転位および脱メチル化により，得られたナフタレンからアグリコン部分を誘導した．PTC 存在下，D-グルコースとの二相系反応により，グルコシドを合成した後，アセチル基を除去することで D-**1** を得た(総収率 14%，7 段階)．その ^{1}H NMR および ^{13}C NMR データは天然物 **1** と一致したが，比旋光度は-102.7 を示し，天然物 **1** (+58.2)の符号とは逆であった．そこで，L-グルコースを用いて，鏡像異性体である L-**1** を化学合成した(総収率 13%，7 段階)．その比旋光度は+116.2 を示し，天然物 **1** の構造は L-**1** であることが明らかになった．

Naphthalene glucoside **1** was isolated from the root of *Rumex dentatus* (Polygonaceae). However, total synthesis of **1** and the stereochemical investigation of its sugar part have not been achieved. In anticipation of the complete structural determination of **1**, the total synthesis was performed through several key steps such as Diels-Alder reaction, Fries rearrangement, and glycosylation using phase-transfer catalysis (PTC) in this study.

By Diels-Alder reaction, the naphthalene derivative was synthesized from senecioyl amide and 2-bromoanisole. The naphthalene was transformed into the aglycone part *via* acetylation, Fries rearrangement, and demethylation. The glycosylation was performed by a biphasic reaction using PTC to obtain D-glucoside and, then, the removal of acetyl groups gave D-**1** in 14% of the total yield over 7 steps. The ^{1}H and ^{13}C NMR data of D-**1** were consistent with those of the natural product. However, its negative specific rotation (-102.7) was contrary to the previously reported data. Thus, L-**1** was synthesized in 13% of the total yield over 7 steps, along with the similar synthetic route of D-**1**. Since its specific rotation was +116.2, the structure of natural product was determined as L-**1**.

total synthesis, naphtalene glucoside, selective glycosylation

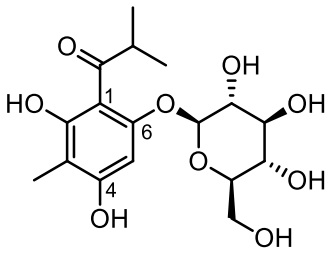
発表責任者：蒔田瑞祈（mc236700@s.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3C4a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 C4 会場

ギンバイカに含まれるフロログルシノール配糖体の全合成
Total synthesis of phloroglucinol glycoside isolated from *Myrtus communis*

○棚瀬 由希乃、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Yukino Tanase, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

天然物 **1** はフトモモ科のギンバイカ(*Myrtus communis*)の葉から単離されたフロログルシノール配糖体である．しかしながら，その全合成研究は現在まで行われていない．そこで，Friedel-Crafts アシル化反応および相間移動触媒(PTC)を用いたグリコシル化反応を鍵段階として，**1** の全合成を行った.



1

出発物質である 2,4,6-トリヒドロキシベンズアルデヒドを，シアノ水素化ホウ素ナトリウムによりヒドリド還元し，トルエン誘導体を得た. Lewis 酸存在下，塩化イソブチルを用いた Friedel-Crafts 反応により，得られたトルエン誘導体をアシル化した. 次に 4 位のフェノール性水酸基を選択的に，ベンジルオキシメチル(BOM)基で保護した後，PTC 存在下，別途調製した糖供与体との二相系反応によりグリコシル化を行った．その結果，6 位が選択的にグリコシル化された保護配糖体が得られた．最後に，加水素分解とエステル交換反応によってすべての保護基を除去し，天然物 **1** の全合成を達成した(6 段階，総収率 8%).

Natural product **1**, a phloroglucinol glycoside, was isolated from the leaves of *Myrtus communis* (Myrtaceae). However, so far, the synthetic study of **1** has not been conducted. Thus, we have demonstrated the total synthesis of **1** *via* Friedel-Crafts acylation and glycosylation using a phase transfer catalyst (PTC) as the key steps.

The hydride reduction of 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde as the starting material by using sodium cyanoborohydride furnished a toluene derivative. The obtained derivative was acylated by Friedel-Crafts reaction in the presence of Lewis acid. Next, a benzyloxymethyl (BOM) group was selectively introduced at 4 position of phenolic hydroxyl and, then, the glycosylation was carried out by using sugar donor prepared separately under a biphasic condition with PTC. As a result, the protected glycoside having a glucose moiety at 6 position was selectively afforded. Finally, by the removal of all the protective groups using hydrogenolysis and transesterification, total synthesis of **1** was achieved in 8% of the overall yield *via* six steps.

total synthesis, phloroglucinol glycoside, glycosylation

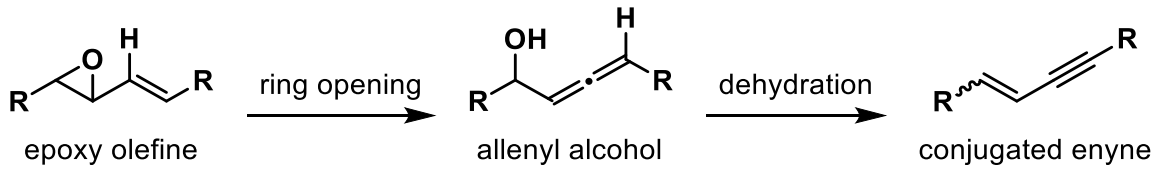
発表責任者：棚瀬由希乃（mc226677@s.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3C4a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 C4 会場

エポキシオレフィンからの共役エンインの合成
Synthesis of conjugated eneyne from epoxy olefin

○水本 大貴、西川 俊夫 (名大生命囊)
○HIROKI MIZUMOTO, TOSHIO NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

アセチレンアルケンの共役した共役エンインは、昆虫や植物、微生物の生産するポリイン脂肪酸や環状エンジイン系抗生物質 Calicheamicin γ[1] などの重要な生物活性天然物に含まれる構造であり、様々な合成法が報告されている。今回我々はエポキシオレフィンを原料とした新たな共役エンインの合成法を開発した。エポキシドからアリルアルコールへ変換する反応を参考にして、エポキシオレフィンからアレニルアルコールへと変換し、その脱水によって共役エンインを得るものである。本講演ではこの反応の詳細について報告する。



Conjugated eneyne is a structure found in important biologically active natural products such as polyyne fatty acid, cyclic enediyne antibiotics and Calicheamicin γ[1]. Various synthetic methods of the eneyne have been reported to date. We will present a new synthetic method for conjugated eneyne from epoxy olefin. According to the reactions of converting epoxide to allyl alcohol, opening of the epoxy olefin gave allenyl alcohol, which was dehydrated to conjugated eneyne. The details of this reaction will be discussed.

eneyne, epoxy olefin, synthesis

講演番号：3C4a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 C4 会場

シクロオクチンの新規合成法の開発

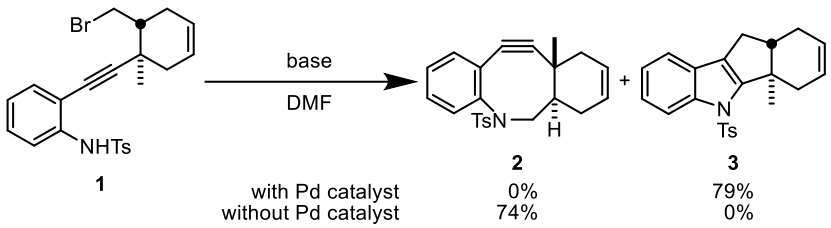
Development of a new synthetic method for cyclooctyne

○菱木 健太、山口 将司、小野 義貴、宮坂 忠親、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Kenta HISHIKI, Masashi YAMAGUCHI, Yoshiki Ono, TADACHIKA MIYASAKA, TOSHIO NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

シクロオクチンはその歪みから銅触媒なしでアジドと Hüisgen 環化反応することが知られている。この反応は SPAAC 反応と呼ばれ、ケミカルバイオロジーをはじめ幅広い分野で利用されている。そのため、これまでにシクロクチンの様々な合成法が開発されてきた。

一方、我々はインドールテルペンアルカロイドの環構造構築の検討過程において [1)]、新規のシクロオクチン合成法を偶然発見した。化合物 **1** に対して塩基存在下、Pd 触媒を作用させると四環性化合物 **3** が生成する一方で、Pd 触媒非存在下で加熱すると四環性化合物 **3** は全く生成せず、シクロオクチン **2** が高収率で得られた。

本研究ではこのシクロオクチン合成の詳細な反応条件やクリック反応を検討したので報告する。



Cyclooctynes possing high ring strain react with azide in the absence of Cu(I) catalyst. This reaction is called SPAAC reaction and has a wide range of applications in broad disciplines, including chemical biology. Therefore, various synthetic methods of cyclooctyne have been developed.

On the other hands, we unexpectedly found a new synthetic method of cyclooctyne in the course of synthetic studies of terpene indole alkaloids.[1)] While treatment of compound **1** with Pd catalyst in the presence of base provided tetracyclic compound **3**, the same reaction without Pd catalyst gave cyclooctyne **2** in good yield.

We will report examination of reaction conditions and click reaction of cyclooctyne **2**.

Reference

1)Ono, Y. Nishikawa, T. *et al. Synlett* **2023**, *34*, 364-368.

Cyclooctyne, SPAAC reaction, chemical synthesis

発表責任者：菱木健太（hishiki.kenta.p7@s.mail.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C4a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 C4 会場

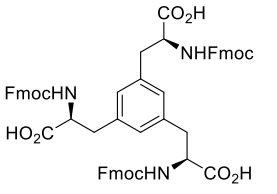
アミロイドβの 3 量体モデルに用いる 3 回対称型トリスアミノ酸リンカーの合成研究

Synthetic study on the C_3-symmetric tris-amino acid linker for the trimer models of amyloid ß peptides

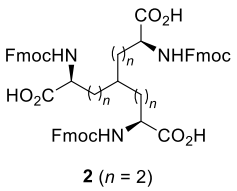
○内野 歩美、塚野 千尋、入江 一浩（京大院農）
○Ayumi UCHINO, Chihiro TSUKANO, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)

アルツハイマー病の発症にはアミロイドβ(Aβ) の凝集体（オリゴマー）が関与しているが、その立体構造は分子量も含めて不明な点が多い。2015 年、固体 NMR 法を用いた 150 kDa の Aβ42 オリゴマーの解析から、3 分子の Aβ42 が 3 回対称に配置した 3 量体構造が提唱された [1]。所属研究室ではこの構造に着目し、3 回対称型トリスアミノ酸 (**1**, **2**) をリンカーとして毒性配座をとりやすくした E22P-Aβ40 の 3 量体モデルを合成・構造機能解析した [2,3]。E22P-Aβ40 の 34、36 または 38 位においてリンカー **1** で架橋したモデルはいずれもほとんど細胞毒性を示さなかったが、柔軟性の高いリンカー **2** で 36 位を架橋したモデルは E22P-Aβ40 単量体と同程度の細胞毒性を示し、このモデルが毒性 3 量体構造を反映したものであることが示唆された。一方 E22P-Aβ40 の 2 量体モデルを用いた所属研究室の研究から、架橋長の短いモデルがより高い毒性を示すことが明らかになった [4]。そこで本研究ではリンカー **2** より架橋長の短い新規リンカーとして 3 回対称型トリスアミノ酸 **3** を設計し、**4** から **5** への Overman 転位を鍵反応とする **3** の合成に着手した。現在、**5** から **3** への変換を検討している。

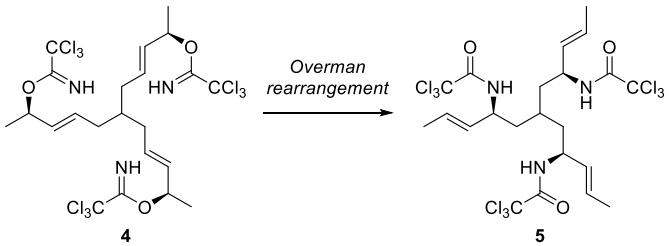
Oligomers of amyloid β proteins (Aβ) contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. However, the structure of the toxic oligomers has not yet been elucidated. In 2015, the C_3-symmetric structure of Aβ42 trimer was suggested based on the analysis of 150 kDa oligomers of Aβ42.[1] Our group synthesized and characterized the trimer models of E22P-Aβ40 tethered by linker amino acids **1** or **2** based on the trimeric structure.[2,3] Though the models cross-linked by **1** at positions 34, 36 or 38 were not cytotoxic, the model cross-linked by **2** at position 36 was as toxic as E22P-Aβ40 monomer. To optimize the Aβ trimer models, we designed a new linker amino acid **3**, which has a shorter spacer than **2**, because the shorter the linker length, the stronger the cytotoxicity.[4] The synthesis of **3** was embarked on using Overman rearrangement of **4** to **5** as a key step. Synthesis of compound **3** from **5** is in progress.



1



2 (*n* = 2)
3 (*n* = 1)



4 **5**

1) Huang, D. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2319. 2) Irie, Y. *et al.*, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 182. 3) Uchino, A. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2022**, *13*, 2517. 4) Chikugo, A. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2022**, *13*, 2913.

amino acid, trimer, amyloid ß peptide

発表責任者：入江　一浩（irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.jp）

講演番号：3C4a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 C4 会場

麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成研究(2)
Synthetic study of a putative biosynthetic intermediate of paralytic shellfish toxin, saxitoxin (2)
○廣住 燎亮[1]、長 由扶子[1]、工藤 雄大[2,1]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[3]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大学際研、[3]東京農工大院工)
○Ryosuke Hirozumi[1], Yuko Cho[1], Yuta Kudo[2,1], Keiichi Konoki[1], Kazuo Nagasawa[3], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Tohoku Univ. FRIS, [3]Tokyo Univ. of Agri. & Tech.)

【背景・目的】サキシトキシン (saxitoxin, STX, **1**) は、淡水および海産藍藻や海産渦鞭毛藻が生産する強力な神経毒である。その生合成経路は解明されつつあるが[1-4]、三環形成機構などは未解明である。我々は推定生合成中間体 5 種が有毒生物の細胞内に存在していることを証明し、その結果から、二環性化合物 **2** を経由する経路を提唱した[4]。しかし、**2** は、標品がないため有毒生物から未同定で、麻痺性貝毒への変換も確認できていない。そこで、本研究では、標品調製のため、**2** の合成を目指した。

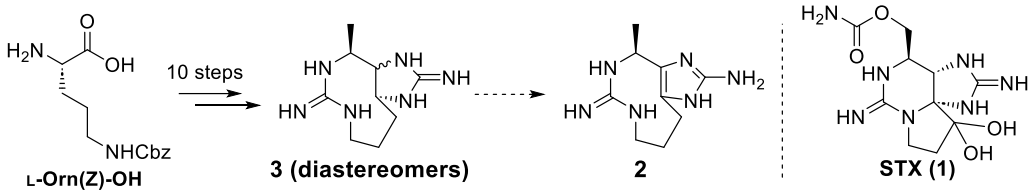


Fig. 1. Synthetic plan for putative biosynthetic intermediate (**2**) of STX (**1**)

【方法・結果】L-Orn(Z)-OH を出発物質として、α-アミノ基のグアニジノ化、カルボン酸を基にした二炭素増炭、環形成および脱保護を含めた計 10 工程で **2** の基本骨格を有するジアステレオマー混合物 **3** の合成に成功した (Fig.1)。この構造は STX と類似しているため、生合成中間体として存在する可能性を考え、**3** のジアステレオマーをそれぞれ分離し、有毒生物の細胞内において探索した。現在、**3** の酸化によるイミダゾール環の構築を試みている。

Saxitoxin (STX, **1**) is a potent neurotoxin produced by freshwater and marine cyanobacteria and marine dinoflagellates. The study on biosynthetic pathway of STX[1-4] have been conducted over decades. However, several points including the mechanism for formation of its tricyclic ring is still unclear. Previously, our group[4] synthesized five putative biosynthetic intermediates and identified them in a toxic cyanobacterium and dinoflagellates. Based on this result, we proposed a route via a bicyclic compound **2**. However, **2** has not been identified in the toxic microalgae, and **2** has not been chemically synthesized so far. Herein, we report the synthetic study of **2**. From L-Orn(Z)-OH, we succeeded to synthesize **3** as diastereomers. After separation of the diastereomers, **3** is now being searched in the cells of toxic microalgae, since **3** can be also assumed to be a biosynthetic intermediate of STX. In addition, we are currently trying oxidation of **3** to form imidazole in **2**.

[References] 1) Y. Shimizu, *et al*., *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1685–1698. 2) R. Kellmann, B. A. Neilan, *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.,* **2008**, *74*, 4044–4053. 3) A. L. Lukowski, A. R. H. Narayan *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2018***, 140,* 11863–11869. 4) S. Tsuchiya, M. Yotsu-Yamashita, *et al., Angew. Chem. Int. Ed*., **2017**, *56*, 5327–5331.

saxitoxin, biosynthesis, biosynthetic intermediate

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3C4a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 C4 会場

クランベシン B 脱炭酸体の不斉全合成

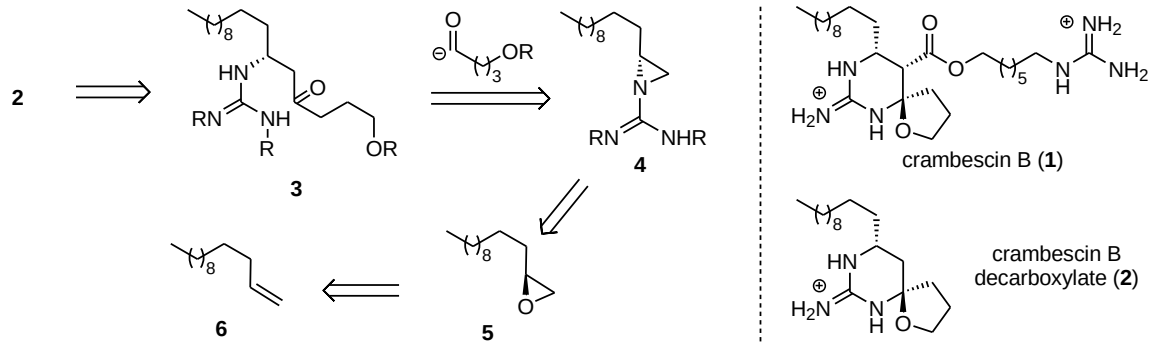
Asymmetric total synthesis of crambescin B decarboxylate

○米倉 悠葵、紺野 真秀、尾﨑 拓、中崎 敦夫 (岩手大理工)
○Yuki YONEKURA, Masahide KONNO, Taku OZAKI, Atsuo NAKAZAKI (Iwate Univ.)

クランベシン B (**1**) は地中海の海綿 *Crambe crambe* から単離された環状グアニジンアルカロイドである[1]。**1** の類縁体であるクランベシン B 脱炭酸体 (**2**) は、電位依存性 Na^+チャネルに対する強力な阻害活性を有することが明らかとなったが [2]、その詳細な作用機序は未解明である。また、既に確立されている **2** の合成法は、多様な類縁体合成を可能とする共通中間体を経由しているため、多段階を要する合成ルートであった[2a,c]。そこで本研究では、**2** の効率的な合成ルートの開拓を目指した。

2 は **3** の環化により合成でき、**3** はアシルアニオン等価体による **4** の開環により達成できると考えた。実際の検討の結果、工程数を削減して **2** の不斉全合成を達成することができた。マウス海馬由来 HT22 神経細胞を用いて、グルタミン酸毒性に対する **2** の細胞保護活性を評価したので併せて報告する。

Crambescin B decarboxylate (**2**), an analogue of crambescin B (**1**), exhibited potent inhibitory activity against voltage-gated sodium ion channels.[2] Synthetic approaches to **2** established in our laboratory required extra steps, because the syntheses passed through common intermediates for the synthesis of a variety of crambescin analogues.[2a,c] In this study, we achieved asymmetric synthesis of **2** in shorter steps. Furthermore, we determined the protective effects of **2** on glutamate-induced cell injury in mouse hippocampus-derived neuronal HT22 cells.



[1] Braekman, J. C. *et al. Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 6531.
[2] (a) Nakazaki, A. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5304. (b) Tsukamoto, T. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1247. (c) Nakazaki, A. *et al. Heterocycles* **2022**, *105*, 343.

crambescin B decarboxylate, asymmetric total synthesis, protection activity

発表責任者：米倉悠葵（g0322192@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C4a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 C4 会場

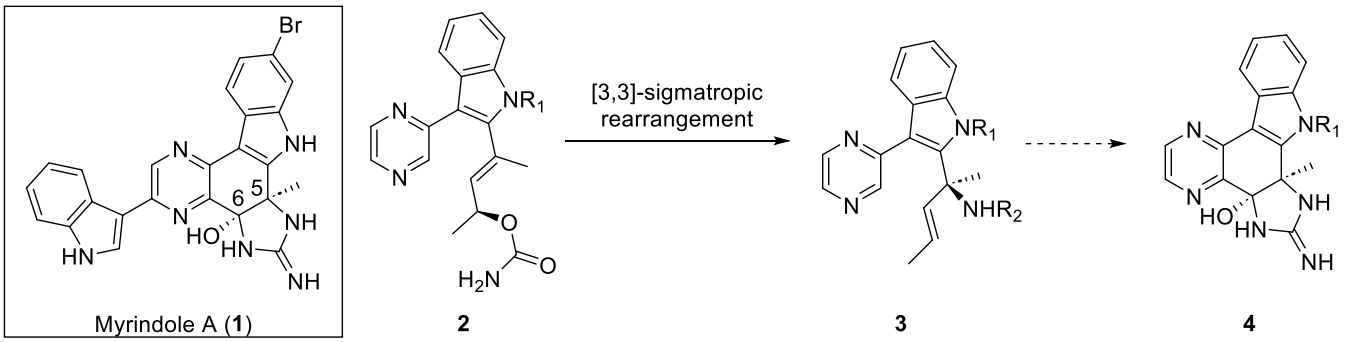
Myrindole A の合成研究

Synthetic studies of Myrindole A

○中村 優斗[1]、矢島 新[2]、斉藤 竜男[2] ([1]東農大院生命、[2]東農大生命)
○Yuto NAKAMURA[1], Arata YAJIMA[2], Tatsuo SAITO[2] ([1]Graduate School of Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

Myrindole A (**1**)は 2021 年に松永らにより日本の Sagosone に生息する海綿 *Myrmekioderma* sp.から単離、構造決定された海洋産アルカロイドである。グラム陽性、グラム陰性菌に対して抗菌活性を示すことが報告されており、新規抗生物質として利用が期待されている。Myrindole A は環状グアニジン部位に連続する 2 つの四置換不斉中心を有し、ピラジンを中心としたビスインドールを特徴的な骨格として有している。現在までにピラジン環及びケトピペラジン環を有する天然物は数多く単離されてきたが、Myrindole A はピラジン環の置換様式において例を見ない天然物である。我々はその特異な構造に興味を持ち、Myrindole A の全合成研究を行うこととした。まず、Myrindole A の五環性骨格構築に当たり、不斉転写により C5 位の窒素原子の導入を計画し、モデル化合物での合成を検討した。市販の(*S*)-乳酸メチルから **2** を合成し、[3,3]-シグマトロピー転位による **3**、続く五環性化合物 **4** の合成に取り組んでいる。本発表では、**2** の合成および **4** への誘導について詳細を報告する。

Myrindole A (**1**), a marine alkaloid, was isolated from the deep-sea sponge *Myrmekioderma* sp. by Matsunaga and co-workers in 2021.[1)] It showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The remarkable structural features of myrindole A include two stereogenic centers, a cyclic guanidine, and a bis-indole skeleton with pyrazine core. We started the total synthesis of myrindole A because of its unique skeleton. We have successfully synthesized compound **2** from commercially available methyl (*S*)-lactate. We report the synthesis of compound **2** and further transformation to the pentacyclic compound **4**.



1) Matsunaga, S. *et al. Org. Lett.* **2021**, *23*, 3477

total synthesis, alkaloid, antimicrobial activity

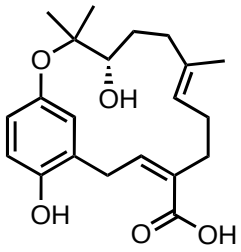
講演番号：3C4a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 C4 会場

Petchiether A の合成研究

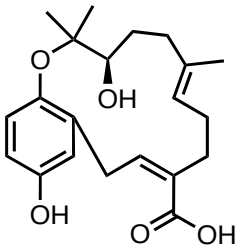
Synthetic studies of petchiether A

庄司 篤史[1]、斉藤 竜男[2]、○矢島 新[2] ([1]東農大院生命、[2]東農大生命)
Atsushi SHOJI[1], Tatsuo SAITO[2], ○ Arata YAJIMA[2] ([1]Graduate School of Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

霊芝 *Ganoderma petchii* の子実体より 2016 年に Chen らによって単離された petchiether A (**1**)および B (**2**)はそれぞれ特異な 15, 14 員環エーテル構造を有するメロテルペノイドであり、ラット腎尿細管上皮細胞からのフィブロネクチン産生および細胞外マトリックスの沈着を阻害することから、腎臓病治療薬のリードとして有望な化合物である。構造的特徴として両者第二級の不斉中心をそれぞれ有しているが、極めて構造の類似した同一の経路で生合成されると推測される両化合物の絶対立体配置は逆であることが報告されている。また、同年 Qui らも *G. capense* より petchiether B と同一の構造である ganocapensin B を報告しているが、これはむしろ Chen らの報告した petchiether A と NMR データおよび比旋光度が一致しているように思われる。そこで我々はこれらの化合物の平面構造および立体化学の混乱の原因がどこにあるのかを明確にするべく、petchiether 類を合成することとした。当初、petchiether 類はヒドロキノン部位がエポキシ環を有するファルネシル部位に対する求核付加反応によって生合成されるものと推測し、それに習っての簡便な合成を試みたがフラスコ中で本反応を実現することは困難であった。そこで、閉環メタセシス反応による大環状化合物の合成と位置選択的な水素化を実現することで、15 員環を有する petchiether A のモデル化合物の合成を達成した。現在は petchiether 類の光学活性体合成に取り組んでいる。



Petchiether A (**1**)



Petchiether B (**2**)
= Ganocapensin B?

Petchiether A (**1**) and B (**2**), isolated from the fruiting bodies of *Ganoderma petchii* by Chen et al. are meroterpenoids with unique 15- and 14-membered ether structures, respectively. They inhibit fibronectin production and extracellular matrix deposition from rat renal tubular epithelial cells, making them promising leads for kidney disease treatment. Qui et al. also reported a compound, ganocapensin B, from *G. capense* with an identical structure to petchiether B. However, it appears to match the NMR data and specific rotation sign of Chen's petchiether A. Therefore, we set out to synthesize petchiethers to clarify the causes of confusion in their planar structures and stereochemistry. We accomplished the synthesis of a model compound of 15-membered ring petchiether A through ring-closing metathesis reaction and achieving regioselective hydrogenation.

total synthesis, terpene, meroterpenoids

講演番号：3C4a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 C4 会場

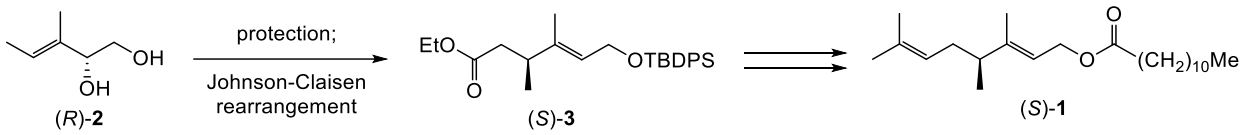
ハリアリ *Gnamptogenys striatula* の道しるベフェロモンの構成成分の合成

Synthesis of the trail pheromone component of the ponerine ant *Gnamptogenys striatula*

○田代 卓哉[1]、渡辺 裕之[2] ([1]三条市大工、[2]東大院農)
○Takuya TASHIRO[1], Hiroyuki WATANABE[2] ([1]Sanjo City Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

4-メチルゲラニルエステル (**1**)は、ブラジルのバーイア州に生息するハリアリ *Gnamptogenys striatula* の道しるベフェロモンの主成分である。化合物 **1** の天然物の絶対立体配置は *S* であると報告されているが、合成は未だ報告例がない。そこで我々は、構造活性相関研究のためのサンプル供給を目的として、化合物 **1** の両鏡像体の合成を行った。

原料となる (*R*)-**2** は酵素を用いたラセミ体の光学分割により調製した。Johnson-Claisen 転位によりエステル(*S*)-**3** へと変換後、(*S*)-4-メチルゲラニオールを経て、目的とする(*S*)-**1** を合成した。同様の手法により、(*S*)-**2** から(*R*)-**1** を得た。合成の詳細について報告する。



4-Methylgeranyl ester (**1**) is a major component of the trail pheromone of the ponerine ant *Gnamptogenys striatula* in Bahia, Brazil. Although the absolute configuration of natural **1** had been reported as *S*, its synthesis had not yet been reported. In this study, we synthesized both enantiomers of **1** with the aim of supplying samples for SAR studies.

The starting material (*R*)-**2** was prepared by enzymatic resolution of the corresponding racemic diol. It was converted to ester (*S*)-**3** by using Johnson-Claisen rearrangement reaction. Ester (*S*)-**3** was converted to (*S*)-**1** via (*S*)-4-methylgeraniol. We report on the details of the synthesis of **1**.

enantioselective synthesis, ponerine ant, trail pheromone

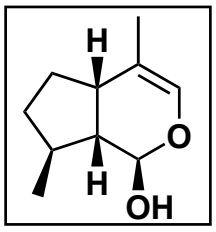
講演番号：3C4a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 C4 会場

イリドイド配糖体の合成研究

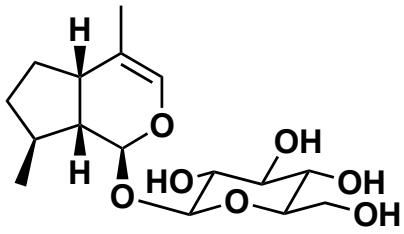
Synthetic Studies on glycosides of iridoids

○西川 俊夫[1]、大岡 左枝[1]、上野山 怜子[2]、白武 勝裕[1]、宮崎 雅雄[2]([1]名大院生命農、[2]岩手大院連合農学)
○ Toshio NISHIKAWA[1], Sae OOKA[1], Reiko UENOYAMA[2], Katsuhiro SHIRATAKE[1], Masao MIYAZAKI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Iwate Univ.)

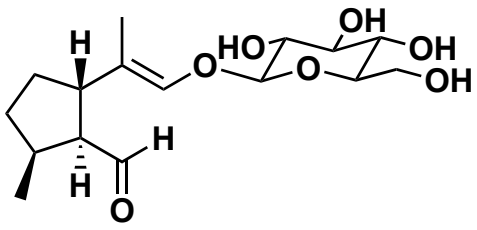
マタタビ（*Actinidia polygama*）に含まれ、ネコ科動物のマタタビ反応を強力に誘起するネペタラクトール（**1**）の一部は、その配糖体が前駆体であり、マタタビ葉が損傷を受けると、配糖体が加水分解されることで放出されると考えている。そこで、**1** の動態研究に向けた標品を得ることを目的とし、配糖体の候補としてネペタラクトール-β-グルコシド（**2**）とイリドジアロ-β-グルコシド（**3**）などの合成研究を行っている。昨年度本大会において、グルコシド **2** の合成を発表した。本大会では、グルコシド **3** の合成研究について報告する。



nepetalactol (1)



nepetalactol-b-glucoside (2)



iridodialo-b-glucoside (3)

Nepetalactol (**1**), isolated from silver vine (*Actinidia polygama*), is a potent inducer of the '*Matatabi reaction* (cat nip reaction) ' of cats as well as a repellent against mosquitoes. We hypothesize that a portion of **1** would exist as glycosides and when the leaves are damaged, the glycosides would undergo hydrolysis to yield **1**. To obtain those authentic samples, we have investigated syntheses of nepetalactol-β-glucoside (**2**) and iridodialo-β-glucoside (**3**) for analysis of the metabolic pathway. Last year, synthesis of glucoside **2** was reported[1)]. In this meeting, synthesis of glucoside **3** will be presented.

1）大岡ら 2F04-03 日本農芸化学会 2023 年度大会（広島・オンライン）

synthesis, iridoid glycoside, Silver Vine

発表責任者：西川俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C4a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 C4 会場

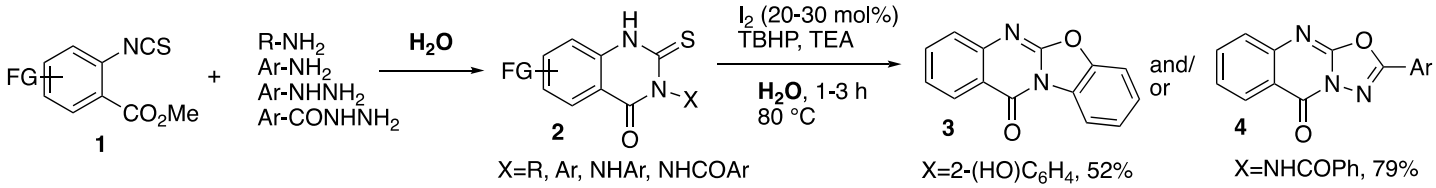
ヨウ素を触媒に用いたキナゾリン誘導体の水中下有機溶媒フリー合成法

Iodine-catalyzed synthesis of quinazoline derivatives in water

○谷森 紳治、鞆谷 祐貴、森脇 美来、槙山 浩平 (阪公大院農)
○shinji Tanimori, Yuuki Tomotani, Miku Moriwaki, Kouhei Makiyama (Osaka Metropolitan Univ.)

キナゾリン誘導体には様々な生理活性が知られ、数多くの合成法が開発されている．本研究では、構造多様性ケミカルライブラリーの迅速かつ環境調和性の高い構築法の開発を目的に、2―イソチオシアナト安息香酸メチル **1** を出発物質に、アニリン、アミンならびにヒドラジンを水中下反応させることでキナゾリノン誘導体 **2** を得、さらにヨウ素触媒を用いて脱硫環化させることでオキサゾロキナゾリノン **3** やオキサジアゾロキナゾリノン **4** を得る方法を見出した．

2―イソチオシアナト安息香酸メチル **1** に等モル量のアニリン、アミンならびにヒドラジンを水中下 60℃で反応させたところ、相当するキナゾリノン体 **2** が得られた．得られたフェノール体 **2a** (X=2-(HO)C_6H_4)ならびにベンズアミド体 **2b** (X=NHCOPh)に対し酸化剤の存在下ヨウ素を反応させたところ、脱硫環化生成物 **3** ならびに **4** が得られた．現在基質適用性を検討している．



Quinazoline and derivatives exhibit diverse range of biological activities, therefore a lot of methods for synthesizing quinazoline derivatives have been developed. In this report, we report the synthesis of three class of quinazolinone derivatives named dihydroquinazolinone **2** oxazoloquinazolinone **3** and oxadiazoloquinazolinone **4** based on iodine-catalyzed desulfurative cyclization of **2** in water.

2-Isothiocyanatobenzoate **1** reacted with amines, anilines, and hydrazines giving quinazolinones **2**. Oxazoloquinazolinone **3** and oxadiazoloquinazolinone **4** have been synthesized from **2a** (X=(HO)C_6H_4) and **2b** (X=NHCOPh) by treating catalytic amount of iodine in the presence of oxidant, respectively. Substrate scopes of the transformations are now under investigation.

quinazoline derivatives, iodine catalyst, organic solvent-free synthesis

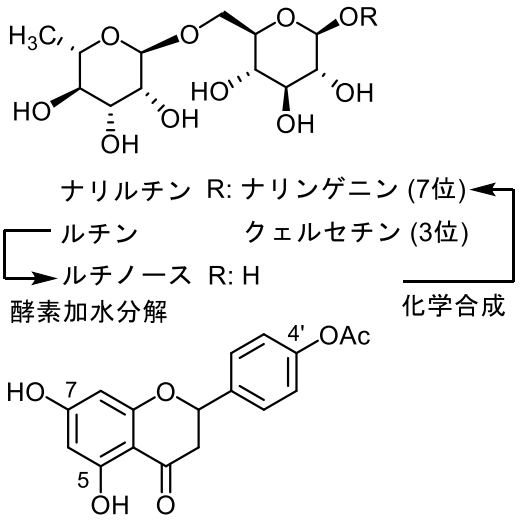
講演番号：3C4a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 C4 会場

豊富な天然資源を活用した、ナリルチンの合成

Synthesis of narirutin utilizing abundant natural resources

○須貝 威、徳田 瑠理、能勢 和明、北澤 奈津美、花屋 賢悟、東林 修平 (慶大薬)
○Takeshi SUGAI, Ruri TOKUDA, Kazuaki NOSE, Natsumi KITAZAWA, Kengo HANAYA, Shuhei HIGASHIBAYASHI (Keio Univ.)

ナリルチンは、邪祓（ジャバラ）という柑橘類に含まれるフラボノイド配糖体で、ナリンゲニンに二糖、ルチノースが結合した構造を持つ。スギ花粉症による鼻づまりの改善等が期待されているが、天然資源からの供給は限られ、従来報告された化学合成法は二糖の合成に多段階を要し位置異性体が副生するという問題点が残されていた。
演者らはルチノースを含む配糖体、ルチンが槐花（生薬：カイカ）に高濃度で含まれ入手容易なことに着目した。食品として入手可能なダッタンソバ粉に含まれるルチノシダーゼを作用させ、単糖成分に分解することなくルチノースを得た。本酵素は配糖体糖鎖に同じルチノースを含むヘスペリジンは加水分解せず、アグリコン部に関し基質特異性が狭い。得られたルチノースを全てアセチル基で保護した後、グリコシル供与体へ誘導した。一方、ナリンゲニンの 4'位のみを閉塞したグリコシル受容体を位置選択的脱アセチル化で調製した。塩基性条件下、炭酸銀をルイス酸として用いグリコシド結合をβ選択的に形成させ、最後にアセチル基を脱保護し、ナリルチンを得た。以上、従来法に比べ短段階、効率のよい実用的合成を達成した。



Narirutin is flavanone glycoside isolated from "Jabara" (*Citrus jabara*) and the fruit extract is known for the treatment of nazal depressant caused by Japanese ceder pollinosis. Less natural abundance of narirutin prompted the chemical synthetic approaches, however, previously reported examples required multistep preparation of disaccharide glycoside donor and lack of site-selectivity upon the glycosidic bond formation. Herein we realized that the preparation of disaccharide (rutinose) by the treatment with Dattan-soba powder (Tartary buckwheat, *Fagopyrum tataricum* seeds) on rutin, which was extracted from "Kaika" (*Styphnolobium japonicum*). The glysosyl acceptor with the requisite free 7-hydroxy group was prepared by the selective deacetylation of naringenin 4',7-diacetate. β-Glycosidation with glycosyl bromide and deprotection of acetyl group furnished narirutin in advanced total yield and fewer synthetic steps.

rutinose, rutinosidase, naringenin

発表責任者：須貝 威（sugai@keio.jp）

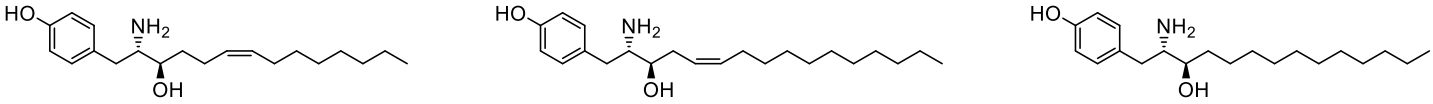
講演番号：3C4p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C4 会場

Vitroprocine 類の合成研究

Synthetic study of vitroprocines

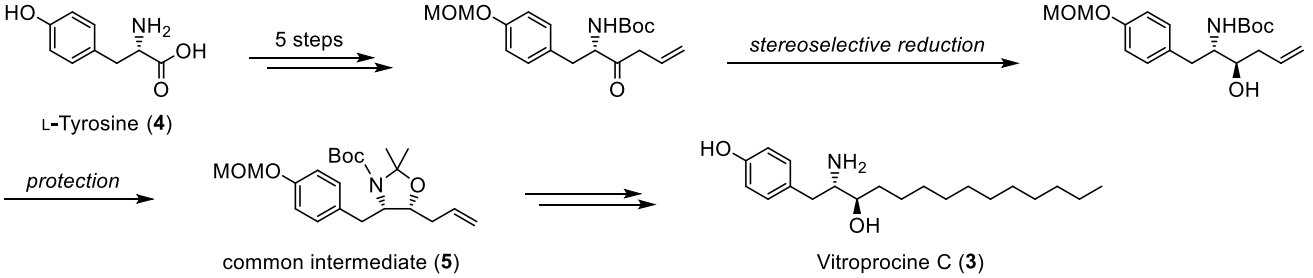
○丹 直輝、中井 成美、若森 晋之介、勝田 亮、石神 健（東農大・生命）
○Naoki TAN, Narumi NAKAI, Shinnosuke WAKAMORI, Ryo KATSUTA, Ken ISHIGAMI (Tokyo Univ. of Agic.)

Vitroprocine 類は、海洋細菌の一種である *Vibrio* sp. QWI-06 株より単離されたアミノポリケチドであり、*Acinetobacter baumannii* に対し抗菌活性を示すことが報告されている。我々は新規抗生物質として期待される vitroprocine 類の効率的な合成経路の確立を目的とし、合成研究に着手した。



Vitroprocine A (**1**)　Vitroprocine B (**2**)　Vitroprocine C (**3**)

合成にあたり、全ての vitroprocine 類に適用可能な中間体を設定し、L-チロシン(**4**)を出発原料とし、共通中間体 **5** を合成した。ケトンの立体選択的還元により生じるヒドロキシ基の立体化学は対応するオキサゾリジノンへと誘導後、NOE 実験によって決定した。さらに共通中間体 **5** に対する炭素鎖の伸長を経て vitroprocine C (**3**)の合成を達成したので、他の類縁体の合成も検討中である。



L-Tyrosine (**4**)　common intermediate (**5**)　Vitroprocine C (**3**)

Vitroprocines are natural aminopolyketides isolated from a marine bacterium, *Vibrio* sp. QWI-06, and have been reported to exhibit antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*. We started synthetic studies to establish an efficient synthetic route for the vitroprocines, which are expected as new antibiotics. Starting from commercially available L-tyrosine (**4**), the common intermediate **5** for all vitroprocines was successfully prepared in seven steps. The stereochemistry of the hydroxy group produced by the stereoselective reduction of the ketone was determined by NOE experiment after conversion to the corresponding oxazolidinone. The synthesis of vitroprocine C (**3**) was succeeded from the common intermediate **5** via carbon chain elongation, and the synthesis of other vitroprocines are now underway.

synthesis

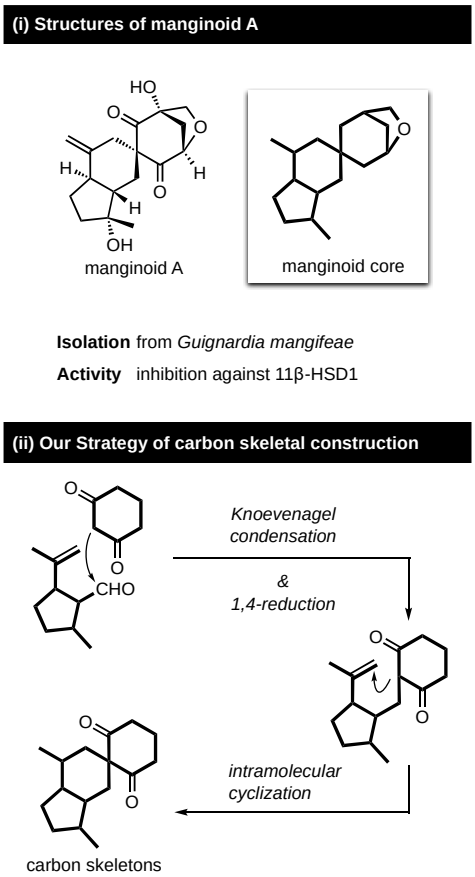
講演番号：3C4p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C4 会場

11β-HSD1 を阻害するメロテルペノイドの合成研究

Synthetic study of meroterpenoids as 11β-HSD1 inhibitor

○加藤 光輝、高橋 晴太郎、勝田 亮、石神 健、若森 晋之介（東農大・生命）
○ Mitsuki KATO, Seitaro TAKAHASHI, Ryo KATSUTA, Ken ISHIGAMI, Shinnosuke WAKAMORI (Tokyo Univ. of Agriculture)

1 型 11β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素（11β-HSD1）は過栄養やストレスによって誘導され，世界的な疾患である糖尿病に関与している。インスリン抵抗性を効果的に改善することが複数の報告で示されたことから，11β-HSD1 の低分子阻害剤は 2 型糖尿病の次世代治療薬の可能性を有している。2017 年に *Guignardia mangiferae* から単離されたメロテルペノイドである manginoid A が，既存の 11β-HSD1 阻害剤よりも 5.3 倍高い阻害活性を示したことから [1]，私たちは manginoid A を含めた manginoid 類の発散的合成法を開発した。すなわち Knoevenagel 縮合・1,4-還元に続く分子内環化反応による manginoid 類の共通炭素骨格を合成する迅速構築戦略である [2]。本大会では，種々のユニットを用いた各種炭素骨格の構築について発表する。



11β-hydroxysteroidcdehydrogenase type 1 (11β-HSD1) inducted by overnutrition and stress involves a worldwide disease, diabetes. Because several reports showed that small molecule inhibitors of 11β-HSD1 effectively improved insulin resistance, the inhibitors possibly become next-generation drug targets for obese type 2 diabetes. In 2017, 11β-HSD1 inhibitory activity of manginoid A as a manginoid meroterpene isolated from *Guignardia mangiferae* showed 5.3 times higher than the existing inhibitor, so this study developed a divergent synthesis of manginoids. The study adopted a rapid construction strategy, Knoevenagel condensation, subsequent reduction, followed by intramolecular cyclization, and synthesized the manginoids' typical carbon skeleton.

引用文献 1) H. Zhu, Y. Zhang, *et al. Org. Lett.* **2017**, *19,* 5956. 2) 山田健士郎, 山田英俊, 若森晋之介, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 福岡（誌上開催）, 2020 年 3 月.

Organic synthesis, 11β-HSD1 inhibitor, Meroterpenoids

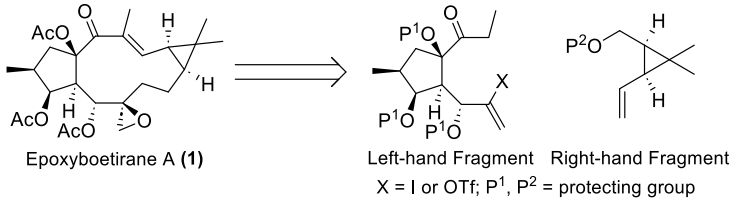
発表責任者：若森晋之介（sw207675@nodai.ac.jp）

講演番号：3C4p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C4 会場

トウダイグサ科植物由来 Lathyrane 型ジテルペン Epoxyboetirane A の左右フラグメントの合成研究
Synthetic Studies on the Right and Left-Hand Fragments of Epoxyboetirane A, a Lathyrane-Type Diterpene

○北 紗織、入江 一浩、塚野 千尋（京大院農）
○Saori KITA, Kazuhiro IRIE, Chihiro TSUKANO (Kyoto Univ.)

Epoxyboetirane A (**1**) は 2014 年に Vieira らによってトウダイグサ科の植物 *Euphorbia boetica* より単離された lathyrane 型ジテルペンである [1]。その構造は、相対立体配置を含めて、高分解能質量分析 (HR-ESI-MS)、1D および 2D NMR により決定された。本天然物は、高度に酸素官能基化された炭素数 5/11/3 員環の縮環系からなる 3 環式骨格および連続する 6 つの不斉中心を含む 8 つの不斉中心が構造的特徴として挙げられる。また、神経前駆細胞の増殖促進 [2] およびがん細胞の多剤耐性抑制などの生物活性を示すことが報告されているが [1]、その詳細な作用機構は明らかになっていない。これまでに、本天然物を含む多官能性の lathyrane 型ジテルペンの全合成の報告例はない。そこで、我々は、その生物活性評価と活性発現に重要な構造の解明を目的として epoxyboetirane A の全合成に着手した。各種構造類縁体の合成も視野に入れて、不斉中心を含む左右フラグメントを連結する収束的な経路を計画した。本発表では epoxyboetirane A の両フラグメントの合成研究について報告する。



Epoxyboetirane A (**1**), isolated from the aerial parts of *Euphorbia boetica* by Vieira *et al.* in 2014, is a lathyrane-type diterpene.[1] The structure, including its relative configuration, was determined by high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS), 1D and 2D NMR. It is structurally characterized by a highly oxygenated 5/11/3-membered fused-ring system, and 8 chiral centers, including 6 contiguous chiral centers. It showed several biological activities including the promotion of proliferation of neural precursor cells[2] and the inhibition of multidrug resistance in cancer cells;[1] however, the detailed mechanism of action remains unknown. To date, there are no reports of total synthesis of this natural product and highly oxygenated lathyrane-type diterpenes. To investigate its biological activities and structure-activity relationships, we embarked on its total synthesis through a convergent synthesis from the left and right-hand fragments containing the chiral centers. In this presentation, we will report the synthetic studies of the right and left-hand fragments of epoxyboetirane A.

1) C. Vieira, N. Duarte, M. A. Reis, G. Spengler, A. M. Madureira, J. Molnár, M.-J. U. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6392–6400; 2) E. Flores-Giubi, N. Geribaldi-Doldán, M. Murillo-Carretero, C. Castro, R. Durán-Patrón, A. J. Macías-Sánchez, R. Hernández-Galán, *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 2517–2528

Lathyrane-type diterpene, diastereoselective synthesis

発表責任者：塚野千尋（tsukano.chihiro.2w@kyoto-u.ac.jp）

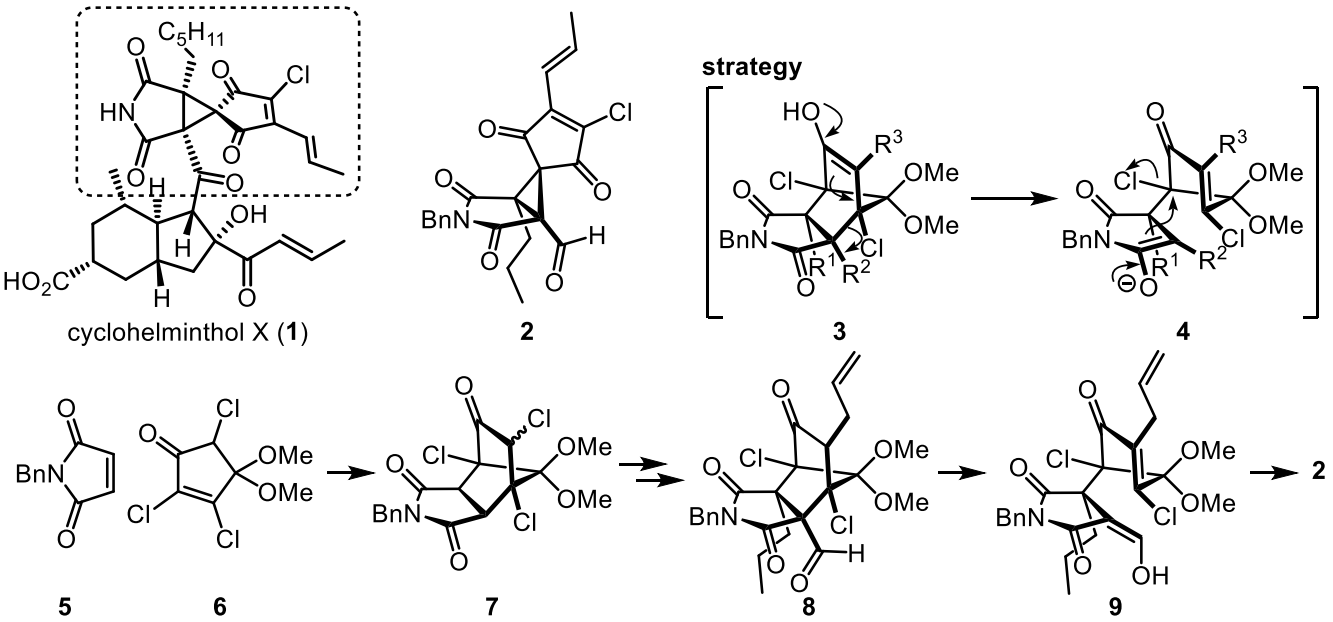
講演番号：3C4p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C4 会場

Cyclohelminthol X の合成研究
Synthetic study of cyclohelminthol X

○橋本 和樹、橋本 勝 (弘前大農生)
○Kazuki Hashimoto, Masaru Hashimoto (Hirosaki Univ.)

Cyclohelminthol X (**1**)は当研究室が単離した強力な抗菌性細胞毒で、これまでに例のない六置換 spirocyclopropane 骨格を有している。従って合成例はなく、本骨格構築法の開発は合成化学的にも興味深い。そこで演者は、**1** の点線で囲った多環コア部分の合成研究に着手、**2** の合成に成功した。予備実験の結果から、三環式化合物 **3** の R^1, R^2,及び R^3 に逐次置換基を導入した後、逆 Michael 型の環開裂を行うことで **4** を合成し、S_N2 型環化により **2** を導くルートを立案した。

5 と **6** との環化成績体 **7** へ、位置選択的に置換基を導入した。興味深いことに 2-propenyl 基を導入した **8** は自動的に環開裂し、**9** が得られた。次に dimethylketal を除去したところ、二重結合の異性化も進行し、最後に Et_3N を作用させることで **2** が得られた。



Antifungal cytotoxin cyclohelminthol X (**1**) involves an unprecedented hexa-substituted spirocyclopropane framework. Our synthetic study, featuring a retro-Michel ring opening of **3** and the subsequent cyclopropane formation, successfully elaborated the core model **2** stereoselectively.

organic synthesis, cyclohelminthol X, cyclopropane

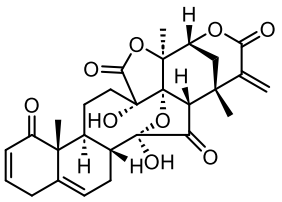
講演番号：3C4p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C4 会場

Physalin 類の合成研究

Synthetic studies on Physalin

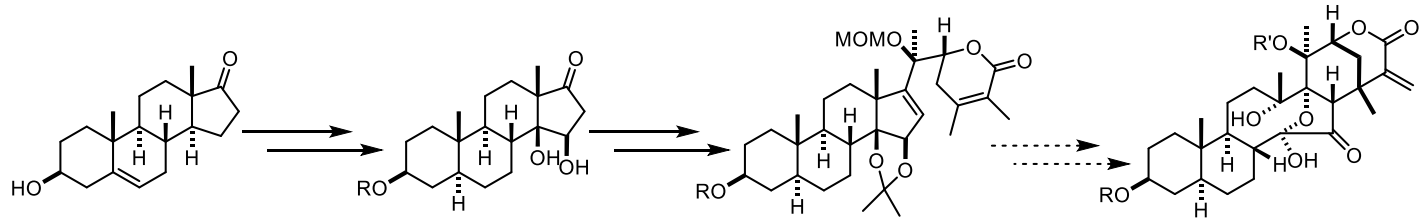
○山口 耀司、宮津 怜奈、宮坂 忠親、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Youji YAMAGUCHI, Rena MIYAZU, Tadachika MIYASAKA, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

ホオズキから単離されたフィサリン類は、アセタール架橋を持つ 9 員環構造や高度に酸素官能基化された複雑な構造を有する。フィサリン類は、抗腫瘍活性や抗炎症活性といった重要な生物活性を持つことが報告されているが、全合成は未だに達成されていない。本研究では我々が推定したフィサリンの生合成経路をもとに、フィサリンの骨格を有するモデル化合物の合成を目指した。



Physalin C

まず、デヒドロエピアンドロステロンから、D 環の修飾を含む 5 段階の反応でケトジオール **1** を合成した。次に、ジオールの保護と *δ*-ラクトン環の導入によりラクトン **2** を得た。今後は、推定生合成を模倣した反応により、モデル化合物を合成する計画である。本発表では各反応の詳細について報告する。



Physalins are steroidal natural products isolated from *Physalis* plants and they are highly oxygen-functionalized steroids including a 9-membered ring and an acetal bridge. While pyhsalins show important biological activities, such as antitumor and anti-inflammatory activity, their total syntheses have not been accomplished to date. In this research, we planned to synthesize the model compound with the physalin skeleton by a biosynthetic pathway proposed from our group.

Functionalization of the D ring of dehydroepiandrosterone gave ketodiol **1**, which was further transformed to **2** by protection of the diol and introduction of a *δ*-lactone. In the future, we plan to synthesize model compound using the transformation inspired by our proposed biosynthetic pathway. In this presentation, we will report the details.

Physalin, biomimetic synthesis, chemical synthesis

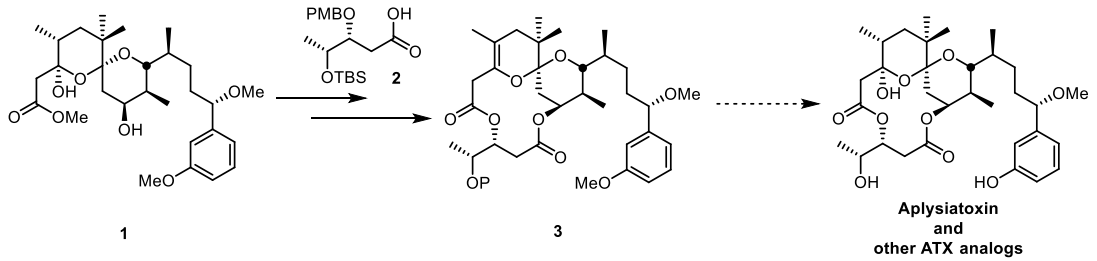
発表責任者：山口耀司（yamaguchi.youji.t3@s.mail.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C4p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C4 会場

アプリシアトキシン類縁体の網羅的合成法の開発

Collective synthesis of analogs of aplysiatoxin

○波田 航平、新木 悠介、野倉 吉彦、西川 俊夫 (名大生命農)
○KOUHEI HADA, YUSUKE ARAKI, YOSHIHIKO NOKURA, TOSHIO NISHIKAWA (Nagoya Univ.)



Aplysiatoxin (ATX) は海洋シアノバクテリアから単離されたポリケチド系天然物である。強力なプロテインキナーゼ C 活性化能を有し、構造を単純化したアナログは抗がん作用を示す。一方、多数ある他の ATX 類縁体は、いずれも天然から数 mg しか単離されず、合成法もないため詳しい生物活性が分かっていない。そこで我々はこれら ATX 類縁体を網羅的に合成し生物活性を調べることを目的に研究を行っている。化合物 **1** を共通中間体としてこれまで 5 つの ATX 類縁体の骨格構築に初めて成功し[1]、昨年の本学会で anhydroATX (**3**)をフェニルメチルエーテル体で合成したことを報告した[2]。

本講演では上記の研究をさらに発展させ、**3** からいくつかの ATX のマクロジオリド類縁体の合成を行ったことを報告する。

Aplysiatoxin (ATX) is a polyketide natural product isolated from marine cyanobacteria. ATX is a potent activator of protein kinase C, however, the biological activities of most of the other analogs have not been unknown, because of their trace amounts obtained from natural source. The objective of this study is to synthesize these ATX analogues collecting and to investigate their biological activities. We reported the synthesis of anhydroATX (**3**) as the phenylmethyl ether at this meeting of the last year.

In this meeting, we will report the synthesis of several macrodiolide analogs of ATX from **3**.

[1] Hada, K. *et. al. J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 15618–15633.
[2] 2023 年度日本農芸化学会広島大会（オンライン）2F04-01

synthesis, macrolide, marine natural product

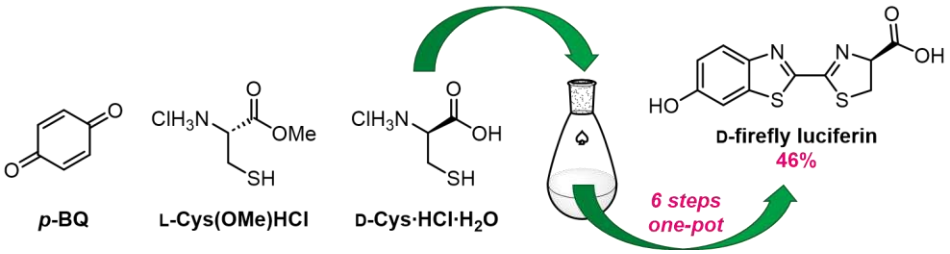
講演番号：3C4p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C4 会場

ホタルルシフェリンの実用的な one-pot 合成法の開発

Practical one-pot synthesis of firefly luciferin

○加藤 まりあ[1]、土橋 一耀[1]、蟹江 秀星[3]、大場 裕一[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]中部大応生、[3]産総研)
○Maria KATO[1], Kazuaki TSUCHIHASHI[1], Shusei KANIE[3], Yuichi OBA[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Chubu Univ., [3]AIST)

ホタルの発光基質 D-ホタルルシフェリン(L)は、酵素ルシフェラーゼ(L)とのいわゆる L-L 反応によって発光する。この発光システムは、生命科学分野の実験で広く利用されている。



2016 年に我々は、*p*-ベンゾキノン(*p*-BQ)と L-システイン(L-Cys)を緩衝液中で撹拌するだけで、L-ルシフェリンがごく低収率ながら得られる one-pot 合成反応を報告した。次いで、この one-pot 合成反応を解析し、推定した反応経路を基にして *p*-BQ、L-Cys メチルエステル、D-Cys を原料にした 6 段階の D-ホタルルシフェリンの合成法を開発した。更に、この一連の反応の one-pot 化にも成功し、その総収率は 46%であった。この one-pot 合成は、従来のルシフェリンの化学合成法と比べ操作が圧倒的に簡便であるなどの利点があり、低コストでのルシフェリンの供給法となりうる。

Firefly luciferin is the substrate of firefly luciferase, that catalyzes the bioluminescence reaction in fireflies. The bioluminescence system is indispensable in life science experiments.

In 2016, we found one-pot synthesis of L-firefly luciferin in neutral buffer from *p*-benzoquinone (*p*-BQ) and L-cysteine (L-Cys). Based on the analysis of this one-pot synthesis, we developed the chemical synthesis of D-luciferin in 6 steps from *p*-BQ, L-Cys methyl ester and D-Cys. The reactions included in this synthesis could be performed in one-pot, giving the luciferin in 46% overall yield. This one-pot synthesis has advantages over the previously reported synthetic methods, in terms of easily operations etc., and may enable a low-cost supply method of the luciferin.

firefly luciferin, one-pot synthesis, bioluminescence

講演番号：3C4p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C4 会場

ミトコンドリア機能阻害剤 fusaramin の全合成による立体化学構造の決定、構造活性相関の解明、新規抗真菌活性の発見

Determination of the Stereochemical Structure, Elucidation of the Structure-Activity Relationship, and the Discovery of Novel Antifungal Activities by the Total Synthesis of Fusaramin, an Inhibitor of Mitochondrial Function

○君嶋 葵[1,2]、萩本 大地[1]、本庄 雅子[1,2]、坂井 克行[1]、本間 颯太[1,2]、藤 晋一[3]、岩月 正人[1,2]、常盤 俊之[2]、野中 健一[1,2]、知念 拓実[4]、臼井 健郎[5]、浅見 行弘[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大大村研、[3]秋田県大生資、[4]東大院薬、[5]筑波大生命環境)

○Aoi Kimishima[1,2], Daichi Hagimoto[1], Masako Honsho[1,2], Katsuyuki Sakai[1], Sota Honma[1,2], Shin-ichi Fuji[3], Masato Iwatsuki[1,2], Toshiyuki Tokiwa[2], Kenichi Nonaka[1,2], Takumi Chinen[4], Takeo Usui[5], Yukihiro Asami[1,2] ([1]Kitasato University, [2]Ōmura Satoshi Memorial Institute, [3]Akita Prefectural University, [4]The Univ. of Tokyo, [5]University of Tsukuba)

出芽酵母は真核生物のモデル生物として知られ、その汎用性の高さから、様々な研究ツールとして、利用されてきた。しかしながら、薬剤探索ツールとしては、その薬剤感受性の低さから新規薬剤の探索は困難となっていた。そこで、我々は、薬剤感受性に関わる 12 個の遺伝子を破壊した薬剤超感受性出芽酵母株を作製し、新規抗真菌化合物の探索を行ってきた。さらに、得られた化合物群をその後の広範囲な抗真菌活性評価スクリーニングに供することで、見逃されていた生物活性を見出すことに成功している。そのような背景のもと、fusaramin (**1**)が本探索系において、ミトコンドリア機能阻害を示す、新規テトラミン酸骨格含有天然物として発見された。しかし、**1** の生産菌の変異により、発酵による取得が困難となったため、一部の立体化学に関しては、未決定のままであり、高次生物活性評価もなされていなかった。そこで、我々は全合成による、**1** の供給を行うことで課題を解決することにした。本研究では、全合成法の確立を通して、未解明である **1** の立体化学構造の決定、構造活性相関の解明、さらには、抗真菌活性評価スクリーニングを通して、新たな生物活性の発見を期待した。本大会では、その詳細を報告する。

Saccharomyces cerevisiae is known as a model eukaryotic organism and has been used as a research tool for various purposes due to its versatility. However, as a drug search tool, the search for new drugs has become difficult due to its low drug sensitivity. Therefore, we constructed a multi drug sensitive budding yeast strain in which 12 genes related to drug sensitivity were disrupted and searched for new antifungal compounds. In addition, compounds obtained in the process have been found to have overlooked biological activities by subsequent extensive antifungal activity evaluation screening. Under these circumstances, fusaramin (**1**) was discovered as a novel tetramic acid containing natural product exhibiting mitochondrial function inhibition in this search system. However, due to the mutation of the producer of **1**, it became difficult to obtain by fermentation. Therefore, some stereochemistry remains undetermined and the detailed biological activity study has not been evaluated. Therefore, we decided to supply **1** by total synthesis. In this study, through the establishment of a total synthesis method, the determination of the unsolved stereochemical structure of **1**, the elucidation of the structure-activity relationship, and the screening for evaluation of antifungal activity, we expected to discover new biological activities. In this meeting, we report details on the achievement of total synthesis, the elucidation of stereochemical structures, structure-activity relationships, and new activities against pathogenic fungi.

Natural product, Mitochondrial inhibitor, Multidrug-sensitive yeast

講演番号：3C4p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C4 会場

合成生物学を基盤とした赤痢アメーバ病治療薬開発

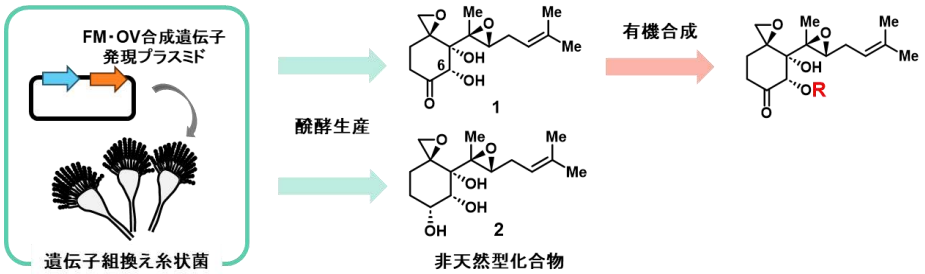
Synthetic biology-based development of antiamoebic agents

○池田 朋奈[1]、大倉 優輝[1]、緒方 南海子[2]、北 将樹[3]、渡辺 賢二[2]、志津 怜太[2]、森 美穂子[4]、中野 由美子[5]、野崎 智義[4]、恒松 雄太[3] ([1]名大農、[2]静岡県大薬、[3]名大院生命農、[4]東大医、[5]国立感染研)

○Tomona IKEDA[1], Yuki Okura[1], Namiko OGATA[2], Masaki KITA[3], Kenji WATANABE[2], Ryota SHIZU[2], Mihoko MORI[4], Yumiko NAKANO[5], Tomoyoshi NOZAKI[4], Yuta TSUNEMATSU[3] ([1]School of Agricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Univ. of Shizuoka, [3]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [4]The Univ. of Tokyo, [5]NIID)

赤痢アメーバ症は世界人口の約１％が感染している腸管感染性原虫症である。現行治療薬であるメトロニダゾールは遺伝毒性などの副作用や薬剤耐性原虫の出現が認められており、新規薬剤の開発が求められている。これを解決するため本研究では、従来の半合成とは異なる、化学合成と生合成遺伝子の発現制御を組み合わせた独自手法による新規薬剤の創製を試みた。

フマギリン(FM)産生菌およびその構造類縁体オバリシン(OV)産生菌から得た生合成遺伝子を組み合わせ、*Aspergillus nidulans* を宿主とし異種発現させることで FM・OV よりも強力な抗アメーバ活性を示す非天然型化合物 **1** を得た。さらに **1** はその構造中に構造展開の足掛かりとして利用できる部分構造を有していた。そこで、ジャーファーメンターを用いた大量培養を行うことにより、**1** をグラムスケールにて獲得し、有機合成による構造展開を行った。このようにして合成した化合物の *in vitro* および *in vivo* における抗アメーバ活性を評価している。これまでの研究で、**1** の 6 位水酸基をアセチル化した化合物が抗アメーバ活性、薬物代謝抵抗性を示していた。そこで本研究では本修飾位置のエステル化による構造展開を行った。また、現在取組んでいる、**1** を生産する生合成経路をさらに改変し、非天然型化合物 **2** を異種発現により獲得する研究についても紹介したい。



Dysentery amebiasis, caused by *Entamoeba histolytica*, affects 1% of the global population. The current treatment has concerns such as potential genotoxicity and the emergence of drug-resistant mutants. Therefore, developing a new drug remains imperative.

As amoebacidal candidates, we expressed the biosynthetic genes for fumagillin and its analog ovalicin in a heterologous host, *Aspergillus nidulans*. This genes-to-molecules system allowed us to design and create unnatural-type natural products, one of which **1** exhibited potent activity. Of note, optimizing the fermentation condition enabled us to obtain **1** with a gram scale. Thus, the structure of **1** was further modified through synthetic derivatization, and the compounds were evaluated by cell-based in vitro assay followed by animal tests.

heterologous expression, biosynthesis, Entamoeba histolytica

講演番号：3C4p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C4 会場

新規 MetAP1 阻害剤の探索と作用機序の解明
Investigation of a novel MetAP1 inhibitor and elucidation of its mechanism of action
○安藤 知佳[1]、板倉 萌香[1]、北 将樹[1]、緒方 南海子[2]、志津 怜太[2]、恒松 雄太[1] ([1]名大院生命農、[2]静岡県大薬)
○ Chika ANDO[1], Moeka ITAKURA[1], Masaki KITA[1], Namiko OGATA[2], Ryota SHIZU[2], Yuta TSUNEMATSU[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

メチオニンアミノペプチダーゼ（MetAP）は、新生されたタンパク質の N 末端のメチオニン残基を選択的に切断する酵素であり、タンパク質の代謝回転や細胞増殖など多くの細胞プロセスの調節に関与する。真核生物には MetAP1 と MetAP2 のアイソザイムが存在するが、詳細な活性や機能差などは未解明である。これまでに MetAP1 阻害剤はほとんど知られていなかったが、我々は試験管内で化合物 **X** が MetAP1 を強力かつ選択的に阻害することを発見した。本研究では簡便な MetAP 酵素活性測定法の開発、および MetAP1 の選択的阻害剤の作用機序の解明を目的とした。

MetAP 酵素活性測定法について、既存の DPPIV を使用する方法ではなく、L-メチオニンと自己切断リンカー、蛍光色素を組込んだプローブを作製することで、より簡便な測定法を開発した。

また、化合物 **X** がヒト細胞内 MetAP1 に結合・阻害することを確かめるために、化合物 **X** の活性に影響を与えない位置にアルキンタグを導入したプローブ前駆体 **1** を合成し、細胞内でクリック反応によりビオチンタグと結合させた後、プルダウンを行うことで化合物 **X** の細胞内結合タンパク質を検出した。加えて、プロテオーム解析を行うことで MetAP1 の相互作用タンパク質を同定し、化合物 **X** が引き起こす表現型へ影響する因子を明らかにした。

Methionine aminopeptidase (MetAP) is an enzyme that selectively cleaves the N-terminal methionine residue of newly synthesized proteins and is involved in the regulation of many cellular processes, including protein metabolic turnover and cell growth. Generally, isozymes MetAP1 and MetAP2 are present in eukaryotes, but their detailed activities and functional differences are unknown. Although few MetAP1 inhibitors were reported, we found that compound **X** strongly and selectively inhibits MetAP1 *in vitro*. In this study, we aimed to develop a simpler method to detect MetAP enzyme activity and reveal a mechanism of action of compound **X** via MetAP1 inhibition.

We initially developed a new fluorescent probe to detect MetAP enzyme activity without the DPPIV enzyme. To confirm that compound **X** binds and inhibits MetAP1 in human cells, we synthesized a precursor probe **1** with an alkyne tag at a position that does not affect the activity of compound **X**. Intracellular binding proteins of compound **X** are detected by treating cells with precursor probe **1**, binding it to the biotin tag in a click reaction, and then conducting a pull-down assay. In addition, we performed proteomic analysis to identify MetAP1 interacting proteins and factors that influence the phenotype induced by compound **X**.

MetAP, enzyme activity, selective inhibition

講演番号：3C4p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C4 会場

合成ユビキノンプローブを用いた出芽酵母のユビキノン取り込みに関与するタンパク質の探索

Comprehensive screening of the proteins involved in the trafficking of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic ubiquinone probe

○水谷 みらい[1]、黒田 聖奈[1]、奥 公秀[2]、桝谷 貴洋[1]、村井 正俊[1]、三芳 秀人[1]([1]京都大院農、[2]京都先端科学大 バイオ環境学部)
○ MIRAI MIZUTANI[1], SEINA KURODA[1], MASAHIDE OKU[2], TAKAHIRO MASUYA[1], MASATOSHI MURAI[1], HIDETO MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyto Univ. of Advanced Science)

【背景と目的】“コエンザイム Q”の名称で広く知られているユビキノン（UQ）は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（ATP 合成）に必須の脂溶性分子であり、その生合成はミトコンドリア内膜で完結する。一方、サプリメントのような形で供給された外来の UQ 類はミトコンドリアに特異的に蓄積することがわかっているが、どのような仕組みで外来 UQ がミトコンドリアに輸送されるのかは全くわかっていない。本研究では、独自に合成した UQ プローブを活用し、出芽酵母 UQ 生合成欠損株（*Δcoq2*）において、外来 UQ の細胞内輸送に関与するタンパク質を同定することを目的とした。

【方法と結果】長鎖 UQ のプレニル側鎖末端に光反応基（ジアジリン）およびクリックケミストリーの足場となる末端アルキンを導入した pUQ5 を合成した(図 1)。pUQ5 はグリセロール（呼吸系）培地での出芽酵母 *Δcoq2* 株の生育を、天然 UQ_6 と同等のレベルで相補した。この結果は、pUQ_5 が UQ_6 と同様にミトコンドリアへ能動輸送され、電子伝達担体として機能していることを意味する。pUQ5 存在下で生育させた *Δcoq2* 株をミトコンドリア、ミクロソームおよび細胞質画分に分画し、それぞれ光親和性標識を行ったところ、ミトコンドリア画分の分子質量 20～30 kDa の領域に強く標識されるタンパク質が複数検出された。これらのタンパク質の解析を進めたところ、ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル 1（VDAC1）や、呼吸鎖複合体-IV のコアサブユニットである COX3 を含む複数のタンパク質が同定された。

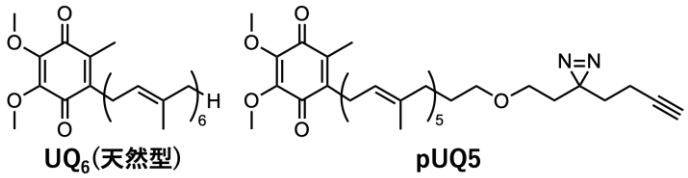


図 1. UQ_6 と pUQ5 の構造

Ubiquinone (UQ), also known as “coenzyme Q”, is an essential player in mitochondrial respiratory chain. Although biosynthesis of UQ is completed in mitochondria, exogenous UQs are known to be taken up and delivered to mitochondria through an unknown mechanism. To get an insight into the mechanism of the intracellular trafficking of UQ via chemistry-enabled strategies, we synthesized a hydrophobic UQ probe (pUQ5), which has a photoreactive diazirine group attached to a five-unit isoprenyl chain and a clickable terminal alkyne. Through photoaffinity labeling of mitochondria isolated from the UQ-deficient *S. cerevisiae Δcoq2* cells cultured in the presence of pUQ5, we identified labeled proteins with apparent molecular masses ranging from ~20 to ~30 kDa, including voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) and cytochrome *c* oxidase subunit 3 (COX3).

ubiquinone, photoaffinity labeling, click chemistry

発表責任者：水谷みらい（mizutani.mirai.66e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C4p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 C4 会場

ミトコンドリア膜透過性亢進を阻害するイソオキサゾール類の作用機構研究

Defining the action mechanism of diarylisoxazole-3-carboxamides, small molecule inhibitors targeting the mitochondrial permeability transition

○渡辺 大賀、桝谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農）
○Taiga WATANABE, Takahiro MASUYA, Masatoshi MURAI, Hidero MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリアは、酸化ストレスなどに起因して過剰の Ca^{2+}が取り込まれると、内膜の物質透過性が増大し、シトクロム *c* の漏出やミトコンドリアの膨潤が誘起される。この現象は膜透過性亢進と呼ばれ、細胞死の鍵現象のひとつと考えられている。近年では心筋梗塞や脳梗塞で生じる酸化ストレス傷害にも膜透過性亢進が関与することが明らかになり、薬剤標的としても注目されているが、本現象に関与するタンパク質群の実体は不明である。2015 年、イタリアの研究グループがミトコンドリア膜透過性亢進の特異的阻害剤としてイソオキサゾール骨格を有する一連の類縁体を見出したが（DIC 類、**図 1**）、その標的タンパク質や作用機構の詳細は現在に至るまで報告されていない。本研究では、光親和性標識実験による DIC 類の標的同定を足掛かりとして、膜透過性亢進に関与するタンパク質群の実体を明らかにすることを目指した。

【結果】光反応性イソオキサゾール（[^{125}I]pDIC、**図 1**）を合成し、ラット肝臓ミトコンドリアを用いて膜透過性亢進の阻害活性を評価した結果、本化合物は **DIC1** と同等の活性を示した。[^{125}I]pDIC によって標識されたラットミトコンドリアをヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーや Blue-Native/SDS-PAGE によって解析すると、“ミトコンドリア膜輸送体”と呼ばれるイオンや代謝物の輸送に関わる膜タンパク質群を含む画分に強く標識を受けるタンパク質が検出され、その一つはリン酸輸送体であった。対照的に、呼吸鎖酵素複合体や F_oF_1-ATP 合成酵素を含む画分からは特異的な標識は認められなかった。

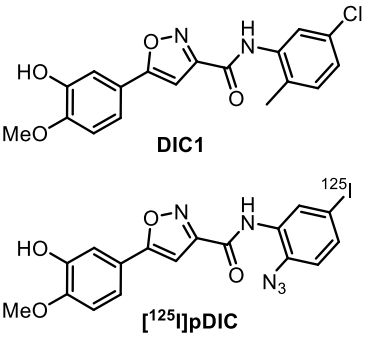


図 1. DIC 類の構造

The opening of mitochondrial permeability transition pore (PTP) is a phenomenon where an increase in cytosolic Ca^{2+} level leads to enhanced permeability of the mitochondrial inner membrane. A series of small molecules sharing isoxazole scaffolds (DICs) has been reported to suppress the PTP opening. In an effort not only to identify the target protein of DIC but also to shed light on the key components involved in mitochondrial PTP, we synthesized a photoreactive DIC ([^{125}I]pDIC). Photoaffinity labeling of rat liver mitochondria with [^{125}I]pDIC, followed by hydroxyapatite chromatography and BN/SDS-PAGE, led to identification of proteins within the fraction containing mitochondrial solute carrier family proteins, including a phosphate carrier. On the other hand, no specific labeling was found in the proteins that constitute F_oF_1-ATP synthase and respiratory complexes.

mitochondria, permeability transition, isoxazole

発表責任者：三芳 秀人（miyoshi.hideto.8e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C4p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 C4 会場

リン脂質-キナゾリン・ハイブリッド阻害剤を用いた呼吸鎖複合体-I のキノン反応ポケットの解析
Characterization of the quinone-binding pocket of respiratory complex I using a PC-quinazoline hybrid inhibitor

○大谷 燎平、志村 優介、桝谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農）
○Ryohei Otani, Yusuke Shimura, Takahiro Masuya, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素である NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。複合体-I のクライオ EM 構造を参照すると、ユビキノン（UQ）反応部位は入口内径が約 5 Å、奥行きが約 30 Å の狭く長い“トンネル様”の構造をとっており、阻害剤もこのトンネル内に結合すると考えられている。一方、我々はこれまでに有機化学をベースとする諸々の実験から、UQ 反応部位に対するキノン類や阻害剤の反応・結合様式は、トンネルモデルで説明できるほど単純なものではないことを主張してきた。本研究では、UQ 反応ポケットの構造と機能に関する新たな知見を得ることを目的とし、脂質のアシル鎖に組み込むことで動きを制限した阻害剤分子の挙動を解析した。

【方法と結果】UQ 反応部位に結合する阻害剤のキナゾリンに着目し、リン脂質-キナゾリンハイブリッド阻害剤を合成した（PC-Qz1、**図1**）。当研究室で確立されたウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMPs）とリポソームの膜融合を利用したアッセイ系を用いて、PC-Qz1 を SMPs 中に導入し阻害活性を評価したところ、複合体-I を阻害できることがわかった。この結果から、SMPs 中の UQ 反応部位は、膜中での動きが制限された阻害剤でも収容できるほどダイナミックに構造変化していることが示唆された。一方で、ミトコンドリア内膜から単離・精製した複合体-I を含むプロテオリポソーム再構成系では複合体-I に対しては阻害活性が無いことが判明した。先行研究も考慮すると、この矛盾する結果は、SMPs 中の複合体-I と単離した複合体-I では、UQ 反応部位に何らかの構造的な差異があることを示唆している。

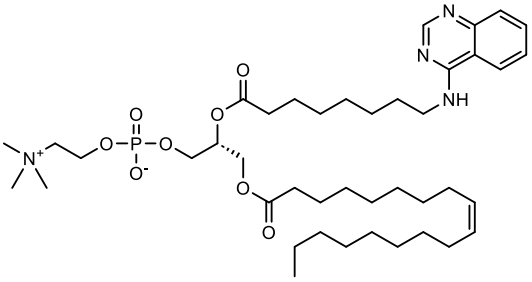


図 1 ：PC-Qz1 の構造

The architectures of ubiquinone (UQ)-accessing tunnel in H^+-translocating NADH-UQ oxidoreductase (complex I) were modeled by cryo-EM studies. However, it remains to be examined whether the prevailing tunnel model reflects physiologically relevant state(s) of the enzyme. Herein, the accessibility of a PC-quinazoline hybrid inhibitor to the proposed tunnel was evaluated using bovine heart submitochondrial particles (SMPs) fused with liposomes containing UQs. We found that even lipid-like quinazoline, which are unlikely to transit the narrow tunnel, can inhibit the electron transfer in complex I.

respiratory complex I, phospholipids, quinazoline

発表責任者：大谷燎平（otani.ryohei.72a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C4p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 C4 会場

Sphingobacterium SPT 代謝産物３-ケトジヒドロスフィンゴシンの立体解析

Stereo analysis of 3-keto-dihydrosphingosine metabolized by *Sphingobacterium* SPT

○村井 勇太[1,2]、本田 拓巳[3]、生城 浩子[4]、矢野 貴人[4]、門出 健次[2]([1]北大院農、[2]北大院先端生命、[3]北大院生命、[4]大阪医薬大・医)

○Yuta MURAI[1,2], Takumi HONDA[3], Hiroko IKUSHIRO[4], Takato YANO[4], Kenji MONDE[2] ([1]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ., [4]Dept. Biochem., Fac. Med., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】 スフィンゴイド脂質は炭素 2 位および 3 位の二箇所に不斉中心が存在し、生体分子にみられる立体構造は D-*erythro* 体 (2*S*, 3*R*)であるとされる。これはスフィンゴ脂質の最初の生合成反応であるセリンパルミトイル転移酵素 (SPT)よる 3-ケトジヒドロスフィンゴシン (KDS)の基質 L-セリンと KDS 還元酵素によるカルボニル基の立体選択的還元に由来する。また SPT は L-セリンだけでなくグリシンや L-アラニン、L-ホモセリンといったアミノ酸も代謝することが報告されている[1]。しかし、これまでに天然 KDS の立体構造を科学的に証明した例はない。そこで本研究では KDS の立体解析法を確立するとともに SPT に代謝された天然 KDS の立体構造を解析することとした。
【方法・結果】 はじめにキラル HPLC 分析のスタンダードとなる L-体 KDS と D-体 KDS を調製した。次に KDS への蛍光基を種々導入検討した結果、ラセミ化することなくクマリン導入した KDS が CHIRALPAK IB カラムを用いた条件において分離係数 1.29 で効率よく分離することに成功した。続いて、この方法を用いて *Sphingobacterium* 由来の SPT にてよって代謝された KDS の立体構造を解析したところ、L-セリンから代謝された KDS はラセミ体であることが初めて確認された。さらに *Sphingobacterium* 由来 SPT は D-セリンも基質と認識し、これもラセミ体の KDS を生産した。現在、その反応機構について検討を行なっている。

Sphingolipids have two chiral centers at the 2- and 3-carbon positions, and the stereochemistry found in biomolecules is the D-*erythro* (2*S*, 3*R*) form. This is due to the first biosynthetic reaction of sphingolipids from L-serine by serine palmitoyltransferase (SPT), followed by the stereoselective reduction of the carbonyl group of 3-keto-dihydrosphingosine (KDS). In addition, it has been reported that SPT metabolizes not only L-serine but also other amino acids such as glycine, L-alanine, and L-homoserine [1]. However, there has been no scientific evidence of the stereochemistry of natural KDS. In this study, we established a novel method for stereoanalysis of KDS and revealed the stereochemistry of natural KDS metabolized by *Sphingobacterium* SPT. Firstly, L- and D-KDS, which are the standards for chiral HPLC analysis, were prepared. Next, we investigated the introduction of various fluorescent groups into KDS and succeeded in efficiently separating coumarin-KDS with a separation factor of 1.29 using a CHIRALPAK IB column. Furthermore, we confirmed the stereochemistry of KDS metabolized by *Sphingobacterium* SPT was racemic for the first time.

参考文献

1) Ikushiro H., *et al.* (2023) *J. Biol Chem.*, **299**, 104684.

sphingolipid, serine palmitoyltransferase, chiral

講演番号：3C5a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 C5 会場

Isolation and preliminary analysis of the protein-based sheath derived from *Haliscomenobacter hydrossis*

○Anushka DINESH, Nozomi MASUZAWA, Yuta NAKANISHI, Jitsusen CHINN, Minoru TAKEDA (Yokohama Natl. Univ.)

[Background and objective] *Haliscomenobacter hydrossis* is an aerobic filamentous bacterium, that is commonly found in activated sludge. This bacterium is considered to be one of the bacteria involved in poor settling problem (filamentous bulking) of activated sludge. It is the only microtubular sheath-forming bacterium that belongs to the phylum *Bacteroidota.* Other sheath-forming bacteria belong to phylum *Proteobacteria* and their sheaths are reported to be assembled of glycan or dipeptide-grafted glycan. There has been no attempt to isolate and analyze the *H. hydrossis* sheath. In this study, we found that *H. hydrossis* forms protein-based sheath different from the sheath-formers belong to the phylum *Proteobacteria*.

[Methods] *H. hydrossis* ATCC27775 was grown in a medium of low C/N ratio mainly composed of soitone peptone to prevent accumulation polyhydroxy alkanoic acid granule accumulation. After cultivation, filaments (cells) were recovered by centrifugation and then cellular disruption was carried out by lysozyme treatment and subsequent heat treatment in the presence of SDS and 2-mercaptoethanol. The lysate suspension was acidified with HCl and the sheath was recover by centrifugation. To complete the removal of cell debris, electroelution (electrolyte: Tris-glycine buffer containing SDS) was performed while trapping the sheath with a membrane filter (pore size 8.0 μm). The purified suspension was dialyzed against water using a dialysis apparatus equipped with a membrane filter to remove the electrolytes. The dialysate was lyophilized to obtain purified sheath for analysis.

[Results] SEM observation suggested that the sheath is closed-ended. The recovery of the purified sheath (as dried matter) was 15 mg/550 mg-filament. As far as observed by SEM, the purified sheath retained the microtube structure. GC and TLC analyses of acid hydrolysate of the sheath indicated the absence of sugars as a major component. Bound-lipid extraction test revealed no lipid component in the sheath. The sheath was found to be degraded by a non-specific proteinase (Pronase E) and was deduced to be composed of protein. By amino acid composition analysis (hydrolysis with 6 M HCl), a complex mixture of amino acids in varying percentages was detected. The sheath was degradable with elastase (acts on Val-Xaa) but not with papain (not act on Xaa-Val), suggesting that Val is important in sheath formation. When the sheath was degraded with 1 M NaOH at 80 °C overnight, water soluble polymer which is expected to comprise about 20% of the sheath was released. We believe that the *H. hydrossis* is the first bacterial sheath mainly composed of protein.

Haliscomenobacter hydrossis, microtube, composition analysis

発表責任者：Minoru Takeda（takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp）

講演番号：3C5a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 C5 会場

細菌細胞内に局在するファージ尾部様粒子が有する推定エフェクタータンパク質の同定
Identification of a candidate effector protein of intracellular phage tail-like nanostructures
○永久保 利紀[1,2]、西山 辰也[3]、浅水 俊平[4,5]、尾仲 宏康[4,6]、野村 暢彦[1,2,7]、豊福 雅典[1,2]([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・MiCS、[3]日本大・生物資源、[4]東大院・農、[5]神戸大・先端バ イオ、[6]学習院大・理、[7]筑波大・TARA)
○Toshiki NAGAKUBO[1,2], Tatsuya NISHIYAMA[3], Shumpei ASAMIZU[4,5], Hiroyasu ONAKA[4,6], Nobuhiko NOMURA[1,2,7], Masanori TOYOFUKU[1,2] ([1]Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba, [3]College of Biores. Sci., Nihon Univ., [4]Grad. Agri. and Life Sci., Univ. Tokyo, [5]EGBRC, Kobe Univ., [6]Facul. Sci., Gakushuin Univ., [7]TARA center, Univ. Tsukuba)

多くの微生物がファージの尾部に似た構造体 (Contractile Injections Systemes: CISs)をコードする遺伝子群を保持している。CISs にはエフェクタータンパク質を注入する機構としての極めて多様な生物学的機能が備わっていることが示唆されており、構造タンパク質のドメイン改変等によるナノ医療などへの応用可能性も大きな注目を集めている。一方で、現状では CISs が搭載するエフェクターの詳細な機能解析はほとんど行われておらず、これが CISs の生物学的機能の解明を阻む原因の一つとなっている。この背景の下、当研究グループは放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 が産生する CIS 様粒子 SLP にペプチドタグを付加して細胞破砕液から単離する系を確立し、この単離画分からエフェクター候補タンパク質 SlpX を見出した。SlpX は CIS エフェクターのコアドメインとして提唱されている DUF4157 を含むタンパク質である。*E. coli* で異種発現させた SlpX は検出可能な細胞毒性を示さず、これは SlpX の N 末端に *E. coli* 由来分泌シグナル配列を付加した場合でも同様だった。さらに、種々のバイオインフォマティクス解析および酵素学的解析により、SlpX がペプチド N 末端に位置する L-アラニンに対して比較的高い特異性を有する aminopeptidase として機能しうることが示された。以上の研究成果は、ユニークな細胞内局在を示す SLP が有するエフェクター依存的な機能の解明につながる。
Gene clusters encoding Contractile Injection Systems (CISs) are conserved in many bacterial genomes. CISs can load and eject effector proteins with diverse functionalities and the unique functions of CISs have the great potential as programmable protein delivery systems. However, functional characterization of CIS effectors has been limited to a few CISs. Here, we identified a candidate effector protein (SlpX) of SLP, a CIS-like nanoparticle produced by *Streptomyces lividans* TK23. SlpX was detected from the His_6-tagged SLPs isolated from mycelial lysates by Ni^{2+}-affinity chromatography. SlpX has DUF4157, a proposed core domain of CIS effector proteins. Heterologous expression of SlpX with or without an *E. coli*-derived secretion signal peptide did not cause cytotoxicity. Furthermore, bioinformatic and biochemical analyses collectively indicated that SlpX exhibits aminopeptidase activity which hydrolyzes the peptide bond at the N-terminus of a substrate peptide. SlpX has relatively higher specificity to the N-terminal L-alanine. These findings will lead to the elucidation of effector-dependent functionality of SLP.

Contractile injection systems, Streptomyces, Peptidase

発表責任者：永久保 利紀（nagakubo.toshiki.gp@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C5a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 C5 会場

Actinoplanes missouriensis の胞子嚢膜形成に関わる遺伝子 *AMIS_66880-66890* の発見と機能解析
Identification of *AMIS_66880-66890* as key genes for sporangium membrane formation in *Actinoplanes missouriensis*

○伊藤 颯人[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,3]([1]東大院・農生科・応生工、[2]北里大・感染制御、[3]東大・微生物イノベ連携機構)
○Hayato ITO[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., [2]Grad. Sch. of Infection Control Sci., Kitasato Univ., [3]CRIIM, Univ. of Tokyo)

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸生長により増殖した後、多数の胞子を内包する胞子嚢を形成して休眠状態になる。胞子嚢は水に浸されると開裂し、胞子を放出する。過去の研究において、胞子嚢表層の胞子嚢膜を粗精製し、構成成分を解析した結果、膜タンパク質 SmpA が胞子嚢膜に局在すること、*smpA*(*AMIS_66900*) 破壊株（Δ*smpA* 株）では正常な形態の胞子嚢が形成されず、放出される胞子数が激減することが判明していた。本研究では、胞子嚢形成機構の解明を目的として、Δ*smpA* 株を親株として、胞子嚢から放出される胞子数が回復したサプレッサー変異株を取得し、原因遺伝子の特定と機能解析を行った。サプレッサー株を 4 株取得し、ゲノム解析を行ったところ、いずれも *AMIS_66890* に変異が生じていた。*AMIS_66890* は *AMIS_66880* とオペロンを形成し、それぞれポリケタイド合成酵素および flippase をコードしていると予想された。そこで、野生株とΔ*smpA* 株を親株として遺伝子破壊株（Δ*66880-66890* 株, Δ*smpA*Δ*66880-66890* 株）を作製し、表現型観察を行った。Δ*66880-66890* 株およびΔ*smpA*Δ*66880-66890* 株では胞子嚢が水中ですぐに崩壊して胞子が放出された。また、Δ*66880-66890* 株の胞子嚢切片の TEM 観察を行った結果、野生株では 3 層で構成される胞子嚢膜のうち最も厚い中間層が非常に薄い、あるいは消失していた。したがって、*AMIS_66880-66890* はこの中間層の形成に関与していることが示唆された。

Actinoplanes missouriensis forms sporangia, which contain a few hundreds of zoospores, to enter a dormant state after mycelial growth. In this study, we conducted functional analysis of the *AMIS_66880-66890* operon to elucidate the mechanism of sporangium formation, because *AMIS_66890* was identified as a gene responsible for the phenotypic changes observed in suppressor mutants derived from a sporangium formation-deficient *smpA* null mutant strain. *AMIS_66890* and *AMIS_66880* encode type-I PKS and flippase, respectively. Phenotypic observations of the Δ*66880-66890* and Δ*smpA*Δ*66880-66890* mutant strains revealed that the sporangia of the Δ*66880-66890* and Δ*smpA*Δ*66880-66890* strains collapsed rapidly in water, releasing zoospores. Additionally, thin-section microscopy of the Δ*66880-66890* sporangia revealed that Layer B, the thickest of the three layers constituting the sporangium membrane, became extremely thin or disappeared. Therefore, *AMIS_66880-66890* seems to be involved in the formation of Layer B.

Actinoplanes missouriensis, Sporangium membrane, Transmission electron microscopy

発表責任者：伊藤颯人（ito-hayato-0926@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 C5 会場

シアノバクテリアに見出された機械受容チャネルによる代謝物の新奇放出機構

A novel release system of metabolites regulated by mechanosensitive channels in cyanobacteria

○釜阪 紘平[1]、加藤 悠一[2]、秀瀬 涼太[2]、松田 真実[2]、近藤 昭彦[1]、蓮沼 誠久[2] ([1]神戸大学イノベ、[2]神戸大学先端バイオ)
○Kouhei KAMASAKA[1], Yuichi KATO[2], Ryota Hidese[2], Mami MATSUDA[2], Akihiko KONDO[1], Tomohisa HASUNUMA[2] ([1]Kobe Univ. STIN, [2]Kobe Univ. EGBRC)

シアノバクテリアにおいて、glucose 1-phoshate adenylyl transferase 遺伝子 (*glgC*) が欠損すると主要な炭素貯蔵物質であるグリコーゲンの蓄積が完全に失われる。*Synechococcus elongatus* PCC 7942 において、*glgC* 欠損株は窒素枯渇条件では 2-オキソグルタル酸を、窒素存在条件ではグルタミン酸を細胞外へ放出することが見出された。しかし、このように特定の代謝物が細胞外に放出されるメカニズムは不明であった。本研究では *glgC* 欠損株において、グルタミン酸が放出される機構の解明に取り組んだ。

我々は細胞膜上に存在する機械受容チャネルである MscM および MscL がグルタミン酸放出に関与していると考え、これらの遺伝子欠損株における代謝物の変化を解析した。結果、*mscM* 欠損株において、細胞内のグルタミン酸蓄積が増加し、細胞外への放出量が低下することが分かった。さらに、MscM および MscL のそれぞれが放出に関与する代謝物を解析した。本研究により、シアノバクテリアにおける各機械受容チャネル依存的な代謝物の細胞外放出機構の存在が明らかとなった。本研究は、シアノバクテリアにおける機械受容チャネルの生理機能の理解において重要であり、代謝物の細胞外移動を制御することで物質生産を向上する知見となることが期待される。

Glycogen deficiency triggers the extracellular release of distinctive metabolites such as 2-oxoglutarate under nitrogen depletion conditions in cyanobacteria; however, the mechanism remains unclear. In the previous study, extracellular and intracellular metabolites in a glucose 1-phoshate adenylyl transferase gene, *glgC*, deficient mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 were analyzed. The results showed the mutant released glutamate under nitrogen-sufficient conditions and 2-oxoglutarate under nitrogen-depletion conditions. These findings suggested that glycogen deficiency induces changes in carbon partitioning and extracellular metabolite release. Here, we investigated the mechanism of glutamate release in the *glgC*-deficient strains.

We hypothesized that mechanosensitive channels on the cell membrane, MscM and MscL, play a role in glutamate release, and analyzed extracellular metabolites in the mutants deficient in these genes. The results showed a decrease in extracellular glutamate in the *mscM*-deficient strain. Furthermore, the changes in the amounts of extracellular metabolites in the *mscM*- and *mscL*-deficient mutants showed metabolites released from these channels. These insights into the mechanosensitive channels contribute to our understanding of their physiological functions and the potential for regulating the release of metabolites for bioproduction in cyanobacteria.

Cyanobacteria, Mechanosensitive channel, Metabolite

発表責任者：釜阪　紘平（kmsk.k@harbor.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3C5a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 C5 会場

出芽酵母の BGL2 先端局在に対する Fab1/Vac14 阻害の影響評価
The evaluation of the impact of Fab1/Vac14 inhibition on the tip localization of BGL2 in *Saccharomyces cerevisiae*.
○竹下 亘、飯田 泰広（神奈川工大）
○Sen TAKESHITA, Yasuhiro IIDA (Kanagawa Inst. Technol.)

深在性真菌症は感染が内臓などの臓器にまで及び、合併症との併発等から死に至ることもある重篤な疾患である。一方で、既存の抗真菌薬は有効性や長期服用に伴う副作用等に課題があり、これを克服した安全で効果の高い新規抗真菌薬が求められている。先端成長は糸状菌の成長や出芽酵母の出芽の際に見られる真菌に特徴的な機構である。我々は、先端成長を制御する標的や薬剤を探索することによってヒト副作用が少ない新規クラスの抗真菌薬を創出できると考え、真菌の先端成長に必要な細胞壁分解酵素である β-1,3-glucanase (BGL2) の細胞内小胞輸送を EmGFP 融合タンパク質として可視化した先端成長評価系を構築した。本研究では、細胞内小胞輸送制御への関与が報告されている脂質キナーゼの Fab1 およびその活性化因子 Vac14 に着目し、これらを阻害した際の BGL2-EmGFP の先端局在率と細胞増殖能を評価した結果、先端局在率の上昇を伴う細胞増殖抑制作用を示すことを見出した。Fab1/Vac14 は先端成長制御を機序とした新規クラスの抗真菌薬標的となる可能性がある。

Deep mycosis is a severe fungal disease that could result in fatal outcomes due to complications. However, the demand for safe and highly effective novel antifungal drugs still exists, given the insufficient efficacy and the side effects associated with the long-term use of existing antifungal drugs. Tip growth is a unique system observed in the growth of fungi. We hypothesized that a new class of antifungal drugs with minimal side effects for humans could be discovered by exploring target molecules and drugs that regulate tip growth. To this end, we established a tip growth assay system by visualizing the intracellular vesicle transport of ß-1,3-glucanase (BGL2), a cell wall-degrading enzyme essential for tip growth, as a fusion protein with EmGFP. In this study, we evaluated the involvement of the lipid kinase Fab1 and its activator Vac14 for tip growth, along with their impact on cell proliferation using a genetic Fab1/Vac14 inhibitory approach. The results revealed a growth inhibitory effect accompanied by an upregulation of BGL2-EmGFP localization rate at the tip. These findings suggest that Fab1/Vac14 could be a novel target for antifungal agents based on tip growth regulation.

Fab1, Vac14, Bgl2

発表責任者：飯田泰広（iida@bio.kanagawa-it.ac.jp）

講演番号：3C5a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 C5 会場

メタノール酵母 *Komagataella phaffii* の Atg12 のリン酸化を介したオートファジー制御機構
Regulatory mechanism of autophagy via Atg12 phosphorylation in the yeast *Komagataella phaffii*
○光部 雅俊[1]、中辻 拓実[2]、齋藤 敬[1]、奥 公秀[3]、白石 晃將[2]、阪井 康能[2] ([1]京大院総合生存学館、[2]京大院農、[3]京都先端科学大・バイオ環境)
○MASATOSHI KOBE[1], TAKUMI NAKATSUJI[2], KEI SAITO[1], MASAHIDE OKU[3], KOSUKE SHIRAISHI[2], YASUYOSHI SAKAI[2] ([1]Kyoto Univ. GSAIS, [2]Kyoto Univ. Agriculture, [3]Kyoto Univ. of Advanced Science)

オートファジーは、隔離膜が細胞内のたんぱく質や細胞小器官を取り囲んでオートファゴソームを形成し、液胞へと輸送・分解する細胞内の主要な分解系である。オートファゴソームの形成において、ユビキチン様共役反応により形成されるイソペプチド結合を介した Atg12-Atg5 複合体が、Atg16 とともに E3 酵素として働いて、Atg8 とリン脂質の共有結合を促進する過程は、全ての生物種で保存されている中心的な分子機構であると考えられてきた。しかし近年、当グループにより、メタノール酵母 *Komagataella phaffii* (旧名 *Pichia pastoris*) を含む一部の生物種では、Atg12-Atg5 複合体の共有結合形成に必要な遺伝子が欠失し、Atg5 と Atg12 が非共有結合により複合体を形成していることを見いだした [1)]。そこで、KpAtg8 の脂質化制御を解析したところ、*Saccharomyces cerevisiae* では恒常的に ScAtg8 の脂質化が見られる一方、*K. phaffi* ではオートファジー条件で KpAtg8 が誘導的に脂質化されていた。非共有結合型の At g12-Atg5 複合体形成が Atg8 の脂質化制御を制御しているのではないかと考え、KpAtg12 の翻訳後修飾に着目して解析を実施した。これまでの結果から、KpAtg12 がオートファジー誘導条件でリン酸化を受けること、KpAtg12 のリン酸化が起こらない変異体発現株ではオートファジーの活性が低下していることが示された。

Autophagy is an intracellular degradation system in which isolation membranes enclose intracellular components, forming autophagosomes, and transport them to the vacuole for degradation. In the formation of autophagosomes, the Atg12-Atg5 complex, formed via a ubiquitin-like conjugation reaction, works together with Atg16 as an E3 enzyme to promote the covalent binding of Atg8 and phosphoethanolamine. This process has been considered a central molecular mechanism conserved in broad ranges of eukaryotes. Recently, however, we have shown that in some species such as *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), the Atg12-Atg5 complex was formed by a non-covalent interaction [1)]. In this study, we analyzed the regulation of KpAtg8 lipidation and found that KpAtg8 was lipidated in an inducible manner only under autophagy-induced conditions. In contrast, in *S. cerevisiae*, ScAtg8 lipidation was observed constitutively regardless of the culture conditions, Therefore, in K. phaffii, formation of non-covalent Atg12-Atg5 complex regulates Atg8 lipidation. We found that KpAtg12 was phosphorylated under autophagy-induced conditions and expression of a phosphorylation defective KpAtg12STA mutant in the *Kpatg12*Δ strain led to decreased autophagic activity when compared with the wild-type strain.

1) Pang et al., *Nat Struct Mol Biol.*, **26,** 289-296 (2019).

Methylotrophic yeast, Autophagy, Atg12-Atg5 complex

発表責任者：光部雅俊（kobe.masatoshi.26n@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C5a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 C5 会場

分裂酵母の核ー細胞質間輸送因子が関わる核膜構造維持機構の解析

Studies on the role of nucleocytoplasmic transport in nuclear envelope integrity in fission yeast

○柴田 遥[1]、久米 一規[2]、藤本 尭玄[2] ([1]広島大工、[2]広島大院統合生命)
○Haruka SHIBATA[1], Kazunori KUME[2], Takahiro FUJIMOTO[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Hirsohima Univ.)

真核生物の核は、生命継承を担うゲノム DNA を収納し保護するうえで重要なオルガネラである。核は膜で覆われたオルガネラであり、細胞質から区画化されて存在することにより、核内での機能を担保している。核構造の破綻による核機能の低下は、関連する疾病や老化細胞で観察されることから、核構造を維持することは生命機能を維持するうえで重要である。

分裂酵母において、核と細胞質間の物質輸送で中心的な役割を担う低分子量 GTPase である Ran が不活化すると、核と細胞質の区画化が失われて核が消失することが報告された(Y Gonzalez et al. 2009) 。そこで本研究では、高温 (36°C) において Ran が不活化し核膜崩壊を引き起こす変異体 *pim1* を用いて、*pim1* 変異体が示す核膜崩壊の原因となる因子を特定する。さらに、当該因子による核膜崩壊メカニズムの理解を目指す。本発表では、*pim1* 変異体の表現型解析の結果と *pim1* 変異体が示す核膜崩壊に関わる細胞内プロセスとの関係についての解析結果を報告したい。

In eukaryotic cells, nucleus is an important organelle in storing and protecting genomic DNA, which is responsible for the inheritance of life. The nucleus is membrane-bound organelle that is compartmentalized from the cytoplasm to ensure its function within the nucleus. Although nuclear dysfunction due to disruption of nuclear structure has been observed in related diseases and in aging cells, little is known about the causes and mechanisms that lead to the disruption of nuclear structure.

It has been reported that inactivation of Ran, a small GTPase that plays a central role in nucleocytoplasmic transport in fission yeast, results in loss of the nuclear compartmentalization and loss of the nucleus itself (Y Gonzalez et al., 2009). Therefore, this study aims to elucidate the mechanisms that cause the collapse of the nuclear compartment. To identify factors involved in the collapse of nuclear compartments due to Ran inactivation, we analyzed a temperature sensitive mutant of *pim1*, which encodes the Ran GEF. In this presentation, we will show the results of phenotypic analysis of *pim1* mutant cells, and the intracellular processes involved in the disruption of nuclear compartmentalization in *pim1* mutant.

fission yeast, nuclear envelope, nucleocytoplasmic transport

講演番号：3C5a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 C5 会場

分裂酵母胞子表面のデコボコ構造におけるα-グルカンの機能

Role of α-glucan in the fission yeast spore surface structure

○関 温子、増田 大輝、中村 太郎（大阪公立大院理）
○Haruko SEKI, Daiki MASUDA, Taro NAKAMURA (Osaka Metropolitan Univ.)

菌類の胞子は、ウニのような形をするものや球形のものなどさまざまである。分裂酵母の胞子は、表面に特徴的なデコボコ構造をもつが、この構造には胞子壁が大きく関わっている。本研究の目的は、胞子デコボコ構造の形成メカニズムを明らかにすることである。

我々は、分裂酵母の胞子壁の構成成分のうち、α-グルカンに注目した。α-1,4-グルカン合成酵素をコードする遺伝子(*mok14*$^{+}$) の破壊株の胞子を電子顕微鏡で観察したところ、デコボコ構造が失われていた。また同様に α-アミラーゼ様タンパク質をコードする遺伝子(*meu30*$^{+}$) の破壊株においても、表面のデコボコは野生型株に比べて小さく、その数も多かった。

次にこの 2 つのタンパク質の関係を明らかにするために蛍光顕微鏡下で局在観察を行った結果、Meu30 の欠損株において Mok14 は正常な局在を示さなかった。以上のことから、α-1,4-グルカンが胞子デコボコ構造の形成に重要であることを明らかにした。また、その形成に中心的にはたらくと考えられる 2 つのタンパク質 Mok14 と Meu30 は、胞子壁上で互いの正しい局在に必要である可能性が示唆された。

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has a characteristic spike structure on the spore surface. The spore wall plays a major role in this structure. The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of the spike structure formation.

We focused on α-glucan as a component of the spore wall. Electron microscopy showed the deletion of *mok14*$^{+}$ encoding an α-1,4-glucan synthase lost the spike structure of spore. In addition, the deletion of *meu30*$^{+}$ encoding an α-amylase-like protein resulted in smaller spike structure and a greater number of spikes on the spore surface than wild-type.

Next, to clarify the relationship between these two proteins, fluorescence microscopy was conducted. Localization of Mok14 was abnormal in the *meu30Δ* strain. These results suggest that α-1,4-glucan is important for the formation of the spike structure and that Mok14 and Meu30 are required for their correct localization on the spore wall.

yeast, cell wall, glucan

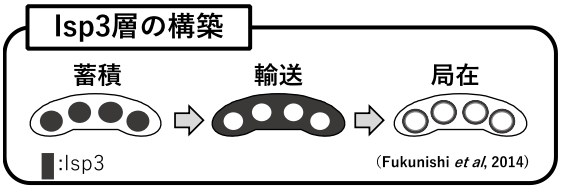
発表責任者：中村太郎（taronaka@omu.ac.jp）

講演番号：3C5a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 C5 会場

分裂酵母 S. Pombe の胞子最外層を構成するタンパク質層の構築メカニズムの解明
Construction of the outermost proteinaceous layer of the spore wall in *S. pombe*

○坂口 智樹[1]、酒井 崇史[2]、吉川 佳里奈[2]、中村 太郎[1] ([1]大阪公立大院理、[2]大阪市立大院理)
○ Tomoki Sakaguchi[1], Takafumi Sakai[2], Karina Yoshikawa[2], Taro Nakamura[1] ([1]Osaka Metropolitan Uni, [2]Osaka City Uni)

分裂酵母 *S. pombe* の胞子は優れたストレス耐性を持つ休眠細胞である。我々はこれまでに、胞子の最外層であるタンパク質層（Isp3 層）が胞子のストレス耐性に関与することを明らかにした（Fukunishi *et al.* 2014)。Isp3 は *S. pombe* 特異的なタンパク質であり、胞子形成時に発現を開始する。発現した Isp3 は、将来胞子が形成される場所に一度【蓄積】し、その後胞子外へと【輸送】され、胞子表面に【局在】することで層を形成する(図)。我々は、この Isp3 層が構築されるメカニズムを解明するために研究を行った。



我々はこれまでに、パルミトイル化酵素が Isp3 の胞子表層への【局在】に関与することを明らかにした。そこで、Isp3 層構築に関与する新規遺伝子を取得するために、約 3800 の遺伝子破壊株ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。その結果、Isp3 の【局在】に異常が見られる株を新たに 15 株取得した。しかしながら、スクリーニングでは Isp3 の【輸送】から【蓄積】に異常が見られる株は取得できなかった。そこで、Isp3 の立体構造と蓄積領域から液液相分離に着目し、液液相分離の阻害剤である 1,6-Hexanediol を用いて観察した結果についても報告する。

The spore of *S. pombe* is a dominant cell that has high stress tolerance. We have revealed that the outermost proteinaceous layer of the spore (the Isp3 layer) is involved in the stress resistance. Isp3 is an *S. pombe* specific protein and expressed during sporulation. After expression, Isp3 is accumulated in the cytoplasm of the nascent spore【accumulation】. Isp3 is then transported to the outside of spore【transport】. Eventually, Isp3 is localized on the spore surface to form the Isp3 layer【localization】.Our purpose is to reveal the mechanism of the Isp3 layer construction.

We have revealed that palmitoyl transferase is involved in the【localization】of the Isp3. To obtain novel genes involved in Isp3 layer construction, we screened about 3,800 gene deletion strains. As a result, we identified 15 strains that showed abnormal【localization】of Isp3. However, we could not obtain any strains that showed abnormal【transport】or【accumulation】of Isp3. Therefore, we focused on liquid-liquid phase separation (LLPS) because of the predicted structure and expression site of Isp3. We report the observation by using the LLPS inhibitor 1,6-hexanediol.

stress tolerance, gene knockout, liquid-liquid phase separation

発表責任者：坂口智樹（sakaguchi.makio1101@gmail.com）

講演番号：3C5a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 C5 会場

分裂酵母の生育に必須な微小管結合因子 Peg1/CLASP の紡錘体形成における役割
An essential role of fission yeast CLASP homolog Peg1 in mitotic spindle assembly
平野 雄大[1]、○湯川 格史[1,2] ([1]広島大・院統合生命、[2]広島大・健康長寿研究拠点)
Yuta HIRANO[1], ○Masashi YUKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

紡錘体微小管は、真核細胞の細胞周期 M 期における染色体均等分配に必須である。細胞はその双極性構造を維持できないと染色体分配異常を引き起こし、致死となる。このような双極性紡錘体構造を形成・維持するために微小管架橋因子が極めて重要な役割を果たし、微小管同士を束ねることで紡錘体構造を安定化させると考えられている。微小管架橋因子は進化上高度に保存されており、真核モデル生物である分裂酵母では Peg1/Cls1（ヒト CLASP ホモログ）が生育に必須な架橋因子として提唱されているが、その詳細な機能については依然不明な点が多い。そこで我々は、オーキシンデグロン（AID）法と呼ばれる植物のタンパク質分解システムを利用して、Peg1 発現抑制時の微小管を観察したところ、M 期において異常な紡錘体形成が確認できた。次に、我々は Peg1 発現抑制による致死性を抑圧する変異株のスクリーニングを行なった。その結果、20 株の遺伝子外抑圧変異株を単離することに成功し、3 種の相補性グループに分類できた。次世代シークエンス解析により変異点を調べた結果、興味深いことに、いずれもチューブリン遺伝子の変異であることが判明した。現在、これらの抑圧変異株について、さらに詳しい解析を行なっている。

Spindle microtubules are essential for the equal distribution of chromosomes during mitosis in eukaryotic cells. To establish and maintain such a spindle structure, microtubule-bundling factor plays a crucial role in stabilizing antiparallel microtubules by crosslinking them together. They are highly conserved through evolution, and especially human CLASP homolog, Peg1/Cls1 is proposed as a microtubule-bundling factor in fission yeast, which is essential for cell growth. However, it remains unclear how it plays an essential role in bipolar spindle formation and mitotic progression. To elucidate its function, we constructed a Peg1 conditional knockdown strain by using the plant auxin inducible degron (AID) system. Then we screened for mutants that suppress the lethality caused by the knockdown of Peg1-AID. As a result, we succeeded in isolating 20 extragenic suppressors, which were divided into 3 groups by complementation test. Interestingly, further NGS analysis revealed that all mutation sites were located in genes encoding microtubule constituents such as α1-tubulin, α2-tubulin and ß-tubulin. To understand how these mutations suppress the lethality, we are currently exploring the behavior of spindle microtubules in these suppressor mutants in the absence of Peg1.

spindle microtubule, mitosis, fission yeast

発表責任者：湯川格史（myukawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C5 会場

ペプチドグリカン構成成分が光触媒殺菌と過酸化水素生成に与える影響の検証

Verification of the effects of peptidoglycan constituents on photocatalytic sterilization and H_2O_2 generation

○佐藤 銀次、本村 陽香、鈴木 智順（東理大院生物）
○Ginji SATO, Haruka MOTOMURA, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science)

当研究室の先行研究において、ペプチドグリカン（PG）層が光触媒殺菌効果を高めること、PG は化合物として添加しても光触媒殺菌効果が高まり、H_2O_2 を生成することが示された。そこで本研究では、PG 構成成分の殺菌効果への影響と、H_2O_2 生成の検証を目的とした。

Escherichia coli IAM12119^T 細胞から PG 層を除去して作製した spheroplast cell、*Lactiplantibacillus plantarum* JCM 1149^T 細胞から PG 層を除去して作製した protoplast cell、元来 PG 層をもたない *Mesoplasma florum* NBRC 100688^T それぞれに対して PG 構成成分を添加し、光触媒殺菌を行い、PG 構成成分未添加の生存率と比較解析した。さらに、PG 構成成分である *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、*N*-アセチルムラミン酸（MurNAc）、ジアミノピメリン酸（DAP）に対して光触媒反応を行い、生成した H_2O_2 の定量を行った。

以上の結果、GlcNAc、MurNAc、DAP は H_2O_2 を有意に生成し、PG による光触媒殺菌効果増強の主要な要因であることが示唆された。

In our previous study, it has been shown that the peptidoglycan (PG) layer enhances the photocatalytic bactericidal effect and that PG, when added as a compound, enhances the photocatalytic bactericidal effect and produces H_2O_2. Therefore, the purpose of this study is to verify the effect of PG constituents on the bactericidal effect and the formation of H_2O_2.

Spheroplast cells and protoplast cells were prepared by removing the PG layer from *Escherichia coli* IAM12119^T cells and *Lactiplantibacillus plantarum* JCM 1149^T cells, respectively. The PG components were added to spheroplast cells, protoplast cells, and *Mesoplasma florum* NBRC 100688^T cells without the PG layer, photocatalytic sterilization was performed, and the survival rate was compared with the survival rate when no PG component. In addition, H_2O_2 produced in the photocatalytic reaction of the PG components, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylmuraminic acid (MurNAc), and diaminopimelic acid (DAP), was determined.

These results suggest that GlcNAc, MurNAc, and DAP significantly produced H_2O_2 and were the main factors in enhancing the photocatalytic bactericidal effect of P

photocatalytic bactericidal effect, photocatalytic sterilization, peptidoglycan

発表責任者：佐藤銀次（6423533@ed.tus.ac.jp）

講演番号：3C5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C5 会場

異なる生育期の細菌に対する光触媒殺菌効果の変動要因の解明

Elucidation of variation factors of photocatalytic bactericidal effect on bacteria at the different growth phases

○安藤 志朗、槐 あかね、鈴木 智順（東理大院生物）
○Shiro ANDO, Akane SAIKACHI, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science)

当研究室の先行研究によって、ペプチドグリカンは光触媒反応で H_2O_2 を生成することが示され、*Lactiplantibacillus plantarum* は生育に伴い肥厚化するペプチドグリカン層により光触媒殺菌感受性が増大することが示唆された。しかし、*Staphylococcus epidermidis* や *Staphylococcus aureus* は生育時期に関わらず *L. plantarum* よりも殺菌感受性が低く、*Escherichia coli* は生育に伴い殺菌感受性が低減することが明らかになった。そこで本研究では、上記細菌 4 株を供試して、光触媒殺菌感受性が異なる要因の解明を目的とした。

はじめに、*L. plantarum*、*E. coli* に対して、カタラーゼ添加の有無による光触媒殺菌効果の比較を行った結果、カタラーゼ添加により光触媒殺菌効果が抑制され、光触媒殺菌における H_2O_2 の重要性が示された。次に、供試 4 細菌株の対数増殖期および定常期細胞に対して、メタバナジン酸アンモニウムを利用したカタラーゼ活性測定を行った。その結果、*Staphylococcus* 属細菌のカタラーゼ活性は *E. coli* よりも高く、細胞生育期が異なっても活性に差は見られなかった。一方、定常期の *E. coli* 細胞は対数増殖期の細胞よりも 2 倍以上高いカタラーゼ活性を示した。

以上の結果より、H_2O_2 消去能は光触媒殺菌効果を変動させる要因であることが示唆された。本講演では上記に加え、*S. aureus* が産生する色素に着目した研究結果についても報告する予定である。

Our previous studies have shown that the peptidoglycan generates H_2O_2 in photocatalytic reaction and that *Lactiplantibacillus plantarum* is more susceptible to the photocatalytic bactericidal effect as the thickening of the peptidoglycan layer as it grows. Photocatalytic treatment of *L. plantarum*, *Staphylococcus* spp., and *Escherichia coli* at different growth phases showed that the bactericidal effect differed depending on the bacteria. Therefore, this study aims to elucidate the factors that these bacteria cause the different photocatalytic bactericidal effects.

We found that the presence of catalase suppressed the photocatalytic bactericidal effect. Catalase activity was measured in the log phase and stationary phase cells. The results showed that the catalase activities of *Staphylococcus* spp. were higher than that of *E. coli*, but no difference was observed between the different cell growth phases. On the other hand, *E. coli* cells in the stationary phase showed more than 2-fold higher catalase activity than log phase cells. The results suggest that H_2O_2 scavenging ability is a factor that can affect the photocatalytic bactericidal effect.

photocatalysis, killing mechanism, reactive oxygen species

講演番号：3C5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C5 会場

ピロロキノリンキノンが酵母細胞表層に存在する可能性について

Possible peripheral existence of pyrroroquinoline quinone in yeast cells

○具志 萌里、水谷 治、外山 博英（琉大農）
○Moeri GUSHI, Osamu MIZUTANI, Hirohide TOYAMA (Univ. of the Ryukyus)

ピロロキノリンキノン（PQQ）とは、グラム陰性菌のペリプラズムに存在するキノプロテインの補欠分子族である。酵母が PQQ を生合成するという報告があるが、バクテリアで知られる PQQ 生合成遺伝子は酵母ゲノム中には見つからないため、酵母はバクテリアとは異なる生合成遺伝子を持っていると予想された。数社の酵母エキス中の PQQ 量を測定した結果、PQQ が検出され、量に差異がみられた。実験室で培養した菌体では、好気条件下 YPD 培地で培養した場合には、菌体破砕液から PQQ が検出されたが、培養液中からは PQQ がほとんど検出されなかった。アルコール発酵条件下や合成培地で培養した場合でも、培養液からはほとんど検出されなかったが、菌体破砕液から PQQ は検出された。しかし、その量は好気条件下 YPD 培地で培養した時よりも少なかった。生合成前駆物質と推定されるグルタミン酸やチロシンを培地に添加しても PQQ 量の顕著な増加はみられなかった。酵母細胞をザイモリエース処理した後に遠心分離すると、上清中に PQQ が検出された。沈殿したプロトプラストをバーストさせて検出される PQQ 量よりも多かった。このことは PQQ または PQQ と結合しているタンパク質が酵母細胞の表層に存在している可能性を示している。

Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a prosthetic group of quinoproteins which in the periplasm of Gram-negative bacteria. There have been reports that yeasts synthesize PQQ. Since its biosynthesis genes reported in bacteria have not been found in the yeast genome, it is expected that yeasts have a different biosynthetic gene from those in bacteria. The amounts of PQQ vary in the products of yeast extract from some manufacturers. When yeast cells were cultured in YPD medium under aerobic conditions, PQQ was detected in the cell extract but very little amounts in the culture medium. PQQ was also detected in the cell extract obtained the cells grown either under alcohol fermentation conditions or in the synthetic medium, but the amounts of PQQ were lower than those in the cell extract obtained from the cells grown in YPD medium under aerobic conditions. Addition of glutamic acid or tyrosine, which are presumed to be biosynthetic precursors, to the culture medium did not significantly increase the amounts. When the cells were treated with Zymolyase and centrifuged, PQQ was detected in the supernatant. The amounts were higher than those obtained from the extract after the obtained protoplasts were bursted. This result suggests that PQQ or PQQ-bound protein(s) exists peripherally in the yeast cells.

Pyrroloquinoline quinone, PQQ, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：外山博英（toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3C5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C5 会場

紀州なれずし発酵乳酸菌の多様性と単離されたビフィズス菌の特徴
Diversity of Kishu Narezushi Fermented Lactic Acid Bacteria and Characteristics of Isolated Bifidobacterum

久保 実希[1]、平田 貴人[1]、大梅 倖輝[1]、丹羽 諒[2]、大野 智生[1]、末松 和真[1]、○岩橋 均[1]([1]岐大応生、[2]京大医院)
Miki Kubo[1], Takato Hirata[1], Kouki Ohbai[1], Ryo Niwa[2], Tomoki Ohno[1], Kazuma Suematsu[1], ○Hitoshi Iwahashi[1] ([1]Gifu Univ., [2]Kyoto Univ.)

なれずしとは魚、塩、米を用いた日本の伝統的な自然発酵食品である。紀州なれずしは室町時代から続く和歌山県の郷戸料理であり、塩漬けした鯖と米飯をあせ（ダンチク）の葉で巻き、樽に詰め発酵される。我々は、発酵時期、発酵期間の異なるなれずしを和歌山市の弥助寿司から入手し発酵中の細菌叢および真菌叢の解析を行った。細菌叢は *Lactobacillales* 目が優先であったが、発酵時期や発酵時間により、優占種は 7 種の属に広がり、発酵微生物の多様性が観察された。真菌叢は、*Saccharomycetales* 目と *Trichosporonales* 目が優先であった。さらに、発酵後期でビフィズス菌の存在が確認された。そこで、当該ビフィズス菌を分離したところ、*Bifidobacterium psychraerophilum* と同定され、Yasuke 株と名付けた。Yasuke 株の耐塩性、耐酸素性を *B. psychraerophilum* DSM22366、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium adolescentis* と比較した。耐塩性は Yasuke 株が最も高く、酸素に対しては Yasuke 株 DSM22366 株ともに他の株よりも強い結果となった。ドラフトゲノムの解析結果と Yasuke 株を用いた乳製品発酵の可能性につても発表する。

Nare-zushi is a traditional Japanese naturally fermented food made of fish, salt, and rice. Kishu narezushi is a local dish of Wakayama Prefecture dating back to the Muromachi period (1336-1573). It is made by rolling salted mackerel and rice with Ase (*Arundo donax*) leaves, then stuffing them into a barrel for fermentation. We obtained narezushi with different fermentation periods from Yazuke Sushi in Wakayama City and analyzed the bacterial and fungal flora during fermentation. The bacterial flora was dominated by the order *Lactobacillales*, but depending on the season of fermentation and fermentation duration, The dominant species spread to seven genera, indicating the diversity of fermenting microorganisms. The fungal flora was dominated by the orders *Saccharomycetales* and *Trichosporonales*. Surprisingly, the presence of *Bifidobacterium* was confirmed in the latter stages of fermentation. The *Bifidobacterium* was isolated and identified as *Bifidobacterium psychraerophilum*, which was named the Yasuke strain. The salt and oxygen resistance of the Yasuke strain was compared to *B. psychraerophilum* DSM22366, *Bifidobacterium longum*, and *Bifidobacterium adolescentis*. The Yasuke strain had the highest salt tolerance, and both the Yasuke and DSM22366 strains were more resistant to oxygen than the other strains. The results of the draft genome analysis and the possibility of dairy fermentation using the Yasuke strain will also be presented.

fermentation food, lactic acid bacteria, bifidobacterium

発表責任者：岩橋　均（iwahashi.hitoshi.y0@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3C5p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C5 会場

Bacillus thuringiensis A2545 株における抗菌活性と関連する遺伝子クラスターの解析
Analysis of gene clusters associated with antibacterial activity in *Bacillus thuringiensis* A2545
松川 木仁未[1]、齋藤 浩之[2]、三田 光章[3]、阿部 雄一[1]、原島 俊[1]、○浴野 圭輔[1]([1]崇城大生物生命、[2]福岡工技セ・生食研、[3]中村産業開発（株））
Kotomi Matsukawa[1], Hiroyuki Saitoh[2], Mitsuaki Mita[3], Yuichi Abe[1], Satoshi Harashima[1], ○Keisuke Ekino[1] ([1]Sojo Univ., [2]Fukuoka Industrial Technology Center, [3]Nakamura Sangyo Kaihatsu)

Bacillus thuringiensis (Bt)は芽胞形成時に結晶性のタンパク質の塊を菌体内に生成する。この結晶性タンパク質には殺虫活性を示すものがあることから長く生物農薬として使用されている。Bt A2545 株は殺虫活性を示さないもののネギの植物病である菌糸性腐敗病の原因菌（*Botrytis byssoidea*）に対して抗菌活性を示す。NGS 解析の結果、本菌株は 12 個のプラスミドを保持しており、二次代謝産物の産生に関係する遺伝子クラスターが染色体上に 8 種類、4 個のプラスミド上にそれぞれ 3 種類、1 種類、1 種類、1 種類存在していることが明らかとなった。紫外線照射によって抗菌活性を失った変異株を取得した結果、この変異株は 3 種類の遺伝子クラスターを保持するプラスミドが脱落していたことから、これらが抗菌活性に寄与していることが示唆された。次に、これら 3 種類の遺伝子クラスターの一部をそれぞれ相同組み換えによって破壊した。A2545 株はタイプ II とタイプ IV の制限修飾系を有することから、タイプ II の制限修飾に関わると予想されたメチラーゼを発現させた dam-/dcm-大腸菌（HST04）で相同組み換えに用いるプラスミドを調製した。取得した 3 種類の遺伝子破壊株について抗菌活性を調べた結果、ある種の非リボソームペプチドが抗菌活性に関与することが示唆された。

Bacillus thuringiensis shows antibacterial activity against the bacterium (*Botrytis byssoidea*) that causes mycelial rot, a plant disease of alliums. As a result of NGS analysis of strain A2545, it was found that it harbors 12 plasmids, and gene clusters related to the production of secondary metabolites were present on the chromosome and on the 4 plasmids, respectively. As a result of obtaining a mutant strain that had lost its antibacterial activity by UV irradiation, it was found that the plasmid carrying three types of gene clusters had been lost from this mutant strain, suggesting that these contributed to the antibacterial activity. Next, parts of each of these three gene clusters were disrupted by homologous recombination. Since the A2545 strain has type II and type IV restriction modification systems, we prepared a plasmid for use in homologous recombination using dam-/dcm- E. coli (HST04) expressing a methylase predicted to be involved in type II restriction modification. The results of examining the antibacterial activity of the three gene-disrupted strains obtained suggested that a certain non-ribosomal peptide was involved in the antibacterial activity.

Bacillus thuringiensis, antibacterial activity, secondary metabolite

発表責任者：浴野圭輔（ekino@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：3C5p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C5 会場

イネいもち病菌における CRISPR/ErCas12a を用いたゲノム編集手法の検討

Investigation of genome editing methods using CRISPR/ErCas12a in rice blast fungi.

○原田 裕太、山崎 真也、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大院創域理工）
○Yuta HARADA, Masaya YAMAZAKI, Takayuki ARAZOE, Takashi KAMAKURA (TUS)

CRISPR/Cas12a は CRISPR/Cas9 と同様に単一のヌクレアーゼ（Cas12a）と gRNA の複合体により標的 DNA の切断が可能なゲノム編集ツールであるが、T リッチな PAM 配列を認識する点や切断により突出末端が形成される点などで CRISPR/Cas9 とは異なる特性を有する。本研究では *Francisella novicida* U112 由来の CRISPR/FnCas12a および *Eubacterium rectale* 由来の CRISPR/ErCas12a コンストラクトの最適化を行い，イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）におけるゲノム編集手法について検討した。

最適化した CRISPR/ErCas12a（CRISPR/ErCas12a）の利用により、CRISPR/Cas9 と同等かそれ以上の効率での相同組換えによる遺伝子破壊が可能であった。しかし、CRISPR/ErCas12a のヌクレアーゼ活性はターゲット配列に大きく依存することが示唆されたため、CRISPR/Cas12a の切断活性予測に利用される 4 つのツール（CINDEL score, CRISPR-DT, DeepCpf1, DeepGuide）について検証した。その結果、DeepGuide と CINDEL score の併用により低活性となるターゲット配列をある程度排除可能であることが示された。また、CRISPR/ErCas12a の利用により、CRISPR/Cas9 では困難であった 40 bp 程度の相同領域を付加したマーカー遺伝子断片のノックインが可能となり、網羅的な遺伝子機能解析に対応した遺伝子破壊が可能となった。

The class2 type V CRISPR/Cas12a is an alternative genome editing tool that can recognize T-rich PAM and produce staggered DNA breaks and multiple CRISPR arrays (gRNAs). Here, we tried to develop efficient genome editing strategies in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* using two optimized CRISPR/Cas12a systems derived from *Francisella novicida* U112 (FnCas12a) and *Eubacterium rectale* (ErCas12a).

The optimized CRISPR/ErCas12a system enabled more efficient homologous recombination-mediated gene editing than the CRISPR/Cas9 system, but the nuclease activity depended on gRNA targets. Therefore, we evaluated four tools (CINDEL score, CRISPR-DT, DeepCpf1, DeepGuide) to predict gRNA activity of CRISPR/ErCas12a and found that using both CINDEL score and DeepGuide could remove gRNA targets with low activity. Further, the CRISPR/ErCas12a system enabled short homology-mediated high-throughput gene disruptions using donor DNA fragments.

fungal genome editing, CRISPR/Cas12a, high-throughput gene disruptions

講演番号：3C5p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C5 会場

乾燥耐性を有するシアノバクテリア *Nostoc* sp. HK-01 の乾燥および蘇生過程における遺伝子発現解析

Gene expression analysis of a terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. HK-01 under dry-wet conditions

○柴﨑 健豪[1]、加藤 浩[2]、篠田 沙月[1]、横谷 香織[3]、安部 智子[1]([1]東京電機大院・理工、[2]三重大・研究基盤、[3]筑波大・生命環境)
○ Kengo SHIBASAKI[1], HIROSHI KATOH[2], SATSUKI SHINODA[1], KAORI YOKOTANI[3], TOMOKO ABE[1] ([1]Tokyo Denki University, [2]Mie University, [3]University of Tsukuba)

陸棲シアノバクテリアの中でも特に乾燥に高い耐性を備える株として単離された *Nostoc* sp. HK-01 は、極めて高い過酷環境耐性を示すことがこれまで報告されてきた [1]。HK-01 株は、その生活環の中で、休眠状態のアキネート、増殖する栄養細胞、窒素固定を行うヘテロシスト、および運動性を示すホルモゴニアの 4 種の細胞形態を示す。栄養細胞は環境に応じて増殖する重要な役割をもつが、短期的な乾燥-湿潤サイクルにおける耐性機構の仕組みについては不明な点も多い。本研究では、耐性機構が誘導されると考えられる湿潤から乾燥状態、乾燥から湿潤状態への移行過程において発現変動する遺伝子群およびタンパク質について解析した。

[方法および結果] 光照射下、BG-11 液体培地で培養した *Nostoc* sp. HK-01 の細胞を集め、暗所下、デシケーター内で乾燥させた。乾燥前の細胞の重さ(湿重量)を 100%として、経時的に湿重量 50%および 10%の細胞を採取し、RNA あるいはタンパク質を抽出した。同様に、乾燥後の細胞群を再び光照射下、BG-11 液体培地で培養し、経時的に採取した。プロテオーム解析ならびにトランスクリプトーム解析により発現量が増加あるいは減少する遺伝子を探索した結果、いくつかの遺伝子およびタンパク質において発現の変動が見られた。

A terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. HK-01 was clarified that the dried cells were resistant to harsh environments [1]. Within its life cycle, HK-01 exhibits four cell morphologies: dormant akinete, proliferative vegetative cell, nitrogen-fixing heterocyst and motile hormogonia. Vegetative cells have an important role in proliferating in response to their environment. Much is unknown about the mechanisms of environmental tolerance its short-term dry-wet cycle. This study analyzed genes and proteins expression during the transition from wet to dry and dry to wet conditions, which are thought to induce resistance mechanisms.

Nostoc sp. HK-01 cultured in BG-11 liquid medium under light irradiation was used in this study. The cells were dried in a desiccator in darkness. RNA and protein were extracted from the cells at 50% and 10% of wet weight, and genes and proteins whose expression levels increased or decreased were investigated. As a result, expression changes were observed in several genes and proteins.

[1] Tomita-Yokotani, K. *et al.*, *Astrobiology* **21**, 1506-1514, 2021.

cyanobacteria, drought tolerance

発表責任者：安部智子（t_abe@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3C5p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C5 会場

水田中のアーバスキュラー菌根菌（AMF）の胞子密度は栄養条件に影響を受けにくい

Spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in paddy field soils is not easily affected by soil fertility.

○岡崎 飛鳥、HUANG Yihao、TRAN QUOC Thinh、久保 幹（立命館大院生命）
○ Asuka OKAZAKI, Yihao HUANG, Thinh TRAN QUOC, Motoki KUBO (The Univ. of Ritsumeikan)

アーバスキュラー菌根菌（AMF）は、陸上植物の 80%以上と共生が可能な植物絶対共生菌である。AMF は水生植物との共生は可能だが、共生率が低い。また、AMF の胞子についての研究は十分に行われていない。そこで、本研究では栄養条件の異なる水田土壌から採取された土壌中の菌根菌の胞子密度と土壌肥沃度との関係性について調べた。

本実験では、さまざまな場所における水田土壌をサンプリングし、水圏環境中の AMF の密度と土壌肥沃度の関係性について調べた（n=46）。まず、土壌中の肥沃度を調べるために、全炭素量（TC）、全窒素量（TN）など 19 項目の測定を行い、AMF の胞子密度はスクロース密度測定法を用いて測定した。その後、主成分分析（PCA）を用いて、関係性を調べた。また、陸上土壌（畑、果樹園）中の胞子密度との比較を行った(n=30)。その結果、水田土壌における AMF の胞子密度は、栄養条件である TC、TN、TP、TK との相関は見られなかった。また、陸上土壌との比較では、胞子密度は水田土壌の方が優位に高かった。結論として、水田土壌中は胞子密度が陸上土壌と比較して優位に高く、土壌中の栄養条件に大きな影響を受けていないことが示唆された。今後は陸上土壌との比較を行っていき、水田環境中における胞子密度に最も影響を及ぼしている要因を明らかにしたい。

This investigates the relationship between spore density of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and soil fertility in paddy field soils. Soil samples collected from paddy fields were subjected to measurements of soil fertility including 19 soil properties. The results revealed no significant correlation between AMF spore density and soil fertility, such as TC, TN, TP, and TK. In addition, paddy field soils showed significantly higher AMF spore densities compared to terrestrial soils. Further research is needed to compare these findings with terrestrial soils and identify key factors influencing spore density in paddy soils.

Arbuscular mycorrhizal fungi, Soil fertility, paddy field

発表責任者：岡崎　飛鳥（si0067fk@ed.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3C5p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C5 会場

Study on function of individual type III effectors in *Ralstonia solanacearum*

○Rana Lokendra[1], Tsuzuki Masayuki[2], Kiba Akinori[2], Hikichi Yasufmi[2], Ohnishi Kouhei[2] ([1]Ehime University, [2]Kochi University)

Ralstonia solanacearum species complex (RSCC) is the causal agent of bacterial wilt in over 200 plant species from more than 50 families. RSSC is divided into four phylotypes. Phylotypes I, II, III and IV. Plants evolve PTI (pattern-triggered immunity) by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to prevent pathogen infection. Pathogens inject type III effectors (T3Es) to overcome PTI. In turn, plants develop ETI (effector-triggered immunity) to fight with T3Es. In this study, we focused on Japanese RSCC T3Es to answer the main question: What is the function of individual T3Es?

We constructed an effector-less mutant OE1-1D50E (D50E), which deleted 50 T3Es of 70 T3Es from a Japanese strain OE1-1. An individual 21 single T3Es were put into D50E. None of the single-effector-expressing strains showed virulence on tobacco as D50E. The bacterial cell growth was monitored in the eggplant and tobacco leaves. Although D50E grew better than mutants defective in the type III secretion system, the growth of D50E was much less than the wild type by 2-3 orders. None of the single-effector-expressing strains grew better than D50E in both host plants.

We evaluated different phenotypes of host plants infected by the strains. The plant cell death was evaluated by measuring ion leakage. Ion leakage of plants infiltrated by D50E was lower than those infiltrated by the wild type. Ion leakage was repressed in the host plants infiltrated by some single-effector-expressing strains. Reactive oxygen species (ROS) was measured to evaluate the plant defense responses using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. ROS production in the D50E-infiltrated leaves was less than in leaves infiltrated with the wild type. Tobacco leaves infiltrated with the *ripA5*-expressing strain produced much more ROS than leaves inoculated with D50E.

Ralstonia solanacearum, Type III effector

発表責任者：Rana Lokendra（rana.lokendra63@gmail.com）

講演番号：3C5p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C5 会場

Tetragenococcus halophilus SL10 株の凝集因子の同定
Identification of the aggregation factor in *Tetragenococcus halophilus* SL10
○柳原 愛梨[1]、松栄 幸汰[2]、脇中 琢良[3]、茂木 喜信[3]、渡部 潤[1,2,3,4] ([1]福島大院食農、[2]福島大食農、[3]ヤマサ醤油、[4]福島大食農発酵研)
○ Airi YANAGIHARA[1], Kouta MATSUE[2], Takura WAKINAKA[3], Yoshinobu MOGI[3], Jun WATANABE[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Food and Agric. Sci. Fukushima Univ., [2]Fac. Food and Agric. Sci. Fukushima Univ., [3]Yamasa Corp., [4]Inst. Ferment. Sci. Fac. Food and Agric. Sci. Fukushima Univ.)

Tetragenococcus halophilus は醤油醸造の発酵スターターとして使用される乳酸菌である。*T. halophilus* は株ごとに多様な性質を示すことが知られており、凝集性を示す株は醤油もろみを圧搾する際に菌体が生揚に移行し難いため清澄な醤油の生産に貢献し得る。今回、我々は醤油もろみから凝集性を示す SL10 株を新たに分離し、この株の凝集機構を明らかにすることを目的に研究を行った。自然変異により凝集能を失った非凝集性変異株を取得し、それらの変異点を解析した。取得した 26 株の変異株の内 24 株は intercellular adhesion（*ica*）オペロンに変異が生じていた。*ica* オペロンは黄色ブドウ球菌において細胞凝集に関与する polysaccharide intercellular adhesin（PIA）合成を担うことが知られている。そこで、小麦胚芽レクチンを用いて細胞表層の PIA を検出したところ、*ica* オペロン変異株は PIA が減少していた。この結果から、SL10 株は黄色ブドウ球菌と同様の機構で PIA によって凝集していると考えられた。残り 2 株の非凝集性変異株はカルジオリピン合成酵素遺伝子（*cls*）に変異が認められた。*cls* 変異株では、カルジオリピンが減少し、その前駆体のホスファチジルグリセロールが増加していた。また、*cls* 変異株は PIA が減少していた。カルジオリピンは膜タンパク質の局在や安定性に関与するリン脂質であることから、*cls* 変異によるカルジオリピンの減少が、膜タンパク質である IcaADC の機能に影響し PIA が減少したと考えられた。
Aggregating strains of *Tetragenococcus halophilus* tend to be trapped during the soy sauce mash pressing process and are therefore critical in clear soy sauce production. However, the precise molecular mechanism involved in *T. halophilus* aggregation remains elusive. Here, we explored the role of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) in aggregate formation in *T. halophilus* SL10, isolated from soy sauce mash. The transposition of the insertion sequence into the intercellular adhesion (*ica*) operon diminished aggregation and PIA production, highlighting the critical role of IcaADBC-mediated PIA production in *T. halophilus* aggregation. Furthermore, two non-aggregating cardiolipin synthase (*cls*) gene mutants with intact *ica* operon did not produce PIA. Phospholipid composition analysis in *cls* mutants revealed a decrease in cardiolipin and an increase in phosphatidylglycerol levels, underpinning the association between phospholipid composition and PIA production. These findings provide evidence for the pivotal role of *cls* in PIA-mediated aggregation.

Tetragenococcus halophilus, aggregation, soy sauce

発表責任者：渡部　潤（watanabe@agri.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：3C6a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 C6 会場

シラスプロテアーゼ分解物由来β-セクレターゼ阻害成分の探索・同定
Identification of the ß-secretase inhibitory ingredient derived from *shirasu* protease hydrolysate
○甲木 孝弘[1,2]、隅谷 栄伸[1]、金野 文香[2]、笠松 真吾[2]、居原 秀[2] ([1]（公財）東洋食品研究所、[2]大阪公立大院 理学研究科 生物化学専攻)
○Takahiro Katsuki[1,2], Hidenobu Sumitani[1], Ayaka Kinno[2], Shingo Kasamatsu[2], Hideshi Ihara[2] ([1]Toyo Institute of Food Technology, [2]Osaka Metropolitan Univ.)

【背景・目的】食品由来成分によるアルツハイマー病（AD）発症予防を目指し、我々はこれまでにイワシ稚魚（シラス）プロテアーゼ分解物（SPH）に、アミロイドβ（Aβ）生成に関与するβセクレターゼ（BACE1）阻害活性を見出している。さらに、BACE1 阻害活性画分を分画・精製し、AD モデルマウス（5x FAD）に腹腔内投与したところ、予防効果が期待できる結果が得られた。しかし、未だ活性成分は不明であったことから、液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析計（LC-QTOF-MS）を用いた BACE1 阻害活性成分の探索を行った。
【方法・結果】LC-QTOF-MS で活性画分の成分検出を試みたが、検出されず、MS に感度の無い成分の含有（特に高分子成分）が考えられた。そこで、活性画分を酸加水分解処理し、再度 LC-QTOF-MS 分析に供した結果、ピークが検出された。得られたピークの MS/MS スペクトルを解析した結果、グリコサミノグリカン骨格を有する成分で、特にコンドロイチン硫酸（CS）の含有を示唆する結果が得られた。そこで、CS 特異的な分解に関与する酵素であるコンドロイチナーゼを活性画分に処理し、BACE1 活性を評価した結果、コンドロイチナーゼ処理により BACE1 阻害活性が消失した。以上の結果から SPH に含まれる BACE1 阻害活性成分の 1 つは CS であることが分かった。
【Introduction】We previously found β-secretase (BACE1) inhibitory activity in *shirasu* (juvenile sardines) protease hydrolysate (SPH) used for amyloid β generation. Intraperitoneal administration of the purified BACE1 inhibitory fraction to Alzheimer's disease model-mice (5x FAD) was hypothesized to exert preventive effects. As the active ingredient had not been identified, we used liquid-chromatograph-quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOF-MS) to identify the BACE1 inhibitory molecule.【Methods and Results】We used LC-QTOF-MS to identify components of the inhibitory fraction, but were unable to detect any constituent molecules, suggesting that the BACE1 inhibitory molecule (in particular, macromolecular components) is insensitive to MS. The inhibitory fraction was then subjected to acid-hydrolysis followed by LC-QTOF-MS, and peaks were detected. Analysis of the MS/MS spectra of detected peaks suggested the presence of chondroitin sulfate (CS). Treatment of the inhibitory fraction with chondroitinase, a CS specific hydrolytic enzyme, resulted in loss of BACE1 inhibitory activity. These findings indicate that CS is a BACE1 inhibitory component of SPH.

Alzheimer's disease, ß-secretase, chondroitin sulfate

発表責任者：甲木　孝弘（takahiro_katsuki@shokuken.or.jp）

講演番号：3C6a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 C6 会場

LPS 誘発炎症モデルマウスに対する 3,5,6,7,8,3’,4’-heptamethoxyflavone の作用解析
Analysis of the effects of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone on a mouse model of LPS-induced inflammation.
○大政 俊樹、奥山 聡、澤本 篤志、中島 光業 (松山大院医療薬学)
○Toshiki OMASA, Satoshi OKUYAMA, Atsushi SAWAMOTO, Mitsunari NAKAJIMA (Grad. Sch. Clin. Pharm., Matsuyama Univ.)

【目的】生活習慣病や心血管疾患、がん、神経変性関連疾患などは慢性的な炎症と深く関連している。本実験では、リポ多糖（LPS）誘発炎症モデルマウスに対する柑橘果皮成分 3,5,6,7,8,3’,4’-heptamethoxyflavone の作用を検討した。【方法】① 9 週齢の C57BL/6N 雄性マウスに HMF（300mg/kg）を毎日 1 回経口投与し、5 日目に LPS（2mg/kg）を単回腹腔内投与した。LPS 投与後 2 日目に行動実験を行い、その後解剖により採取した脳は免疫組織化学染色により解析を行った。② ①の実験と同様に CON 群と LPS 群、HMF 群を設定し LPS 投与 3 時間後と 6 時間後の血清を採取し、フローサイトメトリーによりサイトカイン類の定量を行った。【結果・考察】① 行動実験において、CON 群と比較し LPS 群で有意な行動量の減少を示し、HMF 群ではその減少を抑制する傾向にあった。さらに、海馬におけるミクログリアの定量では、CON 群と比較し LPS 群で有意な増加を示したが、HMF 群でその増加を有意に抑制していた。② 各種血清サイトカイン類の定量において、CON 群と比較し LPS 群で増加したが、HMF による抑制はみられなかった。これらの結果から HMF の脳内における抗炎症作用は、血清サイトカイン抑制によるものではなく、脳内で直接ミクログリアの活性化を抑制することにより発揮された可能性が示唆された。
(1) Nine-week-old male C57BL/6N mice were orally administered HMF (300 mg/kg) once daily, and a single intraperitoneal injection of LPS (2 mg/kg) was performed on day 5. Behavioral analysis was performed on the 2nd day after LPS administration, and brains collected by autopsy were subsequently analyzed by immunohistochemistry. Behavioral analysis showed a significant decrease in behavior in the LPS group compared to the CON group, and a tendency to suppress this decrease in the HMF group. Furthermore, the quantification of microglia in the hippocampus showed a significant increase in the LPS group compared to the CON group, but the increase was significantly suppressed in the HMF group. (2) In the same method as (1), CON, LPS and HMF groups were set up, and serum was collected 3 and 6 hours after LPS administration, and cytokines were quantified by flow cytometry. Serum cytokines were increased in the LPS group compared to the CON group but was not suppressed by HMF. These results suggest that the anti-inflammatory effects of HMF in the brain may have been exhibited not by suppressing serum cytokines but by directly inhibiting microglial activation in the brain.

brain, inflammation, citrus

発表責任者：奥山 聡（sokuyama@g.matsuyama-u.ac.jp）

講演番号：3C6a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 C6 会場

運動と食品因子の併用は認知機能の向上を増幅できるか？ －運動と高吸収性クルクミンでの併用効果検証－

Can the combination of exercise and food Factors amplify improvements in cognitive function ?：Investigation from highly bioavailable curcumin and exercise

○鈴木 友也、太田 百香、伏見 知紗、武田 薫、津田 孝範（中部大院応生）
○TOMOYA SUZUKI, MOMOKA OTA, CHISA HUSHIMI, KAORU TAKEDA, TAKANORI TSUDA (Chubu Univ.)

運動は認知機能の改善効果が知られている。食品因子の中でクルクミンは、ヒトでも認知機能改善効果が報告されているが相反する結果もあり、低生体内吸収性が課題である。以上の背景からクルクミンの認知機能向上作用を効果的に得るためには運動と高生体内吸収性クルクミン製剤(Cur) [1] を併用することで、その作用を増幅できるのではないかと考えられる。本研究は運動と Cur の併用による認知機能向上増幅の検証と機序解明を目的とした。はじめに本研究に適したマウス系統と運動条件の検討を行い、ICR マウスを用いた自由運動が適切であること、運動のみ、Cur のみ(4.5mg /kg, 4wks)では認知機能向上効果が得られないことを確認した。この結果を踏まえて運動と Cur の併用効果を検討した結果、非運動コントロール群、運動群と比較して併用群でのみ有意な認知機能の向上が認められた。興味深いことに併用群の海馬では認知機能に関わる SIRT1、PGC-1α、FNDC5/Irisin、BDNF のタンパク質発現量はいずれも併用群でのみ有意に上昇した。以上の結果から運動と Cur の併用は Sirt1/PGC-1α/FNDC5/Irisin/BDNF 経路を増強して認知機能向上を増幅させると考えられる。

Exercise (EX) is known to improve cognitive function. Curcumin has been reported to improve cognitive function in humans, but there are conflicting results. The main reason for this result is that curcumin has low oral bioavailability. Based on the background, we hypothesized combination highly bioavailable Cur formulation (Cur) [1] combined with EX would significantly enhance cognitive function. The purpose of this study was to clarify improvement of cognitive function by the combination of EX and Cur. First, we confirmed that voluntary wheel running EX using ICR mice was appropriate in our study, and that neither EX alone or Cur (4.5 mg/kg, 4 wks) alone did not significantly improve cognitive function in ICR mice. Based on these results, we examined whether combination of EX and Cur improves cognitive function in mice. Significant improvement of cognitive function was observed only in the EX + Cur group. Furthermore, protein expression levels of Sirt1, PGC-1α, FNDC5/Irisin, and BDNF, which are related to cognitive function were significantly elevated in the EX + Cur group in hippocampus. These results suggest that the combination of EX and Cur significantly amplifies the improvement of cognitive function, and that the Sirt1/PGC-1α/FNDC5/Irisin/BDNF pathway is involved in this effect.

[1] *J. Funct. Foods* 81: 104443 (2021).

exercise, brain function, curcumin

発表責任者：津田孝範（tsudat@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3C6a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 C6 会場

カシス、アカジソ、甜茶に含まれるテストステロン分泌促進活性成分の機能解析と *in vivo* での検証
Functional analysis and *in vivo* verification of testosterone secretagogue in black currant, red perilla and rooibos tea

○足立 悠輔[1]、家代岡 広海[2]、鶴間 あい[2]、寺田 直史[2]、長世 智朗[2]、加藤 英介[2]、稲垣 洋介[3] ([1]北大農、[2]北大院農、[3]日本薬業)
○Yusuke ADACHI[1], Hiromi Kayooka[2], Ai Turuma[2], Naofumi Terada[2], Tomorou Nagase[2], Eisuke Kato[2], Yosuke Inagaki[3] ([1]Hokkaido Univ. Agr, [2]Hokkaido Univ. Grad, Agr, [3]Japan Pharma Co., Ltd., 4-2-16 Nihonbashi Hongokucho Chuo-ku, Tokyo 103-0021, Japan)

テストステロンは男性の生体、精神、性機能の維持に重要な役割を持つ。加齢やストレスによりテストステロンが減少すると、Late-onset hypogonadism（LOH）症候群と呼ばれる様々な症状を引き起こす。本研究では LOH 対策として、精巣ライディッヒ細胞からのテストステロン分泌を促進させる機能性食品の開発を目指した。

素材探索よりカシス、アカジソ、甜茶にライディッヒ細胞モデル I-10 に対するテストステロン分泌促進活性を見出し、それぞれの活性物質として delphinidin-3-rutinoside（D3R）、rosmarinic acid（RA）、myo-inositol（MI）を同定した。また、阻害剤との共投与や遺伝子発現解析より、D3R と RA は cAMP/PKA を介した Star（ステロイド産生急性調節タンパク質)の発現上昇、MI は Cyp19a1 の発現抑制が作用機構に関わることを明らかとした。さらに、C57B6L/6J マウスにカシス、アカジソ、MI を添加した飼料を摂取させたところ、精巣中の Star タンパク質量が増加し、血清テストステロン濃度が上昇した。以上より、D3R、RA、MI を含む食品が、テストステロン分泌を促進することで LOH を予防する機能性食品となる可能性を示した。

Testosterone plays an important role in maintaining male biological, mental, and sexual function. Decreased testosterone due to aging or stress causes a variety of symptoms called late-onset hypogonadism (LOH) syndrome. This study aimed to develop a functional food that promotes testosterone secretion from testicular Leydig cells as a preventive method for LOH syndrome.

Screening identified black currant, red perilla, and rooibos tea to promote testosterone secretion from I-10 cells, the Leydig cell model. Delphinidin-3-rutinoside (D3R), rosmarinic acid (RA), and myo-inositol (MI) was found as the bioactive compound contained in each material. Co-incubation of inhibitors and mRNA analysis revealed that activity of D3R and RA involves cAMP/PKA-mediated upregulation of *Star* gene, and that of MI involves downregulation of *Cyp19a1* gene. Furthermore, C57B6L6J mice fed a diet containing black current, red perilla and MI showed increased serum testosterone levels accompanied by higher level of Star protein in the testis compared to control mice. These results show that foods containing D3R, RA, and MI may be developed as a functional food to promote testosterone secretion and prevent LOH syndrome.

Testosterone, Late-onset hypogonadism, functional food

発表責任者：足立悠輔（adaada2897@icloud.com）

講演番号：3C6a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 C6 会場

弱鬱モデルマウスにおいて腸内細菌の占有率と相関して扁桃体の遺伝子を制御する転写因子の解析

Analysis of transcription factor regulating the amygdala genes correlated with gut bacteria occupancy in the mouse model of weak depression

○成田 龍矢[1]、近藤 隆[2]、阿部 啓子[3]、安岡 顕人[1] ([1]聖徳大人栄、[2]理研生命医科研、[3]東大院農応生科)

○Ryuya NARITA[1], Takashi KONDO[2], Keiko ABE[3], Akihito YASUOKA[1] ([1]Dept. of hum. nut., Seitoku Univ, [2]RIKEN Cent. for Int. Med. Sci., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】　強鬱や自閉症の患者は腸内細菌叢が健康な人と異なることが知られている。我々は若年期のマウスを孤立飼育することにより弱鬱モデルを作製している。本研究では、腸内細菌叢と脳機能を仲介する因子を解析し、食品成分により弱鬱を予防することを目的とする。
【方法・結果】　5 週齢の C57BL/6N 雄マウスを孤独(SH 群)あるいは集団(5 匹、GH 群)で 2 週間飼育したところ、SH 群は他個体との社会的接触の低下や記憶力の低下を示した。組織のトランスクリプトームと盲腸内細菌叢を解析したところ、扁桃体で 20 個、肝臓で 151 個の遺伝子の発現量が *Lactobacillus* 属の占有率と個体レベルで相関していた。これらの細菌相関遺伝子の上流の転写因子を公開データベースで検索したところ、異物代謝応答性の核内受容体 CAR が上位に見いだされた。CAR に近縁な PXR はインドール系化合物に応答することが知られていることから、我々は約 15 種類のインドール系化合物への CAR の応答性をレポータアッセイ系で検討した。その結果、インドール-3-ピルビン酸が CAR を活性化し、3-メチルインドール(スカトール)が CAR を抑制することを見出した。今後は弱鬱マウスの腸内・脳の代謝物の解析や、生体内でのインドール系化合物による CAR の活性化を検討する。

【Background・Purpose】 It was shown that patients of major depression and autism spectrum disorder harbour gut microbiota that are distinct from healthy individuals. We have established weak depression model by raising young mouse in isolated condition. In this study, we investigated factors that intermediate between gut micobiota and brain function to prevent weak depression by food ingredients.
【Method・Result】 Five week-old C57'BL/6N mice were raised under isolated (SH-group) or grouped (GH-group) housing condition. SH-group showed less social interaction, and learning ability. Tissue transcriptome, and caecum microbiota analyses resulted in the identification and 20 amygdala, and 151 hepatic genes whose expression levels significantly correlated with the occupancy of *Lactobacillus* at individual levels. Then we searched up-stream transcription factors of these bacteria-correlated genes using public databases and found a xeno-sensing nuclear receptor, CAR as the primary candidate. Because PXR, which is close relative of CAR, has been shown to respond to indole related chemicals, we examined about 15 indole related chemicals for their effect on CAR activity using reporter assay system. As a result, we identified indole-3-pyruvate as an activator, and 3-methyl indole (skatole) as an inhibitor of CAR. We are planning to analyze gut and brain metabolites in weak depression mouse, and confirm CAR activation by these chemicals *in vivo*.

weak depression, nuclear receptor, indole-related metabolite

発表責任者：安岡顕人（yasuoka.akihito@wa.seitoku.ac.jp）

講演番号：3C6a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 C6 会場

Lacticaseibacillus paracasei strain Shirota の継続摂取が内勤勤労者の日中のパフォーマンスに与える効果

Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* strain Shirota on daytime performance in healthy office workers: A double-blind, randomized, crossover, placebo-controlled trial.

○早川 弘子、石川 紘司、須田 一徳、権藤 祐輔、平沢 元希、中村 隼人、高田 麻衣、河合 光久、松田 一乗（株式会社ヤクルト本社中央研究所）
○Hiroko Kikuchi-Hayakawa, Hiroshi Ishikawa, Kazunori Suda, Yusuke Gondo, Genki Hirasawa, Hayato Nakamura, Mai Takada, Mitsuhisa Kawai, Kazunori Matsuda (Yakult Central Institute)

Lacticaseibacillus paracasei strain Shirota（LcS）には一時的なストレス反応やそれに伴う睡眠悪化を軽減する作用が認められており、これが日中のパフォーマンスにも効果を生むことが期待される。そこで今回は LcS の摂取が日中の覚醒度や意欲・集中力などに及ぼす影響を評価した。健康な内勤勤労者のうち睡眠に不満を有する 40 歳代と 50 歳代の男女 12 名を対象とし、LcS 含有飲料（10^{11} cfu／100 mL・日）に関するプラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較試験を実施した。前観察期と飲料摂取期（各 4 週間）の最終週に、日中の主観的気分指標の評価とパフォーマンスの生理指標として脳波と自律神経機能の測定を実施した。主観的気分指標（眠気、疲労、意欲、集中力、楽観度）はいずれも LcS 摂取期にプラセボ摂取期よりもパフォーマンスが高まる方向に変化し、午後の集中力の高まりは有意であった。聴覚オドボール課題遂行時の事象関連電位 P300 潜時はプラセボ摂取期よりも LcS 摂取期に短縮した。自発脳波の解析では、LcS 摂取により午後の θ 波パワー値（安静開眼時と課題遂行時）が有意に低下した。午後の自発脳波（安静閉眼時）の θ 波パワー値の LcS 摂取に伴う変化率（対プラセボ摂取期）は、同時間帯の集中力体感の変化量との間で負の相関が認められた。交感神経指標 LF/HF についても、主観的気分指標との間で変化量に負の相関が見られた。以上の結果より、LcS の継続摂取は日中のパフォーマンスを向上させる可能性のあることが主観的および客観的に示された。

To explore possible efficacy of *Lacticaseibacillus paracasei* strain Shirota (LcS) for improving daytime performance, we conducted a double-blind, randomized, crossover, placebo-controlled study of 12 healthy office workers with sleep complaints. The participants received fermented milk containing LcS (daily intake of 1×10^{11} cfu/100mL) and placebo milk, each for a 4-week period, and underwent assessments of their subjective mood and physiological state indicators via electroencephalogram and heart rate variability. The attention score in the afternoon as assessed by visual analog scale was higher in the LcS intake period than in the placebo. Theta power on EEG measured at rest or during an auditory oddball task in the afternoon was significantly lower in the LcS period than in the placebo. The change rate of theta power was associated with the change in the attention score. Treatment-associated changes were also observed in sympathetic nerve activity index. These results indicate that LcS has possible efficacy for improving daytime performance, supported by observations in the related physiological state indicators.

probiotics, daytime performance, electroencephalograms

講演番号：3C6a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 C6 会場

ピーマン中の苦味物質を受容する苦味受容体の探索

The exploration of human bitter taste receptors that recognize bitter components of green peppers

○大上 明日実[1]、田村 佳子[1]、吉田 真梨[1]、奥田 悠介[1]、栁澤 琢也[1]、三坂 巧[2] ([1]キユーピー株式会社、[2]東大院農生科)
○ Asumi DAIJO[1], Yoshiko TAMURA[1], Mari YOSHIDA[1], Yusuke OKUDA[1], Takuya YANAGISAWA[1], Takumi MISAKA[2] ([1]KEWPIE Corporation, [2]Univ. Tokyo Appl. Biol. Chem.)

【背景・目的】

野菜に含まれるポリフェノールやテルペンは、様々な健康機能を有することが報告されている。しかしこれら物質の多くは、苦味や渋味などの嫌な呈味を示し、それが野菜の摂取不足の一因にもなってしまっている。そこで我々は、野菜に含まれる多様な化合物群を対象にそれらの苦味が受容されるメカニズムを解明し、苦味強度を制御する手法を探索することで、野菜摂取増大につながる方法を科学的に提案できるのではないかと考えている。

我々はこれまでに、レタス類に含まれる主要苦味成分（セスキテルペンラクトン）がヒト苦味受容体TAS2R46に受容され、その苦味強度が酸性条件下で低減されることを明らかにしている。本研究では対象としてピーマンを選択し、含有される苦味物質がどの苦味受容体によって受容されるかを探索するとともに、客観的苦味強度の簡便な評価方法についても構築を試みた。

【方法・結果】

培養細胞に 25 種類のヒト苦味受容体とキメラ G タンパク質を一過的に発現させた。受容体発現細胞にピーマンに含まれる主要苦味成分であるクエルシトリンを添加し、受容体活性化に伴って生ずる細胞内カルシウム濃度の変化を、蛍光指示薬および発光タンパク質により検出した。その結果、複数のヒト苦味受容体においてクエルシトリンに対する応答が確認されること、特にその中でも TAS2R8 の応答感度が比較的高いことが明らかになった。

The consumption of vegetables is often insufficient, partly because of their bitter tastes. The purpose of this study was to investigate the mechanisms underlying bitter taste reception and develop methods to suppress bitterness. Previously, we reported that TAS2R46-expressing cells responded most strongly to bitter compounds in lettuce. Here, we focused on quercitrin, a bitter compound found in green peppers. Cultured cells heterologously expressed human bitter taste receptors together with a chimeric G protein, and cellular responses to quercitrin were analyzed using calcium imaging or luminescence detection of Ca^{2+}-sensitive photoproteins. Cellular responses were clearly detected for some bitter taste receptors, with TAS2R8-expressing cells responding most strongly to quercitrin. This showed that TAS2R8 would be useful for examining methods to suppress the bitterness of green pepper.

taste receptor, bitter taste, green pepper

講演番号：3C6a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 C6 会場

高甘味度甘味料の後口に感じられる苦味の客観的強度評価法の改良

Improvement of the measurement method for bitter aftertastes in artificial sweeteners

○齋藤 美優、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Miyuu SAITO, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景・目的】高甘味度甘味料は低カロリーで甘味が強いという特徴があるものの、後味に不快な苦味を呈するという欠点が知られている。高甘味度甘味料のうち、アセスルファム K とサッカリンが呈する苦味は、ヒト苦味受容体 TAS2R31 と TAS2R43 で受容されることがすでに報告されている（Kuhn *et al.*, 2004）。受容体が同定されているにもかかわらず、これらの甘味料が呈する苦味強度を苦味受容体アッセイで検出することは、応答強度の微弱さから技術的に困難であった。本研究では、細胞応答の検出に高感度な発光測定法(Toda *et al.*, 2011)を使用することで、アセスルファム K とサッカリンの呈する苦味強度を容易に評価できる方法を確立することにした。
【方法・結果】苦味受容体とアポ発光タンパク質を一過的に発現させた培養細胞に対し、リガンド溶液を添加した際の細胞内 Ca^{2+}濃度変化を、発光強度変化によって評価した。また容易な応答検出を目的に、TAS2R の N 末端タグ配列の変更(Tan & Seetoh, 2022)の効果についても検討した。
細胞応答の検出を従来の蛍光法から発光法に変更することで、TAS2R31 及び TAS2R43 のアセスルファム K・サッカリンに対する濃度依存的な応答が簡便に測定できるようになった。また、N 末端タグ配列変更により、得られる応答強度が 1.5~3 倍程度まで増強した。現在は、改良された簡便な評価系を用い、高甘味度甘味料の苦味を抑制する物質の探索を行っている。

Although artificial sweeteners exhibit strong sweetness, they generally possess an intrinsic lingering bitter aftertaste. It has been reported that acesulfame K and saccharin can activate both of TAS2R31 and TAS2R43, members of the human bitter taste receptors. However, in the present situation, it is difficult to detect bitter aftertastes using traditional cell-based assays because of their weak bitterness. In this study, we attempted to improve the measurement method for cellular responses, using luminescent detection of Ca^{2+}-sensitive photoproteins, instead of fluorescence detection of Ca^{2+}-sensitive fluorescent dyes. Additionally, we altered the N-terminal tag sequence of TAS2R. These changes made it possible to clearly detect the bitter aftertaste of acesulfame K and saccharin. Currently, we are using an improved measurement system to search for substances that can suppress the bitterness of artificial sweeteners.

taste receptor, bitterness, artificial sweetener

発表責任者：三坂巧（amisaka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C6a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 C6 会場

甘味受容体阻害剤が示すうま味受容体阻害活性の検討
Inhibitory activities of sweet taste inhibitors on umami taste receptors.
○川﨑 舞子、木寺 優太、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Maiko KAWASAKI, Yuta KIDERA, Takumi MISAKA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】甘味受容体（T1R2/T1R3）・うま味受容体（T1R1/T1R3）は、クラス C GPCR ファミリーに属する T1Rs のヘテロダイマーから構成されており、T1R3 サブユニットは両者で共通である。受容体に作用する物質群のうち、各サブユニットの膜貫通領域に作用する物質には、受容体の活性調節を行うものが存在する。例えば、甘味受容体阻害剤であるラクチゾールおよびその構造類縁体は、T1R3 の膜貫通領域に作用することで甘味受容体を阻害することが知られている。

一方、これらの物質がうま味受容体の阻害剤としても機能するという報告が散見されるものの、阻害活性の詳細については明らかでない。そこで本研究では、ラクチゾールおよびその構造類縁体を対象に、うま味受容体への阻害活性の有無を測定し、甘味受容体への阻害活性との比較を行った。
【方法・結果】ヒト甘味受容体（T1R2/T1R3）・ヒトうま味受容体（T1R1/T1R3）をそれぞれ安定発現する細胞株を構築した。各細胞株にキメラ G タンパク質とアポ発光タンパク質を一過的に遺伝子導入し、甘味物質/うま味物質と対象化合物の混合溶液添加時の発光強度変化の検出を行った。

その結果、T1R3 の膜貫通領域に作用する甘味阻害剤について、試行した物質すべてがうま味受容体阻害剤として機能することが明らかになった。しかし、これらの化合物を低濃度で用いた場合、甘味受容体を十分に阻害する一方で、うま味受容体をわずかにしか阻害せず、甘味受容体とうま味受容体において阻害活性が大きく異なることも明らかになった。

Sweet and Umami taste perception in mammals is mediated by the sweet taste receptor (T1R2/T1R3) and umami taste receptor (T1R1/T1R3), respectively. Several sweet taste inhibitors that act on the transmembrane domain of T1R3 have been reported, some of which also been reported to function as umami taste inhibitors. This is presumably because the sweet and umami taste receptors have the same T1R3 subunit. In this study, we examined the inhibitory activities of several sweet taste inhibitors on umami taste receptors, and found that all the sweet taste inhibitors tested also functioned as umami taste inhibitors. Furthermore, we compared the effects of these inhibitors on the sweet and umami taste receptors under the same conditions. The results showed that inhibitors at low concentrations had a smaller inhibitory effect on the umami taste receptor than on the sweet taste receptor.

taste receptor, sweet, umami

発表責任者：三坂巧（amisaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C6a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 C6 会場

脊椎動物における旨味・甘味受容体 T1R の進化多様性の解明

Diversity of the umami and sweet taste receptors (T1Rs) in vertebrates

○戸田 安香[1]、西原 秀典[2,3]、藏本 多恵[2,4]、蒲原 功汰[1]、後藤 あず紗[1]、星野 杏子[1]、岡田 晋治[5]、工樂 樹洋[6]、岡部 正隆[7]、石丸 喜朗[1]（[1]明大農・農芸化、[2]近大農・生物機能、[3]東工大院・生命理工、[4]東工大・科技創研、[5]東大院農生科・応生化、[6]国立遺伝研、[7]慈恵医大・解剖）

○YASUKA TODA[1], HIDENORI NISHIHARA[2,3], TAE KURAMOTO[2,4], KOTA KAMOHARA[1], AZUSA GOTO[1], KYOKO HOSHINO[1], SHINJI OKADA[5], SHIGEHIRO KURAKU[6], MASATAKA OKABE[7], YOSHIRO ISHIMARU[1] ([1]Dept. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Kindai Univ., [3]Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Inst. Tech., [4]Inst. Innov. Res., Tokyo Inst. Tech., [5]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo., [6]Mol. Life Hist. Lab., Nat. Inst. Genet., [7]Dept. Anat., Jikei Univ. Sch. Med.)

味覚は、食物中に含まれる栄養素や毒物を検出するための重要な化学感覚である。脊椎動物において、旨味・甘味物質の検出は、G タンパク質共役型受容体の T1R 受容体が担っている。ヒトやマウスなどの哺乳類や、ゼブラフィッシュなどの真骨魚類は、T1R1、T1R2、T1R3 の 3 分子のみを保有している。そのため長い間、脊椎動物の祖先は 3 種類の T1R 遺伝子（*TAS1R*）をもち、進化の過程で変化することなくそのまま現在まで受け継がれてきたと考えられてきた。

一方、当グループは様々な脊椎動物を対象にゲノム及びトランスクリプトームデータ解析を実施することで、T1R 遺伝子が実際には脊椎動物全体で 11 種類存在することを見出した（2023 年度本大会にて発表）。昨年度は、古代魚の一種であるポリプテルスを対象に、in situ hybridization 法を用いた発現解析や培養細胞系を用いた機能解析を実施し、新たに見出した T1R 受容体同士がヘテロダイマーを形成し、分岐鎖アミノ酸を中心とした必須アミノ酸などに応答することを明らかにした。今年度は、軟骨魚類であるゾウギンザメを対象に新規 T1R 受容体の機能解析を実施した。その結果、ゾウギンザメにおいても新規 T1R 受容体は必須アミノ酸を主に受容したことから、脊椎動物の祖先種の T1R 受容体が必須アミノ酸センサーとして機能していた可能性が示された。

新規 T1R 遺伝子は魚類に限らず、爬虫類や両生類のゲノム配列上にも確認されたことから、T1R 受容体が従来考えられていたよりも多様なレパートリーで構成され、脊椎動物の生息環境や食性の多様化に貢献してきた可能性が考えられた。今後、さらなる生物種を対象に解析を進めることで、「おいしい味感覚」を脊椎動物が獲得した進化的背景や生理的意義の解明に資することが期待される。

Taste is a vital sense used to discriminate between nutrient-rich and toxic food items. In vertebrates, sweet and umami tastes are sensed by G protein-coupled receptors termed T1Rs. It has been thought that there are only three T1Rs, T1R1, T1R2, and T1R3, in vertebrates. In this study, however, we newly identified additional members of T1Rs by analyzing the genome and transcriptome data of a broad range of jawed vertebrates. Our data suggest that T1R genes can be classified into eleven members. Our functional analyses of bichir and elephant fish revealed that the newly discovered T1R members function as an essential amino acid receptor. This improves understanding of the evolutionary process of T1R receptors and contributes to elucidating the origin of the umami and sweet tastes.

taste, evolution, GPCR

講演番号：3C6a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 C6 会場

辛味・渋味成分に対する加齢依存的な嗜好性変化
Change in taste preference to capsaicin and catechin due to aging in mice
○成川 真隆[1]、三坂 巧[2] ([1]京女大食、[2]東大院農)
○Masataka NARUKAWA[1], Takumi MISAKA[2] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

味覚機能は加齢に伴い変化することが知られているが、その詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。これまでの研究では、主に基本味を呈する特定の味物質を対象として、加齢によりそれら味物質の嗜好性がどのように変化するのかが検討されてきた。一方、食物は基本味以外にも様々な呈味物質が含まれ、複雑な味を呈する。しかしながら、加齢により基本味物質以外の呈味物質に対する嗜好性がどのように変化するかよくわかっていない。本研究では、唐辛子の辛味成分であるカプサイシンと茶などに含まれる代表的な渋味成分であるカテキンに着目し、加齢によりこれら物質に対するに嗜好性がどのように変わるかを検討した。若齢および高齢マウスを用いて、48 時間二瓶選択テストによりカプサイシンとカテキンに対する嗜好性を測定した。その結果、若齢と高齢マウス間でカプサイシンに対する嗜好性に有意な差は認められなかった。一方で、カテキンに対する嗜好性は高齢マウスで若齢マウスよりも有意に高い値を示した。これは、加齢によりカテキン嗜好性が低下することを意味する。したがって、加齢によりカプサイシン感受性は変化しない一方で、カテキン嗜好性は低下する可能性が考えられた。

While several reports have suggested that taste sensitivity changes with age, the molecular mechanisms underlying this phenomenon are still unclear. Previous studies on the matter have focused mainly on the relationship between aging and taste detection of specific basic taste-inducing substances, and other than for these basic substances, understanding of how aging affects the detection of taste is limited. To understand the effect that aging has on the taste detection of some familiar substances found in our daily meals, namely capsaicin and catechin, we investigated age-related changes in taste preferences to capsaicin and catechin in young and old mice using a 48-h two-bottle preference test. For the capsaicin stimuli, the mice showed avoidance behavior in a concentration-dependent manner. However, we observed that there was no significant difference in the preference ratio for capsaicin between young and old mice. For the catechin stimuli, although both age groups showed avoidance behavior in a concentration-dependent manner, the preference ratio in old mice showed significantly higher values than those in young mice. This suggests that catechin sensitivity is declined due to aging. Thus, we observed that catechin sensitivity decreases with age, but capsaicin sensitivity does not.

Aging, Taste, Mice

発表責任者：成川真隆（narukawa@kyoto-wu.ac.jp）

講演番号：3C6a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 C6 会場

さまざまな塩添加によるうま味の増加

Enhancement of umami taste by adding various salts

○田中 伽奈、桂川 晴花、近藤 高史（近畿大）
○Kana TANAKA, Haruka KATSURAGAWA, Takashi KONDOH (Kindai Univ. Fac. Agric.)

うま味は五基本味のひとつであり、和食の基本である「だし」に欠くことのできない重要な味である。だしのおいしさが少量の NaCl 添加により増加することは経験的に知られているが、その理由は不明である。そこで、本研究では「NaCl 添加によりうま味が増加する」と仮説を立て、健康な女子大学生 7～15 名を用いて、官能評価法により検討した。うま味基準液として、16 mM (0.3%) L-グルタミン酸ナトリウム (MSG) をベースとして 1.3 倍ごとに濃度を増加させた 6 種類の溶液（S0～S5）を調製した。テスト溶液として、S0 にさまざまな濃度の塩化合物を添加し、基準液と 2 点識別することにより、うま味強度と好ましさをスコア化した。その結果、NaCl とその他の Na 塩（Na_2SO_4, $NaHCO_3$, Na gluconate）は、うま味強度と好ましさの両方を濃度依存的に増加した。Cl 塩（$MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, N-methyl-D-glucamine (NMDG)-Cl）は、うま味強度をわずかに増加したが、好ましさは増加しなかった。さらに、NMDG-gluconate（Na^+も Cl^-も含まない塩）の作用は、最も小さかった。本結果から、うま味細胞に Na^+依存性うま味増幅機構が存在する可能性が示唆された。

Umami is one of the five basic tastes and is indispensable for *dashi*, which is the basis of Japanese cuisine. It has been known that addition of small amounts of NaCl or say sauce on *dashi* enhances its palatability to a great extent. However, the mechanisms are not understood. Here we hypothesized that NaCl enhances umami taste caused by monosodium L-glutamate (MSG) in humans. Seven to fifteen healthy University students were used for sensory evaluations. Sixteen mM (0.3%) MSG was employed as basic standard solution (S0). Other five standard solutions (S1 to S5) were prepared with 1.3-fold steps of increased concentrations. Umami intensity and palatability of various salt solutions on S0 (S0 + salts) were evaluated by comparing with 6 standard solutions. NaCl and other Na^+ salts (Na_2SO_4, $NaHCO_3$, sodium gluconate) enhanced both umami intensity and palatability in a concentration-dependent manner. The Cl^- salts ($MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, *N*-methyl-D-glucamine (NMDG)-Cl) showed only modest to weak enhancement of umami intensity with no increase in palatability. Addition of NMDG-gluconate (non-Na^+, non-Cl^- salt) was least effective. These results suggest there are Na^+-dependent enhancing mechanisms for umami taste in humans.

umami taste, taste enhancement, sensory evaluation

発表責任者：近藤　高史（tkon@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3C6a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 C6 会場

ヒト甘味の NaCl 添加による増加作用

Enhancement of sweet taste by NaCl in humans

○近藤 高史、勝亦 佑衣、吉武 杏花（近畿大）
○Takashi KONDOH, Yui KATSUMATA, Kyoka YOSHITAKE (Kindai Univ. Fac. Agric.)

ヒトにおいて、スクロース、フルクトース、グルコースなどの糖による甘味は、少量の NaCl 添加により増加する。この現象は、甘味と塩味の対比効果（すなわち、脳内で生じる味覚情報の統合作用）であると教科書に記載されてきた。しかし、ごく最近、マウスを用いた実験により、舌の甘味細胞に発現する Na-グルコース共輸送体 1 (SGLT1) の関与で説明できることが報告された。そこで、本研究では、ヒトにおいてもマウスと同様に SGLT1 で説明できるか調べた。15 名の健康な女子大学生（21～22 歳）を官能評価に使用した。試験したすべての天然および人工甘味料（グルコース、ガラクトース、スクロース、フルクトース、スクラロース）の甘味強度は、0.1% (17 mM) NaCl 添加により有意に増加した。しかし、この増加はグルコースで最も大きく観察された。NaCl の効果は 0.1%で最大に達し、濃度依存性が認められた。この増加は、フロリジン（SGLT の競合的阻害剤）およびミザグリフロジン（SGLT1 選択的阻害剤）によって減少した。なお、口中にスクロースを 3 分間保持してもグルコースは生成されなかった。これらの結果は、ヒトにおいて、SGLT1 だけでなく他のメカニズムも関与することを示唆する。

Sweet taste of sugars (such as sucrose, fructose, and glucose) is enhanced by adding small amounts of NaCl in humans. Therefore, the phenomenon has been explained as contrast (integration) between sweet and salty sensations occurred in the brain. However, recent studies of mouse experiments demonstrated involvement of sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) expressed in the sweet cells on the tongue. Here we investigated if SGLT1 hypothesis was also supported in humans. Fifteen healthy University students (female, 21-22 years-old) were used for sensory evaluations. Addition of 0.1% (17 mM) NaCl enhanced sweetness of all natural and artificial sweetners tested (glucose, galactose, sucrose, fructose, and suclarose) with the most effectiveness for glucose. Effects of NaCl reached the maximum at 0.1%. The enhancement was reduced by phlorizin (a competitive inhibitor of SGLTs) as well as mizagliflozin (a SGLT1-selective inhibitor). Glucose was not produced from sucrose in the mouth for 3 min. These results suggest that not only SGLT1 but also other mechanisms are involved for the enhancement of sweet taste by NaCl in humans.

sweet taste, taste enhancement, sodium-glucose cotransporter

発表責任者：近藤　高史（tkon@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3C6a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 C6 会場

苦味受容体 Tas2r108 の発現調節により 3T3-L1 細胞の成熟脂肪細胞への分化は抑制される

Modulating expression of bitter taste receptor Tas2r108 inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation.

○大島 翔汰、佐々木 琴美、鶴間 あい、木村 駿介、加藤 英介（北大院農）
○SHOTA OSHIMA, KOTOMI SASAKI, AI TSURUMA, SHUNSUKE KIMURA, EISUKE KATO (Hokkaido Univ.)

苦味受容体（T2R）は、全身の様々な部位に存在し、脂肪細胞にも遺伝子発現が見られるが、その機能は明らかとなっていない。苦味化合物には、脂肪細胞において脂質代謝を調節する効果が多数報告されていることから、T2R は脂肪細胞において脂質代謝を調節していると予想される。本研究では、脂肪組織における T2R が持つ機能を解明することを目的とした。

まず、マウス脂肪モデル細胞株である 3T3-L1 細胞に、プラスミドおよび AAV を用いて *Tas2r108* を過剰発現させ、成熟脂肪細胞への分化誘導に対する影響を解析した。次に、CRISPR-Cas9 法を用いて *Tas2r108* をノックアウトし、同様に分化誘導に対する影響を解析した。最後に、shRNA により *Tas2r108* をノックダウンし、分化誘導に対する影響を解析した。いずれの場合でも 3T3-L1 細胞の成熟脂肪細胞への分化の抑制が見られ、Tas2r108 は脂肪細胞の分化を制御する機能を有することが示唆された。また、*Tas2r108* のノックアウト細胞において、cAMP により発現が誘導され、過剰発現により分化が抑制される転写因子 *Nr4a1-3* の遺伝子発現が上昇しており、Tas2r108 は cAMP の調節を通じて分化を抑制していることが推定された。

Bitter taste receptors (T2Rs) are expressed throughout the body such as adipocyte. However, the role of T2Rs in adipocytes remain unknown. Bitter tastants are known to modulate lipid metabolism in adipocytes. Therefore, we hypothesized that T2Rs regulate lipid metabolism in adipocytes and studied their function.

First, *Tas2r108* was overexpressed in murine 3T3-L1 preadipocytes by introducing AAV or plasmid vectors, and its effect on adipocyte differentiation was analyzed. Next, *Tas2r108* knockout 3T3-L1 cell line was generated using the CRISPR-Cas9 system and analyzed its effect on differentiation. Finally, the effect of *Tas2r108* knockdown on adipocyte differentiation was evaluated. In all cases, adipocyte differentiation of 3T3-L1 was inhibited, suggesting that Tas2r108 has a role to regulate adipocyte differentiation. Additionally, in *Tas2r108* knockout cells, gene expression of the transcription factor *Nr4a1-3*, whose expression is induced by cAMP and whose overexpression suppresses differentiation, was highly elevated, suggesting that Tas2r108 suppresses differentiation through regulation of cAMP.

bitter taste, adipocyte, lipid metabolism

発表責任者：加藤英介（eikato@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C6p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C6 会場

新姫果皮抽出エキスの抗炎症効果
Anti-inflammatory effect of Niihime extract.
○小山 彩華[1]、渡辺 章夫[1,4]、衛藤 未侑[1]、針谷 夏菜華[1]、夏目 矩行[2]、山野 亜紀[3]、照屋 俊明[2,3]、米澤 貴之[4]、禹 済泰[5] ([1]十文字学園女大・食品開発、[2]琉球大院・理工、[3]琉球大・教育、[4]中部大・生機研、[5]中部大・応生)
○Ayaka KOYAMA[1], Akio WATANABE[1,4], Miyu ETO[1], Nanaka HARIGAI[1], Noriyuki NATSUME[2], Aki YAMANO[3], Toshiaki TERUYA[2,3], Takayuki YONEZAWA[4], Je-Tae WOO[5] ([1]Department of Food Science, Jumonji Univ., [2]Graduate school of Engineering and Science, Univ. of the Ryukyus., [3]Faculty of Education, Univ. of the Ryukyus., [4]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [5]Department of Biological Chemistry, Chubu Univ.)

新姫は三重県熊野市で商業的に栽培されている香酸柑橘である。タチバナと在来柑橘の自然交雑種とされ、シークヮーサーのような強い酸味と独特の爽やかな香りを持つ。これまでの研究でシークヮーサーから単離された Nobiletin(Nob)が細胞や動物において慢性的な炎症を改善することが報告されている。新姫も Nob を豊富に含むため、シークヮーサーや Nob と同様の抗炎症効果が期待される。本研究では、新姫エキスおよび新姫の主成分である Nob と 8-Demethoxy tangeretin(8-Detan)の抗炎症効果についてマウスマクロファージ様細胞株 RAW264、ラット好塩基球様白血病細胞株 RBL-2H3、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用いて検討した。その結果、新姫エキス、Nob と 8-Detan は LPS で炎症誘導した RAW264 において NO 産生を抑制し、抗原感作したラット好塩基球様白血病細胞株 RBL-2H3 においてもヒスタミンの分泌を抑制した。また、新姫エキス、Nob と 8-Detan は、TNF-α で炎症誘導した HUVECs に対してヒト単球細胞株 THP-1 の接着を抑制した。これらのことから新姫エキスと主成分である Nob と 8-Detan は様々な細胞において炎症を抑制する効果が確認された。詳細な作用機序については現在解析中である。

Niihime, sour citrus fruit, is commercially cultivated only in the Kumano area of Mie prefecture. It is considered to be an autogenous citrus produced by cross hybridization of landrace mandarin and Tachibana (*Citrus tachibana*). The fruit has a citrus flavor and sour taste similar to Shiikuwasa (*Citrus depressa*). Previous studies have demonstrated that nobiletin (Nob) isolated from Shiikuwasa modulates chronic inflammation in cells and animals. Since Niihime is also rich in Nob it would be expected to have anti-inflammatory effects similar to Shiikuwasa. This study examined the effects of Niihime extract, Nob, and 8-Demethoxy tangeretin (8-Detan) on inflammation using mouse RAW264 macrophages, rat RBL-2H3 mast cells, and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The Niihime extract, Nob, and 8-Detan suppressed the production of histamine in antigen-stimulated RBL-2H3 cells and nitrous oxide production in LPS-stimulated RAW264 cells. Niihime extract, Nob, and 8-Detan also suppressed cell adhesion in human THP-1 monocytes and TNF-α induced HUVECs. These results suggest that Niihime extract, Nob, and 8-Detan have anti-inflammatory effects in various cell lines. The study of the detailed mechanism of these effects is currently underway.

Niihime, Polymethoxyflavonoids, Anti-inflammatory

発表責任者：渡辺章夫（akio-wa@jumonji-u.ac.jp）

講演番号：3C6p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C6 会場

ポリメトキシフラボノイドの吸収性と生理活性の相互連関解析
A study of the relationship between absorption and activity of polymethoxyflavonoids.
○衛藤 未侑[1]、阿部 馨[1]、山下 留奈[1]、小山 彩華[1]、夏目 矩行[2]、米澤 貴之[3]、禹 済泰[4]、渡辺 章夫[1,3] ([1]十文字学園女子大・食品開発、[2]琉球大院・理工、[3]中部大・生機研、[4]中部大・応生)
○ Miyu ETO[1], Kaoru ABE[1], Runa YAMASHITA[1], Ayaka KOYAMA[1], Noriyuki NATSUME[2], Takayuki YONEZAWA[3], Je-Tae WOO[4], Akio WATANABE[1,3] ([1]Department of Food Science, Jumonji Univ., [2]Graduate school of Engineering and Science, Univ. of the Ryukyus., [3]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [4]Department of Biological Chemistry, Chubu Univ.)

ミカン科やショウガ科由来の天然化合物であるポリメトキシフラボノイドは、抗炎症作用や抗肥満など様々な生理活性を持つことが明らかとなっている。しかし、ポリメトキシフラボノイドのメトキシ基の付く位置と数の違いが吸収、代謝、生理活性の発現に及ぼす作用機構は未だ不明な点が多い。

本研究では、シークヮーサー、新姫、黒ショウガ由来の 12 種類のポリメトキシフラボノイドを入手または単離精製し、腸管吸収評価としてヒト腸管上皮様細胞株 Caco-2 を用いて、2 時間培養後の基底膜側の化合物濃度を定量した。生理活性については、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264、ラット好塩基球様白血病細胞株 RBL-2H3、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)などの培養細胞株を用いて抗炎症作用を指標とした生理活性に関する構造相関解析を実施した。

その結果、抗炎症性には A 環の 5 位と 7 位にメトキシ基を持つことが必要で、吸収性にはメトキシ基が付く位置とメトキシ基が付く数が B 環より A 環の方が多いことが重要であると考えられた。今後は、ポリメトキシフラボノイドの代謝物や ABC 多剤排出トランスポーターへの影響を検討していく予定である。

Polymethoxyflavonoids are natural compounds found in *Rutaceae* and *Zingiberaceae*, that possesses various biological functions such as anti-inflammatory and anti-obesity effects. However, the effects on absorption, metabolism, and bioactivity, of variations in the positions and numbers of the methoxy groups of polymethoxyflavonoids remain unknown.

In this study, we performed a structural correlation analysis of 12 types of polymethoxyflavonoids on absorbability in human intestinal Caco-2 cells and anti-inflammatory bioactivity using mouse RAW264 macrophages, rat RBL-2H3 mast cells, and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

The results demonstrated that polymethoxyflavonoids with methoxy groups at the 5 and 7 positions of the A ring tended to enhance anti-inflammatory effects. We also showed that the 4' position and the number of the methoxy group A rings being greater than B rings were major factors that affected absorbability. We plan to investigate the effects of metabolites of polymethoxyflavonoids or ABC multidrug transporters in future studies.

Kaempferia parviflora, Niihime, Polymethoxyflavonoids

発表責任者：渡辺章夫（akio-wa@jumonji-u.ac.jp）

講演番号：3C6p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C6 会場

アミロイドβ誘発記憶障害モデルマウスのミトコンドリア機能低下に対する真珠層抽出成分の効果

Effect of nacre extract on mitochondrial dysfunction associated with the intracerebroventricular injection of beta-amyloid in mice

○趙 岩、若生 真由美、大町 知輝、長谷川 靖（室工大院）
○enn cyou, mayumi wakou, tomoki omachi, yasushi hasegawa (Muroran Institute of Technology)

【背景・目的】
真珠は真珠層で構成されており、古くから生薬として使用されてきた。当研究室では、真珠層抽出成分がスコポラミン誘発記憶障害モデル、アミロイドβ（Aβ）誘発記憶障害モデルマウスの記憶を改善することを明らかにしてきた。近年、ミトコンドリアの機能低下が老化や記憶障害などの病気に関わっていることが明らかになっている。真珠層抽出成分の作用機構を明らかにするため、真珠層抽出成分中の有効成分の同定及びミトコンドリア機能に対する真珠層抽出成分の作用について検討を行った。
【方法・結果】
（方法）ICR マウスの脳室内に Aβ溶液を投与しアルツハイマー病モデルマウスを作製した。真珠層抽出成分は逆相カラムと陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画後、得られた各画分をマウスに腹腔内投与し、行動薬理試験を用いて活性画分を単離した。その後、脳からミトコンドリアを単離し、膜電位、ATP 含量を測定した。また、ミトコンドリア合成にかかわるタンパク質の発現量変化についてリアルタイム PCR を用いて測定した。PC12 細胞に、Aβおよび真珠層抽出成分を添加し、同様に膜電位、ATP 含量、そしてリアルタイム PCR を測定した。（結果）Aβ誘発記憶障害モデルマウスにおいて、以前当研究室で同定した硫酸多糖が記憶改善作用を示し、ミトコンドリア機能の低下を抑制することが分かった。また、PC12 細胞においても、Aβの添加で低下した膜電位と ATP 含量が回復し、細胞生存率も回復することがわかった。

The pearl is composed of nacreous layers and has been used in traditional Chinese medicine. We have shown that nacre extract can improve Aβ-induced memory impairment. Recent research has revealed the involvement of mitochondrial dysfunction in memory impairment. In this study, we aimed to identify the active substance in the nacre extract and investigate its effects on mitochondrial dysfunction. We also examined the effects of the nacre extract on PC12 cells. (Results) The sulfated polysaccharide we previously identified also ameliorated Aβ-induced memory impairment and reversed the decrease of mitochondrial membrane potential and ATP content. In addition, sulfated polysaccharide protected PC12 cells against Aβ-induced toxicity and mitochondrial dysfunction.

Mitochondrial dysfunction, Beta-amyloid, Sulfated polysaccharide

講演番号：3C6p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C6 会場

オレガノの匂いによるマウスの食塩摂取調節機能に関する研究

The scent of oregano regulate a preference for sodium chloride

○青栁 樹奈、細野 朗、大畑 素子、横山 壱成、長田 和実（日本大生物資源）
○NANA AOYAGI, AKIRA HOSONO, MOTOKO OHATA, ISSEI YOKOYAMA, KAZUMI OSADA (Nihon Univ.)

先行研究では C57BL/6J マウスに対してオレガノの匂いを 24 時間暴露し，その期間中に二瓶選択実験を実施した結果，顕著な適塩作用が確認され，その活性成分は Carvacrol であることを突き止めた．この適塩効果は生得的であり，匂い成分の濃度に依存して誘起され，雌雄共に効果はあるが雌でより感受性が高いことが示された．また，オレガノの匂い刺激による脳領域活性化の解析を目的としてマウス脳内の Fos 陽性細胞密度の測定を実施した結果，オレガノの匂いは分界条床核のうち，Na 摂取調節領域である腹側部を有意に刺激することが明らかになった．

本研究では，マウスに対するオレガノの匂い成分が誘起する適塩効果の影響をより詳細に検討するため，定量 RT-PCR を実施した．C57BL/6j メスマウスに一般飼料を自由摂取させ，3 匹 1 グループで飼育した．嗅覚行動実験実施時に低 Na 食を給餌し，1 日 2 時間の二瓶選択実験（精製水 vs 0.3MNaCl 水溶液）を実施した．同時にオレガノ 1g を曝露する群（オレガノ群）と対象として水を暴露する群，の食塩水摂取率の変化を測定した．実験開始 5-6 日後，オレガノの十分な適塩効果を確認した後に嗅球，扁桃体，視床下部などを採取して各組織の cDNA を定量 PCR に供した．食塩摂取に関与するホルモンや神経伝達物質等のシグナル物質及びその受容体を解析したところ，オレガノ群にて嗅球と扁桃体のセロトニン受容体の有意な増加が確認され，セロトニン神経系の活性化が適塩効果と関連することが示唆された．さらに視床下部ではオレキシン系の低下とオキシトシンの弱い増加が見られた．同様の条件で免疫組織学的実験も実施したので併せて報告する予定である．

Our previous study indicated that long odor exposure (24hr) of oregano or that of active components carvacrol, significantly decreased NaCl preference. To clarify the mechanism of oregano volatiles controlling salt consumption, we explored the transcriptional activity of several kinds of neurotransmitters, hormones, and those receptors in mouse brains that were employed with two-bottle choice teste preference test between 0.3MNaCl vs. distilled water. This behavioral test was conducted for 2 hours per day with either a 1g oregano exposure or a control odor exposure. Five or six days after the start of the odor exposure and behavioral tests, we obtained the mice’s brains and employed these samples as quantitative PCR. As a result, oregano odor exposure induced serotonin receptors in the olfactory bulb and amygdala, suggesting that the serotonin nerve system performs a crucial role in reducing the consumption of NaCl by oregano odor exposure.

oregano, salt appetite, olfactory sense

講演番号：3C6p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C6 会場

肝臓 67kDa ラミニン受容体を介した EGCG の脳機能調節作用
EGCG's modulatory effects on brain function via the liver 67kDa laminin receptor
○麻生 菜帆、李 寛雨、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○ Naho ASO, Kwanwoo LEE, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

緑茶カテキンの一種である EGCG は抗肥満作用や脳機能調節作用など多彩な生体調節作用を有する。EGCG はその受容体である 67-kDa laminin receptor (67LR) を介して抗炎症作用を始めとした生理作用を発揮することが報告されているが、脳機能調節作用における 67LR の関与については不明である。そこで、EGCG がその主要な代謝器官である肝臓を介して脳機能調節作用を発揮すると仮定し、肝実質細胞特異的 67LR ノックアウトマウス (67LR KO マウス)を用いて検討を行った。
Cre/loxP システムを用いたゲノム編集により、対照マウスおよび肝実質細胞特異的 67LR KO マウスの作製を行った。作製したマウスに EGCG を 2 週間経口投与し、新奇物体認識試験および Y 字迷路試験にて、マウスの認知機能を評価した。その後、脳の海馬を摘出して神経新生マーカータンパク質発現を評価した。その結果、対照マウスでは EGCG の投与により認知機能の向上が認められた。また、対照マウスでは EGCG により神経新生が促進されることが示唆された。一方、67LR KO マウスでは EGCG によるこれらの作用は観察されなかった。
以上より、EGCG は肝臓 67LR 依存的に海馬における神経新生を促進し、認知機能を向上させる可能性が示された。
EGCG exhibits various biological regulatory actions such as anti-obesity and brain function regulation. However, the involvement of 67LR in the regulation of brain function remains unclear. Therefore, we hypothesized that EGCG exerts its regulatory effects on brain function via the liver, its major metabolic organ, and tested this hypothesis using 67LR knockout mice specific for hepatic parenchymal cells (67LR KO mice).
Control mice and liver parenchymal cell-specific 67LR KO mice were generated by genome editing using the Cre/loxP system. The mice were orally administered EGCG for 2 weeks, and their cognitive functions were assessed through behavioral testing. Subsequently, the hippocampus of the brain was removed and the expression of neurogenesis marker protein was evaluated. The results revealed that EGCG treatment improved cognitive function and promoted neurogenesis in control mice. Conversely, in 67LR KO mice, these effects of EGCG were nullified.
These results suggest that EGCG may promote neurogenesis in the hippocampus and improve cognitive function in a liver 67LR-dependent manner.

EGCG, 67LR, cognitive function

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C6p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C6 会場

茶由来サポゲニン R1-barrigenol はマウスにおいて LPS による認知機能低下を改善する

R1-barrigenol, tea sapogenin, ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive decline in mice.

○田代 結衣、林 遼太郎、岡田 晋治、阿部 啓子、小林 彰子（東大院農）
○Yui Tashiro, Ryotaro Hayashi, Shinji Okada, Keiko Abe, Shoko Kobayashi (The Univ. of Tokyo)

疫学調査において茶の脳機能改善効果が報告されているが、カテキンやテアニン以外の成分の効果についてはほとんど検討されていない。これまでに我々は、茶に含まれるサポゲニンの 1 つである R_1-barrigenol（R1B）がミクログリア細胞において Lipopolysaccharide（LPS）誘導性の炎症を抑制することを報告してきたが、*in vivo* での効果については不明であった。そこで本研究では、LPS 投与モデルマウスにおける R1B の認知機能改善効果を評価した。C57BL/6J マウスに R1B（16 mg/kg BW）を 1 日 1 回投与し、7 日目の投与後に LPS を腹腔内投与し炎症を誘導した。LPS 投与 1 日後から新奇物体認識試験、位置認識試験、Y 字迷路試験の 3 種類の認知行動試験を行ったところ、R1B は LPS による物体認識記憶と位置認識記憶の低下を抑制することが明らかになった。これらの記憶は海馬依存的であることから、R1B の作用を解析するため、海馬の RNA-seq によるトランスクリプトミクスを行った。KEGG pathway 解析により、R1B が細胞の応答を制御する Wnt5a の受容体の発現を低下させることで、LPS による認知機能低下を抑制した可能性が考えられた。RT-qPCR により R1B がこの受容体の発現を抑制することが確認されたため、現在タンパク質レベルでの解析を行っている。

We have reported that R_1-barrigenol (R1B), one of the representative sapogenins in green tea, suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in microglial cells, but the *in vivo* effects of R1B are not clear. In this study, we evaluated the effects of R1B on the cognitive function of an LPS-treated mouse model. C57BL/6J mice were treated with R1B (16mg/kg BW) once a day, and LPS was administered to induce inflammation. Three cognitive behavioral tests were performed, and their results showed that R1B improved the object and spatial memory. Since these memories relate to the hippocampus, we conducted transcriptomics of the hippocampus by RNA-seq. As a result, R1B may have suppressed LPS-induced cognitive decline via suppression of Wnt5a receptor expression. RT-qPCR confirmed that R1B suppressed the expression of this receptor.

neuroinflammation, sapogenin, cognitive function improvement

発表責任者：小林彰子（ashokok@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C6p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C6 会場

ツノナシオキアミ乳化オイル粉末による睡眠の質改善作用
Euphausia pacifica emulsified oil powder improves sleep quality.
○山田 秀俊[1]、宮坂 らいむ[1]、濱田 浩司[2] ([1]帝科大・生命環境、[2]國洋)
○ Hidetoshi YAMADA[1], Raimu MIYASAKA[1], Hiroshi HAMADA[2] ([1]Teikyo Univ. of Science, [2]Kokuyo Co., Inc.)

適切な睡眠が健康的な生活を維持するために重要であることは知られているが、一般人口の約 30%が不眠を経験している。睡眠の質を高め健康的な生活を送るためには、食品成分と睡眠の質との関係について理解する必要がある。ツノナシオキアミ（*Euphausia pacifica*）は、リン脂質型の海洋 n-3 多価不飽和脂肪酸や 8R-ヒドロキシエイコサペンタエノ酸を豊富に含む生物であり、ツノナシオキアミオイルは機能性オイルとして活用されている。本研究では、睡眠の質に不満を感じている 64 人の被験者にツノナシオキアミ乳化オイル粉末素材を 8 週間摂取させ、睡眠の質改善効果について評価した。睡眠の質に関する評価は、主観的評価：起床時の眠気に関する視覚アナログ尺度および OSA 睡眠調査 MA 版、客観的評価：ウェアラブル睡眠モニター（Fitbit）にて評価した。主観的評価では、プラセボ群と比較して乳化オイル粉末摂取群において起床時の眠気と疲労の低減効果が観察された。客観的評価においては、40 歳以上の被験者で睡眠サイクルの改善が観察された。これらの結果は、ツノナシオキアミ乳化オイル粉末の摂取が、睡眠状態が不調な健常者において睡眠の質改善に働くことを示している。

Although it is known that adequate sleep is crucial for maintaining a healthy lifestyle, approximately 30% of the general population has experienced insomnia. Thus, a better understanding of the relationship between food components and sleep quality is needed. North pacific krill, *Euphausia pacifica,* is rich in marine n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form as well as 8*R*-hydroxy-eicosapentanoic acid. Here, emulsified oil powder derived from this krill was used in a trial involving 64 participants to assess its potential to enhance sleep quality. Consumption of the powdered emulsified oil was found to reduce drowsiness upon waking and enhance fatigue recovery and for participants aged 40 and above an improvement in sleep cycle was observed. In conclusion, consumption of krill oil powder was effective in enhancing sleep quality for individuals with partial sleep restrictions.

Sleep, Krill oil, 8R-HEPE

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ntu.ac.jp）

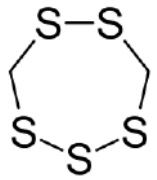
講演番号：3C6p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C6 会場

シイタケ香気成分 Lenthionine は、Allyl isothiocyanate と共通の機序で TRPA1 チャネルを活性化させる

Lenthionine activates TRPA1 channels by the same mechanism as allyl isothiocyanate

○新田 貴大[1]、竹隈 幸洋[1]、鴨井 享宏[1]、岩﨑 有作[2] ([1]ハウス食品グループ本社（株)、[2]京都府立大院 生命環境科学)
○Takahiro NITTA[1], Yukihiro TAKEKUMA[1], Takahiro KAMOI[1], Yusaku IWASAKI[2] ([1]HOUSE FOODS GROUP INC., [2]Kyoto Prefectural Univ.)

【目的】Allyl isothiocyanate（AITC）に代表される TRPA1 チャネルのアゴニストは、TRPA1 の N 末端側システイン残基への求電子的共有結合を介して、チャネルを活性化させる。そこで、化学構造の求電子性に着目することで、新たな TRPA1 アゴニストを見出せる可能性がある。本研究では、求電子的構造のジスルフィドとトリスルフィドを有する、シイタケ特有の香気成分“Lenthionine”（1,2,3,5,6-Pentathiepane）に着目し、その TRPA1 活性を調べた。



Lenthionine

【方法と結果】ヒト TRPA1 を発現させた HEK293 細胞を作出し、Ca^{2+}イメージング法により Lenthionine の TRPA1 活性を評価した。Lenthionine 100 μM は、AITC 30 μM と同等(104%)の活性を示した。この活性は TRPA1 アンタゴニスト A-967079 の共添加によって消失した。一方、Lenthionine は、ヒト TRPV1 あるいはヒト TRPM8 発現 HEK293 細胞に対しては活性を示さなかった。更に、AITC が結合するシステイン残基をセリンに置換した変異型ヒト TRPA1 発現 HEK293 細胞に対する Lenthionine の活性は、野生型ヒト TRPA1 発現 HEK293 細胞に対する活性と比較して、55%減弱した。

【結語】ATIC と共通の作用機序を有した新規 TRPA1 アゴニストとして Lenthionine を同定した。

Agonists of TRPA1 channel, such as allyl isothiocyanate (AITC), activate the channel through electrophilic covalent binding to the N-terminal cysteine residue of TRPA1. Therefore, it is possible to find novel TRPA1 agonists by focusing on the electrophilic property of the chemical structure. In this study, we investigated the TRPA1 activity of “lenthionine”, known as a unique shiitake flavor compound has electrophilic disulfide and trisulfide bonds. The activity of hTRPA1 expressed in HEK293 cell was evaluated by calcium imaging. TRPA1 was activated by Lenthionine and inhibited by addition of A-967079, one of the antagonists. In addition, both hTRPV1 and hTRPM8 were not activated by lenthionine. Furthermore, the activity of mutated hTRPA1 (C621S, C641S, and C665S), in which AITC binding sites were replaced by serine, was reduced by 55 % compared to the wild type. In conclusion, these results indicated that lenthionine is a novel TRPA1 channel agonist with a mechanism of action similar to ATIC.

Trpa1, Lenthionine, Shiitake

発表責任者：新田貴大（t-nitta@housefoods.co.jp）

講演番号：3C6p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C6 会場

植物マイクロ RNA csn-miR166c-3p はオートファジー活性化を介してパーキンソン病症状を緩和する

The plant microRNA csn-miR166c-3p ameliorates Parkinson's disease symptoms by the activation of autophagy

○島田 優、熊添 基文、恩田 弘明、小川 史代、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Yu Shimada, Motofumi Kumazoe, Hiroaki Onda, Fumiyo Ogawa, Yoshinori Fujimura, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

パーキンソン病は運動機能障害や認知機能の低下を特徴とする疾患であり、その原因は中脳黒質におけるドーパミン産生神経細胞の減少である。現在の治療は、ドーパミン前駆体補填などによる対症療法であり、ドーパミン産生神経細胞の減少は進行するため、病態は悪化の一歩をたどることが知られている。その病態メカニズムとして、機能不全ミトコンドリア蓄積による神経細胞の障害が報告されており、1 型インターフェロン(IFN-I) はオートファジー活性化を介して、機能不全ミトコンドリアを除去することが知られている。一方、植物由来マイクロ RNA (miRNA, miR) が動物体内で作用することが報告され、新たな生体調節分子として注目されている。そこで本研究では、パーキンソン病の根源である神経細胞死の阻害を目指し、神経細胞特異的に IFN-I を活性化する植物 miRNA の探索およびその作用を評価した。

ヒト体内にて検出報告のある植物 miRNA をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に導入し、遺伝子発現変動を次世代シーケンサーにて解析した結果、IFN-I 経路の活性化を誘導する miRNA として csn-miR166c-3p を見出した。また当該 miRNA はミトコンドリアを障害する 6OHDA (6-Hydroxydopamine) による神経細胞死を抑制した。さらに、実際の病態に近い 6OHDA 脳室内投与パーキンソン病モデルマウス(C57BL/6J male) に csn-miR166c-3p を投与し、行動試験を行うとともに脳組織における神経細胞残存数を免疫蛍光染色により評価した。その結果、当該 miRNA 投与により、IFN-I/オートファジー関連因子が誘導されるとともに 6OHDA によって誘導されるパーキンソン病症状および神経細胞数の減少が csn-miR166c-3p 投与により抑制された。以上より、csn-miR166c-3p は神経細胞を保護することでパーキンソン病の進行を抑制する可能性が示された。

Parkinson’s disease (PD) is caused by a decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Some studies suggest that the accumulation of dysfunctional mitochondria leads to neuronal cell death, which in turn causes PD. Additionally, type I interferon (IFN-I) is known to eliminate dysfunctional mitochondria by activation of autophagy. In this study, we explored plant miRNAs that specifically activate the IFN-I pathway in neurons. We identified csn-miR166c-3p as a miRNA that induces IFN-I pathway activation in neurons. The administration of this miRNA improved PD symptoms and protected neurons in PD model mice. In conclusion, csn-miR166c-3p has been shown to improve the symptoms of PD by protecting neurons.

plant microRNA, neurodegenerative diseases, autophagy

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C6p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C6 会場

腸内細菌枯渇状態のマウスは甘味をより好む

Sweet taste preference alteration in mice by antibiotics-induced microbiota depletion

○藍原 祥子、小池 亜由梨、丸岡 祐子（神戸大院農）
○Yoshiko AIHARA, Ayuri KOIKE, Yuko MARUOKA (Kobe Univ.)

味覚の感受性は身体の栄養状態によって変化する。食物の代謝は、生体の消化吸収機能だけでなく、共生する腸内細菌の代謝に大きく依存することが明らかにされつつあり、腸内細菌叢の乱れが消化管疾患や免疫疾患に繋がる可能性も報告されている。抗生物質の服用は腸内細菌叢を変化させるが、ヒトにおいて味覚障害が生じる例が報告されている。本研究では、マウスをモデルとして腸内環境変化による味覚変化の解析を行った。７週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに抗菌剤及び抗真菌剤を自由飲水させ、抗生物質誘導性腸内細菌枯渇（ＡＩＭＤ）群を作成した。８～１２週齢となったマウスにリッキングテストによる味覚嗜好性評価テストを基本 5 味に対し行ったところ、甘味に対する嗜好性のみＡＩＭD群で有意な上昇が観察された。腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸を糞と盲腸内容物で定量すると、乳酸、酢酸、酪酸、プロピオン酸の総量が有意に減少していた。血中レプチン量は群間で差が無かった。以上より、短鎖脂肪酸の減少が甘味嗜好行動の増大に関与している可能性が示唆された。

Sensitivity of taste perception can be altered by health and nutritional status of the body. The digestion and metabolism of the food depends on not only by body's own function, but also on intestinal bacteria's activity; where dysbiosis may lead some gastrointestinal disorders. Antibiotics affect gut flora, and cases of taste disorders have been reported in humans. In the present study, alterations of taste perception due to changes in the gut microbiota were analyzed in a mouse model: 7-week-old C57BL/6J mice were given antibacterial and antifungal agents ad libitum to create antibiotic-induced microbiota depletion (AIMD) groups; at 8-12 weeks of age, taste preferences were assessed using the brief access preference test. Among the five basic tastes, a significant increase in preference was only observed for sweet taste in the AIMD group. Quantification of metabolites of intestinal bacteria in faeces and cecum contents showed a significant decrease in the total amount of lactic acid, acetic acid, butyric acid and propionic acid. Blood leptin levels did not differ between the two groups. These results suggest that a decrease in short-chain fatty acids may be responsible for the increase in sweet-taste preference behaviour.

taste preference, gut microbiota, metabolism

発表責任者：藍原祥子（y.aihara@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3C6p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C6 会場

乳素材から調製したシアリル糖ペプチド濃縮物の記憶維持効果
Milk-derived sialylglycopeptide concentrate affects memory retension
○高梨 直也、鳴海 佳輔、山口 敏幸、福留 博文、中川 久子、郷田 雅之、小林 俊二郎（雪印メグミルク（株）ミルクサイエンス研究所)
○Naoya TAKANASHI, Keisuke NARUMI, Toshiyuki YAMAGUCHI, Hirofumi FUKUDOME, Hisako NAKAGAWA, Masayuki GOTA, Shunjiro KOBAYASHI (Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co., Ltd.)

【背景と目的】我々はこれまでに、チーズホエイ由来の乳素材からシアル酸含有 *O* 結合型糖鎖を有する乳由来シアリル糖ペプチド（milk-derived sialylglycopeptide, mSGP）濃縮物を調製した。シアル酸は乳児の脳の発達に重要とされている。そこで線虫を用いて、mSGP 濃縮物が学習記憶に与える影響を検証した。【方法】若齢線虫を飢餓状態にし、誘引物質であるブタノンの存在下で OP50（大腸菌）を摂取させ連合学習を行った。その後、ブタノン非存在下で線虫を最大 4 時間維持し、0、3、4 時間経過後のブタノンに対する走化性指数を記憶の指標として評価した。評価サンプルは OP50 とともに学習後から最大 4 時間摂取させた。【結果】シアル酸標準品、または同量のシアル酸を含む mSGP 濃縮物を評価した結果、mSGP 濃縮物の方が 3、4 時間の時点で高い記憶維持効果が認められた。このことから mSGP の構造が記憶維持効果に関与している可能性が示された。次に mSGP 濃縮物を酵素で処理して、mSGP の糖鎖部分を分解したサンプルの評価を行った結果、記憶維持効果が認められなかった。さらに、mSGP 濃縮物から均一な糖ペプチドを精製して評価を行ったところ、mSGP 濃縮物と同等の効果が認められた。以上のことから、mSGP 濃縮物による線虫の記憶維持効果には mSGP のシアル酸を含む糖鎖が寄与していることが示唆された。
[Aims] We have previously reported the preparation of milk-derived sialylglycopeptide (mSGP) concentrate containing sialylated *O*-glycans from an ingredient derived from cheese whey. Sialic acid, a constituent of mSGP, is important nutrient for brain and cognitive development. This study was investigated the effects of mSGP concentrate on the memory function by *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). [Methods] Synchronized day 1 adult worms were starved for 1 hr, and learned with OP50 (*E.coli*) and butanone for 1 hr. The learned worms were held on NGM plates with OP50 + test samples before testing (0, 3 and 4 hrs). At observation point, worms were tested for chemotaxis to butanone. [Results] Worms treated with mSGP concentrate after learning showed a higher chemotaxis index at 3 and 4 hrs than those treated with sialic acid standard. The mSGP concentrate treated with neuraminidase and *O*-glycosidase did not affect memory retention of *C. elegans*. The chemotaxis index of sialylglycopeptide purified from mSGP concentrate was equivalent to that of mSGP concentrate. [Conclusion] Our experiments indicate that sialic acid-containing glycan moiety of mSGP enhanced memory for associative learning in *C.elegans*.

sialylglycopeptide, sialic acid, memory

発表責任者：高梨　直也（naoya-takanashi@meg-snow.com）

講演番号：3C6p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 C6 会場

多感覚の統合的解析による『出来立てのおいしさ』の数値的特徴解明

Numerical characterization of "freshly made deliciousness" by integrated analysis of multiple senses

○小川 雪乃、西部 美咲、亀井 誠生、堀江 芙由美、日下部 裕子（農研機構食品研）
○Yukino OGAWA, Misaki NISHIBE, Mio KAMEI, Fuyumi HORIE, Yuko KUSAKABE (Food Res. Inst., NARO)

食品のおいしさ・おいしくなさには、味・香り・食感・温度など様々な感覚要素や、個人的な好みが寄与している。そのため、『おいしい』という言葉だけでは、どのようなおいしさのことを指しているのか具体的に表現しきれない。そこで、人が感じる食品のおいしさについて客観的・汎用的に表現する手法の開発を目指して、おいしさに関係する感覚・生理応答の数値的特徴解析を行った。本研究では、20～50 代の男女を対象として、出来立ての状態（高温）、調理後やや冷めた状態（中温）、十分に冷ました状態（低温）の 3 温度条件におけるチキンナゲットがもたらす感覚・生理的応答を比較した。具体的に、タイムインテンシティ法を用いた味・香りの官能評価、咀嚼筋電図、咀嚼音、嚥下音の同時記録、および喫食後のアンケート調査による総合的な食品評価を取得した。データ解析の結果、食品テクスチャと関係する咀嚼音および咀嚼筋活動、味・香り感覚の時系列変化が、総合的なおいしさ評価と関連することが示された。また、食品がもたらす感覚的・生理的応答の数値的表現を統合的に評価することにより、各温度条件に対する生理認知応答パターンを明らかにした。

Various sensory factors such as taste, aroma, texture, and temperature, as well as personal preferences, contribute to the deliciousness or unpalatableness of food. Therefore, the word "tasty" alone is not sufficient to describe specifically what kind of tastiness it refers to. Therefore, we conducted a numerical feature analysis of sensory and physiological responses related to deliciousness, aiming to develop a method to describe the deliciousness of foods objectively and universally as perceived by people. In this study, we compared the sensory and physiological responses of chicken nuggets under three temperature conditions: freshly prepared (high temperature), slightly cooled after cooking (medium temperature), and sufficiently cooled (low temperature), targeting men and women in their 20s to 50s. Specifically, sensory evaluation of taste and aroma using the time-intensity method, and comprehensive food evaluation by simultaneous recording of masticatory electromyogram, chewing sound, and swallowing sound, and questionnaire survey after eating were obtained. The results indicated that masticatory sound, masticatory muscle activity, and the time-series change patterns of taste and aroma sensation were related to overall taste evaluation. In addition, integrative evaluation revealed that physiological cognitive response patterns to each temperature condition.

Taste, Biometrics, Sensory evaluation

発表責任者：小川 雪乃（yukino.ogawa@affrc.go.jp）

講演番号：3C6p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 C6 会場

フラネオールの嗅覚刺激による自発運動量への影響

The effect of furaneol through olfactory stimulation on spontaneous locomotor activity

○木脇 百香、大畑 素子、横山 壱成、細野 朗、津田 真人、長田 和実（日本大学）
○Momoka Kinowaki, Motoko Ohata, Issei Yokoyama, Akira Hosono, Masato Tsuda, Kazumi Osada (Nihon Univ.)

フラネオール（以下 Fr）はキャラメル様の甘い香気を有し，食品においてはメイラード反応で生成される香気成分である．Yokoyama et al.[1]は，ラットへの Fr の嗅覚刺激が摂食量の有意な増加を引き起こすが，対照群と比較して体重は変化しないことを明らかにした．我々は，Fr の嗅覚刺激がマウスの自発運動量の顕著な増加を誘発し，これが体重の維持に関係する可能性があることを報告した[2]．本研究では，Fr 嗅覚刺激によるマウスの自発運動量増加のメカニズムの一端を明らかにするために，中枢および抹消における遺伝子発現を解析した．7 週齢の C57BL/6j オスマウスを用い，1 週間汎化させた．Fr を週 3 回，1 日 0 分，15 分，60 分の 3 条件で曝露する群を用意した．13 週齢まで 6 週間にわたり自発運動量を測定し，各群のマウスより脳および胃を採取し，複数のホルモンや神経ペプチド及びその受容体の遺伝子発現量を定量 PCR で測定した. その結果, 胃におけるグレリンの mRNA 発現量が Fr 60 分曝露群で顕著に高く，視床下部における甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（*Trh*）も増加する傾向にあった．これら遺伝子発現の増加と自発運動量の増加の関連を現在検討している．

Furaneol, emitting a sweet caramel odor generated by the Maillard reaction, has been known as an inducer of food intake in rats without altering their body weight [1]. Recently, we have reported that olfactory stimulation of furaneol induces a significant increase of the spontaneous locomotor activity in mice, and the effect would be related to maintaining body weight [2] .In the present study, we investigated some gene expression patterns in the brain and stomach of mice to clarify the mechanism by which olfactory stimulation of furaneol increases spontaneous locomotor activity in mice. C57BL/6j male mice were divided into three groups, namely, 0 min (control), 15 min, and 60 min daily furaneol-exposed mice groups. These mice were exposed to furaneol (or water) three days per week, then continued for 6-week periods. The spontaneous locomotor activity was significantly increased by Furaneol exposure over time. The mRNA expression levels of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamus and ghrelin in the stomach were marginally or marked higher each other in the 60min furaneol exposure group than in the control group. We are investigating the relationship between the change of these genes expression and the increase of the spontaneous locomotor activity in mice exposed furaneol.

1) Yokoyama et al., J. Food Sci., 2020. 2）木脇 他., 日本農芸化学会 2023 年度大会., 2023.

Furaneol, Olfactory stimulation, Spontaneous locomotor activity

講演番号：3C6p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 C6 会場

木材粉末を用いて調製した食パンの嗜好性の評価

Evaluation of the palatability of bread prepared with wood powder

○佐藤 典子、小田 悠斗、高倉 春斗、宇和野 みづき (甲子園大学)
○Noriko SATO, Yuuto ODA, Haruto TAKAKURA, Miduki UWANO (Koshien University)

現代日本での食生活において、食物繊維摂取量が不足している者が存在している。食物繊維を積極的に摂取するためには、食物繊維を多く含む食品を摂取するよう心掛けるべきである。食物繊維を多く含む食品は知られているが、今まで食用とはされていなかった未利用資源を活用する事は、限られた資源の有効活用にも資する事となる。木材の間伐材はその多くが廃棄されているが、微細な粉末に加工し、木材粉末を食用とする試みが行われている。木材には、リグニンを含むため、木材粉末を含む食品を調理し、日常の食生活で食する事で食物繊維摂取量を増加させる事が可能となる。これらの食品を日常の生活の中で食用とする事が適切かどうか検討するために、木材粉末を含む食パンを調製し、官能評価を行った。その結果について報告する。方法としては、Panasonic 社製ホームベーカリー (SD-MDX4) を使用し、木材粉末は樽脇園（静岡県）社製スーパーウッドパウダーを使用し、食パンを調製した。令和 5 年 9 月 20 日（水）に官能評価を実施した。木材粉末を含む食パンと木材粉末を含まない食パンの官能評価の結果は有意差があった。今後、調理方法を検討する事で、嗜好性が高い食品を調製できる可能性がある。

In today's Japanese diet, there are those whose dietary fiber intake is inadequate. In order to actively consume dietary fiber, we should try to consume foods rich in dietary fiber. While fiber-rich foods are well known, utilizing unutilized resources that have not been used for food can contribute to the effective use of limited resources. Although most of the thinned wood is disposed of, some attempts are being made to process it into a fine powder and use the powder as a food source. Since wood contains lignin, it is possible to increase dietary fiber intake by cooking foods containing wood powder and eating them in the daily diet. It is necessary to evaluate the palatability of foods containing wood powder and to determine whether they are suitable for human consumption. The results of this study are reported. The method used was a Panasonic home bakery, and wood powder was Super Wood Powder made by Taruwakien (Shizuoka, Japan) to prepare the bread. Sensory evaluation was conducted. There was a significant difference between the results of the sensory evaluation of the bread with and without wood powder. We believe that there is a possibility to adjust the food with high palatability by examining the cooking method in the future.

sensory evaluation, loaf of bread, powdered wood

発表責任者：佐藤典子（sato@koshien.ac.jp）

講演番号：3C7a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 C7 会場

Isolation and identification of high D-amino acid-producing lactic acid bacteria
○levi PHAM, Shouji TAKAHASHI (Nagaoka Univ. of Tech.)

Recently, lactic acid bacteria (LAB) have been shown to produce various D-amino acids during fermentation, but their functions are still unclear. As D-amino acids affect the taste of foods and have beneficial effects on human health and beauty, D-amino acids produced by LAB are important for the quality and function of fermented foods. In this study, we aimed to isolate high-D-amino acid-producing LAB to develop applications for D-amino acids produced by LAB and elucidate their physiological functions.

A total of 431 LAB strains isolated from fermented foods in Niigata Prefecture were cultured in MRS medium. D-Amino acids in their culture supernatants were detected using D-amino acid oxidase (ReDAAO) from the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA. The results showed that the five strains named A1, B9, G1, C3, and B1 had higher D-amino acid production abilities. Strains G1 and C3 showed much higher D-amino acid production abilities. The 16S rRNA and *pheS* sequences of strains G1 and C3 showed the highest identity with those of *Latilactobacillus curvatus*, suggesting that strains G1 and C3 are members of *L. curvatus*. The D-amino acids produced by strains G1, C3, and B1 increased even during the log growth phase of cultivation.

D-amino acids, lactic acid bacteria, enzymatic screening

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3C7a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 C7 会場

好フルクトース、好酸性かつ寒天で生育困難な新属・新種の乳酸菌 *Philodulcilactobcillus* 属の分離・同定

Isolation and identification of *Philodulcilactobacillus myokonensis* gen. nov., sp. nov., a fructophilic, acidophilic, and agar-phobic lactic acid bacterium

○高屋 朋彰[1]、石山 洋平[2]、大橋 勝太[1]、熊久保 涼太[1]、山﨑 健[1]、大滝 俊樹[2]([1]小山高専・物質、[2]（株）ミヤトウ野草研究所)
○ Tomoaki KOUYA[1], Yohei ISHIYAMA[2], Shota OHASHI[1], Ryota KUMAKUBO[1], Takeshi YAMAZAKI[1], Toshiki OTAKI[2] ([1]NIT. Oyama Col., [2]MIYATOU YASOU KENKYUJO CO., LTD.)

【背景・目的】乳酸菌は発酵産業において一般的に用いられており，様々な健康機能が報告されている．本研究では，高い糖度（Brix50%）の発酵野菜エキスから，好フルクトース・好酸性かつ寒天では生育が困難な新奇乳酸菌の発見・単離に成功したため，その形態学的、生理学的、生化学的特性を包括的な分析によって明らかにすることを目的とした．
【方法】検定菌として，新奇乳酸菌 WR16-4^T 株を用いた．1.5% (w/v)の寒天および 0.8% (w/v)のゲランガムを用いた MRS 固化培地（pH 4.5）を調製し，寒天平板拡散法および直接計数法による評価を行った．pH の最適化（pH 3.0～6.5，スクロース濃度（5～60% (w/v)），および糖の種類（グルコース，フルクトース，スクロース，グルコース＋フルクトース）について，その増殖性（$O.D._{660\,nm}$）を評価した．さらに WR16-4^T 株について，16S rRNA 遺伝子解析，全ゲノム解析，および系統解析を行った．
【結果】WR16-4^T 株は，0.8%ゲランガム含有 MRS 培地で嫌気培養を行った場合に最も早くコロニーを形成した．至適 pH は pH　4.5-5.0 であり，50%(w/v)のスクロース濃度でも増殖すること，およびスクロースまたはグルコース＋フルクトースで培養できることが明らかとなった．遺伝学的解析の結果，新属･新種な乳酸菌であることが明らかとなったため，*Philodulcilactobacillus myokonensis* を提唱した．

Lactic acid bacteria are commonly in the fermentation industry and pose potential positive effects on health. In this study, a new lactic acid bacterium was isolated from fermented vegetable extracts. This bacterium is fructophilic, acidophilic, and hard to grow on agar medium. Therefore, the present study aimed to determine the morphological, physiological, and biochemical characteristics of this novel lactic acid bacterium using comprehensive analyses.

Growth occurred at pH 3.5–5.5, with optimal growth at pH 4.5–5.0. The cells formed colonies on a solid MRS medium with 20% (w/v) sucrose and 0.8% (w/v) gellan gum under anaerobic conditions. The bacterium was able to grow on up to 50% (w/v) sucrose but not on D-glucose. The 16S rRNA gene and core genome phylogenetic trees suggested that this novel strain was most closely related to the type strain of *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75T. Based on the physiological, morphological, and phenotypical characteristics of strain WR16-4^T, we propose its classification as a novel genus, *Philodulcilactobacillus myokonensis* gen. nov., sp. nov.

Philodulcilactobacillus, lactic acid bacteria, fermented vegetable extracts

講演番号：3C7a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 C7 会場

Aurantiochytrium 属の遊走子が示す走化性とその分子機構
Chemotaxis exhibited by zoospores of *Aurantiochytrium* sp., and its molecular mechanisms.
○渡邉 研志、新井 萌子、立田 光、秋 庸裕（広島大院・統合生命）
○Kenshi WATANABE, Moeko Arai, Hikaru Tatsuta, Tsunehiro Aki (Hiroshima Univ.)

【目的】高度不飽和脂肪酸などの機能性脂質を生産する海洋性微生物 *Aurantiochytrium* 属は特定の条件下で遊走子を形成して放出する。この遊走子の走化性は採餌や生育阻害物質からの忌避に関与すると考えられ、その理解は海洋環境中における同属微生物の生態および関与する物質循環の解明につながる。そこで本研究では、*Aurantiochytrium* 属の遊走子の各種化合物に対する走化性を検証し、それを規定する分子機構の解明を試みた。
【方法・結果】*Aurantiochytrium limacinum* SR21 株を Poor 培地（2.0 g/L グルコース、0.5 g/L 酵母エキス、20 g/L 人工海水塩）で培養することで放出させた遊走子を回収し、アミノ酸や糖類など 88 種類の化合物に対する走化性をキャピラリーアッセイ法により調べた。その結果、バリン、アラニン、システイン、アスパラギン、メトキシアミンのほか、リグニンの構成分子であるバニリンに対して誘引応答を示した。バニリンへの走化性を規定する構造的特徴をその類縁化合物を用いて調べたところ、バニリンの 1 位のアルデヒド基がアセチル基となったアセトバニロンに対しても誘引応答を示したが、炭素鎖長をさらに延長した類縁体には応答を示さなかった。したがって、この部分の極性や立体配置がリガンド認識に重要である可能性が示唆された。

The genus *Aurantiochytrium*, a marine oleaginous microorganism producing functional lipids such as polyunsaturated fatty acids, forms and releases zoospores under certain conditions. The chemotaxis of these zoospores is involved in the foraging and repellency from growth-inhibiting substances, and understanding this behavior may lead to a better understanding of the ecology of *Aurantiochytrium* sp. in the marine environment and the material cycle involving this microorganism. In this study, we examined the chemotaxis of zoospores of *Aurantiochytrium* sp. to various compounds and attempted to elucidate the molecular mechanisms that govern this chemotaxis.

The zoospores of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 were grown in Poor medium (2.0 g/L glucose, 0.5 g/L yeast extract, 20 g/L artificial sea salt) and were collected and examined for chemotaxis to 88 compounds including amino acids and sugars using a capillary assay. As a result, the zoospores were significantly attracted to valine, alanine, cysteine, asparagine, methoxyamine, as well as to vanillin, a component molecular of lignin. We investigated the structural features that define chemotaxis to vanillin using analogues of vanillin. The zoospores were attracted to acetovanillone, in which the aldehyde group at the 1-position of vanillin was replaced by an acetyl group, but not to analogues in which the carbon chain length at the same site was further extended. Thus, it was suggested that the polarity and steric configuration of this moiety may be important for ligand recognition.

Aurantiochytrium sp., chemotaxis

発表責任者：秋 庸裕（aki@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C7a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 C7 会場

メタン酸化細菌の走化性
Chemotaxis toward methane by rice-field dwelling bacteria
○箕田 和奏、八幡 穣（筑波大生物資源）
○Wakana MINODA, Yutaka YAWATA (The Univ. of Tsukuba)

水田はメタンの主要な発生源であることが知られているが、その大気への放出速度は底泥中でのメタン生成速度と、メタン酸化細菌（MOB）によるメタン消費速度とのバランスによって大きく影響される。一方で水相中での溶存メタンの分布は均一ではなく、メタン発生源の底泥と気液界面間や、メタンの大気への通路となる植物体と周囲の水相間には強いメタン勾配があると予測される。こうした環境では、運動性と走化性により自らに適した環境に移動することができる一部のメタン酸化細菌（MOB）の増殖に有利に働いている可能性があるが、水田中での MOB の空間動態については知見が少ない。そこで、本研究では水田より単離されたタイプ I の MOB である *Methylomonas koyamae* をモデルとして、マイクロ流体デバイス(Gradient generator)内に形成した安定的メタン勾配内でのビデオ顕微鏡解析することで MOB のメタンに対する走化性速度の定量を行った。解析の結果から、*M. koyamae* は 52 μm/s 程度の遊泳速度を持ち、興味深いことに 10%のメタンを含む気体に対する負の走化性速度（-0.99 μm/s 忌避行動)を示した。先行研究より、タイプ I MOB は低メタン・高酸素環境を好むことが知られていることから、今回の結果は *M. koyamae* は自身のメタン代謝に最適なメタン濃度に移動する走化性を持つことを示唆する。本研究より得られる知見は、微生物の空間行動が水田からのメタン放出速度に与えている影響を理解する上で新しい視点をもたらす物である。
The balance between methane production by methanogenic bacteria and consumption by methane oxidizing bacteria (MOB), each takes place in sediment and water phase, dictates methane release from rice fields. The strong methane gradient at air-water and water-plant interfaces potentially favor MOB with motility and chemotaxis, but it remains unclear whether if a bacterial capability to navigate complex chemical gradient enhance methane uptake. Here, using *Methylomonas koyamae* isolated from rice fields as a model organism for type I MOB, we quantitatively analyzed chemotactic behavior toward methane by video microscopy analysis under a stable methane gradient formed in a microfluidic gradient generator. Surprisingly, *M. koyamae* showed a negative chemotaxis velocity (m/s) for gases containing 10% methane. Considering that type I MOBs prefer low methane and high oxygen environments, our result suggests that *M. koyamae* has propensity to migrate toward optimal for methane metabolism. This study provides a new perspective in understanding the impact of microbial spatial behavior on the methane release from rice fields.

methane oxidizing bacteria, chemotaxis, wetland ecosystem

発表責任者：箕田和奏（s2011461@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C7a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 C7 会場

海洋細菌 *Aureispira marina* が有する不飽和 2-ヒドロキシ脂肪酸の二重結合の解析

Double bond analysis of unsaturated 2-hydroxy fatty acid contained in a marine bacterium *Aureispira marina*

○川原 一芳、入山 楓歌、飯田 博一（関東学院大理工生命）
○Kazuyoshi KAWAHARA, Fuka IRIYAMA, Hirokazu IIDA (Kanto Gakuin Univ.)

タイ国の海岸から分離された *Aureispira marina* は滑走性を有するグラム陰性細菌で、アラキドン酸を菌体脂肪酸として有するという特徴が報告されていた。我々は本菌が主要脂質としてセラミドを有することを見出し、その詳細な構造を解析している。セラミドに含まれる脂肪酸は、細菌には珍しい D 型の 2-OH-iso-$C_{17:0}$ および 2-OH-iso-$C_{17:1}$ であり、2-OH-iso-$C_{17:1}$ の二重結合は 3 位と 4 位の間に存在する。本研究ではこの二重結合の立体構造について調べた。

2-OH-iso-$C_{17:1}$ のカルボキシ基を $LiAlH_4$ で還元し、過ヨウ素酸酸化および $NaBH_4$ による還元で、炭素鎖が 1 つ短い分岐鎖の脂肪族アルコール（iso-$C_{16:1}$-OH）に変換した。一方、*trans* 型の二重結合を持つ市販の D-sphingosine（炭素鎖 18）から過ヨウ素酸酸化および $NaBH_4$ による還元で、炭素鎖が 2 つ短い $C_{16:1}$-OH（直鎖）を調製した。得られた 2 つのアルコールについて GC-MS 分析を行い構造を確認した。調製した 2 つのアルコールについて二次元 NMR（^1H,^1H COSY および ^1H,^{13}C HMQC）を測定した。その結果、二重結合に関わるプロトンのシグナルおよびアリル位のカーボンのシグナルの化学シフト値が一致した。従って *A. marina* のセラミドを構成する 2-OH-iso-$C_{17:1}$ の二重結合は *trans* 型であると決定できた。

Aureispira marina isolated from the coast of Thailand was a Gram-negative gliding bacterium with arachidonic acid as one of cellular fatty acids. In the previous study we found that ceramide was a major cellular lipid, and the fine structure of its components has been investigated. Fatty acids in the ceramide are D-2-OH-iso-$C_{17:0}$ and D-2-OH-iso-$C_{17:1}$, and the double bond in the latter resides between 3 and 4 positions. In the present study, stereochemistry of the double bond was investigated. The carboxyl group of 2-OH-iso-$C_{17:1}$ was reduced with $LiALH_4$, oxidized with sodium periodate, and reduced with $NaBH_4$ to prepare the corresponding fatty alcohol (iso-$C_{16:1}$-OH). Separately, commercially available D-sphingosine (C_{18}) with *trans* double bond was derivatized to $C_{16:1}$-OH by periodate oxidation and reduction with $NaBH_4$. The structure of these fatty alcohols was confirmed by GC-MS analysis. 2D NMR of these two fatty alcohols was measured using ^1H,^1H COSY and ^1H,^{13}C HMQC techniques. Chemical sift values of signals of the double bond protons and the allylic carbon were nearly identical, indicating that the double bond in 2-OH-iso-$C_{17:1}$ comprising the ceramide in *A. marina* was in *trans* conformation.

Aureispira marina, 2-hydroxy fatty acid, double bond

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：3C7a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 C7 会場

南極ユキドリ営巣跡から分離した微生物からのバイオフィルム阻害物質のスクリーニング

Screening for biofilm inhibitors from microorganisms isolated from Antarctic snow petrel nesting sites

○阿座上 弘行[1,2]、木下 颯[1]、SIDDIQA Ayesha[1]、林 昌平[3]([1]山口大農、[2]山口大中高温微セ、[3]島根大生物資源)
○Hiroyuki AZAKAMI[1,2], Hayato KINOSHITA[1], Ayesha SIDDIQA[1], Shohei HAYASHI[3] ([1]Fac. of Agr., Yamaguchi Univ, [2]RCTMR, Yamaguchi Univ, [3]Fac. of Life Env. Sci., Simane Univ.)

19 地点の南極土砂サンプルから 7 綱 40 属に分類される細菌約 1500 株を単離・同定し，それらは南極微生物ライブラリーとして凍結保管した。その中のユキドリ営巣跡から単離された約 200 株について、病原菌のバイオフィルム形成への影響をスクリーニングした。ライブラリーの菌株を 15℃、10 日間または 25℃、7 日間培養した後、培養上清を調整した。これらの培養液を緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 及びう蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* UA159 の培養液に添加し，バイオフィルム形成量を定量した。その結果、192 株中 54 株の培養液が *P. aeruginosa* に対して、9 株の培養液が *S. mutans* に対してバイオフィルム形成を 40%以上阻害した。そのうち，10 株が *P. aeruginosa* に対して，6 株が *S. mutans* に対して 60%以上の阻害活性を示した。強い活性を示した株の半数以上が *Bacillus* 属に分類されるものであった。現在、これらの培養上清がどの程度の濃度で効果があるのか、また阻害は抗菌活性によるものかについて調査している。

Approximately 1,500 bacterial strains classified into 7 classes and 40 genera were isolated and identified from Antarctic sediment samples from 19 sites. Approximately 200 strains isolated from snow petrel nesting sites were screened for their effects on pathogen biofilm formation. Culture supernatants of these strains were added to culture of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and the *Streptococcus mutans* UA159, and the amount of biofilm formation was quantified. As a result, among 192 strains, 10 strains inhibited biofilm formation against *P. aeruginosa*, and 6 strains inhibited biofilm formation against *S. mutans* by more than 60%. Many strains that showed strong activity belonged to the genus *Bacillus*. We are currently investigating at what concentration these culture supernatants are effective and whether the inhibition is due to antibacterial activities.

biofilm, inhibitor, antarctic bacteria

発表責任者：阿座上　弘行（azakami@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C7a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 C7 会場

NO シグナリングを有する有用放線菌の探索

Explore for useful actinomycetes with NO signal

○武井 勝紀、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大院）
○Masaki TAKEI, Shinsaku ITO, Syunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of Agric)

放線菌は、抗生物質をはじめとした二次代謝産物を生産することが知られており、「生理活性物質の宝庫」と呼ばれている。この事から、放線菌の二次代謝制御の仕組みについての理解は、産業面において多大な利益に繋がると考えられているが、その仕組みの全容は解明されていない。

我々はモデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 において、硝酸還元酵素（Nar）と NO ジオキシゲナーゼ（Fhb）を介して硝酸、亜硝酸、一酸化窒素（NO）が循環する窒素酸化物循環経路を見出した。本代謝サイクルから生産される NO は、NO 依存性の二成分制御系 DevS/R を介した抗生物質生産のシグナル分子として働くことが示唆されている。

今回我々は、放線菌群内での NO signaling 機構の保存性を検証した。17 種の放線菌について、*S. coelicolor* において示唆された NO signaling 関連遺伝子をゲノム情報から検証した結果、*nar, hmpA, devS/R* が多くの菌種に高度に保存されていた。次に NO の前駆体である亜硝酸の生産を検証した結果、15 種で生産を確認した。加えて、外部からの NO 発生剤添加は 5 つの種において抗生物質の生産量に影響を与えた。以上の結果は放線菌に NO signaling が不偏的に存在していることを示唆する。

Actinomycetes are known for producing useful secondary metabolites, including antibiotics. Therefore, understanding the regulations of secondary metabolism in actinomycetes is believed to bring significant industrial benefits. However, these mechanisms remain unclear. A recent study suggested a nitrogen oxide metabolic cycle forming NO in the genetic model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145. We further suggested that the endogenously produced NO regulates antibiotic production in the bacterium via the DevS/R two component system.

In this study, we investigated the distribution of the NO signaling system among actinomycetes. Based on the NO signaling related genes suggested in *S. coelicolor*, we validated these genes in 17 actinomycete species. The results revealed that *nar*, *hmpA*, and *devS/R* were highly conserved in many strains. Subsequently, the results of verifying the production of nitrite, the precursor of NO, confirmed its presence in 15 species. Additionally, Exogenous NO generator affected in antibiotic production levels in five species. These results suggest that NO signaling is ubiquitously present in actinomycetes.

Actinomycete, Nitric oxide, Signaling

発表責任者：武井勝紀（mangomasaki@gmail.com）

講演番号：3C7a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 C7 会場

乱流が作り出す複雑な攪拌が微生物生産に与える影響の実測

Experimental observation of the effect of chaotic mixing on bacterial production

○阿部 響介、八幡 穣（筑波大生物資源）
○Kyosuke ABE, Yutaka Yawata (The Univ. of Tsukuba)

熱いコーヒーに垂らされた一滴のミルクは複雑な形に引き延ばされる。同じように、海洋中では植物プランクトンや動物から放出された溶存態有機物（ＤＯＭ）が乱流により 3 次元的なリボン状に引き延ばされるプロセスが起こっていると考えられている。こうした乱流による攪拌は、運動性と走化性を持つ微生物にとって正負両面の影響がある。栄養のホットスポットが長く引き延ばされれば、より多くの走化性細菌が栄養にアクセスするチャンスを得られる一方で、薄く引きのばれた栄養は拡散により消失しやすくなる。これまでに直接数値シュミレーション(DNS)により中程度の乱流環境が走化性細菌に有利であることが示されているものの、乱流による攪拌が、不均一な栄養環境下で増殖する微生物に与える影響を実験的に評価した知見はない。そこで、本研究では制御された形で DOM の引き延ばし現象を再現できるマイクロ流体ロボティクス装置を作製し、様々なＤＯＭの濃度と出現間隔における細菌の増殖を評価する実験系を確立した。この実験系を用いて海洋細菌 Vibrio ordalii の走化性欠損株と運動性欠損株を、野生株と共培養することで、指向性運動により得られるメリットの定量的解析を目指した。本研究の結果は、水相がダイナミックに運動する環境における微生物の増殖について、これまでにない知見を提供するものである。

In the ocean and other aquatic environment, turbulence stretches dissolved organic matter (DOM) released by phytoplankton and animals in tangled web of filaments. The process, driven by chaotic mixing induced by turbulence, is expected to either favor motile and chemotactic bacteria or planktonic bacteria, depending on the energy input toward the water column. However, empirical observation on the effect of such chaotic mixing on the aquatic microbes has been missing. Here, using a novel microfluidic robotic system, we quantitatively explored the effect of the range of energy input onto the growth of motile marine bacterioplankton. Our robotic systems recreated the exponential stretching of nutrient patch, which mimic the physical characteristic of turbulent mixing in the aquatic environment. This study offers a unique insight into the role of directed swimming on the bacterial production under natural environments.

turbulent, chemotaxis, quantitative analysis

発表責任者：八幡穣（yawata.yutaka.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C7a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 C7 会場

タモギタケ発酵ダイズ抽出物の抗アレルギー効果

Antiallergic effect using immune cells by extract of soybean fermented with Pleurotus cornucopiae

○齋藤 汐里、澤田 雄太、福士 涼介、新井 博文、佐藤 利次（北見工大）
○Shiori SAITO, Yuta SAWADA, Ryosuke HUKUSHI, Hirohumi ARAI, Toshitugu SATO (Kitami Inst. Technol.)

【背景】これまでダイズを食用担子菌で発酵させた結果、ポリフェノール量や抗酸化活性の上昇などが明らかとなった。また、近年アレルギー性疾患の罹患者数増加が問題となっているが、食品に含まれる抗酸化活性を示すポリフェノール成分の摂取による症状緩和が注目されている。そこで本研究では、免疫細胞を用いてタモギタケ発酵ダイズの抗アレルギー効果を評価した。
【方法】ダイズは、水分量 65%で滅菌後、タモギタケを接種し、25℃で 20、40、60 日間発酵させた。発酵ダイズは 70%エタノールで抽出し、凍結乾燥させたものを使用した。脱顆粒抑制効果は IgE 感作した RBL-2H3 細胞に、抗原(DNP-BSA)添加により放出される *β*-ヘキソサミニダーゼ(*β*-hex)活性を測定することで評価した。また、ロイコトリエン B_4（LTB_4）産生抑制効果は、アラキドン酸含有培地で前培養した PB-3c 細胞をカルシウムイオノフォア A23187 で刺激することにより生産される LTB_4 を HPLC で定量することで評価した。
【結果】タモギタケ発酵ダイズ抽出物は、いずれの発酵日数でも RBL-2H3 細胞の *β*-hex 放出を抑制しなかった。一方、PB-3c 細胞からの LTB_4 産生は抑制される傾向を示し、コントロールと比較して発酵 20 日で約 31%、発酵 40 日で 24%、発酵 60 日で 21%有意に抑制された。以上の結果から、タモギタケ発酵ダイズ抽出物は、脱顆粒抑制効果を示さなかったが、LTB_4 産生を抑制する可能性が示唆された。

Fermentation of soybean with edible basidiomycetes has revealed an increase in polyphenol content and antioxidant activity. In recent years, the increasing number of people suffering from allergic diseases has become a problem, and attention has been focused on symptom relief through the intake of polyphenol components that exhibit antioxidant activity in foods. In this study, we evaluated the anti-allergic effects of *Pleurotus cornucopiae* (Pc) fermented soybeans using immune cells. Soybean adding a water to 65% was sterilized, inoculated with Pc, and fermented at 25°C for 20, 40, and 60 days. The fermented soybeans were then extracted with 70% ethanol and lyophilized. The degranulation inhibitory effect was evaluated by measuring the *β*-hexosaminidase (*β*-hex) activity released by the addition of DNP-BSA to IgE-sensitized RBL-2H3 cells. The inhibitory effect on leukotriene B_4 (LTB_4) production was evaluated by HPLC quantification of LTB_4 produced by stimulating PB-3c cells with A23187. The results showed that *β*-hex release was not inhibited. On the other hand, LTB_4 production was significantly inhibited by fermented soybean extract, about 31% on day 20, 24% on day 40, and 21% on day 60, compared to the control.

Pleurotus cornucopiae, Soybean, leukotriene B_4

講演番号：3C7a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 C7 会場

界面ファーメンターによる生物活性 sclerotiorin の高生産

Production of biologically active sclerotiorin in an interface fermentor

○熊崎 風夏[1]、岩月 正人[2]、小田 忍[1] ([1]金沢工大・ゲノム研、[2]北里大・大村研)
○Fuka KUMAZAKI[1], Masato IWATSUKI[2], Shinobu ODA[1] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]Omura Inst., Kitasato Univ.)

【目 的】水に難溶な二次代謝物の生産に有効である界面ファーメンターを用いて、抗ガン、抗ウイルス、動脈硬化症予防などの有用な生物活性を示す sclerotiorin を高純度・高生産し得る条件を確立することを目的とした。
【方 法】修正サブロー培地と有機層（dimethylsilicone oil; KF-96A-1CS）との固／液界面にカビを増殖させて有機層中に sclerotiorin を発酵生産する界面ファーメンターを用いた。得られる sclerotiorin の構造は UPLC、^{1}H NMR、^{13}C NMR 等で確認した。14 株の *Penicillium* spp.の中から *P. sclerotiorum* NBRC 113796 を最優秀株として選定し、sclerotiorin を高生産するために炭素源と窒素源、炭素源濃度、初発 pH、培養温度などの諸条件について最適化を行った。液体培養法との比較も行った。
【結 果】培養条件は、炭素源は glucose（40 g/L）、窒素源は soytone（5 g/L）、初発 pH は 8.0、培養温度は 28 °C が最適であり、最大 4.3 g/L の sclerotiorin が生成した。液体培養法と界面培養法との比較では、前者で 12 日以降は sclerotiorin の過剰分解が生じて蓄積量の低下が認められたのに対し、後者では 17 日目まで sclerotiorin の蓄積量は増加し続けた。このことより、界面培養法における代謝物の *in situ* な抽出と有機層による代謝物の保持が非常に有効であることが示唆された。

Objectives: The aim of this study was to optimize the interfacial fermentation conditions of sclerotiorin having some important biological activities, such as anti-cancer and antiviral ones.
Methods: Concerning *Penicillium sclerotiorum* NBRC 113796 selected as the best strain for the production of sclerotiorin, some fermentation conditions, such as carbon and nitrogen sources, carbon source content, initial medium pH, and cultivation temperature, were optimized by using a solid–liquid interface fermentor.
Results: The best carbon and nitrogen sources were glucose (40 g/L) and soytone (5 g/L). The optimum initial medium pH and cultivation temperature were 8.0 and 28 °C, respectively. While the accumulation of sclerotiorin in submerged cultivation was reduced after 12th day by excessive degradation, the solid–liquid interface fermentor enabled to increase the sclerotiorin production until 17th day. Thus, the interface fermentor demonstrated some superior characteristics such as the effective extraction in situ and the function of reservoir of targeted product.

secondary metabolite, sclerotiorin, interface fermentor

発表責任者：小田忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3C7a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 C7 会場

オピオイド発酵生産プラットフォームの構築

Construction of an opioid fermentation production platform

○南 博道[1,2]、中川 明[1,2] ([1]石川県大・資源研、[2]ファーメランタ株式会社)
○Hiromichi Minami[1,2], Akira Nakagawa[1,2] ([1]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Fermelanta, Inc.)

テバインはオキシコドンやオキシモルフォンなどのオピオイド系鎮痛剤の重要な原料となる化合物である。オピオイド系鎮痛剤は強い鎮痛作用を示すため、主に痛みを伴うガン患者に処方される。テバインは植物からの抽出によって得られるが、中間代謝産物のため蓄積せず、微量にしか含まれない。そのため、テバインの抽出にはコストがかかり、化学合成で得られる一般的な鎮痛剤であるイブプロフェンに比べ、オピオイド系鎮痛剤は 500 倍以上の薬価である。さらに、ガン患者の増加に伴い、疼痛緩和治療としての使用量も増加しており、テバインの需要は今後ますます増加することが考えられる。以上のことから、安価なオピオイド系鎮痛剤の供給を実現するために、テバインの大量生産系の構築が望まれている。本研究では、化学合成法や植物での生産に代わって、微生物である大腸菌を用いた安価なグルコースからの実用化に向けたテバイン生産法を提案する。テバインの生産には 20 種類の遺伝子の導入が必要であり、そのための遺伝子導入技術や、大腸菌内で植物の酵素遺伝子を機能させるノウハウなど様々な技術開発を行った。その結果、およそ 90 時間で 40 mg/L のテバイン生産に成功した。

Thebaine is a compound that serves as a crucial raw material for opioid analgesics such as oxycodone and oxymorphone. Opioid analgesics are mainly prescribed to cancer patients who are experiencing significant pain due to their strong analgesic effects. Thebaine is produced by extraction from plants and is therefore expensive. In addition, with the global societal issue of aging, the number of cancer patients is increasing annually, suggesting a continuous rise in the demand for thebaine. Therefore, there is a desire to establish a large-scale production system for thebaine to realize the supply of affordable opioid analgesics. This study proposes the practical production of thebaine using *Escherichia coli*, a microorganism, as an alternative to chemical synthesis or plant production, with glucose as the cost-effective raw material. The production of thebaine requires the introduction of approximately 20 genes, necessitating various technological developments, including gene introduction techniques and the activation of non-functional plant enzyme genes. As a result of these efforts, successful thebaine production at a practical level of 40 mg/L was achieved within approximately 90 hours.

synthetic biology, thebaine, Escherichia coli

発表責任者：南　博道（minami@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C7a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 C7 会場

Metschnikowia pulcherrima AH550 株のプリケリミン酸高生産条件の検討
Investigation of Conditions for High Pulcherriminic acid Production by *Metschnikowia pulcherrima* AH550 Strain

○浜口 愛勇生[1]、尚 思岐[2]、田口 久貴[1]、笹野 佑[1] ([1]崇城大院工、[2]崇城大生物生命)
○Ayuki HAMAGUCHI[1], Siqi SHANG[2], Hisataka TAGUCHI[1], Yuu SASANO[1] ([1]Grad. Sch. of Eng. Sojo Univ., [2]Sojo Univ.)

【目的】プルケリミン酸（PA）は環境中の鉄をキレートすることで鉄欠乏を引き起こし、様々な微生物に対し抗菌活性を示す赤褐色色素である。我々がショウジョウバエから分離した *Metschnikowia pulcherrima* AH550 株は、*M. pulcherrima* NRRL Y-7111^T 株よりも PDA 培地上でコロニー周囲が強く呈色し、糸状菌に対して有意に高い抗菌性を示したことから、PA 生産性が高いと考えられる。また、ゲノム解析結果から PA 合成関連遺伝子群(*PUL1*～*4*)がゲノム上にクラスターで存在していた。本研究では AH550 株の様々な条件下での PA 生産性を寒天培地上での呈色性と、リアルタイム PCR 法により測定した *PUL* 遺伝子群の転写活性を指標に評価した。
【方法および結果】各条件下(糖、アミノ酸、鉄イオン濃度、pH 等)での PA 生産性を比較した。結果、AH550 株は Y7111 株と比較して、ほぼすべての条件下で、各 *PUL* 遺伝子の転写量が亢進していた。特に二糖類では全般的に転写量が上昇していた。Leu、Trp、Asn、Asp 等を培地に添加することで PA 生産性が向上し、添加しない場合と比較して、2～10 倍程度増加が見られた。高 pH 条件下では中性条件下と比較して転写量が 10%程度まで抑制されたが、低 pH 条件下では 50%程度の抑制に留まった。
【Introduction】Pulcherriminic acid (PA) is a red-brownish pigment that chelates iron in the environment, leading to iron deficiency, and exhibits antibacterial activity against various microorganisms. The *Metschnikowia pulcherrima* AH550 strain we isolated from Drosophila showed stronger coloration around the colony on PDA medium than *M. pulcherrima* NRRL Y-7111^T(type strain) and significantly higher antibacterial activity against filamentous fungi, suggesting that it is a high PA producer. Genome analysis showed that genes related to PA synthesis (*PUL1-4*) were present in clusters. In this study, the PA productivity of strain AH550 under various conditions was evaluated based on its coloration on agar medium and the transcriptional activity of the PUL gene cluster measured by real-time PCR.
【Results】PA productivity was compared under each condition (sugar, amino acid, iron ion concentration, pH, etc.). The results showed that the transcription of each PUL gene was enhanced in strain AH550 compared to strain Y7111 under almost all conditions. In particular, disaccharide generally increased transcription, and the addition of Leu, Trp, Asn, Asp, and His to the medium increased PA productivity by 2- to 10-fold compared to the absence of such addition. Under high pH conditions, transcription was suppressed by up to 10% compared to neutral conditions, while under low pH conditions, transcription was suppressed by only 50%.

Metschnikowia pulcherrima, Pulcherriminic acid, PUL cluster

発表責任者：笹野佑（sasano@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：3C7a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 C7 会場

生合成遺伝子クラスターにおける高精度クローニング法の開発

Development of a high precision cloning method for biosynthetic gene clusters

○武田 知己[1,2]、阿蘇 未沙紀[1]、上田 寛子[1]、加藤 章太朗[1,2]、湯澤 賢[1,2]（[1]慶大・先端生命研、[2]慶大院・政策メディア・先端生命）
○Tomoki TAKEDA[1,2], Misaki ASO[1], Hiroko UEDA[1], Shotaro KATO[1,2], Satoshi YUZAWA[1,2] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Syst. Biol. Prog. Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.)

放線菌はこれまで最も多くの生理活性物質を人類に提供した微生物の 1 つである．ゲノムあたり 20-40 個の生合成遺伝子クラスター（BGC）を有する一方，BGC の 8 割は一般的な実験室条件下では休眠状態にある. BGC の発現には異種宿主の利用が提案されており, BGC を適切な発現系にクローニングする必要がある．有力な手法の 1 つとして，Direct Pathway Cloning（DiPac）が挙げられるが，BGC のサイズに伴って PCR エラーによる変異が蓄積される可能性が高くなる．

そこで本研究では，高精度な BGC のクローニング法として，DiPac を基にした改良手法を提案する．本手法を用いて，放線菌由来の BGC を含む複数の巨大プラスミドを高効率かつ変異なく合成することに成功した．異種発現の宿主として *Streptomyces albidoflavus* J1074 を用いた実験では，約 35 kb のプラスミドを接合伝達して，抗 HIV 薬として知られる Aureothin の生産に成功した．本手法は DNA アセンブリによって BGC のクローニングを実現するため，約 10^2 bp のプロモーターから約 10^3 bp のタンパク質ドメインまで広い範囲で DNA の置換に対応できる. 今後は本手法を活用した標的物質の大量生産や抗生物質アナログの生産といった各種応用が期待される．

Streptomyces species are among microorganisms providing highly active substances to humankind, each genome conserving 20-40 biosynthetic gene clusters (BGC). However, 80% of these BGCs remain dormant under typical laboratory conditions. The utilization of heterologous hosts has been proposed for the expression of BGCs, necessitating the cloning of BGCs into an appropriate expression system. Direct Pathway Cloning (DiPac) is one of the most promising methods, however, it may result in the accumulation of mutations from PCR errors.

In this study, we propose an improved method based on DiPac for the precise cloning of BGCs. Using this method, we successfully synthesized several large plasmids containing BGCs from *Streptomyces* with high efficiency and without mutations. In experiments using *Streptomyces albidoflavus* J1074 as a host for heterologous expression, we successfully produced aureothin, an anti-HIV agent, through the conjugative transfer of a roughly 35 kb plasmid. This technique supports DNA assembly for cloning BGCs and can handle a wide array of DNA substitutions, paving the way for the mass production of target substances and synthesizing antibiotic analogs.

Biosynthetic gene cluster, DNA assembly, Heterologous expression

発表責任者：武田知己（okaban@sfc.keio.ac.jp）

講演番号：3C7a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 C7 会場

二次代謝物生合成酵素阻害剤を用いた新規化合物の探索系の構築

Establishment of natural product screening system using biosynthetic enzyme inhibitor

髙村 郁実[1]、野川 俊彦[2]、岡野 亜紀子[2]、越野 広雪[2]、沼本 穂[1]、和田 大[1]、○加藤 直樹[1]([1]摂南大・農、[2]理研 CSRS)
Ikumi TAKAMURA[1], Toshihiko NOGAWA[2], Akiko OKANO[2], Hiroyuki KOSHINO[2], Minori NUMAMOTO[1], Masaru WADA[1], ○Naoki KATO[1] ([1]Setsunan Univ., [2]RIKEN CSRS)

【目的】天然化合物は重要な創薬資源であるが、近年、新規化合物の発見が非常に困難となっており、新たな探索法が模索されている。本研究の目的は、ゲノムマイニングと二次代謝物生合成酵素阻害剤処理を組み合わせた新たな探索法を構築し、それを用いて新規化合物とその生合成遺伝子クラスターを発見することである。私たちはこれまでに、糸状菌の産生するデカリン含有テトラミン酸化合物の生合成経路において、ジアステレオ選択的 Diels-Alder 反応を触媒するデカリン合成酵素の阻害剤を同定している。本発表では、この阻害剤を用い、培地に添加することで化合物生産が阻害される糸状菌の探索系を構築したので報告する。
【方法と結果】まず検証実験として、以前に取得したデカリン化合物生産菌 5 株を用いて、デカリン合成酵素阻害剤の培地への添加により、標的のデカリン化合物の生産が阻害されることを確認した。次に、近隣の土壌より分離した糸状菌約 200 株の中から、その系統分類群を基に選抜した 70 株を用い、阻害剤の添加、非添加条件での代謝物の生産パターンの変化を指標にスクリーニングを行った。その結果、阻害剤添加濃度に応じて生産が変化する化合物を生産する菌株を 10 株見出した。標的化合物同定を進めるとともに、ゲノム解読も並行して実施し、化合物同定の助けとなるゲノム配列情報を収集した。絞り込んだ菌株のうち、目的化合物を高生産した *Didymella* sp. SU22-F008 の解析結果について報告する。

Natural product is an important resource in drug discovery. To overcome difficulties in finding new compounds, exploration of the biosynthetic gene clusters (BGCs) of natural products, which are rich in microbial genomes, is necessary. Aim of this study is to establish a new method to find natural products and their BGCs by a combination of genome mining and biosynthetic enzyme inhibitor. We performed a screening using an inhibitor of decalin synthase, which is involved in the biosynthetic pathways of fugal decalin-containing tetramic acids, and found some fungal strains changing the metabolite productions in response to the inhibitor.

enzyme inhibitor, decalin, screening

発表責任者：加藤　直樹（naoki.kato@setsunan.ac.jp）

講演番号：3C7p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C7 会場

脂肪酸ポリオールエステルを菌体外に生産するロドトルラ属酵母の生産能及びゲノム情報の解析
Characterization and genome analysis of a *Rhodotorula* strain secreting polyol esters of fatty acids
○真野 潤一[1]、須志田 浩稔[1]、田中 剛[2]、内藤 健[3]、小野 裕嗣[2]、池 正和[1]、徳安 健[1]、北岡 本光[4] ([1]農研機構食品研、[2]農研機構分析研、[3]農研機構資源研、[4]新潟大農)
○Junichi MANO[1], Hirotoshi Sushida[1], Tsuyoshi Tanaka[2], Ken Naito[3], Hiroshi Ono[2], Masakazu Ike[1], Ken Tokuyasu[1], Motomitsu Kitaoka[4] ([1]NFRI, [2]NAAC, [3]NGRC, [4]Niigata Univ.)

生産物の複雑な分離回収プロセスを必要としないバイオマスリファイナリーを実現するため、我々は、糖質から菌体外脂質を効率的に発酵生産する微生物を環境中から探索し、これまでに *Rhodotroula paludigena* BS15 株を単離している。この菌株は、フラスコを用いたフェドバッチ培養で 110 g/L の脂肪酸ポリオールエステルと 103 g/L の菌体（乾燥重）を 12 日間で生産することができる。本研究では、この菌株の各種糖質からの脂肪酸ポリオールエステルの生産性と全ゲノム解析を行ったので報告する。
各種糖質を炭素源として含む培地で BS15 株を培養したところ、非常に幅広い炭素源で生育が可能なことが明らかとなった。一方、脂肪酸ポリオールエステルの生産は、グルコース、フルクトース、マンノース、スクロースにおいてのみ良好であった。イルミナ社の Hiseq 及びオクスフォードナノポア社の PromethION を用いてゲノム DNA を分析し、得られた結果を統合することで全ゲノム解析を行った。その結果、19 のコンティグからなる 22.5 Mb のゲノム配列を得た。得られた各コンティグの末端の多くが、テロメア配列であったことから、完全長に近いゲノム配列が得られたものと推測された。本研究で得られたゲノム配列及び推定された遺伝子の情報は、GenBank に BQKY01000001–BQKY01000019 として登録されている。
To realize biomass refinery without complex downstream processes, we extensively screened for microbial strains that efficiently produce extracellular oil from sugars. *Rhodotorula paludigena* BS15 was found to efficiently produce polyol esters of fatty acids (PEFAs). This strain can produce 110 g/L PEFAs and 103 g/L dry cells in flask-scale fed-batch fermentation for 12 days. Here we report PEFA production from various carbon sources and the whole genome sequence analysis.
We confirmed the strain can utilize various sugars for cell growth. On the other hand, PEFAs were efficiently produced only from glucose, fructose, mannose and sucrose. Two different types of next-generation sequencers, Illumina HiSeq and Oxford Nanopore PromethION, were used to analyze the whole-genome sequence of the strain BS15. The integrative data analysis generated the 22.5-Mb sequence comprised of 19 contigs. Telomeric sequences were found on the ends of the contigs, indicating that the genome sequence is almost complete. The contig sequences were registered with accession numbers BQKY01000001–BQKY01000019 in GenBank.

Polyol esters of fatty acids, Rhodotorula, Biosurfactant

発表責任者：真野潤一（jmano@affrc.go.jp）

講演番号：3C7p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C7 会場

食品廃棄物の循環利用に向けたオメガ３脂肪酸生産麹菌の改良

Improvement of omega- 3 fatty acid production of *Aspergillus oryzae* for recycling food waste

○中村 仁勇[1]、服部 領太[2]、鈴木 聡[1]、小竹 英一[1]、真野 潤一[1]([1]農研機構食品研、[2]農研機構本部)
○Masao NAKAMURA[1], Ryota HATTORI[2], Satoshi SUZUKI[1], Eiichi KOTAKE[1], Junichi MANO[1]
([1]NFRI, [2]NARO)

環境負荷低減のため、食品廃棄物等の有効活用が求められている。一方、オメガ３脂肪酸は高い健康機能性で注目を集めており、その一つであるα-リノレン酸(ALA)を多く含む食用油や飼料が求められている。そこで、我々は、様々な食品廃棄物で培養が可能な麹菌を用いて ALA を大量生産することを目指している。
以前の研究で、オメガ３脂肪酸不飽和化酵素と推測される遺伝子(AO09001000714)を *tef1* プロモーターと接続し、*A. oryzae* RIB40 株に導入したところ、脂質に占める ALA の割合が野生株に比べて増加することを確認している。本研究では、ALA の更なる生産性向上に向けて、同遺伝子のマルチコピー導入株の作出を試みた。先述の研究で用いたベクターに、新たに *amyB* プロモーターと接続した同遺伝子を挿入し、*A. oryzae* RIB40 株に導入した。菌体内の脂質に占める ALA の割合をガスクロマトグラフィーで分析した結果、培養開始から 2 日後の時点で従来の形質転換株では 18.6%であったのに対し、本研究で新しく得られた株は 38.2%であった。新しく得られた株の導入遺伝子のコピー数をリアルタイム PCR の結果から計算したところ、6.208 となり、ベクターが複数同時に導入されていることが示唆された。本研究で作出した麹菌株を様々な食品廃棄物を用いて培養することで、ALA を含む高付加価値な食品・飼料素材の生産が期待される。

The utilization of food wastes is strongly demanded. α-Linolenic acid (ALA), a kind of omega-3 fatty acids, is valuable as food oil and animal feed. Therefore, we aim to achieve mass production of ALA using *Aspergillus oryzae* which can grow on various food wastes.

In our previous study, the putative omega-3 fatty acid desaturase gene (AO09001000714) was connected to *tef1* promoter and introduced into *A. oryzae* cells. The obtained transformant had a higher ratio of ALA to total fatty acids than the wild type. In this study, we created a multi-copy strain to improve the efficiency of the fungal ALA biosynthesis. The gene connected to *amyB* promoter was newly inserted in the vector we had used previously, and *A. oryzae* was transformed. The copy number of the gene in the new transformant was calculated to be 6.208 from the results of real-time PCR. Fatty acid analysis using gas chromatography showed that the new transformant had a higher ratio of ALA (38.2%) to total fatty acids than that of the previous strain (18.6%) on the second day of culture.

ω-3 fatty acids, Aspergillus, metabolic engineering

発表責任者：中村　仁勇（nakamura610@affrc.go.jp）

講演番号：3C7p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C7 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* においてオートファジーの欠損がコウジ酸生産を促進する分子機構の解析
Analysis of the molecular mechanism by which autophagy deficiency promotes kojic acid production in *Aspergillus oryzae*.

○松下 天斗[1]、陳 俊林[1]、有岡 学[1,2]（[1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構）
○Takato MATSUSHITA[1], Junlin CHEN[1], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

コウジ酸（KA）は、麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産する二次代謝産物である。その生合成には *kojA*、*kojR*、*kojT* の 3 遺伝子が関与しており、このうち KojR は他の 2 遺伝子の発現を制御する転写因子である。これらの発現と KA 生産は栄養条件、特に窒素源の有無で制御されることが知られている。当研究室では以前、オートファジーに必須な *Aoatg8* を欠損した株では *kojA* と *kojT* の発現が野生株と比較して数十倍に増加することを見出していた。そこで本研究ではオートファジーと KA 生産の関係性を分子レベルで解明することを目指した。

KA 生産定量の結果、Δ*Aoatg8* 株は野生株より多くの KA を生産した。野生株とΔ*Aoatg8* 株に EGFP-KojR を導入して KojR の核局在が見られた細胞の割合を算出したところ、野生株は飢餓条件において 86%の核局在率を示し、栄養条件では 26%に低下した。一方Δ*Aoatg8* 株の核局在率は飢餓条件では野生株と同程度であったが、栄養条件では 66%まで増加した。このことから、Δ*Aoatg8* 株での KA 生産亢進が KojR の核局在化率の上昇に起因する可能性が示唆された。また KojR の予想核外移行シグナルのアラニンに置換した変異体を野生株に発現させたところ、栄養条件でも 89%の細胞で核に局在していた。今後は KojR の局在や活性を制御する修飾と、それを触媒する因子を探索する予定である。

Kojic acid (KA) is a secondary metabolite produced by *Aspergillus oryzae*. KA biosynthesis is mediated by three genes, *kojA*, *kojR*, and *kojT*, among which KojR is a transcription factor that regulates two other genes. It is known that their expression and KA production are regulated by nitrogen sources. We previously found that the expression of *kojA* and *kojT* was highly increased in the strain lacking *Aoatg8*, which is essential for autophagy. In this study we aimed to clarify the relationship between autophagy and KA production at the molecular level.

KA production analysis showed that the Δ*Aoatg8* strain produced more KA than the wild type strain. Microscopic observation of EGFP-KojR demonstrated that KojR localized to the nucleus at a similar level in both strains when they were grown in the starvation medium, but in the nutrient-rich media the level of nuclear localization was much higher in the Δ*Aoatg8* strain than in the wild type strain, suggesting that high production of KA in the Δ*Aoatg8* strain was due to consistent nuclear localization of KojR. Mutation in the putative nuclear export signal caused KojR to localize to the nucleus even under the nutrient-rich condition. We are planning to search for modifications that regulate KojR localization and the factors that catalyze them.

Aspergillus oryzae, kojic acid, autophagy

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C7p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C7 会場

麹菌の異種天然化合物の生産性に関与する新規制御因子の同定と代謝機能の解析
Identification and metabolic function analysis of a novel regulator for productivity of heterologous natural compounds in *Aspergillus oryzae*

○吉岡 弘史[1]、原中 実穂[1]、齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[4]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理、[4]中国・五邑大)
○Hiroshi YOSHIOKA[1], Miho HARANAKA[1], Naoya SAITO[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[4], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ, [4]Wuyi Univ., China)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年天然化合物の異種生産宿主として生合成研究に用いられており、その生産性向上は産業利用において重要である。酵母では単一の制御因子の改変による代謝フラックスの改良が報告されているが、糸状菌では同様のアプローチによる研究は進んでいない。*A. oryzae* において代謝制御因子を発見できれば、糸状菌の二次代謝に関連する代謝フラックスの制御機構が解明されるとともに、異種天然化合物の生産性向上につながる可能性がある。本研究では、*A. oryzae* を用いた異種天然化合物の生産性に関与する制御因子を同定し、代謝機能の解析を行った。

異種テルペンの生産を指標に転写因子遺伝子を対象として行ったスクリーニング[1)]において、破壊により 2.7 倍の生産量の増加および液体培地における培養初期の生育の遅延を示す遺伝子を見いだした。さらに、代謝への影響を調べたところ、破壊株ではアミラーゼ・エタノール発酵・メバロン酸経路のような代謝に関連する遺伝子の発現が変動し、関係する代謝産物の量にも変化が見られた。本研究で得られた知見をもとに、糸状菌の二次代謝につながる代謝フラックスの制御機構が解明され、異種天然物の生産性向上のための効率的な宿主開発をもたらすことが期待される。

1）原中ら、日本農芸化学会 2022 年度大会 4B04-01

Aspergillus oryzae has recently been used in biosynthesis research as a host for heterologous production of natural compounds, and productivity improvement is required for industrial use. It is important to discover metabolic regulators in filamentous fungi for uncovering the metabolic regulatory mechanisms and for enhancing the production of heterologous natural compounds. This study aims to identify and functionally analyze a novel regulator for productivity of heterologous natural compounds in *A. oryzae.* In screening with a heterologous terpene, we found a transcription factor gene, deletion of which increased the productivity by 2.7-fold and delayed growth. In the deletion strain, the metabolic genes associated with amylases, ethanol fermentation and mevalonate pathway were differentially expressed, and the amounts of related metabolites were altered. The findings of this study are expected to elucidate the regulatory mechanisms of metabolic flux to secondary metabolite in filamentous fungi, which provides an effective strategy to improve the productivity of heterologous natural compounds.

Aspergillus oryzae, metabolism, natural product

発表責任者：丸山潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C7p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C7 会場

麹菌を用いた異種天然化合物生産における染色体領域の機能的関連の解析
Investigation of the functional relevance of chromosomal regions in heterologous natural compound production using *Aspergillus oryzae*

○神作 佳孝[1]、齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[4]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理、[4]中国・五邑大)
○Yoshitaka KANSAKU[1], Naoya SAITO[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[4], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ, [4]Wuyi Univ., China)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の異種天然化合物生産において、その生産性向上を目的とした育種のために個々の遺伝子と生産との機能的関連を調べることは重要である。しかし、遺伝子破壊を一つ一つ繰り返して効果を調べる従来の方法では多大な時間と労力を要する。これまでに我々は CRISPR/Cas9 システムを利用して *A. oryzae* の染色体大規模欠損を可能にし、異種天然化合物の生産性への影響を染色体領域レベルで調べることをできるようにした[1)]。本研究では、ゲノム全体を対象とした大規模欠損領域の選定を行い、異種天然化合物生産における各染色体領域の機能的関連を解析した。

A. oryzae の染色体大規模欠損の標的として、生存・生産に必要な代謝関連遺伝子を含まず二次代謝関連遺伝子を含み、かつ転写産物量の少ない領域を対象とした。さらに、出芽酵母の必須遺伝子の情報を利用してそのオルソログを含まないようにした、0.2～0.5 Mb のおよそ 70 から 180 個の遺伝子を含む染色体領域を大規模欠損の標的として選定した。これらの染色体領域に対して大規模欠損を行ったところ、新たな領域の大規模欠損株を取得した。異種生産のモデルとして用いたジテルペン pleuromutilin の生産量を調べた結果、染色体領域により生産量が変化する大規模欠損株が含まれていた。本発表では、各染色体領域の大規模欠損が生産量に及ぼす影響について報告する。

1)齊藤ら、日本農芸化学会 2023 年度大会 2B09-06

Aspergillus oryzae is used as a host for heterologous production of natural compounds. For productivity improvement, it is important to assess the functional relevance of individual genes in heterologous production, but repeating gene modifications requires a lot of times and labors. We previously performed large-scale chromosome deletion in *A. oryzae* using CRISPR/Cas9 system, which enables to analyze its effect on the productivity. In this study, we investigated the functional relevance of chromosomal regions containing multiple genes in heterologous production of natural compounds. In addition to genome and transcriptome information, orthologs of essential genes in budding yeast were used to select targets for large-scale chromosomal deletions in *A. oryzae*. Large-scale deletion strains were obtained, and some of them showed the altered productivity of a heterologous terpene. We will present the effect of large-scale deletion in individual chromosomal regions on productivity of heterologous natural compounds.

Aspergillus oryzae, genome editing, natural product

発表責任者：丸山潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C7p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 C7 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* における Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)の機能解析
Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) in *Aspergillus oryzae*
○清水 雄太[1]、舟窪 絵衣美[2]、進藤 斉[1,2]、穂坂 賢[1,2]、徳岡 昌文[1,2] ([1]東農大院応生、[2]東農大応生)
○ YUTA SHIMIZU[1], EIMI FUNAKUBO[2], HITOSHI SHINDO[1,2], MASARU HOSAKA[1,2], MASAFUMI TOKUOKA[1,2] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric, [2]Tokyo Univ. of Agric)

麹菌(*Aspergillus oryzae*)は長年、醸造産業に用いられてきた経緯から、安全な微生物として認知されている。近年、麹菌を新たに自然界などから単離して利用する試みが増えており、より安全に利用する上で、麹菌が有する機能未知二次代謝物の生合成遺伝子クラスターの特徴付けは重要な課題である。当研究室では、二次代謝物の主要な基本骨格である Non-ribosomal peptide（NRP）生合成酵素の NRPS 及び NRPS-like について遺伝子高発現株を網羅的に作製することで、麹菌において機能未知の遺伝子についての特徴付けを試みている。これまでに改変 *enoA* プロモーターを利用した高発現株を 12 遺伝子について作製した。その結果、1) *A. flavus* において actinopolymorphol C 合成に関わる *lnaA* と 99%の相同性を持つ NRPS16 遺伝子(AO090020000240)の高発現により、actinopolymorphol C と同じ質量電荷比の化合物が生産されること、2) *A. flavus* において ditryptophenaline 合成に関わる *dtpA* と 74%の相同性を持つ NRPS30 遺伝子（AO090102000465）の高発現により、ditryptophenaline とは異なる質量電荷比の化合物が特異的に生産されること、を明らかにした。現在その他の NRPS 遺伝子についても解析を進めている。

Aspergillus oryzae has a long history of use in the brewing industry and is recognized as a safe microorganism. In recent years, there have been an increasing number of attempts to isolate and utilize *A. oryzae* from nature. Therefore, characterization of biosynthetic gene clusters for secondary metabolites of unknown function is an important issue for safer utilization of *A. oryzae*. In this study, we focused on non-ribosomal peptides (NRPs), which are the major secondary metabolites of filamentous fungi, and aimed to characterize them by generating a comprehensive set of strains with high gene expression of the biosynthetic enzymes NRPS and NRPS-like. So far, high expression strains using the modified *enoA* promoter have been generated for 12 genes, with the following results: 1) by high expression of the NRPS16 gene (AO090020000240), which has 99% homology with *lnaA* involved in actinopolymorphol C synthesis in *A. flavus*, producing compounds with the same mass-to-charge ratio as actinopolymorphol C, and 2) by high expression of the NRPS30 gene (AO090102000465), which has 74% homology with *dtpA*, involved in ditryptophenaline synthesis in *A. flavus*, produces compounds with different mass-to-charge ratios than ditryptophenaline.

Aspergillus oryzae, Secondary metabolism, Non-ribosomal peptide

講演番号：3C7p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 C7 会場

混合栄養硫黄酸化細菌 *Thiothrix nivea* の酢酸代謝に及ぼす硫化水素の影響

Effect of hydrogen sulfide on acetate metabolism by a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium, *Thiothrix nivea*

○荒木 優衣[1]、斉藤 朝昌[1]、近藤 敬子[2]、片平 正人[2]、武田 穣[1]([1]横国大工、[2]京大エネ研)
○ Yui ARAKI[1], Tomoaki SAITO[1], Keiko KONDO[2], Masato KATAHIRA[2], Minoru TAKEDA[1] ([1]Yokohama Natl. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】*Thiothrix nivea* は混合栄養性の硫黄酸化細菌であり、硫化水素などをエネルギー源とし二酸化炭素を炭素源とする独立栄養と、酢酸などの有機酸をエネルギーおよび炭素源とする従属栄養を両立することができる。さらに菌体からは、セルロースアミノ化剤として作用する有用な水溶性多糖であるグルコース・グルコサミン β-1,4 結合共重合体（GG）が得られる。本研究では、効率的 GG 調製手順の確立を目指し *T. nivea* の酢酸代謝に対する硫化水素濃度の影響に着目して検討することとした。また、菌体からの GG の回収手順の簡素化も試みた。従属栄養では二酸化炭素の固定は達成できないものの、有害ガスである硫化水素の除去と物質生産を両立できる。

【方法】用いた菌株は *T. nivea* ATCC 35100 である。2 L 容のジャーファーメンターを用いて回分培養を行った。炭素源は酢酸 1.25 g/L とし、酢酸消費に伴う pH 上昇に対応すべく pH を自動制御（塩酸を自動添加）した。培地量 1.2 L、温度 30℃、通気速度 1 vvm、撹拌速度 120 rpm に設定した。培養中、硫化ナトリウム溶液を一定速度で連続添加した。培養中、溶存酸素濃度および排気中硫化水素濃度を連続測定し、培養後に菌体乾重と GG 収量を測定した。なお、従来は行っていた溶菌操作を省略し、菌体を直に希塩酸処理することで GG を抽出した。

【結果】H_2S（Na_2S）を供給しない限り増殖はもたらされなかった。すなわち、H_2S は増殖因子としの役割もあると考えられる。微量の H_2S 存在下での増殖速度は H_2S 濃度に依存して高まった。大過剰の H_2S 存在下でも増殖は阻害されなかった。むしろ、H_2S 供給速度が高いほど菌体収量および GG 収量は増加したことから、従属栄養と独立栄養が同時進行することが示された。塩酸ではなく酢酸で pH を維持した場合、GG 収量は塩酸添加時の約 50 倍（0.33-0.47 mg/L）となった。また、溶菌を省略しても菌体からの GG の回収量と純度は低下しなかった。

[OBJECTIVE] *Thiothrix nivea* is a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium that can be both autotrophic and heterotrophic. From the bacterial cells, copolymer of glucose and glucosamine (GG), which is a useful as a cellulose amination agent can be prepared. In this study, we investigated heterotrophic cultivation for stable supply of GG by focusing on hydrogen sulfide concentration.

[Methods] *T. nivea* ATCC 35100 was used. Batch culture was performed using a 1.5 L jar fermenter at 30 ºC. Acetic acid was added as carbon source. The pH was maintained about 7.8-8.0. by the addition of HCl or acetic acid. During cultivation, Na_2S solution was continuously added at a constant rate and H_2S concentration in in the exhaust was monitored. After cultivation, GG yield was measured.

[RESULTS] Growth did not occur unless Na_2S (Na_2S) was supplied suggesting that H_2S is a growth factor. Growth was not inhibited in the presence of excess H_2S. Higher H2S supply increased GG yields. When pH maintenance (fed-batch cultivation) was carried out with acetic acid supply, GG yield increased dramatically.

Thiothrix nivea, Hydrogen sulfide, Fermentation

発表責任者：武田穣（takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp）

講演番号：3C7p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 C7 会場

柑橘由来フェニルアラニンアンモニアリアーゼを発現させた組換え大腸菌を用いた *trans*-ケイ皮酸の発酵生産

Production of *trans*-cinnamic acid using recombinant *Escherichia coli* expressing phenylalanine ammonia-lyase from citrus fruit.

○西川 優里[1]、小林 美稀[1]、大橋 博之[2]、大橋 貴生[1]([1]摂南大院、[2]大阪産業研)
○ YURI NISHIKAWA[1], MIKI KOBAYASHI[1], HIROYUKI OHASHI[2], TAKAO OHASHI[1] ([1]Setsunan Univ., [2]ORIST)

【背景・目的】*trans*-ケイ皮酸は香水や染料、医薬品などの化成品原料として重要な芳香族化合物の一種である。*trans*-ケイ皮酸は石油からの化学工業プロセスにより生産されてきたが、低炭素型・炭素循環型社会の実現の観点から、再生可能資源であるバイオマスを原料とし、微生物を用いたバイオプロセス生産への転換が強く望まれている。代謝系において *trans*-ケイ皮酸はフラボノイド生合成中間代謝産物であり、L-Phe を基質にフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）によって生成される。そこで、フラボノイドを多量に蓄積する柑橘系植物であるオレンジ（*Citrus sinensis*）由来の三種類の PAL タンパク質（CsPAL1, CsPAL3, CsPAL4）に着目した。微生物を用いた *trans*-ケイ皮酸の発酵生産を最終目的とし、本研究では組換え CsPAL 酵素群の特性解析、大腸菌を宿主とした *trans*-ケイ皮酸の発酵生産を行った。
【方法・結果】大腸菌 BL21(DE3)を宿主として組換え His tag 融合 CsPAL タンパク質を発現させた。次に CsPAL タンパク質を Ni カラムで精製し、CsPAL の酵素特性解析を行った。最後に、PAL タンパク質を発現させた組換え大腸菌を用いて、L-Phe を発酵基質とした *trans*-ケイ皮酸の発酵生産を試みており、本発表で結果を報告する。

trans-Cinnamic acid is a valuable aromatic compound used as a raw material for chemical products such as perfumes, dyes, and pharmaceuticals. *trans*-Cinnamic acid is synthesized from L-Phe by phenylalanine ammonia-lyase (PAL) as an intermediate in flavonoid biosynthesis. In this study, we purified the recombinant PAL enzymes (CsPALs) from *Citrus sinensis*. The purified CsPALs were employed to enzyme kinetic analyses. Then, we also attempted the *in vivo* production of *trans*-Cinnamic acid from L-Phe using the recombinant *Eshcerichia coli* expressing CsPAL enzymes.

phenylalanine ammonia-lyase, flavonoid, *Escherichia coli*

発表責任者：大橋貴生（takao.ohashi@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3C7p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 C7 会場

組換え大腸菌を用いたラズベリーケトンの高生産

High production of raspberry ketone using recombinant *E.coli*

○薄井 くるみ[1,2]、桝尾 俊介[1,2]、高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大院生命環境系、[2]微生物サステイナビリティ研究センター)
○Kurumi USUI[1,2], Shunsuke MASUO[1,2], Naoki TAKAYA[1,2] ([1]The Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

【背景・目的】ラズベリーケトン（RK）は、ラズベリーなどの植物に非常に微量（1-4 mg/Kg）に含まれる二次代謝産物である。天然香料としては最も高価な香料の一つであり、高い需要がある。これまで我々は、RK の生合成経路を導入した組換え大腸菌を用いて、グルコースを原料とした RK の発酵生産に取り組んできたが、前駆体であるチロシンの生産量（19 g/L）と比較し RK の生産量は非常に少ない（41 mg/L）という問題があった。本研究では、各発現遺伝子のリボソーム結合領域（RBS）の改変と外来遺伝子の追加、培養条件の検討による、RK の生産量増加を試みた。
【方法・結果】96 ウェルプレートを用いた発酵生産、および LC-MS を用いた RK とその中間代謝産物の定量系を構築した。また、RBS Calculator v2.0 を用いて発現強度の異なる 15 種の RBS を選抜、作製した。これらを用いて、RK 生合成経路を構成する CoA-ligase 遺伝子、ベンザルアセトン合成酵素遺伝子、脱アンモニア酵素遺伝子、ベンザルアセトン還元酵素遺伝子の RBS を改変した。さらに、生合成中間体の malonyl CoA の生産量を増加させるため、マロン酸トランスポーター遺伝子と malonyl CoA 合成酵素発現遺伝子を導入した。得られた株の代謝産物を解析したところ、最大で 374 mg/L の RK を生産した。これは、従来の生産系の約 9 倍の生産量である。本研究を通して、組換え大腸菌を用いた RK の生産性改善による生産量増加に成功した。

Raspberry ketone (RK) is a natural flavor compound in great demand as an additive in foods and cosmetics. Due to limited RK contents in plants (1-4 mg/Kg), natural RK is one of the most expensive flavor compounds. Previously, we have developed the *de novo* production systems of RK from simple carbon sources using recombinant *E. coli*. Here, we optimized ribosome binding site (RBS) of recombinant expressed genes in *E. coli* for efficient RK production, added foreign genes, and investigated culture conditions. Using 96-well plates and LC-MS, we established a high-throughput fermentation and quantification method for RK and its intermediates. We designed 15 different RBS with varying expression levels using RBS Calculator v2.0 and substituted RBSs for four genes in the artificial RK biosynthetic pathway. And we introduced a gene that has been reported to increase the intermediate malonyl CoA. As a result, the strain produced up to 9-fold more RK than the high RK-producing strains obtained in previous studies. Through this study, we succeeded in increasing the production of RK by improving the productivity of using recombinant *E. coli*.

Raspberry ketone, ribosome binding site, *E.coli*

発表責任者：薄井　くるみ（s2220986@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C7p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 C7 会場

大腸菌を用いたフライボノイド生産プラットフォームの構築

A flavonoid production platform using *E.coli*

○中川 明[1,2]、新谷 隆史[1]、南 博道[1,2] ([1]ファーメランタ株式会社、[2]石川県立大学)
○Akira Nakagawa[1,2], Takafumi Shintani[1], Hiromichi Minami[1,2] ([1]Fermelanta Inc., [2]Ishikawa pref. Univ.)

フライボノイドには、抗酸化作用を有するものが多く、例えばケルセチンは化粧品、アントシアニンは目のサプリメントや糖尿病症状改善等、カテキンは活性酸素除去等に幅広い用途で利用されている．フライボノイドは植物体に微量にしか含まれないため、栽培や抽出効率から、非常に高価なものが多い．また、植物体にほとんど含まれない希少フライボノイドや天然には存在しない非天然フライボノイドの中には、既存のフライボノイド以上の生理活性を有するものがあることは想像に難くない．よって、フラボノイドを安価に、大量に、自在に、生産することは、人類の幸福に資する技術となり得ると考えられる．フラボノイドの多くはナリンゲニンを中間体とするため、ナリンゲニンを大量に生産することができれば、有用なフラボノイドも生産できる．そこで、我々は、植物の栽培よりも遥かに容易に培養できる大腸菌を用いて、種々のフラボノイドに転換しうるナリンゲニンを大量に生産する研究を遂行している．本発表では、グルコースからのナリンゲニン生産に関して、我々独自の技術に関して議論したい．

Flavonoids often possess antioxidant properties; for example, quercetin is used in cosmetics, anthocyanin in eye supplements and improving diabetes symptoms, and catechin in the removal of reactive oxygen species, demonstrating a wide range of applications. Since flavonoids are present only in trace amounts in plant bodies, many of them are highly expensive due to troublesome cultivation and extraction. Moreover, it is not hard to imagine that among rare flavonoids scarcely present in plant bodies or non-natural flavonoids, there are those with physiological activities surpassing existing flavonoids. Therefore, it is thought that producing flavonoids cheaply, in large quantities, and freely can be a technology that contributes to human happiness. Since many flavonoids are derived from naringenin as an intermediate, producing naringenin in large quantities could enable the production of various useful flavonoids. Based on these considerations, we are conducting research to mass-produce naringenin using *Escherichia coli*, which can be cultivated much more easily than plants. In this presentation, we would like to discuss our unique technology regarding naringenin production from glucose.

Secondary metabolite, Eshcherichia coli, Flavonoid

発表責任者：中川明（reticuline@gmail.com）

講演番号：3C7p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 C7 会場

大腸菌を用いたモルヒネの発酵生産

Fermentative production of morphine using *Escherichia coli*

○Rosenberg Sumamal[1]、中川 明[1,2]、新谷 隆史[1]、南 博道[1,2] ([1]ファーメランタ株式会社、[2]石川県立大学)
○ Sumamal Rosenberg[1], Akira Nakagawa[1,2], Takafumi Shintani[1], Hiromichi Minami[1,2] ([1]Fermelanta Inc., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

モルヒネを始めとするオピオイド系鎮痛剤は古来より人類の痛みの緩和に用いられてきた医薬品であり、歯痛やリウマチから術後の鎮痛、ガンによる疼痛まで、幅広く処方されている．実際に、世界保険機関の必須医薬品モデルリストにも掲載されており、人類にとって非常に重要な医薬品である．昨今の医療の発達から途上国の平均寿命が伸びている一方で、手術機会の増加、ガンによる死亡率も劇的に上がってきている．しかしながら、モルヒネは高価な医薬品であり、手に入りにくく、そうした国々では、中々処方しにくい．痛みは患者の QOL を著しく低下させ、終末医療においては、壮絶な闘病をしなくてはならないことから、安価なモルヒネの供給は世界的な課題となっている．よって、本研究は、安価なモルヒネ供給を実現することを目的に、大腸菌を用いたモルヒネの実用生産系の構築を遂行する．これまでに、我々は、未発表ながら、大腸菌でモルヒネを生産することに成功している．しかし、現行のモルヒネ生産システムは、3 菌株を段階的に培養して生産するものであり、実用化には程遠いものであった．本発表では、大腸菌を用いたモルヒネ生産系において、種々の検討を遂行し、1 菌体でモルヒネ生産に成功した事例について紹介する．

Opioid analgesics, including morphine, have been used since ancient times as pharmaceuticals to alleviate human pain. Prescribing for wide range symptom from dental pain and rheumatism to pain caused by cancer, these medications play a crucial role in relieving pain. Despite recent advancements in healthcare leading to increased life expectancy in developing countries, there has been a dramatic rise in surgical opportunities and mortality rates due to cancer. However, morphine remains a costly pharmaceutical, often difficult to access, especially in those countries Pain significantly impairs QOL for patients, and in the context of end-of-life care, the need for affordable morphine supply has become a global challenge. Therefore, this research aims to achieve cost-effective morphine production by constructing a practical production system using Escherichia coli. Although we have already succeeded to produce morphine using *E. coli*, the system requires the sequential cultivation of three bacterial strains. In this presentation, we will discuss the morphine production system using a single *E. coli* strain.

Morphine, Secondary metabolite, Escherichia coli

発表責任者：中川明（reticuline@gmail.com）

講演番号：3C7p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 C7 会場

De novo RiPPs 創薬を志向した非天然チオペプチド発酵生産系の確立
Establishment of unnatural thiopeptide fermentation platform for *de novo* RiPPs drug discovery
○伊地知 新太[1]、永井 栄美子[2]、浅水 俊平[3]、Vinogradov Alexander A.[4]、後藤 佑樹[4]、菅 裕明[4]、尾仲 宏康[1]([1]学習院大理、[2]アルバートアインシュタイン医科大学、[3]神戸大先端バイオ、[4]東大院理)
○Shinta IJICHI[1], Emiko NAGAI[2], Shumpei ASAMIZU[3], Alexander A. Vinogradov[4], Yuki GOTO[4], Hiroaki SUGA[4], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Dept. of Life Sci., Gakushuin Univ., [2]AECM, [3]EGBRC, [4]Dept. of Chem., UTokyo)

RiPPs は、塩基配列に規定される前駆体ペプチドがリボソームで合成された後、翻訳後修飾を受け成熟する天然物の総称である。故に塩基編集での多様な非天然ペプチドの生成が容易である。チオペプチドは、含窒素 6 員環を中心とするマクロ環含有 RiPPs ファミリーの一つである。我々はチオペプチド lactazole の生合成研究を行い、その生合成酵素は非常に寛容な基質許容性を有し、環構造、尾部のアミノ酸は殆ど任意のものに置換できることを示した[1]。そのため、lactazole 生合成マシナリーの利用で抗体と同等の特異性を有すペプチド創薬が展開可能であると着想し、新規生理活性を持つ lactazole ベースの非天然チオペプチド(LUTs)の *de novo* 創製を行った[2]。一方で生理活性評価には多量のサンプルが必要だが、現状大量供給法は確立されていない。本研究では、創製した 11 種の LUTs をモデルとし、安価でクリーンな微生物による発酵生産系確立を目指した。

まず天然型の lactazole 類の生産を指標にし、発現エレメントの最適化を実施した。その後、異種発現ホストの選抜及び改良、培養条件等の検討により、構造多様性に富むモデル 11 種の LUTs 中 10 個(>90%)の生産を達成し、さらに生産量を最大 27 mg/L へ引き上げることに成功した。今後は lactazole 生合成マシナリーを利用した任意の創薬標的へのシーズとなる LUTs の探索及び発酵生産による安価な大量供給という、新たなペプチド創薬基盤の確立を目指している。

Thiopeptides are a family of RiPP natural products with macrocyclic rings. We previously isolated novel thiopeptides, lactazoles from *Streptomycetes* and studied their biosynthesis. Lactazole biosynthetic enzymes have broad substrate tolerance and most of amino acids that forming the ring, and C-terminal tail can be substituted to any amino acids[1]. Therefore, we conceived antibody-like peptide drug discovery using lactazole biosynthetic machinery and created lactazole-based unnatural thiopeptides with novel biological activities[2]. On the other hand, it is important to secure enough quantities of material for biological tests, but effective supplying system have not been established. In this study, we aimed to construct a microbial production system of lactazole-based unnatural thiopeptides using the 11 models. As a result, we successfully produced 10 unnatural thiopeptides with various structural differences. We are currently constructing a new platform for drug discovery based on lactazole biosynthetic machinery.

[1] Vinogradov, A. A. *et al.*, *Nat. Commun.* 2020, [2] Vinogradov, A. A. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2022

RiPPs, microbial production, unnatural cyclic peptides

講演番号：3C7p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 C7 会場

フェノール性二次代謝産物発酵生産プラットフォームの構築

Establishment of a platform for the production of phenolic secondary metabolites

○新谷 隆史[1]、中川 明[1,2]、南 博道[1,2] ([1]ファーメランタ株式会社、[2]石川県大資源研)
○ Takafumi SHINTANI[1], AKIRA NAKAGAWA[1,2], Hiromichi MINAMI[1,2] ([1]Fermelanta Ltd., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

人類は太古より、植物に含まれるさまざまな化合物を医薬品や化粧品、香料などとして利用してきた。しかし、これらの多くは構造が複雑なため、化学合成による実用生産が困難である。ファーメランタ株式会社では、このように複雑な構造を持つ生理活性物質を、大腸菌を用いて安価かつ大量・迅速に生産することを目指して研究開発を進めている。現在は、植物のあらゆる二次代謝産物の生産に対応するために、重要な中間体を生合成する経路のプラットフォーム化を進めている。本発表では、カンナビノイドなどのフェノール性二次代謝産物の前駆体であるオリベトール酸の生産プラットフォームについて報告する。オリベトール酸はポリケタイドの一種であり、ヘキサノイル-CoA とマロニル-CoA からポリケタイド合成酵素によって合成される。オリベトール酸の生産プラットフォーム株には、ヘキサノイル-CoA を生合成する酵素遺伝子群とポリケタイド合成酵素の遺伝子などが組み込まれている。本発表では、オリベトール酸から生合成できる様々な二次代謝産物についても考察する。

Since time immemorial, humans have used various compounds contained in plants as medicines, cosmetics and perfumes. However, many of these compounds have complex structures, making their practical production by chemical synthesis difficult. Fermelanta Ltd. is conducting research and development with the aim of producing useful bioactive substances inexpensively, in large quantities and rapidly using *Escherichia coli*. We are currently developing platforms of biosynthetic pathways for the key intermediates in the production of all secondary metabolites. This presentation reports on a production platform for olivetolic acid, a precursor of phenolic secondary metabolites such as cannabinoids. Olivetolic acid is a type of polyketide and is synthesized from hexanoyl-CoA and malonyl-CoA by a polyketide synthase. Olivetolic acid producing platform strains incorporate a group of enzyme genes for the biosynthesis of hexanoyl-CoA and genes for a polyketide synthase. This presentation will also discuss the various secondary metabolites that can be biosynthesised from olivetolic acid.

olivetolic acid, cannabinoids, *E.coli*

発表責任者：新谷隆史（takafumi.shintani@fermelanta.com）

講演番号：3C7p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 C7 会場

新規 lasso peptide における機能向上アナログの作製とその生理活性評価
Preparation of function-enhancing analog of a new lasso peptide and evaluation of its biological activity
○道下 ひかる [1]、星野 翔太郎 [1]、永井 栄美子 [2]、尾仲 宏康 [1] ([1] 学習院大理、[2] アルバート・アインシュタイン医科大学)
○Hikaru MICHISHITA[1], Shotaro HOSHINO[1], Emiko NAGAI[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Dept. of Life Sci., Gakushuin univ., [2]AECM)

リボソーム翻訳後修飾ペプチド (RiPPs)は、リボソームによって合成された前駆体ペプチドが様々な翻訳後修飾を受けて生産される天然物の一群である。その生合成の特徴から、遺伝子操作により前駆体ペプチドに対してアミノ酸置換、除去、付加などを容易に行うことができ、多様な非天然型 RiPPs の作製が可能である。我々は新規構造を有する lasso peptide (RiPPs の一種)を希少放線菌より単離し、それが一般的な大腸菌株には抗菌活性を示さない一方で、外膜バリアに異常を持つ変異株に対して抗菌活性を示すことを見出した。従って、本化合物はグラム陰性細菌に活性を持つが膜透過性に問題があることが想定された。そこで、第一級アミンを側鎖に持つ Lys 残基を導入し、それを起点に各種誘導体化を行うことで、膜透過性の付与を目指した。まず初めに、2 つのインテグレーションプラスミドにそれぞれ lasso peptide の翻訳後修飾酵素群及び前駆体をコードする遺伝子を導入し、異種発現系の構築をした。その結果、天然型 lasso peptide 生産が見られた。次に overlap PCR により前駆体ペプチドの C 末端に Lys を付加したプラスミドを作製し、異種発現系を用いて LC-MS による生産確認を行ったところ、C 末端 Lys 付加 lasso peptide アナログの生産に成功した。大量培養後、有機溶媒抽出と各種クロマトグラフィーによる精製を行った。現在、本アナログに膜透過性ポリマーを付加した機能向上アナログの作製及びその生理活性評価を行っている。

RiPPs have the advantage of being easily engineered to produce various analogs. We isolated a new lasso peptide from a rare actinomycete, but it showed no antibacterial activity against *Escherichia coli* due to a problem with membrane permeability. To address this issue, we introduced a Lys residue to improve membrane permeability. We used a heterologous expression system by transforming a group of post-translationally modified enzyme genes and a precursor gene of lasso peptide into a host strain. After successfully producing the lasso peptide, we created a plasmid with Lys-addition at the C-terminus of the precursor peptide. We confirmed the production of the lasso peptide analog using the same heterologous expression system by LC-MS. Currently, we are working on improving the functionality of the analog by adding a membrane-permeable polymer at the Lys residue and evaluating its biological activity.

RiPPs, Bioengineering, heterologous expression

講演番号：3D1a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D1 会場

メイラード反応生成香気による線虫 *C. elegans* の寿命延長に対する熱ショック因子の関与
Involvement of heat shock factor on the lifespan extension through the olfactory stimulation of Maillard reaction odorants in *C. elegans*.

○横山 壱成[1]、瀬戸山 央[2]、大畑 素子[1]、長田 和実[1]([1]日大生物資源、[2]（地独）神奈川県立産業技術総合研究所)
○ Issei YOKOYAMA[1], Ou SETOYAMA[2], Motoko OHATA[1], Kazumi OSADA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】メイラード反応により生成する香りは、食品の嗜好性向上に寄与するだけでなく、吸入による生理作用を誘導することが明らかにされている。昨年度我々は、線虫 *C. elegans* が嗅覚系を介してメイラード反応生成香気に誘引行動を示し、その香気曝露によって寿命が延長されることを見出した。本研究では、香気刺激による寿命延長メカニズムの解明を目的とした。【方法・結果】リジン・グルコース混合液を 90℃で 30 分加熱した溶液（メイラード反応物）をシャーレ蓋に設置し、線虫に対して香気刺激を行った。メイラード反応生成香気の曝露は、野生型線虫（N2）の酸化および熱ストレス負荷時の寿命を延長させた。また qPCR による mRNA 発現解析の結果、メイラード反応生成香気を曝露した線虫は、熱ショック反応に関連する遺伝子（*Hsf-1*, *Hsp-16.2*, *Hsp-70*）および抗酸化酵素であるカタラーゼ（*Ctl-1*, *3*）の発現が上昇した。嗅覚シグナルの伝達が不全である *odr-3* 変異体において同様の実験を行ったところ、熱ショック関連遺伝子の発現上昇は消失したものの、*Ctl-1*, *3* の発現量に変化はなかった。以上より、メイラード反応生成香気の香気刺激による寿命延長には、ストレス応答に関連する遺伝子群が寄与することが考えられた。また、興味深いことに *Ctl-1*, *3* の発現上昇に関しては、香気刺激とは独立あるいは別の制御を受けていることが示唆された。現在、*hsf-1* などの変異体での寿命測定および主要香気成分での検討を行っている。

【Objective】Odorants generated by the Maillard reaction contribute to the improvement of food palatability and induce physiological effects through inhalation. The objective of this study was to elucidate the mechanism of anti-aging effect through Maillard reaction odorants. 【Results】The olfactory stimulation of Maillard reaction odorants improved oxidative and thermal stress resistance in the wild-type (N2) *C. elegans*. Although the mRNA expression of heat-shock response genes (*Hsf-1*, *Hsp-16.2*, and *Hsp-70*) were up-regulated by olfactory stimulation, such up-regulation was not observed in anosmia mutant (*odr-3*). These results suggest that Maillard reaction odorants affects heat-shock response in *C. elegans* through olfactory stimulation. Interestingly, the mRNA expressions of catalase (*Ctl-1* and *Ctl-3*) were also up-regulated, but the up-regulations remained even in *odr-3* mutant. Currently, we are trying to further elucidate the mechanism of lifespan extension using *hsf-1* mutant.

Odor, Maillard reaction, *C. elegans*

講演番号：3D1a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D1 会場

線虫 *C.elegans* における希少糖 D-allulose の AGEs 蓄積抑制効果
Inhibition of AGEs accumulation by the rare sugar D-allulose in *C. elegans*
○佐藤 正資、平田 恵子、染原 のい、藤澤 智彩、細川 歌音（香川大農）
○Masashi Sato, Keiko Hirata, Noi Somehara, Chisaki Fujisawa, Kanon Hosokawa (Kagawa Univ.)

我々は，線虫 *Caenorhabditis elegans* の寿命延長を指標として，抗老化活性をもつ希少糖の探索を行ってきた。しかし， その寿命試験においては，線虫個体の生死を約 1 ヶ月間観察する必要があり，多くの労力と実験者の熟練を必要とする。そこで，より簡便な老化評価試験法の開発が求められた。

最近，*C.elegans* 体内で特定の蛍光を発する物質が加齢に伴い増加すること，その蛍光は最終糖化産物（advanced glycation end products: AGEs）由来と考えられることが報告された[1,2]。我々はこれらの報告を参考にし，線虫抽出物の蛍光を計測することにより，線虫の老化を評価する方法を確立した。D-fructose を除くケトヘキソース異性体 7 種を試料として,この試験を行ったところ, D-fructose の C3 エピマーである D-allulose のみに蛍光値の減少（すなわち，老化物質 AGEs の蓄積阻害）が認められた。本発表では，この結果と併せて，その作用機序について考察する。

We have been searching for rare sugars with anti-aging activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*, using lifespan extension as an indicator. However, in this lifespan test, observing the life and death of individual nematodes for about a month requires a lot of work and skill from the experimenter. Therefore, there was a need to develop a simpler test method to evaluate aging. Recently, it has been reported that specific fluorescent substances in *C. elegans* increases with aging. The fluorescence is thought to be derived from advanced glycation end products (AGEs) [1,2]. Based on these reports, we established a method to evaluate aging in *C. elegans* by measuring the fluorescence of nematode extracts. When seven ketohexose isomers except D-fructose were used in this assay, only D-allulose showed a decrease in fluorescence (i.e., inhibition of the accumulation of AGEs, the aging substance). In this presentation, we will discuss the mechanism of action of D-allulose in addition to the results of this assay.

1) Setoyama, O., *Int J Anal Bio-Sci*, **8**, 59 (2020)
2) Komura, T., et al., *npj Aging Mech Dis*, **7**, 12 (2021)

Caenorhabiditis elegans, D-allulose, AGEs

発表責任者：佐藤正資（sato.masashi@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3D1a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D1 会場

抗酸化物質の機能性、吸収性を高める多糖系キャリアの開発

Development of polysaccharide-based nanocarriers for enhanced functionality and bioavilability of antioxidants

○河南 翔馬、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Shoma KANNAN, Kazuya KOUMOTO (FIRST, Konan Univ.)

抗酸化物質（ポリフェノール）の継続的な摂取は死亡リスクを低下させることが報告されている。しかし、ポリフェノールは水に不溶なものが多く、加えて消化管内で分解されやすいため、経口摂取しても小腸から吸収されるのはわずか 2%程度にとどまる。その課題を解決するためにはキャリアの利用が不可欠であり、我々の研究室では、食用の β-1,3-1,6-glucan から作った変性 β-1,3-1,6-glucan ナノ粒子をキャリアとする研究を行ってきた。そこでナノ粒子のキャビティ内に包接することにより高濃度で水に可溶化できることを発見した。その際、H-ORAC 法を用いて包接されたポリフェノールの抗酸化活性を測定すると、フリーのものと比較して抗酸化活性が上昇する興味深い現象を見出した。本研究では、ナノ粒子への包接に伴う模擬消化液中での分解耐性について検討した。発表では、カテキン、レスベラトロール、カフェイン酸を含む健康増進効果が多く報告されるポリフェノールに焦点を当て、グルカンナノ粒子への包接特性や抗酸化活性、さらには模擬消化試験による分解耐性について報告する。

Continuous intake of antioxidants (polyphenols) has been reported to reduce the risk of mortality. However, since most polyphenols are insoluble in water and, in addition, are easily degraded in the digestive tract, only about 2% of polyphenols are absorbed through the intestine after oral intake. To solve this problem, the use of carriers is essential, and our laboratory has been investigating the use of renatured ß-1,3-1,6-glucan nanoparticles prepared by edible β-1,3-1,6-glucan as carriers. We have found that the carrier can be solubilized in water at high concentration by encapsulating polyphenols within the cavity of the nanoparticles. Here, we measured the antioxidant activity of the encapsulated polyphenols using the H-ORAC assay, and found an interesting phenomenon in which the antioxidant activity enhanced compared to that of the free polyphenols. In this study, we investigated the resistance to degradation in a digestive solution following inclusion of polyphenols in nanoparticles. The presentation will focus on polyphenols with many reported health-promoting effects, including catechins, resveratrol, and caffeic acid, and will report their inclusion properties and antioxidant activity in the glucan nanoparticles, as well as degradation tolerance in a digestion solution.

antioxidants, polyphenol, beta-1,3-glucan

発表責任者：河南翔馬（s2191017@s.konan-u.ac.jp）

講演番号：3D1a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D1 会場

黄花フリージア（*Freesia X hybrida*）に含有される新規フラボノイド配糖体の化学構造及びその生理活性評価

Chemical structures and antioxidant activities of novel flavonoid glycosides in Freesia (*Freesia X Hybrida*)

○菅谷 真歩[1]、岩本 のぞみ[1]、宇佐美 真由[1]、齋藤 歩那[1]、酒見 裕香[1]、三沢 典彦[2]、竹村 美保[2]、上垣 陽平[2]、東村 泰希[3]、村濱 稔[4]、降旗 一夫[5]、新藤 一敏[1] ([1]日女大家政、[2]石川県大生資研、[3]石川県大食品研、[4]石川県農林総合研究センター、[5]東大農)

○Maho SUGAYA[1], Nozomi IWAMOTO[1], Mayu USAMI[1], Ayuna SAITO[1], Yuka SAKEMI[1], Norihiko MISAWA[2], Miho TAKEMURA[2], Yohei UWAGAKI[2], Yasuki HIGASHIMURA[3], Minoru MURAHAMA[4], Kazuo FURIHATA[5], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women Univ, [2]Ishikawa Prefectural Univ, [3]Ishikawa Prefectural Univ. Food, [4]Ishikawa Agriculture and Forestry Research Center, [5]The Univ. of Tokyo)

当研究室ではアヤメ科(*Iridaceae*)のフリージア(*Freesia x Hybrida*)花中の有用成分について研究を行っている。これまでにフリージアの一品種である石川 f2 号の花の黄色色素化合物が新規な crocetin 配糖体であることを明らかとして報告済である。今回、石川 f2 号、カヤック、ブールバール、ポルトパサールの 4 品種花について抽出物のラット脳脂質過酸化抑制試験を行ったところ MeOH 抽出物に優れた活性を有することを見出した。抽出物の DAD HPLC 分析の結果、これら 4 品種で抗酸化活性の理由であると予想されるフラボノイド配糖体のピークが多数観察されることが判明した。ただし f2 と他の 3 品種では異なるフラボノイド配糖体のピークが観測されたため、f2 とカヤック（3 品種の中で最も含有量が高い）を対象とし、各物質の単離精製・構造決定を行った。結果、f2 から A～F と命名した 6 種類、カヤックから G,H と命名した 2 種類の新規化合物を発見した。化合物 A～H はいずれも quercetin の C 環に caffeic acid が結合したアグリコンを有していた。また A～D に含まれる glucose が D-glucose であること、A～D,F に含まれる rhamnose が L-rhamnose であることも決定し、すべての絶対立体配置まで明らかとした。

抗酸化試験の結果、ラット脳過酸化抑制活性試験では A,B,D,E,G が、DPPH ラジカル消去活性試験では A,B,D,E,G,H に優れた活性を示した。さらに Mouse3T3-L1 脂肪細胞を用いた Mouse3T3-L1 前駆脂肪細胞分化誘導実験を収量の多かった D,E,G,H を用いて実施した結果、全てに有意な分化誘導作用が認められた。

Rat brain lipid oxidation inhibiting activity tests on MeOH extracts of four Freesia flower species (Ishikawa F2, Kayak, Boulevard, and Porto Pasar) proved that they possess potent antioxidant activities. Since DAD HPLC analysis of the extracts showed several flavonoid glycoside peaks which were proposed to be the antioxidant compounds, we purified major peaks from f2 and Kayak extracts using chromatographic methods. Next, we determined the structures of the isolated compounds using detailed MS and NMR analysis. As the results, we discovered six new compounds A, B, C, D, E, and F from f2, and two new compounds G and H from kayak. All the compounds possessed common aglycone composed by quercetin (or quercitrin) and caffeic acid. The absolute chemistried of sugars in these compounds were also clarified by enzymatic reactions.

Potent lipid peroxidation activities were observed in A, B, D, E, and G (IC_{50} 0.63 - 5.21 μM), and moderate DPPH radical scavenging activities were observed in A, B, D, E, G, and H (IC_{50} 9.98- 32.2 μM). In addition, mouse3T3-L1 preadipocyte differentiation induction experiments were conducted using D, E, G, and H, and significant differentiation-inducing effects were observed in all of them.

Freesia X Hybrida, antioxidants, flavonoid

講演番号：3D1a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D1 会場

ナンテンハギ（*Vicia unijuga*）に含まれる抗酸化成分の同定（ケルセチン配糖体）及びその活性評価
antioxidant activities of quercetin glucosides in *Vicia unijuga*

○島上 真帆、菅谷 真歩、太田 秀香、岡 美波、小川 莉央、新藤 一敏（日女大）
○Maho SHIMAGAMI, Maho SUGAYA, Hideka OTA, Minami OKA, Rio OGAWA, Kazutoshi SHINDO (Japan Women Univ)

当研究室では、生体内で発生する活性酸素であるラジカル種を消去する活性を有する食品成分を探索している。今回、マメ科（*Fabaceae*）の山菜であるナンテンハギ（*Vicia unijuga*）から優れたラジカル種活性酸素消去活性を有する抗酸化成分を発見したので、これについて報告する。ナンテンハギは日本に広く分布し、てんぷらやお浸しの材料として利用されており、また中国では疲労を緩和する漢方材料としても利用されている。ナンテンハギが抗酸化作用を有するという報告は見当たらなかったため、今回ナンテンハギの各種溶媒抽出物のラジカル種消去抗酸化活性をラット脳脂質過酸化抑制試験を用いて検討したところ、MeOH 抽出物、80 % MeOH 抽出物が優れた脂質過酸化抑制活性を有することを見出した。そこで同系での活性を指標に活性物質を各種クロマトグラフィーで単離精製し、HRESI-MS・各種 NMR スペクトルを用いた構造決定を行った。その結果、活性物質を quercitrin, afzelin, quercetin 7-glucuronide と決定した。これら quercetin 配糖体がナンテンハギに含まれていることは今回の研究で初めて明らかとなった。また quercitrin, afzelin については既にラット脳脂質過酸化抑制活性の報告があった（IC_{50} quercitrin 5.6 μM, afzelin 310.6 μM）が quercetin 7-glucuronide の脂質過酸化抑制活性については初めての報告（IC_{50} 5.2 μM）である。また quercetin 7-glucuronide がマメ科植物から単離されたのも、今回が初めての報告である。

During the screening of antioxidant wild vegetables using rat brain lipid oxidation inhibiting activity test, we found that MeOH extract and 80 % MeOH extract of *Vicia unijuga* shows potent antioxidant activity. Thus, we isolated the antioxidant compounds from these extracts using preparative HPLCs (ODS HPLC → silica HPLC), and analyzed their structures by HR-ESIMS and 1D (^{1}H and ^{13}C) and 2D (^{1}H-^{1}H COSY, HSQC, HMBC) NMR. As the results, we identified the antioxidant compounds as quercitrin, afzelin, and quercetin 7-glucuronide. This is the first study reporting these quercetin glucosides in *Vicia unijuga*. In addition, this is the first study reporting the presence of quercetin 7-glucuronide in *Fabaceae*.
The lipid oxidation inhibiting activities of quercitrin and afzelin were reported in the previous studies, while this is the first report on lipid oxidation inhibiting activity of quercetin 7-glucuronide.
Now, we are evaluating other antioxidant activities using mammalian cells.

Vicia unijuga, antioxidants, quercetin glucosides

講演番号：3D1a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D1 会場

ポリアミン量減少による骨芽細胞分化低下に対するスペルミジンとダイゼインの影響
Impact of Spermidine and Daidzein on Osteoblast Differentiation Impaired by Decreased Polyamine Levels

○君羅 好史[1]、植村 武史[2]、古地 壯光[2]、大澤 吉弘[1]、真野 博[1] ([1]城西大・薬・医療栄養、[2]城西大・薬・薬)
○Yoshifumi KIMIRA[1], Takeshi UEMURA[2], Takemitsu FURUCHI[2], Yoshihiro OSAWA[1], Hiroshi MANO[1] ([1]Josai Univ. Pharma. Nutr., [2]Josai Univ. Pharma.)

【目的】加齢による細胞内ポリアミンの減少が細胞老化と関連することが指摘されている。骨芽細胞においてもポリアミンの減少は骨芽細胞分化を低下させることから、食品由来ポリアミンの摂取に加え、ポリアミン代謝を調節する食品機能性成分が骨芽細胞を活性化し、骨の老化を予防できると考えられる。納豆はポリアミンの一種スペルミジンを高濃度で含有し、また大豆イソフラボンはポリアミンの代謝を調節する作用を持つことから、骨の老化を予防する機能性食品となる可能性を有する。本研究では納豆に含まれるポリアミンとイソフラボンによる骨芽細胞分化制御メカニズムについて検討することを目的とする。
【方法・結果】ポリアミン生合成阻害剤である DFMO 存在下でマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を培養すると、細胞内ポリアミン量が低下し、骨芽細胞の分化指標である ALP 活性が顕著に低下した。DFMO による骨芽細胞分化抑制作用に対するスペルミジンおよびダイゼインの添加は ALP 活性を亢進させた。ALP の mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR 法にて解析したところ、DFMO により Runx2 発現量に影響を与えることなく ALP の mRNA 発現量が顕著に低下した。スペルミジンは DFMO の ALP 発現量低下作用を抑制し、ダイゼインとスペルミジンの同時添加はさらに ALP 発現量を増加させた。
【結論】以上の結果より、ポリアミンの低下による骨芽細胞分化抑制に対し、スペルミジンおよびダイゼインは骨芽細胞の分化亢進作用を有すると推察された。
The decline in intracellular polyamines with aging is associated with cellular senescence and reduced osteoblast differentiation. It is hypothesized that consuming polyamines from food, along with functional components regulating polyamine metabolism, can activate osteoblasts and prevent bone aging. This study investigates how polyamines and isoflavones from natto control osteoblast differentiation. In experiments with MC3T3-E1 cells and DFMO (polyamine biosynthesis inhibitor), intracellular polyamines and ALP activity decreased. Spermidine and daidzein supplementation under DFMO increased ALP activity, suggesting their potential in promoting osteoblast differentiation despite polyamine reduction.

polyamine

講演番号：3D1a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D1 会場

紫キャベツ長期摂取の生体機能への影響

Influence of a long-term diet including red cabbage on biological function

○渡邉 理江[1,2]、井上 碧[1]、先川 碧[1]、儀間 章託[2]、達脇 茉胡[1]、田中 昭佳[1]、塚本 芽衣[1] ([1]美作大食物、[2]美作大院生活科学)
○Rie WATANABE[1,2], Aoi INOUE[1], Aoi SAKIKAWA[1], Shota GIMA[2], Mako TATSUWAKI[1], Haruka TANAKA[1], Mei TSUKAMOTO[1] ([1]Mimasaka Univ., [2]Graduate School of Human Life Sciences, Mimasaka Univ.)

【背景・目的】酸化ストレスにより、過剰に発生した活性酸素種 ROS が種々の組織障害を惹起し、慢性疾患の発症進展や老化促進へと繋がる。多くの ROS 消去剤や抗酸化剤が、この過剰 ROS の体内消去に関与しており、体内の抗酸化反応ばかりでなく、食品からもこれらは補われている。その 1 つのチオレドキシン-1 は、種々のストレスにより発現誘導される生体防御因子であり、抗酸化作用・抗炎症作用を示す。ブロッコリー・キャベツに多く含まれ、チオレドキシン遺伝子発現を誘導するスルフォラファンは、メタボリックシンドロームや糖尿病に防御効果を示すことも報告されている。本研究では、野生型実験マウスを用いて、紫キャベツ含有食の長期食餌摂取による効果を評価した。
【方法・結果】紫キャベツおよび対照としてヤングコーンをフリーズドライ加工粉砕後、通常食餌に 20%混合させて経口負荷試験食餌を作製した。10 週齢 C57BL/6 マウスに対し経口負荷を 61 週間行った。結果、ヤングコーン群に比し、紫キャベツ群で体重が有意に低下した。加え、HbA1c 値も測定した。紫キャベツ群において、HbA1c 値は有意に低下し、紫キャベツによる血糖コントロールの改善が示唆された。

[Background・Aim] Oxidative stress-induced excess reactive oxygen species (ROS) generation elicit various tissue damages, resulting in chronic diseases and aging. Many ROS scavengers and antioxidants are relating to reduction of the increased ROS and supplied by foods as well as biological reactions. One of them, thioredoxin-1 (hTrx-1) is a defensive protein induced by various stresses and exerts antioxidative and anti-inflammatory effects. It is demonstrated that sulforaphane, which is abundant in broccoli and cabbage and induces Trx protein, has protective effects on diet-induced metabolic syndrome and diabetes. In this study, wild mice were fed red cabbage powder-containing diets in order to evaluate the effect of long-term diets.
[Methods・Results] Red cabbage and young corn (as a control) were freeze-dried, powdered and admixed with a standard powdered feed at a final concentration of 20% (w/w). Wild mice (C57BL/6, 10 weeks old) were fed 20% Red cabbage or young corn powder-containing diets ad libitum for 61 weeks. Compared to the young corn group, the red cabbage group showed significantly decreased body weight. In addition, HbAlc value was determined. The HbAlc value was significantly reduced in the red cabbage group, suggesting improvement of blood glucose control by the red cabbage.

antioxidant, red cabbage, blood glucose control

発表責任者：渡邉理江（watanabe-rie@mimasaka.ac.jp）

講演番号：3D1a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D1 会場

乳酸菌 *Lactobacillus crispatus* KT-11 株の腸管を介した皮膚改善効果とその分子基盤の解明

Effects and mechanisms of *Lactobacillus crispatus* KT-11 on skin improvement through the intestinal tract

○平野 萌々華[1]、大木 妙子[2]、渡邉 樹[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院農、[2]株式会社キティー、[3]九大院農学研究院)
○Momoka HIRANO[1], Taeko OKI[2], Itsuki WATANABE[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]The Univ. of Kyusyu, [2]KITII Corporation, [3]Kyusyu University Faculty of Agriculture)

1.緒言
本研究では、乳酸菌 *Lactobacillus crispatus* KT-1 株が腸管細胞を介して皮膚にどのような効果を有するのか、皮膚細胞における長寿遺伝子活性化を指標とし、機能性の検証とその作用機序で解明を目的として研究を行った。
2.方法及び結果
KT-11 を添加したヒト結腸癌由来細胞(Caco-2)の培養上清を、ヒト表皮角化細胞(HaCaT)に添加し、長寿遺伝子の活性を RT-PCR を用いて評価した。また、長寿遺伝子活性化による皮膚の表皮改善効果についても評価を行った。その結果、ミトコンドリア活性化や、バリア形成、しわ形成や保湿維持に関わる遺伝子の発現を制御する活性を有することが明らかとなった。
3. 考察
上記の研究から、KT-11 は腸管細胞に働きかけて、皮膚細胞を活性化しうることが明らかとなった。
1. Introduction
In this study, we conducted research to verify the functionality of sterilized *Lactobacillus crispatus* KT-11 and to elucidate their mechanism of action by using Sirtuin activation in skin cells as an indicator of what effect they have on the skin via intestinal cells.
2. Research Method and Results
Culture supernatants of human colon cancer-derived cells (Caco-2) supplemented with sterilized KT-11 were added to human epidermal keratinocytes (HaCaT), and the activity of Sirtuin was evaluated using RT-PCR. The effect of Sirtuin activation on epidermal improvement of skin was also evaluated. The results showed that the activity regulates mitochondrial activation and the expression of genes involved in barrier formation, wrinkle formation and moisture retention maintenance.
3. Conclusion
From the above studies, it is clear that KT-11 can activate skin cells by acting on intestinal cells.

Lactic acid bacteria, skin, sirtuin

講演番号：3D1a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 D1 会場

アスタキサンチン／β-グルカンナノ粒子包接複合体の調製とその安定性の評価
Preparation of Astaxanthin/β-Glucan Inclusion Complex and Evalution of its Stability

○三和 正弥、甲元 一也（甲南大学 FIRST）
○Masaya Miwa, Kazuya Koumoto (FIRST, konan Univ)

化粧品で配合されるアスタキサンチンは、抗しわ、抗皮膚老化、皮膚繊維芽細胞における活性酸素の除去等の機能性を持つことが報告されている。しかし、水に溶けにくいため、油に溶かした配合が基本として行われてきた。その中で、私たちの研究室では食用多糖である β-1,3-1,6-グルカンから作製した β-グルカンナノ粒子がその内部キャビティにアスタキサンチンを包接し、水へ高濃度で溶解させる興味深い性質を示すことを発見した。この特性を利用すれば処方後の溶液、ローション、クリーム等におけるアスタキサンチンの新しい機能性の発現も期待される。そこで、本研究では、アスタキサンチン／β-1,3-1,6-グルカン包接複合体を調製し、水溶液中、ローションのような粘稠溶液、さらに O/W 型エマルション（クリーム）中におけるアスタキサンチンの安定性、放出特性について評価した。アスタキサンチンをナノ粒子に包接し、粘性の高い溶液やクリームに添加しました。そして UV 測定を行い、放出量を比較した。これまでの実験結果から、粘度の高い溶液中に添加された包接複合体溶液における適切な添加量を UV 測定によって確認しました。また、クリーム中での包接複合体の放出挙動も確認した。今後の実験では、水溶液、粘度の高い溶液、クリームといった 3 つの溶媒中での包接した機能性物質の放出量を比較していく。また、発表ではアスタキサンチンを包接したことによる光、熱安定性についても報告する。

Astaxanthin, which is blended in cosmetics, has been reported to have functional properties such as anti-wrinkle, anti-skin aging, and removal of active oxygen in skin fibroblasts. However, since it is insoluble in water, its formulation has been based on dissolving it in an oil. We discovered that β-glucan nanoparticles prepared from β-1,3-1,6-glucan, an edible polysaccharide, have an interesting property of including astaxanthin in their inner cavity and dissolving it in water at high concentration. This property is expected to lead to the development of new functionalities of astaxanthin in solutions, lotions, creams after formulation. In this study, we prepared astaxanthin/β-1,3-1,6-glucan inclusion complexes and evaluated the stability and release properties of astaxanthin in aqueous solutions, viscous solutions such as lotions, and O/W-type emulsions (creams). The inclusion of astaxanthin in glucan nanoparticles was attributed to intermolecular interactions due to hydrophobic interactions and hydrogen bonding, so that the included astaxanthin was released slowly in aqueous solution. The release rate was slower in lotions and creams with reduced fluidity. In addition to these release properties, the stability of the inclusion complexes against light and heat will also be presented.

Astaxanthin, β-Glucan, Inclusion complex

講演番号：3D1a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 D1 会場

ウロリチン A による腸管を介した皮膚改善
Skin improvement through the intestinal tract with Urolithin A
○徳永 直大[1]、平江 衣絵[2]、大倉 美早紀[3]、小原 亜希子[4]、工藤 眞文[4]、卯川 裕一[4]、片倉 喜範[5]
([1]九大 農、[2]九大院 生資環、[3]九大院 システム生命、[4]株式会社ダイセル、[5]九大院農院)
○Naohiro TOKUNAGA[1], Kinue HIRAE[2], Misaki OKURA[3], Akiko OHARA[4], Masatake KUDO[4], Yuichi UKAWA[4], Yoshinori KATAKURA[5] ([1]Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Syst. Life. Sci., Kyushu Univ., [4]DAICEL CORPORATION, [5]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

ウロリチン A は、ザクロの皮などに含まれるエラグ酸が腸内細菌によって分解されてできる代謝産物であり、皮膚における SIRT1 を活性化することがすでに明らかとなっている。最近では、ウロリチン A を直接摂取できるサプリメントが開発されているが、ウロリチン A の腸管を介した皮膚への機能性については十分に明らかになっていない。そこで本研究では、ウロリチン A を添加した腸管上皮細胞の培養上清を用いて、ヒト表皮角化細胞（HaCaT）に対する機能性を検証した。その結果、HaCaT 細胞における SIRT1 活性化と、それに伴うミトコンドリア生合成の促進・活性化、脂質合成及びセラミド生合成の促進が確認された。次に、腸管と皮膚との相互作用を担う因子としてエクソソームを想定し、その関与を推定するために、ウロリチン A 処理した腸管由来のエクソソーム内 miRNA のマイクロアレイ解析を行った。その結果、エクソソームにおけるウロリチン A 処理に伴う変動 miRNA の KEGG 解析から、ウロリチン A が腸管を介して、皮膚を含む各種細胞を活性化することが期待された。

Urolithin A is a metabolite formed when ellagic acid contained in pomegranate peels is degraded by intestinal bacteria, and has already been shown to activate SIRT1 in the skin. Recently, supplements that allow direct ingestion of Urolithin A have been developed, but the functionality of Urolithin A in the skin via the intestinal tract has not been fully clarified. In this study, we examined the functionality of Urolithin A on human epidermal keratinocytes (HaCaT) using culture supernatants of intestinal epithelial cells to which Urolithin A was added. As a result, we confirmed SIRT1 activation in HaCaT cells and the accompanying promotion and activation of mitochondrial biosynthesis, lipid synthesis, and ceramide biosynthesis. Next, assuming exosomes as a factor responsible for the interaction between the intestine and skin, we performed microarray analysis of miRNAs in exosomes derived from Urolithin A-treated intestine in order to estimate their involvement. As a result, based on KEGG analysis of the variation miRNAs in exosomes upon Urolithin A treatment, it was expected that Urolithin A activates various cells, including skin, via the intestinal tract.

Urolithin A, skin, mitochondria

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3D1p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D1 会場

Development of bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules

○Gaku NAKATO[1], Hikaru INOUE[1,2], Satoshi ONAWA[1], Hitoshi AGEMATSU[1], Nozomu OBANA[3], Risako FURUKAWA[1], Joe INOUE[1,2], Shinji FUKUDA[1,2,3,4,5] ([1]KISTEC, [2]Keio Univ., [3]Univ. of Tsukuba, [4]Juntendo Univ., [5]Metabologenomics, Inc.)

Bifidobacterium longum exerts beneficial effects on mucosal barrier function and the attenuation of intestinal inflammation. Taking exogenous probiotics can have beneficial physiological effects on the intestine, but they can only temporarily colonize the intestines of a limited number of individuals. Previous studies have indicated that endogenous bacteria have different colonization mechanisms due to individual-specific intestinal adaptations. Endogenous bacteria may colonize the intestinal tract via these adaptations. We hypothesized that human-derived fecal *B. longum* could be isolated, cultured, and returned to the same individual or similar intestinal environment to re-colonize their intestine long-term. Therefore, we first generated an antibody against human-derived *B. longum* (Jih1) to isolate this species as a candidate for probiotics. Using the anti-human *B. longum* antibody, we verified the isolation and reculturing of the target *B. longum* and performed an antibody functional analysis. We found that antibody-bound *B. longum* could be recultured after undergoing magnetic-activated cell sorting (MACS). In addition, the target bacteria could be enriched from both an intestinal bacterial mixture and human-derived microbiota that had been supplemented with *B. longum*. Finally, the target molecule of the antibody was identified as that of glutamine synthetase (GS), an intracellular enzyme. This study showed that the antibody-based bacterial isolation method has the potential to be applied to personalized probiotics. Antibody function analysis revealed that human *B. longum* cells characteristically expressed GS both on their cell surface and in secreted form. There are reports that GS is involved in adhesion as a moonlighting protein. Taken together, we hypothesize that GS expressed on the surface *of B. longum* may function as a colonization factor in the intestine.

Antibody, Bifidobacterium longum, Probiotics

発表責任者：中藤学（op-nakato@res-kistec.jp）

講演番号：3D1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D1 会場

長崎県五島市での腸内細菌叢と排便状況等に関する横断研究ならびにシンバイオティクスヨーグルト摂取による整腸作用への影響

Gut Microbiota and Bowel Movements in Goto City, Nagasaki Prefecture: A Cross-sectional Study and the Effects of Consuming Synbiotic Yogurt

○小谷 篤幸[1]、徐 宸東[1]、新井 聡[1]、加藤 久美子[1]、世羅 至子[2]、本郷 涼子[2]、山口 彩[2]、岩淵 紀介[1]、小田巻 俊孝[1]、田中 美順[1]、田中 一成[3]([1]森永乳業・基礎研、[2]長崎県大・栄養健康、[3]長崎県大・地域連携セ)

○Atsuyuki ODANI[1], Chendong XU[1], Satoshi ARAI[1], Kumiko KATO[1], Nobuko SERA[2], Ryoko HONGO[2], Aya YAMAGUCHI[2], Noriyuki IWABUCHI[1], Toshitaka ODAMAKI[1], Miyuki TANAKA[1], Kazunari TANAKA[3] ([1]Innovative Research Institute, Morinaga Milk Industry Co.,Ltd., [2]Department of Nutrition Science, University of Nagasaki, [3]Regional Partnership Center, University of Nagasaki)

腸内細菌は健康との関連が報告されている。我々は長崎県五島市の市民 299 名を対象とし、腸内細菌叢および排便状況等に関する横断研究を実施した。結果、五島市では全国の日本人を対象としたコホート研究の被験者と比較して、腸内のビフィズス菌の割合が少ないこと、腸内細菌の多様性が低いことが特徴として挙げられた。さらに、1 週間あたりの排便回数が 5 回以下の方または便秘気味の方が一定数見受けられ、五島市において便秘は健康課題の 1 つであると推察された。

横断研究の結果を受け、我々は五島市の便秘傾向者 22 名を対象に、ビフィズス菌 BB536 20 億個およびラクチュロース 4 g を含むシンバイオティクスヨーグルトを 4 週間摂取する単群オープン試験を実施した。結果、摂取前と比較して摂取期間中は排便回数・日数が有意に増加した。また、摂取 4 週後にはビフィズス菌割合の有意な増加、便性状・QOL の有意な改善がみられた。さらに、摂取前時点で疲労度が高い集団で層別解析を行ったところ、疲労指標の改善がみられた。これらの結果から、ビフィズス菌 BB536・ラクチュロースを含むシンバイオティクスヨーグルトの摂取は、腸内環境を変化させ、排便状況や QOL の改善などに寄与する可能性が示唆された。

Gut microbiota is associated with health. We conducted a cross-sectional study on 299 adults in Goto City, Nagasaki Prefecture, to survey the gut microbiota and bowel movements. The results showed that they had a lower abundance of bifidobacteria and a lower diversity of intestinal bacteria compared to the nationwide cohort study. Additionally, some participants showed symptoms of constipation, implying that constipation is one of the health issues in Goto City.

Based on these findings, a single-arm open trial was conducted on 22 adults with a tendency for constipation in Goto City. Participants received synbiotic yogurt containing *Bifidobacterium longum* BB536 and lactulose for 4 weeks. The results showed a significant increase in the frequency and days of defecation. In addition, a significant increase in abundance of bifidobacteria, improvement in stool characteristics and QOL score. Subgroup analysis based on high fatigue levels at baseline showed improvement in fatigue scores. In conclusion, the intake of synbiotic yogurt containing *B.longum* BB536 and lactulose may alter the gut microbiota and contribute to enhancements in bowel movements and QOL.

Bifidobacterium, microbiota, synbiotics

講演番号：3D1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D1 会場

Lactococcus cremoris subsp. *cremoris* FC 株の摂取が便秘傾向者の腸内細菌叢に及ぼす影響
The effect of *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* FC on the intestinal microbiota of constipation-prone individuals

○田畑 祥之、渡辺 真通、後藤 弥生、鈴木 利雄、丸山 健太郎（フジッコ株式会社）
○ YOSHIYUKI TABATA, MASAMICHI WATANABE, YAYOI GOTOH, TOSHIO SUZUKI, KENTARO MARUYAMA (Fujicco Co., Ltd.)

【目的】*Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* FC（*L. cremoris* FC）には便通改善作用があることが明らかになっている[1]が、腸内細菌叢に及ぼす影響についてはいまだ不明である。 本試験では *L. cremoris* FC 摂取による便秘傾向者の腸内細菌叢の変化を測定し、便秘症状との関連を検討した。
【方法】便秘傾向者を対象にして、プラセボまたは *L. cremoris* FC を含むハードカプセルを 4 週間継続摂取させた（プラセボ群 21 名、FC 群：低用量 21 名・中用量 22 名・高用量 21 名）。摂取前後での糞便サンプルを回収後、Miseq による 16S rRNA シーケンス解析により腸内細菌叢を解析した。
【結果】プラセボと比べて *L. cremoris* FC 摂取によりα多様性及びβ多様性の有意な差は見られなかった。一方、属レベルでは、*L. cremoris* FC 摂取群において、摂取前後で *Oscillospira* 属の有意な減少が、*Bifidobacterium* 属、*Lactococcus* 属及び *Collinsella* 属において有意な増加が見られた。
【結論】*L. cremoris* FC は便秘傾向者の便通改善に伴い、腸内細菌叢を変化させることが示唆された。

【Objectives】It is known that *L. cremoris* FC improves bowel movements[1], but its effect on the intestinal microflora is still unknown. In this study, we verified the changes in the intestinal microflora due to the intake of *L. cremoris* FC and its association with constipation symptoms.
【Methods】 Hard capsules containing *L. cremoris* FC or Placebo were ingested for 4 weeks in constipation-prone subjects (21 subjects in the placebo group and a total of 64 subjects in the three FC groups: low, medium, and high dose). After collecting fecal samples before and after ingestion, the intestinal microbiota was analyzed by 16S rRNA sequencing analysis using Miseq.
【Results】No significant changes were observed in the α-diversity and β-diversity. On the other hand, at the genus level, there was a significant decrease in the genus *Oschillospira*, and significant increases in the genera *Bifidobacterium*, *Lactococcus* and *Collinsella* only in the *L. cremoris* FC intake group before and after consumption.
【Conclusion】It was suggested that *L. cremoris* FC changes the intestinal microflora of constipation-prone individuals with their improved bowel movements.

(1) M. Watanabe *et al*. Int J Food Sci Nutr, 74, 695-706 (2023).

L. cremoris FC, microbiota, constipation

発表責任者：田畑祥之（y-tabata@fujicco.co.jp）

講演番号：3D1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D1 会場

緑茶カテキン EGCG がヒト末梢血由来単核細胞の DNA メチル化に与える影響

The impact of EGCG on DNA methylation in human peripheral blood mononuclear cells

○張 翼麟、山本 真生、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Yilin ZHANG, Mao YAMAMOTO, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

緑茶カテキンの主成分である (−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) は、抗がん作用、抗炎症作用など多彩な生体調節作用を有することが知られているが、エピジェネティック制御因子としてがんの進行を制御することが明らかとなっている。しかしながら、正常細胞に対する EGCG の DNA メチル化制御作用は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、EGCG がヒト末梢血由来単核細胞 (hPBMC) における DNA メチル化制御活性を明らかにすることを目的とした。

EGCG が hPBMC のグローバルな DNA メチル化レベルに与える影響を評価したところ、EGCG 処理により DNA メチル化レベルが低下した。続いて、DNA メチル化パターンを DNA メチル化アレイにて解析した結果、EGCG 処理による 699 箇所の CpG 部位のメチル化レベルの変動が検出された。また、変動した CpG 部位の近傍遺伝子に対して GO 解析並びにパスウェイ解析を行ったところ、主要組織適合遺伝子複合体クラス II (MHC II) に関連する多くの項目を見出した。さらに、変動した MHC II に関連する 7 つの CpG 部位に対して、EGCG がヒト急性単球白血病細胞株 (THP-1) およびヒト骨髄腫細胞株 (U266) に与える影響を評価した結果、2 種類の細胞株で異なる変化が示された。以上の結果より、EGCG は抗原提示細胞における MHC II をコードする遺伝子の DNA メチル化に影響を及ぼし、その影響は細胞種によって異なることが示唆された。

(−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG), the principal component of green tea catechin, is recognized for its diverse biological activities. While EGCG has been acknowledged as an epigenetic regulator in cancer progression, its impact on DNA methylation in normal cells remains less explored. In this study, we aimed to clarify the role of EGCG in regulating DNA methylation in human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC).

Initially, we assessed the impact of EGCG on the global DNA methylation level of hPBMC, observing a notable reduction following EGCG treatment. Subsequent analysis using DNA methylation microarrays revealed alterations at 699 CpG sites attributed to EGCG treatment. Gene Ontology and pathway analyses, focusing on genes proximal to these CpG sites, revealed an association with the major histocompatibility complex class II (MHC II). We conducted a further analysis of the impact of EGCG on the DNA methylation levels of seven CpG sites associated with MHC II in THP-1 and U266 cells. Intriguingly, these two cell types exhibited distinct patterns of change. These findings collectively suggest that EGCG exerts an impact on the DNA methylation of genes encoding MHC II in antigen-presenting cells, with observed variations across different cell types.

EGCG, Epigenetics, Major histocompatibility complex class II

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3D1p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D1 会場

腸内環境改善を介したストレス低減効果に対する小麦ブラン摂取の影響に関する無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験

A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group comparison trial on the effect of wheat bran intake on stress reduction effects through improving the gut environment

○菊池 洋介[1]、大谷 彩夏[1]、川本 智裕[1]、長谷田 茜[2]、勝山（鏡） 豊代[2]、本間 直幸[2]、西平 順[2]
([1]日清製粉グループ本社、[2]北海道情報大)
○Yosuke KIKUCHI[1], Ayaka OTANI[1], Chihiro KAWAMOTO[1], Akane HASEDA[2], Hiroyo Kagami-Katsuyama[2], Naoyuki HONMA[2], Jun HISHIHIRA[2] ([1]Nisshin Seifun Group Inc., [2]Hokkaido Information University)

【背景・目的】近年食事によるストレス改善効果に注目が集まっている。既報によれば腸内細菌叢はストレス応答と関連し、便通と QOL は正の相関を持つとされる。小麦ブランが腸内環境改善効果を有することを踏まえると、小麦ブランは腸内環境改善を介してストレス等の心身不調状態改善の可能性がある。【方法】日常生活におけるストレスを感じている、かつ便秘気味の 20 歳以上 60 歳未満の日本人男女を対象とし、小麦ブランを含むパンまたは小麦ブランを含まないプラセボパンいずれかを 4 週間、1 日 1 回の食事の主食と置き換えて継続摂取する無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した（各群 40 名）。試験食品の摂取開始前と摂取 4 週後にストレス関連指標、腸内環境関連指標について調査を行った。【結果】有効性解析対象者は各群 39 名であった。全体解析ではストレスに関する VAS アンケート・排便回数・腸内細菌叢の酪酸産生菌の割合について、小麦ブラン摂取群においてのみ摂取開始前と比較して摂取 4 週後に有意に改善した。さらに小麦ブランのストレス緩和作用が得られやすい集団を探索的に検証したところ、摂取開始前の酪酸産生菌の割合が中央値未満の集団ではストレスに関する VAS アンケート・便の量について、摂取開始前から摂取 4 週後までの変化量はプラセボ群と比較して小麦ブラン摂取群において有意に改善した。本研究は、戦略的イノベーション創造プログラム（ＳＩＰ）「スマートバイオ産業・農業基盤技術」によって実施された。

[Purpose] According to previous reports, gut microbiota is associated with stress response. Considering the gut environment-improving effects of wheat bran, it may potentially improve physical and mental conditions such as stress through improving the gut environment. [Method] We conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group comparison trial on Japanese men and women aged 20 to 59 who feel stress and tend to be constipated. They replaced their main meal once a day with either bread containing wheat bran or without it for four weeks. We investigated stress-related and gut environment-related indicators. [Results] In the overall analysis, the Visual Analogue Scale (VAS) questionnaire on stress, bowel movements, and butyric acid-producing bacteria improved only in the wheat bran intake group four weeks after starting intake. Furthermore, in the group where the proportion of butyric acid-producing bacteria before starting intake was less than the median, the change in the VAS questionnaire and the amount of stool from before starting intake to four weeks after was significantly improved in the wheat bran intake group compared to the placebo group.

wheat bran, stress, butyric acid-producing bacteria

講演番号：3D1p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D1 会場

UVB 照射により脆弱化した皮膚への卵殻膜摂食の効果
Effects of Eggshell Membrane Feeding on Skin Weakened Due to Ultraviolet B
○宮澤 萌愛、松﨑 愛、山地 巧真、山根 拓実、大石 祐一（東京農大応生）
○Moe MIYAZAWA, Megu MATSUZAKI, Takuma YAMAJI, Takumi YAMANE, Yuichi OISHI (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】UVB は、UVA よりエネルギーが強く、皮膚の表皮層に到達して炎症を惹起し、経表皮水分蒸散量の上昇など皮膚に悪影響を与えることが知られている。卵殻膜摂食は、先行研究にて皮膚中のコラーゲン量及びヒアルロン酸量を増加させることが確認された。このことから本研究では、UVB による皮膚への悪影響を、卵殻膜摂食によって抑制できるという仮説を立て、ラットに UVB を照射し卵殻膜を摂食させ、皮膚への影響を検討することを目的とした。
【方法】8 週齢雄性 HWY/Slc ヘアレスラットに AIN-93G を Control 食として 1 週間馴化飼育後、5 匹ずつ 6 群(Control 群、Control＋UVB 照射群、卵殻膜 5%群、卵殻膜 5%＋UVB 照射群、卵殻膜 10%群、卵殻膜 10%＋UVB 照射群)に分け、4 週間試験食を摂食させた。UVB は週 3 回 0.25J/cm^2 で照射した。解剖後、皮膚中のセラミド量を TLC、mRNA 量をリアルタイム PCR 法で解析した。
【結果】UVB 照射によって、炎症マーカーの mRNA 量は照射群で有意に増加し、UVB 被曝が確認された。経表皮水分蒸散量は Control＋照射群と比較して卵殻膜 10%＋照射群で有意に減少した。セラミド合成律速酵素 mRNA 量は、非照射群と比較して照射群で有意に増加した。セラミド量は Control＋照射群と比較して卵殻膜 10%＋照射群で増加傾向だった。この結果から、UVB によって炎症が惹起された際に、10%卵殻膜摂食が、皮膚のバリア機能悪化を抑制させる可能性が示唆された。
Ultraviolet radiation B (UVB) exposure have adverse effects on the skin, such as the increase of transepidermal water loss (TEWL). On the other hand, we found that eggshell membrane feeding increased the amount of hyaluronan and collagen, which promotes skin moisture retention, and being involved in the maintenance of viscoelasticity, respectively. In this study, we investigated whether the adverse effects of UVB on skin can be suppressed by feeding eggshell membrane. The mRNA levels of inflammatory markers were significantly increased in the UVB irradiation group, confirming UVB exposure. TEWL was significantly decreased in the UVB irradiation group with 10% eggshell membrane feeding in comparison to that of the Control UVB irradiation group. Ceramide levels tended to increase in the UVB irradiation group with 10% eggshell membrane feeding in comparison to that of the Control UVB irradiation group. These results suggest that feeding 10% eggshell membrane increase ceramide levels, suppress TEWL, and may improve the skin barrier function when inflammation occurs due to UVB.

eggshell membrane, ultraviolet B, skin

発表責任者：大石祐一（y3oishi@nodai.ac.jp）

講演番号：3D1p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D1 会場

ハイカカオチョコレートの嗜好性に関する調査研究

Study on the palatability of high cacao chocolate.

○田平 琴音[1]、村上 汀子[1]、岡前 菜花[1]、伊藤 大二郎[1]、釜阪 寛[1]、中野 久美子[2]、伏木 亨[1]([1]甲子園大、[2]甲子園短大)
○ Kotone TABIRA[1], Teiko MURAKAMI[1], Nanoka OKAMAE[1], Daizirou ITOU[1], Hirosi KAMASAKA[1], Kumiko NAKANO[2], Tohru HUSIKI[1] ([1]koshien Univ., [2]koushien Junior College)

日本のチョコレート市場では，ミルクチョコレートに比べて，ハイカカオチョコレートの市場は限定的である。先行研究によって、一部の人は年齢を経ることや喫食経験に従って、ハイカカオチョコレートの嗜好性が高まることが分かった（岡前ら，第 77 回 日本栄養・食糧学会大会プログラム，2023)。
今回、健康な成人被験者 34 名に対し、ハイカカオチョコレートを 5 週間に亘って喫食経験を積んでもらった（5 種のハイカカオチョコレート約 37g/人/週)。開始時，2 週目，5 週目に 4 種のチョコレート（ハイカカオチョコレート 2 種，ミルクチョコレート 2 種）の嗜好調査と嗜好性に関するアンケート調査を実施した。結果，喫食経験によって，ハイカカオチョコレートの嗜好性は有意に向上した。一方，ミルクチョコレートの嗜好性は開始時から高く，経時的な変化は認められなかった。
このように、喫食経験を重ねることが学習効果による嗜好性獲得となる機構の一部について明らかにした。

In the Japanese chocolate market, the demand for high-cacao chocolate is more limited compared to that for milk chocolate. Previous research, as presented by Okamae et al. in the 77th Japan Society of Nutrition and Food Science Conference Program (2023), indicated that individuals' preference for high-cacao chocolate tends to increase with age and eating experience.
In this study, 34 healthy adult students were provided with the opportunity to consume high-cacao chocolate over a 5-week period, receiving approximately 37 grams of five different types of high-cacao chocolate per person per week. Preference surveys for four types of chocolate (two types of high-cacao chocolate and two types of milk chocolate) and a questionnaire on palatability were conducted at the beginning, 2nd week, and 5th week of the study. The results revealed a significant improvement in the preference for high-cacao chocolate with increased eating experience. Conversely, the preference for milk chocolate remained consistently high from the beginning, with no observable change throughout the study.
In this way, we have clarified part of the mechanism through which repeated eating experiences contribute to the development of preferences due to the learning effect.

milk chocolate, high cacao chocolate, palatability

発表責任者：田平琴音（e121504@ps.koshien.ac.jp）

講演番号：3D1p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 D1 会場

紫カリフラワーの抗酸化活性に及ぼす調理の影響

Effect of cooking on the antioxidant activity of purple cauliflower

○近藤（比江森） 美樹、伊藤 志音里、小柳 彩華（高知県立大健康栄養）
○Miki Hiemori-Kondo, Shiori Ito, Saika Koyanagi (Univ. of Kochi)

我々は、紫色を呈するカリフラワー(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)の抗酸化成分として 5 種類のアントシアニンを同定し、2023 年度の本大会において報告している。本研究では、食生活における摂取方法を考慮し、紫カリフラワーの抗酸化活性に及ぼす調理の影響を検討した。

まず、新鮮な紫カリフラワーを 6 種類の方法（茹で、蒸し、炒め、揚げ、電子レンジ加熱、オーブン加熱）で 100 g ずつ調理した。調理済み紫カリフラワーの色彩を色差計によって測色した後、凍結乾燥し、粉砕した。粉末から酸性エタノールで抽出物を調製し、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去活性を指標に抽出液の抗酸化活性を測定した。さらに、総ポリフェノール量およびアントシアニン量を Folin-Ciocalteu 法および pH differential 法で測定した。

6 種類の調理方法のうち、「茹で」において非加熱試料と比較して抗酸化活性および関与成分量が約 30～40%減少した。さらに「茹で」は最も低い a^*値（赤味度）を示し、退色が認められた。一方、「電子レンジ」加熱後の試料は抗酸化活性を維持していた。これらの結果から、紫カリフラワーの調理方法として今回採用した調理方法のうち、抗酸化活性、関与成分量、および色相の観点から「電子レンジ」加熱が最も適することが明らかになった。

This study examined the changes in the antioxidant activity and color of purple cauliflower cooked using different methods, namely boiling, steaming, frying, deep-frying, and heating in a microwave oven or oven. The color of the cooked cauliflower was measured using a color meter. The cooked cauliflowers were then freeze-dried and milled into powders. The extracts of each powder were prepared using acidic ethanol and assayed for DPPH radical scavenging activity. The total polyphenol and anthocyanin contents in the samples were determined by Folin–Ciocalteu and pH differential methods, respectively. Of the six cooking methods, a significant decrease in the antioxidant activity and the responsible components was observed in the sample prepared from boiling purple cauliflower compared with the uncooked sample. In addition, the boiled sample had the lowest a^* value (redness). In contrast, the sample prepared by microwave heating maintained the antioxidant activity of purple cauliflower. The results of this study indicate that microwave cooking is the most suitable method for preparing purple cauliflower, considering the antioxidant activity and amounts of antioxidant compounds present in purple cauliflower.

Purple cauliflower, Antioxidant activity, Anthocyanin

発表責任者：近藤（比江森） 美樹（kondo_miki@cc.u-kochi.ac.jp）

講演番号：3D1p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 D1 会場

動物油脂と植物油の配合がフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境におよぼす影響

Effects of dietary mixture of animal fat and plant oil on colonic ALP activity and the luminal environment in rats fed fructo-oligosaccharides

岡田 妃可、○岡崎 由佳子（藤女子大人間生活）
Hiyori OKADA, ○Yukako OKAZAKI (Fuji Women's University)

我々は，水溶性食物繊維やオリゴ糖類がラットの大腸 ALP 活性と遺伝子発現を増加させ，この作用が糞中 Mucin や細菌類等の腸内環境関連因子の変動と相関関係にあることを示してきた。またオリゴ糖による大腸 ALP 誘導作用は，摂取する脂肪の種類により異なり，n-6 系多価不飽和脂肪酸の多い油と比較して飽和脂肪酸や n-3 系多価不飽和脂肪酸の多い油脂食で高まることを示した。本研究では，飽和脂肪酸の多いラードに n-6 系多価不飽和脂肪酸の多いブドウ種子油を加えた飼料を用いた場合のオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性と他の腸内環境関連因子への影響を比較検討した。

実験動物として，4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。実験食としてラード，ブドウ種子油，ラードとブドウ種子油を 4：1 又は 1：1 の比率で配合した脂質を 30%加えた飼料に 4%フルクトオリゴ糖（FOS）を添加した 4 群を設け，14 日間飼育した。その結果、FOS 摂取ラットの大腸 ALP 活性は，ラード食群と比較して，ブドウ種子油で有意に低下した。ラードとブドウ種子油 4：1 配合食群では大腸 ALP 活性が低下傾向を示し，1：1 配合食群では有意に低下した。大腸 ALP 遺伝子（*Alpi-1*）発現も，ALP 活性と同様の挙動を示した。FOS 摂取条件下での糞中 Mucin 含量，盲腸内乳酸含量，糞中 *Lactobacillus* spp.の割合はラード食群と比較してブドウ種子油食群で有意に減少したが，脂質配合食による同様な影響は認められなかった。以上より，FOS 摂取による大腸 ALP 誘導作用は，今回検討した腸内環境関連因子の中でもより n-6 系多価不飽和脂肪酸の影響を受ける可能性が示唆された。

We recently reported that fermentable non-digestible carbohydrates commonly elevate colonic ALP activity and the gene expression in rats and that the effect of oligosaccharides on colonic ALP activity is changed by the quality of dietary fats. This study aims to investigate the effect of mixtures of lard, which is high in saturated fatty acids, and grape seed oil, which is high in n-6 polyunsaturated fatty acids on colonic ALP activity in rats fed oligosaccharide diet. Male SD rats were fed a diet containing 30% lard, grape seed oil (GC), lard and GC mixture (4:1) or the ratio 1:1 with 4% fructo-oligosaccharides (FOS) for 14 days. Colonic ALP activity was significantly decreased in GC + FOS and the lard and GC mixture (1:1) + FOS groups when compared with lard diet group, and similar trend was observed in the mixture (4:1) group. Fecal mucins, the *Lactobacillus* spp. and cecal lactate were significantly lower in the GC+FOS group than in the lard + FOS group, but the same result was not observed in the lard and GC mixture groups. These results suggest that the inducing effect of FOS on colonic ALP activity might be more sensitive to dietary n-6 polyunsaturated fatty acids.

Colonic ALP, Lard, Grape seed oil

講演番号：3D1p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 D1 会場

冷温受容体を活性するメントールの長期摂取が体温調節機能に及ぼす影響

Effects of long-term intake of menthol on thermoregulatory function

○森 紀之、毎熊 麻花、中島 綾、柳井 美希 (同女大・生活科学)
○Noriyuki MORI, Asaka MAIKUMA, Aya NAKASHIMA, Miki YANAI (DWCLA)

冷温受容体 TRPM8 は冷温刺激だけでなくメントールによっても活性化される。長期間の冷温刺激は寒冷馴化により体温調節機能へ影響を与えることが考えられるが、メントールによる冷温受容体への刺激も同様の影響を与える可能性が考えられる。本研究ではメントールの長期摂取における体温調節機能への影響を明らかにすることを目的とする。

6 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを、普通食を与える群と 0.25%メントール添加食を与える群の 2 群に分け、さらに飼育期間を 2 週間と 4 週間に類別し飼育した。体温調節機能の評価は、温度を一定に保った状態から徐々に下げていく環境温度におけるマウスの肩甲骨間褐色脂肪組織周辺(IBAT)温度、直腸温度、尾静脈周辺温度の変化を麻酔下において測定した。

体温調節機能の評価では、4 週間メントール食を摂取した群において、普通食を摂取した群に比して IBAT 温度の減少が抑えられる傾向にあった。2 週間の摂取では 2 群間に差はみられなかった。以上の結果から、メントールの長期摂取は体温調節機能に影響を与えることが考えられた。

The cold receptor TRPM8 is activated not only by cold stimuli but also by menthol. It is thought that long-term cold stimulation affects the thermoregulatory function due to cold acclimation, and it is thought that stimulation of cold receptors by menthol may have a similar effect. The purpose of this study is to clarify the effects of long-term intake of menthol on thermoregulatory function.

C57BL/6 male mice (6wks) were divided into two groups: a group fed a normal diet and a group fed a diet supplemented with 0.25% menthol, and reared for two weeks and four weeks. The thermoregulatory function was evaluated by observing changes in the temperature around the interscapular brown adipose tissue (IBAT), rectal temperature, and tail vein of mice under anesthesia while the temperature was kept constant and then gradually lowered.

In the evaluation of thermoregulatory function, there was a tendency for the decrease in IBAT temperature to be suppressed in the group that consumed a menthol diet for 4 weeks compared to the group that consumed a normal diet. There was no difference between the two groups in intake for 2 weeks. From the above results, it was considered that long-term intake of menthol affects the body temperature regulation function.

TRPM8, menthol, thermoregulation

講演番号：3D1p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 D1 会場

PQQ による GPR35 活性化機構の解析

Analysis of GPR35 activation mechanism by PQQ

○安藤 春美[1]、金森 星[1]、中島 史恵[1]、井上 飛鳥[2]、内田 浩二[3]、柴田 貴広[1]([1]名大院生命農、[2]東北大院薬、[3]東大院農)
○Harumi Ando[1], Akari Kanamori[1], Fumie Nakashima[1], Asuka Inoue[2], Koji Uchida[3], Takahiro Shibata[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ., [3]The Univ.of Tokyo)

ピロロキノリンキノン(PQQ)は、グルコース脱水素酵素やアルコール脱水素酵素などの脱水素酵素においてレドックス補因子として作用する。食品成分である PQQ は哺乳類にとって重要な栄養素として考えられるだけでなく、その多様な生理機能から機能性食品成分として注目も集めてきた。しかしながら、その詳細な生理作用機序はまだ不明な点が多い。当研究室では PQQ によって活性化される標的分子として、代謝物感受性 GPCR の 1 つである GPR35 を同定している。
本研究では、PQQ-GPR35 間の相互作用に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、統合計算科学システム MOE を用いて、PQQ と GPR35 ホモロジーモデルのドッキングシュミレーションを行った。その結果、PQQ のカルボキシ基との相互作用が予想されるアミノ酸残基をいくつか見出した。これらのアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した GPR35 変異体を作製し、TGFα切断アッセイを用いて PQQ の濃度依存的な活性を評価した結果、Arg240 のアラニン変異体で活性が大きく低下した。これらの解析から、GPR35 と PQQ の相互作用には Arg240 が重要であることが示唆された。

Pyrroloquinoline quinone (PQQ) acts as a redox cofactor of dehydrogenases such as glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. Due to its diverse physiological function, PQQ is not only considered as an important nutrient for mammals, but has also attracted attention as a functional food ingredient. However, the molecular mechanism how PQQ shows physiological functions has been remained unclear. In our laboratory, we have identified GPR35, one of the metabolite sensing GPCRs, as a target receptor activated by PQQ.
In this study, we performed docking simulations of PQQ and GPR35 homology models using the Integrated Computer-Aided Molecular Design Platform MOE to identify important amino acid residues for the PQQ-GPR35 interaction. As a result, we found several amino acid residues that are expected to interact with the carboxy group of PQQ. Based on the result of MOE analysis, GPR35 mutants in which each of the amino acid residues were replaced with alanine were prepared. TGFα-shedding assay showed that compared with WT GPR35, dose-dependent activation by PQQ was significantly reduced in the alanine mutant of Arg240. These analyses suggested that Arg240 is important for the interaction between GPR35 and PQQ.

PQQ, GPR35, GPCR

発表責任者：安藤春美（ando863773@gmail.com）

講演番号：3D1p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 D1 会場

Inhibitory effect of cumin and cardamom extract on Influenza A virus infection

○Abdullah Al Sufian Shuvo[1], Yoshihiko Maekawa[2], Masahiro Kasai[3], Takeshi Kawahara[1,2,4]
([1]Graduate School of Medicine, Science and Technology, Shinshu University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, [3]S &B Foods Inc., [4]Academic Assembly School of Science and Technology, Institute of Agriculture, Shinshu University)

Introduction: Cumin (*Cuminum cyminum*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*) are popular spices in many Asian countries, including Japan. Although these compounds are also used in traditional medicines to treat various diseases, their effects on influenza A viruses, which are also the causative viruses of pandemics and seasonal influenza pandemics, have not been fully elucidated. Following the global viral pandemic, there has also been interest in the effects of extracts of these materials on influenza virus infection.

Objective: The main goal of our research is to investigate the antiviral activity of these two spices against influenza virus.

Methodology: Cumin and cardamon extract were prepared by dissolving in sterile water or 50% ethanol. These extracts were added to a culture of Malin Darby Canine Kidney (MDCK) cells, the representative target cells of influenza virus, and infected with H1N1 human influenza A virus strain A/Puerto Rico/8/34 (PR8). The inhibitory effect was evaluated by measuring virus M1 protein in a quantitative real-time PCR assay 6 hours after infection. Cells after treatment with extracts in the concentration range studied were evaluated by MTT assay to evaluate the cytotoxic effect. To further evaluate the effect on the viral adsorption process, a hemagglutination inhibition assay was performed using chicken erythrocytes.

Result: Cumin and cardamon (dissolved in water and 50% ethanol) showed significant inhibition of viral M1 protein level compared to positive control without cytotoxic effect on MDCK cells. Moreover, these extracts inhibited hemagglutination by PR8 strain at higher concentration.

Conclusion: Both of cumin and cardamom were suggested to suppress influenza A virus strain infection by inhibiting attachment process. These materials are expected to be used as antiviral materials for functional foods.

Cumin, Cardamom, Influenza virus

発表責任者：Takeshi Kawahara（tkawafb@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D1p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 D1 会場

発酵食品の製造時の発酵プロセスにおける藻類添加の効果の検証

Verification of the effect of algae addition in the fermentation process during the production of fermented foods.

○河野 祐介[1]、橋本 祐佳[1]、吉冨 健一[2]、鈴木 健吾[1]、中島 綾香[1]([1]株式会社ユーグレナ、[2]株式会社咲吉)
○Yusuke Kawano[1], Yuka Hashimoto[1], Kenichi Yoshitomi[2], Kengo Suzuki[1], Ayaka Nakashima[1] ([1]Euglena, Co., Ltd, [2]Sakichi, Co., Ltd)

我々は、様々な発酵食品を対象に、その発酵工程において種々の食用藻類の藻体を原料として加えるという技術的アプローチを試みている。これまでの研究からユーグレナをはじめとした藻体が、発酵助剤様に活用できる可能性が示されており、これにより、発酵産物の有用機能の増強、従来と異なる栄養成分の誘導、発酵速度や生産性のアップ、味の変化（バラエティー化）等々の有用効果を誘導、更には制御が可能となると考え、その研究を通じてより有益な食品類の開発・提供に繋げたい。本発表では、我が国の伝統食の原料でもある米麹製造時のコウジ菌による発酵を対象として、その発酵工程に藻類の一種である食用ユーグレナ粉末を加える製造試験を行った結果を報告する。発酵物の成分比較は、LC-MS を用いたメタボローム解析により行った。その結果、ユーグレナ粉末を発酵工程に加えたほうが、加えていないものと比較して、一部の抗酸化物質等の産生が増していることが確認された。以上の結果から、ユーグレナを発酵段階に共存させることで、よりユニークな発酵食品の開発ができる可能性が示された。

We are performing a technical approach to various fermented foods by adding cells of various edible algae as an additional raw materials in the fermentation process. Our research to date has shown that *Euglena* and other algae can be used as fermentation aids, and we believe that this will enable us to induce and even control useful effects such as enhancement of valuable functions, induction of different nutrients from conventional ones, increase in fermentation speed and productivity, and change and diversification of its taste. Through this research, we would like to develop and provide more beneficial food products. In this presentation, we will report the results of rice malt production test in which edible euglena powder, a kind of alga, was added in the fermentation process using *Aspergillus*. Comparison of the components of the fermented products was conducted by metabolomic analysis using LC-MS. As a result, it was confirmed that the addition of euglena powder to the fermentation process increased the production of some antioxidants and other substances compared to those not added. These results indicate that the coexistence of euglena powder in the fermentation stage may enable the development of more unique fermented foods.

fermentation, Aspergillus, Antioxidant

講演番号：3D2a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D2 会場

緑藻類ヒトエグサに含まれるアンジオテンシン変換酵素阻害活性成分
Angiotensin converting enzyme inhibitory active ingredient contained in the green alga, *Monostroma nitidum*
○近藤 さくら、黒須 泰行、本間 悠里、垣田 浩孝（日大院総合基）
○Sakura KONDO, Yasuyuki Kurosu, Yuri HOMMA, Hirotaka KAKITA (Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ.)

アンジオテンシン変換酵素（Angiotensin Converting Enzyme：ACE）は、肺の血管内皮細胞で産生される血圧調節に関与する酵素である。ACE はアンジオテンシン I を血圧上昇作用を持つアンジオテンシンⅡに変換し、同時に血圧降下作用を持つブラジキニンを不活性化する。高血圧治療は薬品投与が主であるが経済的負担が大きい。患者が日常的に改善できる食事療法や運動療法も有効な高血圧治療と考えられている。近年、農畜産物中の ACE 阻害活性成分の探索が行われるようになっている。一方、緑藻類海藻 *Monostroma nitidum*（ヒトエグサ）は長寿県である沖縄県の伝統料理の食材であり、その成分が注目されている。そこで本研究ではヒトエグサから ACE 阻害活性成分を抽出してその特徴づけをすることを目的とした。ヒトエグサの凍結乾燥粉末を蒸留水で懸濁し、煮沸し、遠心分離して熱水抽出液を得た。加熱処理物の一部をトリプシンで処理をしてトリプシン処理液を得た。ACE 阻害活性は熱水抽出液よりもトリプシン処理液が高かった。以上の結果からヒトエグサ由来の ACE 阻害活性成分はペプチド性であることが示唆された。
The angiotensin converting enzyme (ACE) is an enzyme produced in the vascular endothelial cells of the lungs and involved in blood pressure regulation. ACE converts angiotensin I to angiotensin II, which has the effect of increasing blood pressure, and at the same time inactivates bradykinin, which has the effect of lowering blood pressure. The main treatment for hypertension is drug administration, but this imposes a large economic burden. Diet and exercise therapy, which patients can improve on a daily basis, are also considered effective treatments for hypertension. In recent years, searches have been made for ACE-inhibiting active ingredients in agricultural and livestock products. On the other hand, the green alga *Monostroma nitidum* is an ingredient in the traditional cuisine of Okinawa Prefecture, a prefecture with a long lifespan, and its ingredients are attracting attention. Therefore, the purpose of this study was to extract and characterize the ACE-inhibiting active ingredient derived from *M. nitidum*. Freeze-dried algal powder was suspended in distilled water, boiled, and centrifuged to obtain a hot water extract. A part of the heat-treated product was treated with trypsin to obtain a trypsin-treated solution. The ACE inhibitory activity was higher in the trypsinized solution than in the hot water extract. These results suggested that the ACE-inhibiting active ingredient derived from *M. nitidum* is peptidic.

Seaweed, Food, Inhibitory activity

発表責任者：垣田浩孝（mailto:Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D2a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D2 会場

ブルーベリー葉エキスによる動脈弛緩反応を介した血圧降下作用
Antihypertensive effect of Blueberry leaf extract with vaso-relaxing-effect
○藤田 裕之[1]、叢 シン宇[1]、矢野 善久[1]、山崎 正夫[2] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]宮崎大学農)
○Hiroyuki FUJITA[1], Xinyu CONG[1], Yoshihisa Yano[1], Masao Yamasaki[2] ([1]Kyoto Univ. of Advanced Science, [2]Miyazaki Univ.)

【背景、目的】動脈弛緩活性を示す物質もまた血管を拡張させることにより血圧降下作用を期待することができる。そこで、この動脈弛緩活性に着目して種々の食品サンプルを検索したところ、ブルーベリー葉エキス(BLE)が強力な動脈弛緩活性を示すことを明らかにしてきた。そこで、この動脈弛緩作用の作用メカニズム及び経口投与により血圧降下作用を示すか検討した。
【方法】動脈血管標本には SD ラットの摘出頸動脈をリング状に切片としたものを用い、等張性圧トランスデューサーにより張力を測定し、動脈弛緩活性を評価した。血圧測定には高血圧自然発症ラット(SHR)を用い、強制経口投与後の血圧を Tail-cuff 法により経時的に測定した。
【結果、考察】BLE の示す動脈弛緩活性は、血管内皮除去標本ではその活性を消失したことから血管内皮依存性であることがわかった。また、この反応には COX 阻害剤であるアスピリンおよびインドメタシンによりその弛緩反応が阻害されたが、L-NAME では阻害されなかったことから、プロスタサイクリンが関与していることが示唆された。
次に、SHR を用いて BLE による血圧降下作用について検討した結果、経口投与することにより用量依存的な血圧降下作用を示し、1 g/kg の投与により有意な血圧降下作用を示すことが明らかになった($p<0.05$)。現在、BTE に含まれる活性成分の単離・構造決定について検討を進めているところである。
Vaso-relaxing substances can also be expected to anti-hypertensive activity. We have found that blueberry leaf extract (BLE) shows strong vaso-relaxing activity. We investigated the mechanism of vaso-relaxation and whether orally administered BLE shows anti-hypertensive activity.
The vaso-relaxing activity exhibited by BLE was found to be endothelium-dependent, as the activity was abolished in the endothelium-removed specimens. The relaxation response was inhibited by the COX inhibitors aspirin and indomethacin, but not by L-NAME, suggesting that prostacyclin is involved in this response.
Next, we examined the anti-hypertensive effect of BLE using SHR and found that oral administration of BLE showed a dose-dependent effect, with a dose of 1 g/kg showing a significant hypotensive effect ($p<0.05$). Isolation and structural determination of the active components in BLE are currently under investigation.

Anti-hypertensive effect, Blueberry leaf extract, vaso-relaxation

発表責任者：藤田裕之（fujita.hiroyuki@kuas.ac.jp）

講演番号：3D2a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D2 会場

魚類由来エラスチンペプチドの継続摂取は高血圧性腎障害を抑制する

Fish elastin peptide attenuates renal injury in SHRSP

○中村 優希[1]、増田 誠司[1,2,3]、竹森 久美子[1,2] ([1]近畿大学大学院農学研究科応用生命化学専攻、[2]近畿大学農学部食品栄養学科、[3]近畿大学アンチエイジングセンター)
○Yuki Nakamura[1], Seiji Masuda[1,2,3], Kumiko Takemori[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, KINDAI University, [2]Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, KINDAI University, [3]Anti-Aging Center, KINDAI University)

これまでに、Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV 阻害は腎臓を保護する効果があることが報告されている。先行研究で、我々は魚類由来エラスチンペプチド (EP) が DPP-IV 阻害活性を有することを発見した。そこで本研究では、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)の高血圧性腎障害発症に対する魚類由来エラスチンペプチドの予防効果を検討した。生後 15 週齢の雄性 SHRSP に EP(600 mg/kg)を 4 週間継続投与した(EP 群)。驚いたことに、EP を投与した SHRSP では、血圧の低下は見られないにもかかわらず、重症高血圧状態での腎臓の典型的な血管病変である血管壊死は少数であった。さらに、EP 群の糸球体画分の中に含まれる細小動脈内の DPP-IV と 内皮細胞接着分子である ICAM-1 mRNA の発現は正常血圧の WKY ラットと同程度にまで抑制された。 また、好中球画分における DPP-IV、AT1 受容体、好中球接着分子である Mac-1 およびフリーラジカル産生源である iNOS の発現は EP 群で低値を示した。以上の結果から、EP は高血圧性内皮細胞傷害を基盤とした血管透過性を抑制することが明らかにされた。その作用機序として DPP-IV を介した白血球と内皮細胞の相互作用に基づく炎症性変化が関与している可能性が考えられる。

It has been reported that Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV inhibition has a protective effect on the kidney. In a previous study, we found that elastin peptide (EP) from fish exhibits DPP-IV inhibitory activity. Therefore, this study investigated the preventive effects of fish-derived elastin peptide on the development of hypertension-induced renal damage in spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHRSP). Male SHRSP at 15 weeks of age were administered EP (600 mg/kg) continuously for four weeks (EP group). Surprisingly, despite no observed reduction in blood pressure in EP-treated SHRSP, there were few avascular necrosis, a typical vascular lesion of the kidney associated with severe hypertension-induced kidney damage. Furthermore, the mRNA expression of DPP-IV in the small arteries within the glomerular fraction and ICAM-1, an endothelial cell adhesion molecule, was suppressed to a level similar to that of normotensive WKY rats. Additionally, the expression of DPP-IV, AT1 receptor, Mac-1, a neutrophil adhesion molecule, and inducible nitric oxide synthase (iNOS), a source of free radicals, in the neutrophil fraction was lower in the EP group. These results indicate that EP suppresses vascular permeability based on hypertension-induced endothelial cell injury. The underlying mechanism may involve inflammatory changes based on DPP-IV-mediated leukocyte-endothelial cell interactions.

fish elastin peptide, Dipeptidyl peptidase-IV, SHRSP

発表責任者：中村優希（yuki.9fct@gmail.com）

講演番号：3D2a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D2 会場

スフィンゴ脂質作動性血管収縮に対する Fisetin の作用機序解析
Fisetin permeates cell membranes to prevent sphingosylphosphorylcholine-induced vascular contraction
○鶴留 奈津子[1]、南 雄二[2]、加治屋 勝子[2] ([1]香大医、[2]鹿大農)
○Natsuko Tsurudome[1], Yuji Minami[2], Katsuko Kajiya[2] ([1]Faculty of Medicine, Kagawa University, [2]Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

スフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴシルホスホリルコリン（SPC）は、血管収縮を引き起こし急性心血管疾患の原因となる。我々はフラボノイド類の Fisetin が SPC 作動性血管収縮を制御することを見出してきた。本研究では、SPC 作動性血管収縮に対する Fisetin の作用機序を明らかにするため、血管収縮を担う平滑筋細胞における細胞膜脂質やマイクロドメインに注目し、Fisetin の作用箇所を解明することを目的とした。

Fisetin と SPC の混合液で平滑筋細胞を刺激し、細胞収縮を観察・測定した。ショ糖密度勾配遠心法を用いて平滑筋細胞よりマイクロドメイン画分を分画し、マイクロドメイン画分に含まれる脂質組成をリピドミクス解析した。脂質解析結果を基にマイクロドメインのモデル膜としてリポソームを作製し、Fisetin や SPC の構造類似化合物を用いてモデル膜に対する膜透過性の構造活性相関を検証した。

Fisetin は SPC ではなく平滑筋細胞に作用し、脂質組成依存的に細胞膜を透過して細胞内で SPC 作動性血管収縮を制御していると考えられた。本講演では、Fisetin や SPC の構造類似化合物における細胞膜透過性や構造依存性について報告する。

Sphingosylphosphorylcholine (SPC), sphingolipids, induce vascular contraction and is a cause of acute cardiovascular disease. We have identified that fisetin, flavonoids, regulates SPC-induced vascular contraction. In this study, we elucidated the action site of fisetin by focusing on cell membrane lipids and microdomains in vascular smooth muscle cells (VSMC).

We evaluated whether fisetin interacts with SPC or VSMC. Additionally, lipidomic analysis was performed on the lipid composition of the microdomain fraction of VSMC. Model membrane liposomes of microdomains were prepared and their membrane permeability was investigated.

From this study, we revealed that fisetin was suggested to act directly on VSMC, permeating the cell membrane and regulating SPC-induced vascular contraction.

Fisetin, Sphingolipid, Vascular contraction

講演番号：3D2a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D2 会場

膵リパーゼを阻害する大麦若葉由来タンパク質の阻害活性に重要なアミノ酸配列の解析
Analysis of amino acid sequences critical for the inhibitory activity of a protein from barley grass that inhibits pancreatic lipase

○山口 莉奈[1]、佐々木 琴美[2]、鶴間 あい[2]、加藤 英介[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○ Marina Yamaguchi[1], Kotomi Sasaki[2], Ai Tsuruma[2], Eisuke Kato[2] ([1]Hokkaido Univ. Agr, [2]Hokkaido Univ. Grad, Agr)

肥満は各種疾患のリスクを高める大きな健康問題である。薬による肥満の改善は副作用があるため、食生活の改善も重要である。食生活の改善では抗肥満作用を示す天然物の摂取が有効である。大麦若葉のフルクトース 2 リン酸アルドラーゼ(UniProt：A0A287NGA7)は、膵リパーゼを阻害し肥満を抑制する効果がある。本研究はこのタンパク質の阻害機能の解析を目的とした。

A0A287NGA7 の阻害にかかわる配列を調べるために、全長 341 アミノ酸残基をペプチドに分け、それぞれの阻害活性を評価した。N 末端側から 1-134 番目アミノ酸残基のペプチド（Pep1-134）に阻害活性が見られた。このペプチドをさらに 5 分割して阻害活性を評価したところ、Pep1-28、Pep112-134 に阻害活性が見られた。これらのペプチドでは阻害活性が低下していたが、A0A287NGA7 の阻害活性に重要な配列と考えられた。現在、さらに Pep1-28 を分割して阻害活性を評価することで、阻害に重要な配列や構造を調査中である。

Obesity is a major health problem that increases the risk of various diseases. Management of dietary habitat is also important because improving obesity with drugs have side effects. Consuming natural products that exhibit anti-obesity effect is an effective way to improve dietary habitat. Fructose 2-phosphate aldolase (UniProt: A0A287NGA7) from barley grass shows inhibitory activity against pancreatic lipase and thus prevents obesity. In this study, we aimed to analyze the inhibitory function of this protein.

Amino acid residues of the A0A287NGA7 were divided into several peptides to examine the sequence involved in the inhibition. Of the 341 amino acid residues, peptides at amino acid residues 1 to 134 (Pep1-134) from the N-teminal residue showed inhibitory activity. Pep 1-134 was further divided into 5 peptides and evaluated for their inhibitory activity. Pep1-28 and Pep112-134 showed the inhibit activity. Although the inhibitory activity was decreased in these peptides compared with A0A287NGA7, the sequences were considered important for the inhibitory activity of A0A287NGA7. We are currently examining the inhibitory activity of Pep1-28 in more detail.

Obesity, Pancreatic lipase, *Hordeum vulgare* L.

発表責任者：山口莉奈（yamaguchi.marina.j7@elms.hokudai.ac.jp）

講演番号：3D2a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D2 会場

Na+共輸送型グルコーストランスポーターSGLT2 及び SGLT1 活性を阻害する食品成分の探索・解析
Search and analysis of components inhibiting Na+ co-transporting glucose transporter SGLT2 and SGLT1 activity.

○佐藤 優[1]、島尻 結衣[1]、小森 大雅[2]、尾關 佑樹[3]、深見 裕之[3]、薩 秀夫[2]([1]前橋工大院、[2]前橋工大、[3]小林製薬・中央研究所)
○Yu SATOU[1], Yui SHIMAZIRI[1], Taiga KOMORI[2], Yuki OZEKI[3], Hiroyuki FUKAMI[3], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. Technol., [3]Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd. Central R&D Laboratory)

【目的】近年、世界的に糖尿病患者数が増加している。糖尿病はインスリン依存型（Ⅰ型）糖尿病と非インスリン依存型（Ⅱ型）糖尿病に分類され、Ⅱ型糖尿病は全体の 95%を占めている。Ⅱ型糖尿病は生活習慣などの外的要因が大きく関係しており、Ⅱ型糖尿病の予防にはいかにして血糖値を下げるかが重要である。そこで本研究では、腎臓での糖の再吸収を担っている Na+共輸送型グルコーストランスポーター2（SGLT2）と腸管でのグルコースの吸収を担う Na+共輸送型グルコーストランスポーター1（SGLT1）の活性を阻害する食品成分の探索・解析を目的とした。
【方法・結果】SGLT2 高発現細胞及び SGLT1 高発現細胞を用いて、グルコース類似体である 2-デオキシグルコース(2DG)と食品成分を細胞に添加し、酵素法により得られた蛍光強度を測定することで SGLT2 及び SGLT1 活性を算出した。約 60 種類の食品成分について SGLT2 活性について検討した結果、ブラックジンジャー抽出物が SGLT2 活性を阻害することを見出した。今後これらの食品成分について SGLT1 活性に対する影響も検討する予定である。また並行して、ブラックジンジャー抽出物に含まれるどのような成分が SGLT2 活性を阻害しているかを解析中である。

【Objectives】In recent years, the number of diabetes patients has been increasing worldwide. Diabetes is classified into insulin-dependent (Type I) and non-insulin-dependent (Type II). Type II diabetes is largely related to external factors such as lifestyle, and it is important how to lower blood glucose levels to prevent type II diabetes. The purpose of this study was to explore and analyze food ingredients that inhibit the activity of Na+ co-transporting glucose transporter 2 (SGLT2), which is responsible for glucose reabsorption in the kidney, and Na+ co-transporting glucose transporter 1 (SGLT1), which is responsible for glucose absorption in the intestinal tract.
【Methods and Results】 Using SGLT2 and SGLT1-high expressing cells, SGLT2 and SGLT1 activities were calculated by adding the glucose analog 2-deoxyglucose (2DG) and food components to the cells and measuring the fluorescence intensity obtained by enzymatic method. We examined the SGLT2 activity of about 60 food components and found that black ginger extract inhibited SGLT2 activity. We are currently analyzing what components in black ginger extract inhibit SGLT2 activity.

transporter, diabetes, phytochemical

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3D2a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D2 会場

褐藻類クロメとノコギリモクのメタノール抽出画分中のヒアルロニダーゼ阻害活性

Hyaluronidase-inhibitory activity in methanol extraction fractions derived from two brown algae, Ecklonia kurome and Sargassum macrocarpum

○岸野 愛、黒須 泰行、本間 悠里、垣田 浩孝（日大院総合基）
○Chika KISHINO, Yasuyuki KUROSU, Yuri HOMMA, Hirotaka KAKITA (Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ.)

生活環境の変化に伴って、日本ではⅠ型アレルギー患者数が増加している。医薬品治療には身体的、経済的な負担が伴う。近年、抗アレルギー効果を持つ食品由来物質の摂取でアレルギー症状を抑える療法が注目されている。すでに多くの植物由来ポリフェノールが抗アレルギー効果を有することが報告されている。一方、褐藻類大型海藻も多量にポリフェノールを含有する。そこで、本研究では食用の褐藻類クロメ（*Ecklonia kurome*）と非食用でホンダワラ藻場の形成藻であるノコギリモク（*Sargassum macrocarpum*）のエタノール抽出画分中のヒアルロニダーゼ阻害活性成分を探索し、特徴付けすることを目的とした。瀬戸内海で採取された海藻を実験に供した。ヒアルロニダーゼ阻害活性は、ヒアルロニダーゼがヒアルロン酸を分解して生じるNアセチルグルコサミンの量の変化により見積もった。クロメでは 70%、90%、100%メタノールでの抽出画分がヒアルロニダーゼ阻害活性が高く、ノコギリモクでは 80%エタノール抽出画分が最も活性が高かった。このことからクロメとノコギリモクに含まれているヒアルロニダーゼ阻害活性物質は異なっていることが示唆された。

The number of type I allergy patients is increasing in Japan, due to changes in the living environment. Pharmaceutical treatment of allergic diseases involves physical and economic burdens. In recent years, therapy that suppresses allergic symptoms by ingesting food-derived substances with anti-allergic effects has attracted attention. It has already been reported that many plant-derived polyphenols have anti-allergic effects. On the other hand, brown algae also contain large amounts of polyphenols. Therefore, the purpose of this study was to explore and characterize the hyaluronidase-inhibiting active components in the ethanol-extracted fractions of two brown algae, E. kurome and S. macrocarpum. Ethanol extraction was carried out at 30°C for 5 hours and the ethanol extract fraction was obtained by centrifugation. The hyaluronidase inhibitory activity was estimated based on the change in the amount of N-acetylglucosamine produced when hyaluronidase decomposes hyaluronic acid. For E. kurome, the 70%, 90%, and 100% methanol extraction fractions had the high hyaluronidase inhibitory activity, and for S. macrocarpum, the 80% ethanol extraction fraction had the highest activity. These results suggest that the hyaluronidase inhibitory substances contained in Kurome and Sawfish are different.

Seaweed, Hyaluronidase-inhibitory, Food

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D2a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D2 会場

緑藻類スジアオノリに含まれるヒアルロニダーゼ阻害活性成分の分子量分布と組成
Molecular weight distribution and composition of hyaluronidase inhibitory active ingredient derived from the green alga *Ulva prolifera*

○古谷 香乃、黒須 泰行、本間 悠里、垣田 浩孝（日大院総合基）
○Kano Furuya, Yasuyuki Kurosu, Yuri Homma, Hirotaka Kakita (Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ.)

生活習慣の影響もあり、日本ではアレルギー疾患を持つ患者の数は増加傾向であり、社会問題となっている。そのため、習慣的に摂取することでアレルギー疾患の予防や軽減ができる食品の探求や開発が期待されている。そこで我々は食用として流通している緑藻類海藻スジアオノリ(*Ulva prolifera*)に注目した。本研究ではヒアルロニダーゼの阻害活性を示す成分を *U. prolifera* から探索し、分子量分布と組成を明らかにすることを目的とした。海藻の凍結乾燥粉末を熱水で 5 時間加熱して海藻粗抽出液を得た。海藻粗抽出物はフェノール硫酸法にて糖含有量、Quick Start プロテインアッセイにてタンパク質含有量、ヒアルロニダーゼ活性阻害率測定した。海藻粗抽出液を Toyopearl HW55 カラムに添加し、溶出画分は 2 分ごとに分取した。溶出画分のヒアルロニダーゼ阻害活性、糖含有量、タンパク質含有量、ポリフェノール含有量を測定した。以上の結果からヒアルロニダーゼ阻害活性成分は糖主体であることが示唆された。次に Toyopearl HW55 でのリクロマトグラフィーを行い、ヒアルロニダーゼ阻害活性画分については組成及び分子量分布を明らかにする予定である。

Due in part to lifestyle habits, the number of patients with allergic diseases is on the rise in Japan, and this has become a social problem. Therefore, there is great hope for the search and development of foods that can prevent or alleviate allergic diseases when consumed habitually. Therefore, we focused on the green alga, *Ulva prolifera*, which is commercially available as food. The purpose of this study was to search for components from *U. prolifera* that exhibit inhibitory activity against hyaluronidase, which causes severe allergies and inflammation, and to clarify their molecular weight distribution and composition. The freeze-dried algal powder was heated in hot water for 5 hours to obtain a crude seaweed extract. The crude seaweed extract was measured for sugar content, protein content and hyaluronidase activity inhibition rate. The crude seaweed extract was applied to a Toyopearl HW55 column. Elution fractions were collected every 2 minutes. Hyaluronidase inhibitory activity, sugar content, protein content, and polyphenol content of the elution fraction were measured. These results suggested that the active component of hyaluronidase inhibition is mainly sugar. We plan to perform rechromatography to clarify the composition and molecular weight distribution of the hyaluronidase inhibitory activity fraction.

Seaweed, Anti allergy, Composition

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D2a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 D2 会場

ピーナッツアレルゲン Ara h1 の N 末端ドメインの消化酵素に対する抵抗性の検討と消化物由来残存エピトープの同定

Investigation of resistance of the N-terminal domain of peanut allergen Ara h1 to digestive enzymes and identification of residual epitopes from the digest

石橋 里菜[1]、Asaduzzaman Md.[1]、松井 照明[2]、高里 良宏[2]、伊藤 浩明[2]、木村 吉伸[1,3]、○前田 恵[1]（[1]岡大院環境生命、[2]あいち小児保健医療センター、[3]くらしき作陽大食文化）
Rina ISHIBASHI[1], Md. Asaduzzaman[1], Teruaki MATSUI[2], Yoshihiro TAKASATO[2], Komei ITO[2], Yoshinobu KIMURA[1,3], ○Megumi MAEDA[1] ([1]Grad. Sch. Env. and Life Sci., Okayama univ., [2]Aichi Children’s Health and Medical Center, [3]The Fac. of Food Culture, Kurashiki Sakuyo Univ.)

我々は，ピーナッツ主要アレルゲン Ara h1 (63 kDa) の N 末端ドメイン (65 アミノ酸残基) を欠損した 54 kDa Ara h1 を新たに同定し，63 kDa Ara h1 の N 末端ドメインが，多量体形成とアレルゲン性に重要な役割を果たしている可能性を推察した[1]。本研究では，63 kDa Ara h1 の高度な多量体化が，消化酵素に対する抵抗性を付与し，消化物中にエピトープを含む複数のペプチドが残存することで，アレルギー症状を誘発すると想定し，63 kDa Ara h1 と 54 kDa Ara h1 のペプシン消化に対する抵抗性の差異の解析を目的とした。精製 Ara h1（63 kDa および 54 kDa）をブタの胃粘膜由来ペプシンで 37℃, 2 h 消化し，SDS-PAGE により Ara h1 の分解性を比較解析した。その結果，63 kDa Ara h1 と比較して 54 kDa Ara h1 の方が速やかに消化されることを確認した。また，RP-HPLC によりペプシン消化物の解析を行ったところ, 63 kDa Ara h1 のみにピークが検出された。精製ペプチドは, アミノ酸配列解析, ESI-MS により，N 末端ドメインのエピトープを含む配列であることが確認された。更に，ピーナッツアレルギー症例血清 IgE との反応性をドットブロット解析したところ，ピーナッツアレルギー患者血清 IgE と反応を示すことが確認された。以上の結果から, 63 kDa Ara h1 は, 高度に多量体を形成することで 54 kDa Ara h1 と比較して消化酵素に対して強い抵抗性を示し, 消化物中に残存した N 末端ドメインのエピトープを含むペプチドがアレルギー症状を誘発している可能性が考えられた。

We previously identified a new 54 kDa Ara h1 lacking the N-terminal domain of the 63 kDa peanut major allergen Ara h1, and suggested that the N-terminal domain of 63 kDa Ara h1 may play an important role in oligomerization and allergenicity [1]. In this study, we analyzed the difference in resistance to pepsin digestion between 63 kDa Ara h1 and 54 kDa Ara h1, because we speculated that the high degree of oligomerization of 63 kDa Ara h1 confers resistance to digestive enzymes and induces allergic symptoms due to residual multiple peptides containing epitopes. Purified Ara h1 (63 kDa and 54 kDa) was pepsin digested to compare the degradability of Ara h1 and to identify the remaining peptides. The results showed that 54 kDa Ara h1 was digested more rapidly than 63 kDa Ara h1, and that residual peptides including epitopes were generated only from 63 kDa Ara h1. These results suggest that 63 kDa Ara h1 is more resistant to digestive enzymes than 54 kDa Ara h1 by forming a highly oligomerized form, and that peptides containing epitopes in the N-terminal domain remaining in the digested product may induce allergic symptoms.[1] Asaduzzaman *et al., Glycoconjugate Journal* **38**, 67-76 (2021)

peanut allergy, Ara h1, epitope

発表責任者：前田恵（mmaeda@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3D2a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 D2 会場

花粉 Gibberellin-regulated protein の免疫学的手法による定量

Quantification of pollen Gibberellin-regulated protein by immunological methods

○門間 敬子、平川 由紀、吉原 早紀、村林 穂香、成田 宏史（京女大家政）
○Keiko Momma, Yuki Hirakawa, Saki Yoshihara, Honoka Murabayashi, Hiroshi Narita (Kyoto Women's Univ.)

Gibberellin Regulated Protein (GRP)はモモアレルギー重症化アレルゲンである。果物アレルゲンは相同性が高く、種を越えて交差反応することもあり汎アレルゲンとなりやすい。さらに最近スギ・ヒノキ花粉に GRP が存在することが明らかとなり花粉症との関連が世界的に注目されている。

モモ GRP とスギ花粉 GRP の相同性は 68%、システイン残基 12 個が保存されており類似した構造を持つと考えられる。本研究では、抗モモ GRP モノクローナル抗体を用いてスギ花粉由来 GRP を精製した。これを用いてマウスを免疫し、抗スギ花粉 GRP モノクローナル抗体（MSKG）6 つを作製した。MSKG23 のみモモ GRP と交差反応した。MSKG23 を固相とし、MSKG25 および MSKG30 を HRP 標識した二次抗体としてサンドイッチ ELISA を構築し、スギ花粉およびヒノキ花粉中の GRP 量を測定したところ、モモ(～10μg/g)よりも多く、それぞれ約 40μg/g および約 150μg/g の GRP が検出された。さらに、モモおよびウメの花粉でも GRP を検出した。GRP は消化耐性が高く経口感作により食物アレルギーが起こりやすいと考えられるが、粘膜や気道からの花粉感作も起こっている可能性もある。

Gibberellin Regulated Protein (GRP) is a severe allergen of peach allergy. Fruit allergens are highly homologous and can cross-react across species, making them likely to be general allergens. Furthermore, the recent discovery of the presence of GRPs in cedar and cypress pollen has attracted worldwide attention in relation to pollinosis.

The homology between peach GRP and cedar pollen GRP is 68%, and 12 cysteine residues are conserved, suggesting that they have similar structures. We immunized mice with purified GRP from cedar pollen using a peach anti-GRP monoclonal antibody and produced six anti-Cedar pollen GRP monoclonal antibodies (MSKG); only MSKG23 cross-reacted with peach GRP. The amount of GRP in cedar and cypress pollen was measured by constructing an ELISA with MSKG23 as the solid phase and MSKG25 and MSKG30 as HRP-labeled secondary antibodies, and approximately 40 and 150 μg/g were detected, respectively, they are more than peach(~10 μg/g). Furthermore, GRP was also detected in peach and plum pollen. It is possible that sensitization by GRP is also occurring not only orally but also through mucous membranes and airways by pollen.

Gibberellin-regulated protein, allergen, pollen

講演番号：3D2a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 D2 会場

ラット好塩基球白血病細胞 RBL-2H3 に発現している苦味受容体
Rat bitter receptors expressed in RBL-2H3 cell
○川島 満[1]、小林 和暉[2]、眞榮田 麻友美[2]、吉川 潤[1,2]、前橋 健二[1,2] ([1]東農大院応生、[2]東農大応生)
○Mitsuru KAWASHIMA[1], Kazuki KOBAYASHI[2], Mayumi MAEDA[2], Jun YOSHIKAWA[1,2], Kenji MAEHASHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

食物アレルギーや花粉症等の即時型アレルギーは、好塩基球やマスト細胞の脱顆粒により遊離したヒスタミン等のケミカルメディエーターにより惹起される。免疫研究では、ラット好塩基球白血病細胞(以下、RBL-2H3) が広く用いられており、最近、カフェインや漢方薬などの苦味物質が、RBL-2H3 細胞において脱顆粒抑制作用を示すことが報告された。苦味物質の受容には、口腔内の味細胞に発現している苦味受容体が関わることが知られている。しかし近年、苦味受容体は呼吸系、消化系、内分泌系など体のさまざまな部位にも発現していることが明らかになり、その生理的役割に関心が持たれている。本研究では、RBL-2H3 細胞における 35 種類のラット苦味受容体遺伝子候補及び甘味受容体遺伝子候補の発現を RT-PCR 法により調べ、いつくかの苦味受容体遺伝子候補の発現を認めた。発現が確認された苦味受容体遺伝子のうち、rT2R108 遺伝子をクローニングし、HEK293 細胞を用いて機能解析を行った。その結果、rT2R108 はサッカリンナトリウム(以下、Na-Sac)に応答する苦味受容体であると推定された。さらに Na-Sac は、RBL-2H3 細胞における脱顆粒試験において、濃度依存的に抑制作用を示したことから、脱顆粒抑制と苦味刺激が何等かの関連性を持つ可能性が示唆された。

Food allergies and pollen allergies, are caused by chemical mediators such as histamine released by degranulation of basophils and mast cells. Rat basophil leukemia cells (RBL-2H3) are widely used in immunological research, and it has recently been reported that some bitter substances have an inhibitory effect on degranulation in RBL-2H3 cells. It is known that bitter taste receptors expressed in taste cells are involved in the reception of bitter substances. However, in recent years, it has been found that bitter taste receptors are also expressed in various parts of the body and there has been interest in their physiological role.

In this study, we investigated the expression of 35 types of bitter taste receptor gene candidates in RBL-2H3 cells using RT-PCR, and found that several genes were expressed. Among them, the rT2R108 gene was cloned and functionally analyzed using HEK293 cells. As a result, rT2R108 was estimated to be a bitter taste receptor that responds to sodium saccharin (Na-Sac). Furthermore, Na-Sac exhibited an inhibitory effect in a degranulation test in RBL-2H3 cells, suggesting that some relationship between anti-degranulation and bitter stimulation.

RBL-2H3, degranulation, bitter receptor

発表責任者：前橋健二（maehashi@nodai.ac.jp）

講演番号：3D2a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 D2 会場

MHC class II 分子を発現する粘膜型マスト細胞は抗原提示により食物アレルギー症状を増悪させる
MHC class II-expressing mucosal mast cells exacerbate food allergy symptoms through antigen presentation

○中野 信浩[1]、大石 賢司[1,2]、北浦 次郎[1]、小川 秀興[1]、清水 俊明[1,2]、奥村 康[1] ([1]順天堂大院医・アトピー疾患研究センター、[2]順天堂大院医・小児科学)
○Nobuhiro NAKANO[1], Kenji OISHI[1,2], Jiro KITAURA[1], Hideoki OGAWA[1], Toshiaki SHIMIZU[1,2], Ko OKUMURA[1] ([1]Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo Univ., [2]Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Juntendo Univ.)

食物アレルギーを発症したマウスの腸管では、粘膜型マスト細胞の急激な増加が観察されるが、そのメカニズムには不明な点が多い。我々は、食物アレルギーマウスの腸管に MHC class II (MHCII) 分子を発現する粘膜型マスト細胞を見出したことから、その細胞の役割を解析するため MHCII 欠損マスト細胞をもつマウスを作製した。MHCII 欠損マスト細胞をもつマウスは、野生型マスト細胞をもつマウスに比べ食物アレルギー症状が軽減され、腸管マスト細胞の増加が有意に抑制されていた。MHCII が腸管のマスト細胞増殖に与える影響を探るため、*in vitro* の培養系で MHCII 発現粘膜型マスト細胞を作製し、アレルギーマウスの $CD4^+$ T 細胞と共培養した。MHCII 発現粘膜型マスト細胞は抗原提示により抗原特異的 Th2 細胞を活性化させ、IL-5 の産生を誘導した。粘膜型マスト細胞はアレルギー炎症時に IL-33 存在下でマスト細胞増殖因子 IL-9 を産生することが報告されているが、IL-4 と IL-5 が共存すると IL-9 産生量が顕著に増加することを見出した。以上のことから、MHCII 発現粘膜型マスト細胞による抗原提示は、腸管でのマスト細胞増生を引き起こし、食物アレルギー症状を増悪させることが示された。

Mucosal mast cells (MMCs), which are major effector cells of food allergy, rapidly increase in the intestinal mucosa during allergic inflammation. However, the mechanism of rapid mast cell proliferation remains unknown. In this study, we discovered MHC class II (MHCII)-expressing MMCs in the intestine of food-allergic mice. We next generated mice with MHCII-deficient mast cells or wild-type mast cells. Food allergy symptoms and increased intestinal MMC numbers were significantly suppressed in mice with MHCII-deficient mast cells than in mice with wild-type mast cells. To explore the role of MHCII-expressing MMCs on mast cell proliferation, induced MHCII-expressing MMCs generated from bone marrow cells *in vitro* were cocultured with $CD4^+$ T cells from food-allergic mice. Induced MHCII-expressing MMCs activated antigen-specific Th2 cells and induced IL-5 production by activated Th2 cells. It has been reported that MMCs produce the mast cell growth factor IL-9 in the presence of IL-33 during allergic inflammation. We found that MMC IL-9 production was markedly enhanced in the presence of both IL-4 and IL-5. These results indicate that antigen presentation by MHCII-expressing MMCs causes intestinal MMC hyperplasia, resulting in exacerbation of food allergy symptoms.

Food allergy, Mucosal mast cell, MHC class II

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：3D2a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 D2 会場

食物アレルギー環境下、CD4+制御性 T 細胞 は骨と腸管において異なる応答を示す
CD4+ regulatory T cell shows different responses in bone and intestine under food-allergic condition

○星野 友宏[1]、曽我 皓平[2]、西辻 幸介[2]、礒垣 遼[2]、八村 敏志[2]、足立（中嶋） はるよ[2,3]([1]慶応大薬・薬科学、[2]東大院農生科・食の安全研究セ、[3]東大院農生科・免疫生体機能社会連携講座)
○Tomohiro Hoshino[1], Kohei Soga[2], Kosuke Nishituji[2], Ryo Isogaki[2], Satoshi Hachimura[2], Haruyo Nakajima-Adachi[2,3] ([1]Dept. Pharmaceutical Sci., Keio Univ., [2]Res. Cent. Food Safety., Univ. Tokyo, [3]Dept Immunobiol. Biofunct. Res., Univ. Tokyo)

アレルギー反応は IL-4 の過剰産生を特徴とする。IL-4 は一般に骨量の維持に働くが、我々は先行研究で卵白食(EW)摂食時に消化管アレルギーモデルマウスが形成する過剰な IL-4 環境が骨量減少を駆動することを示した。IL-4 による骨量減少は T 細胞において IL-4 過剰産生が起こる遺伝子組換えマウスにおいても確認される（*PNAS*, 90: 11618, 1993)。アレルギー応答の抑制や骨代謝制御に関わる制御性 T 細胞（Treg）の分化は過剰な IL-4 により阻害されるが、消化管アレルギーモデルでは EW 摂食による過剰 IL-4 産生時にも Treg が誘導される。そこで本研究は消化管アレルギーによる過剰 IL-4 産生と Treg、骨量減少の関係の解析を目的とした。9 日間の EW 摂食により消化管アレルギーモデルマウスにおいて産生される過剰な IL-4 を中和すると、骨量減少の有意な抑制と腸間膜リンパ節(MLN)CD4+ T 細胞中の Treg の分化促進が観察される一方、骨髄中の Treg の分化には変化が見られなかった。加えて通常食の対照マウスと比較し、Th2 様の形質である IL-4 の mRNA の高発現が MLN の Treg で確認されたが、骨髄中 Treg では確認されなかった。以上からアレルギー応答時の IL-4 に対して MLN の Treg と骨髄の Treg は異なる応答を示し、機能的にも異なる可能性が示唆された。

Allergic responses are characterized by IL-4 overproduction. Although IL-4 is generally thought to inhibit the differentiation of osteoclasts, which cause bone absorption, we previously found that IL-4 overproduction causes bone loss in the gastrointestinal (GI)-allergy model mice fed with EW-diet. IL-4-induced bone loss is also observed in a mouse strain genetically modified to overproduce IL-4 in CD4+ T cells (*PNAS*, 90: 11618, 1993). Excessive IL-4 inhibits the differentiation of regulatory T cells (Tregs), cells playing effective roles in the suppression of bone loss as well as allergy suppression. However, in the GI-allergy model fed with EW-diet, Tregs are induced under excessive IL-4 conditions. Our study showed that, in the GI-allergy model fed with EW-diet for 9 days, IL-4 neutralization with anti-IL-4 monoclonal antibody prevented bone loss and promoted Treg induction in mesenteric lymph node (MLN), but did not in bone marrow (BM). In addition, compared to the control group, the EW-fed group showed higher IL-4 mRNA expression, a Th2-like phenotype, in MLN Tregs but not in BM Tregs. These results suggest that Tregs in MLN or those in BM respond to IL-4 differently and their function is distinct from each other.

food allergy, regulatory T cell, bone loss

発表責任者：足立（中嶋） はるよ（haruyona@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D2a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 D2 会場

消化管アレルギーモデルにおける腸内細菌が骨量および骨の免疫応答に与える影響
Effects of gut microbiota on bone volume and bone immune response in a gastrointestinal allergic model

○西辻 幸介[1]、曽我 皓平[1]、礒垣 遼[1]、星野 友宏[2]、角田 茂[1,3]、平山 和宏[1,4]、八村 敏志[1]、足立（中嶋） はるよ[1,5] ([1]東大院農生科・食の安全研究セ、[2]慶応大薬・薬科学、[3]東大院農生科・獣医・実験動物、[4]東大院農生科・獣医・獣医公衆衛生、[5]東大院農生科・免疫生体機能社会連携講座)
○ Kosuke NISHITSUJI[1], Kohei SOGA[1], Ryo ISOGAKI[1], Tomohiro HOSHINO[2], Shigeru KAKUTA[1,3], Kazuhiro HIRAYAMA[1,4], Satoshi HACHIMURA[1], Haruyo Nakajima-Adachi[1,5] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Pharmaceutical Sci., Keio Univ., [3]Lab. Biomed. Sci., Univ. Tokyo, [4]Dept. Veterinary Public Health, Univ. Tokyo, [5]Dept. Immunobiol. Biofunct. Res., Univ. Tokyo)

OVA23-3 は卵白食（EW）の摂食 9~11 日目頃にかけて IL-4 に起因する炎症が生じ、体重減少やアレルギー性小腸炎および骨量減少を併発する消化管アレルギーモデルマウスである。本研究では、通常飼育 OVA23-3(SPF)に抗生物質を投与し（Abx）、EW で誘導される病態および免疫応答を評価した。そして、EW で誘導される病態について EW/CN の値で算出したところ、体重変化は SPF : 80.3% /Abx : 86.5%となり、腸管スコア（値が低いほど腸炎が悪化）は SPF : 67.0%/Abx : 74.4%となった。また骨量について、Abx 投与による骨量の増加が CN・EW それぞれで見られたが、EW で誘導される骨量減少量は SPF よりも増大した（SPF : 83.3%/Abx : 77.8%）。さらに、Abx では EW 摂食により骨髄のインターロイキン 4（IL-4）発現量が増加しており、その産生細胞と考えられるマクロファージや好酸球の割合が増加していた一方、制御性 T 細胞の割合は有意に低下していた。
以上より、腸内細菌が消化管アレルギーモデルにおける体重減少および腸炎の悪化要因となること、および通常時には骨量を減少させる方向性に強く働くことが示された。そして、Abx で炎症時に骨量減少が増大した要因については、1）骨量減少を誘導する細菌が優勢になる、もしくは 2）骨髄において IL-4 による炎症環境の形成を抑制する細菌が劣勢になる可能性が考えられた。
OVA23-3 is a gastrointestinal allergic model mouse in which IL-4-induced inflammation occurs around day 9 to 11 after egg white (EW) feeding, resulting in weight loss, intestinal inflammation, and bone loss. In this study, we administered antibiotics (Abx) to OVA23-3 (SPF) and evaluated the pathogenesis and immune responses induced by EW. Then, the ratio of EW/CN showed that the body weight change was SPF:80.3% and Abx:86.5%, and the intestinal score was SPF:67.0% and Abx:74.4%. Regarding bone volume, Abx increased bone volume in CN and EW, but bone loss was greater than SPF (SPF: 83.3%/Abx: 77.8%). Furthermore, in Abx group, EW feeding increased IL-4 expression in the bone marrow and the percentage of macrophages and eosinophils, which are thought to produce IL-4, while the percentage of regulatory T cells was significantly decreased. These results indicate that gut microbiota is a factor in weight loss and aggravation of enteritis in a gastrointestinal allergic model. In addition, the reason why bone loss increased during inflammation in Abx could be (1) predominance of gut microbiota that induce bone loss or (2) inferiority of gut microbiota that attenuate the IL-4-dependent inflammation in the bone marrow.

gastrointestinal allergy, gut microbiota, bone loss

発表責任者：足立（中嶋）はるよ（haruyona@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D2 会場

Lentilactobacillus hilgardii strain H-50 の自由摂取による食物アレルギーの予防効果の検証
Studies on the preventive effect of free intake of *Lentilactobacillus hilgardii* strain H-50 on food allergy

○川原 佳菜子[1]、範 蓉[2]、鈴木 卓弥[2]、山本 祥也[2]（[1]広大生生、[2]広大院統合）
○Kanako KAWAHARA[1], Rong FAN[2], Takuya SUZUKI[2], Yoshinari YAMAMOTO[2] ([1]The Univ. of Hiroshima, [2]Grad. Sch Integr. Sci. Hiroshima Univ.)

I 型アレルギーは 2 型ヘルパーT（Th2）細胞への偏った分化や免疫グロブリン（Ig）E の過剰産生などによって起こる即時型の過敏症である。中でも食物アレルギーにおけるアナフィラキシーは全身性の重篤なアレルギー症状であり、死に至る場合もある。我々の研究グループは、清酒の腐造や腐敗を引き起こす乳酸菌の一群から、細胞培養において卵白アルブミン（OVA）誘導性の Th2 免疫応答を強力に抑制する *Lentilactobacillus hilgardii* H-50（H-50 株）を選抜することに成功した。そこで本研究では、OVA 誘発性アナフィラキシーモデルマウスへ H-50 株含有飼料を自由摂取させ、アナフィラキシー症状の予防効果の検証とその作用機序の解析を行った。

0.5%(w/w)の H-50 株（死菌体、凍結乾燥物）をモデルマウスへ 37 日間自由摂取後、アナフィラキシーを誘導したところ、通常飼料摂取群と比較して体温低下が有意に抑制された。また、通常飼料摂取群と比較して、H-50 株摂取群では血清 IgE レベル、脾臓重量、脾臓細胞を OVA で再刺激した際の IL-4 産生量の有意な減少が認められた。さらに、H-50 株摂取群では回腸において mMCP-1 および IgE 受容体の Fc ε R1a の mRNA 発現量の有意な減少がみられた。以上の結果より、H-50 株は抗原感作および脱顆粒を抑制することで、食物アレルギーを予防することが示唆された。

Type I allergy is caused by biased differentiation towards type 2 helper T (Th2) cells and overproduction of immunoglobulin (Ig) E. Among them, anaphylaxis is a severe systemic allergic condition that can lead to death. *Lentilactobacillus hilgardii* strain H-50 has been selected in our laboratory as a strain with strong anti-allergic effects in vitro. Here, we studied the preventive effect and mechanism of free intake of feed with H-50 strain on OVA-induced anaphylaxis.

0.5% (w/w) dead H-50 strain was freely fed to anaphylactic model mice, and then anaphylaxis was induced on Day 37. As a result, the temperature decrease was significantly suppressed in the H-50 strain-fed group compared to the normal feed (NF)-fed group. In addition, a significant decrease in serum IgE levels, spleen weight and IL-4 production when splenocytes were restimulated with OVA, were observed in the H-50 strain-fed group compared to the NF-fed group. Furthermore, a significant decrease in mRNA expression of *mMCP-1* and IgE receptor *FcεR1a* in the ileum was showed in the H-50 strain-fed group. These results suggest that H-50 strain prevents food allergy by suppressing antigen sensitization and degranulation.

Lentilactobacillus hilgardii strain H-50, Food allergy, Anaphylaxis

発表責任者：山本祥也（yamamo59@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3D2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D2 会場

Kaempferol による RALDH2 発現調節と食物アレルギー改善効果
Regulation of RALDH2 expression by Kaempferol and its effects on food allergy
○髙橋 美貴、長田 和樹、綿貫 優実、山口 昌樹、八代 拓也、西山 千春（東理大院先進工生命システム）
○ Miki TAKAHASHI, Kazuki NAGATA, Yumi WATANUKI, Masaki YAMAGUCHI, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

制御性 T 細胞（Treg）はアレルギー性疾患や炎症性疾患の抑制に働く。腸管の樹状細胞(DC)が特異的に発現する酵素 RALDH2 /*Aldh1a2* により合成されるレチノイン酸は Treg 分化を促進する。これまでに私達は、RALDH2 発現を促進する食品成分の探索を行い、フラボノール Kaempferol (KAE)を見出した。その機序の解析から、KAE が芳香族炭化水素受容体 AhR のアンタゴニストとして作用し、DC の RALDH2 発現や活性を増強することが示唆された。今回、DC 特異的転写因子 PU.1/*Spi1* と IRF4/*Irf4* について解析し、KAE 処理が DC の *Irf4* の mRNA レベル、PU.1 と IRF4 のタンパク質量を増加させ、*Aldh1a2* エンハンサー配列への PU.1 結合を促進すること、*Spi1* や *Irf4* の siRNA 導入 DC では KAE による *Aldh1a2* mRNA 増加が阻害されることが明らかとなった。ポリフェノールの作用点としてしばしば同定される抗酸化ストレス応答マスター転写因子 NRF2 の欠損 DC では、KAE による *Aldh1a2* mRNA 発現誘導が増強することも判明した。KAE 存在下で培養した DC をマウスに移入するとパイエル板の Treg 数が増加し、KAE 処理 DC が生体内 T 細胞分化を制御し得ることが示された。OVA 誘導性食物アレルギーモデルを用いて、アレルギー反応に対する KAE の効果を評価した結果、KAE 投与がアレルギー性下痢やアナフィラキシーによる体温低下を有意に改善した。
RALDH2/*Aldh1a2* specifically expressed in intestinal dendritic cells (DCs) plays important roles in protection against allergic diseases and inflammatory diseases by synthesizing retinoic acid, which promotes the development of regulatory T cells (Tregs). Previously, we have identified kaempferol as the most effective flavonoid that upregulates the RALDH2 expression. KAE upregulated the expression of RALDH2 by acting as an antagonist of AhR. In the present study, we evaluated the effects of DC-specific transcription factors PU.1 and IRF4 in RALDH2 expression, and found that KAE treatment increased IRF4 and PU.1 proteins, and subsequent recruitment of PU.1 to enhancer sequence in the *Aldh1a2* gene. KAE-induced increase of *Aldh1a2* mRNA was suppressed in PU.1 or IRF4 knocked down DCs. The deficiency of NRF2, which is often identified as a target of polyphenols, enhanced KAE-induced increase of *Aldh1a2* mRNA. When KAE-treated DCs were transferred into mice, increase of Tregs in the Peyer's patches was observed. We utilized an OVA-induced food allergy model and confirmed that allergic diarrhea and body temperature drop in anaphylaxis were significantly suppressed in mice administered kaempferol.

Kaempferol, Raldh2, Treg

講演番号：3D2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D2 会場

褐藻ノコギリモクから単離された物質 2 種の抗アレルギー効果
The antiallergic effect of two compounds isolated from a brown alga, *Sargassum macrocarpum*
○杉浦 義正[1]、三角 彰太[2]、山谷 裕昭[3]、中西 正美[4]、平田 文久[4]、勝崎 裕隆[5]、林 裕一[6]、村瀬 昇[1]([1]水産機構水大校、[2]西ノ島町、[3]ノア隠岐、[4]JF しまね、[5]三重大院・生資、[6]岡部・海洋事業部)
○Yoshimasa SUGIURA[1], Shouta Misumi[2], Hiroaki Yamatani[3], Masami Nakanishi[4], Fumihisa Hirata[4], Hirotaka Katsuzaki[5], Yuichi Hayashi[6], Noboru Murase[1] ([1]Natl Fish Univ, [2]Nishinoshima Town, [3]Noah Oki, [4]JF Shimane, [5]Mie Univ, [6]Okabe Co., Ltd.)

【目的】我々は、島根県西ノ島町海域で採取された褐藻ノコギリモクの抽出物に抗アレルギー性を見出し、その抽出物から物質 3 種を単離した。そのうち 1 種を sargachromenol と同定し、有効物質であることを報告した[1)]。本研究では、他 2 種の有効性の確認と化学構造の決定を行った。
【方法】抗アレルギー性は、炎症関連酵素（ホスホリパーゼ A_2、リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ-2、ヒアルロニダーゼ）の活性阻害試験や、アレルギー性炎症モデルマウスにおける耳介浮腫抑制試験（起炎剤: アラキドン酸、ホルボールエステル、オキサゾロン）、RBL-2H3 細胞による脱顆粒抑制試験により確認した。また、質量分析（LC-MS）や NMR スペクトル解析で構造解析を行った。
【結果】物質 2 種（物質 1 と 2）は何れも、炎症関連酵素活性阻害や耳介浮腫抑制、脱顆粒抑制を示したので、抗アレルギー成分であることが明らかとなった。抗アレルギー作用全般で、物質 1 より物質 2 の方が高い有効性を示す傾向であった。構造解析を進めた結果、物質 2 はテルペノイドの 1 種、sargarquinoic acid と推定された。現在、物質 1 の化学構造を確認中である。1) 杉浦ら, 第 77 回 日本栄養・食糧学会大会 講演要旨集, p217.

Previously, we isolated three compounds from an extract of Sargassum macrocarpum. One of the three compounds was identified as sargachromenol with an antiallergic property. In this study, other two compounds were examined for antiallergic properties and analyzed for chemical structures. The experiments for an antiallergic effect of the two compounds were conducted using ear swelling in mice induced by sensitizers (arachidonic acid, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, and oxazolone), inflammation-related enzymatic activities (phospholipase A_2, lipoxygenase, cyclooxygenase-2, and hyaluronidase), and degranulation in RBL-2H3 cells. The chemical structure analyses were performed with LC-MS and NMR spectra. The two compounds (compound 1 and 2) possessed antiallergic properties. The property of compound 2 tended to be higher than that of compound 1. Resulting from the structural analyses, compound 2 was presumed as a terpenoid, sargarquinoic acid. The structural analysis of compound 1 is in progress.

Sargassum macrocarpum, terpenoid, antiallergy

発表責任者：杉浦義正（ysugiura@fish-u.ac.jp）

講演番号：3D2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D2 会場

Analysis of the inhibitory mechanism of vialinin A and DMT on TNF-α production in RBL-2H3 cells

○DJIDJOU TAGNE ANGE MURIELLE, KOUICHI SUGAYA, JUN-ICHI ONOSE, NAOKI ABE
(Tokyo University of Agriculture)

The treatment of autoimmune diseases has witnessed great advances in the past decades with the discovery and clinical application of biological TNF-α inhibitors. Nevertheless, current TNF-α antagonist drugs are not orally available, are expensive, and have certain side effects that remain a problem for some people living with TNF-α-related diseases.

Our laboratory research group has previously reported that a biological active compound, vialinin A, isolated from the Chinese edible mushroom *Thelephora vialis*, was a potent inhibitor of TNF-α production and release from RBL-2H3 cells. Additionally, molecular probe experiments using DMT, a bioactive synthetic analog, identified ubiquitin-specific peptidase 5 (USP5) as one of the target molecules of vialinin A, confirming that vialinin A and DMT inhibited its enzymatic activity.

The primary goal of this study was to elucidate the detailed mechanism of a novel approach by which vialinin A and/or DMT inhibits TNF-α production from antigen-antibody reaction mediated by FcεRI receptor on RBL-2H3 cells. Western blotting results showed that both molecules suppressed the phosphorylation levels of the early phase signaling molecules such as Syk, PLCγ1 and PLCγ2 with no suppressive effects on Lyn phosphorylation. Analysis of the effect of both molecules on the phosphorylation/degradation levels of late phase signaling molecules such as IkBα, NFkB, and TRAF6 originating from the binding of vialinins to USP5 is still to be examined.

In summary, vialinin A and its analogue DMT might inhibit TNF-α production and release and suppressing β-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells by suppressing the phosphorylation levels of early phase signaling molecules such as Syk, PLCγ1 and PLCγ2 based on Lyn inhibition.

vialinin A, TNF-α production, RBL-2H3 cells

発表責任者：DJIDJOU TAGNE ANGE MURIELLE（10822001@nodai.ac.jp）

講演番号：3D2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D2 会場

アレルゲン特異的 T 細胞誘導性乳酸菌の作製とその有効性の検討

Preparation of allergen-specific T cell-inducible lactic acid bacteria

○高崎 凌、笠原 紳、須田 義人、島津 朋之（宮城大食産業）
○RYO TAKASAKI, SHIN KASAHARA, YOSHIHITO SUDA, TOMOYUKI SHIMAZU (Miyagi Univ.)

乳酸菌に対する健康効果への期待は高く，この中でも免疫力向上機能は長年注目を集めている機能性といえる。本研究室においても乳酸菌 *Lactobacillus brevis* が Treg をはじめとする T 細胞誘導能を有することを明らかとしている。しかしこうした乳酸菌は「何に対して反応するのか」を決定する抗原特異性と呼ばれる特性は持つもののアレルゲン等に対するものではなく，アレルギー等に対して強力な免疫反応を誘導できないものと考えられる。一方で乳酸菌の持つ「T 細胞誘導能」と「抗原特異性」を掛け合わせることでより強力な免疫反応を誘導することが可能になると考えられる。そこで本研究では乳酸菌にアレルゲンを発現させ，その乳酸菌により誘導される T 細胞に抗原特異性を付与し，より強力な免疫反応を誘導できるか検討することを目的とした。方法としてまず OVA 遺伝子に関してコドン最適化を行い，乳酸菌 *L. brevis* ATCC367 株へエレクトロポレーションによる遺伝子導入を行った。その後乳酸菌内での OVA 遺伝子の発現量を real-time PCR により解析し発現量の上昇がみられた。またウエスタンブロット法を用いタンパク質産生の有無を解析し，乳酸菌内における OVA のタンパク質産生が示唆された。また OVA を特異的に認識する T 細胞のみを有する DO11.10 マウスを用いた *in vitro* 試験, *in vivo* 試験より OVA 遺伝子保有乳酸菌（optOVA-*L. brevis* ATCC367）が機能性を持ったアレルゲン特異的 T 細胞が誘導されるかについて検討を行っている。

Lactic acid bacteria attract people's attention because they may help activate immunity. We have shown that certain types of lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* promote T cells differentiation, especially induction of Tregs. In many cases, however, immune responses induced by such lactic acid bacteria are not strong enough since the bacterial cells do not contain allergen molecules. On the other hand, it has been known that stronger immune responses can be observed when "T cell-differentiation inducing ability" and "antigen specificity" of lactic acid bacteria are properly combined. The objective of this study is to investigate whether more powerful immune responses can be detected by expressing allergens in *L. brevis* ATCC367 cells. The codon-optimized OVA gene was introduced into *L. brevis* ATCC367 cells and accumulation of OVA was confirmed by Western blotting. We are now investigating that OVA-expressing *L. brevis* ATCC367 can induce functional allergen-specific T cells.

Lactobacillus brevis, antigen specificity, T cells differentiation

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：3D2p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D2 会場

経皮感作食物アレルギーにおける皮膚のかゆみと好酸球の関係

Relationship between skin itching and eosinophils in epicutaneous-sensitized food allergy

黒木 穣、水田 成俊、鳥屋尾 千佳、○服部 秀美（宮崎大農）
Yutaka KUROKI, Naritoshi MIZUTA, Chika TOYAO, ○Hidemi HATTORI (Miyazaki Univ.)

食物アレルギーの既往歴がないにもかかわらず、突然食物アレルギーを発症する事例が報告されている。この原因の一つとして経皮感作が挙げられているが、発症メカニズムについて不明な点は多い。そこで本研究では皮膚の痒みに注目し、新規発症メカニズムについて検討した。マウスのバリア機能を脆弱にした背部皮膚へ卵白アルブミン(OVA)水溶液を塗布し経皮感作を行った(OVA 群)。Control として PBS を塗布した(control 群)。塗布開始から 21 日後に OVA の経口惹起を行い、血液及び皮膚を採取した。また、OVA 経口惹起後から 12 時間にわたり掻破回数を計測した。血中 OVA 特異的 IgE、IgG の測定をしたところ、OVA 群で分泌量が増加したことから経皮感作の成立が確認できた。掻破回数計測の結果、経口惹起 2 時間後の OVA 群は control 群と比べて掻破回数が有意に増加した。皮膚の DFS 染色と免疫染色(major basic protein; MBP)から、経口惹起 2 時間後の OVA 群では、好酸球が浸潤し脱顆粒していることが分かった。以上のことから、経皮感作成立後にアレルゲンを摂取すると、好酸球が皮膚に浸潤し脱顆粒によって MBP を放出することで、痒みが誘発されることが示唆された。

Cases of sudden onset of food allergy have been reported despite no history of food allergy. Although epicutaneous sensitization is one of the causes of this allergy, the onset mechanism remains unclear. Therefore, we focused on skin itching and investigated the pathogenic mechanism. Ovalbumin (OVA) solution was applied to the back skin of BALB/c female mice with weakened barrier function (OVA group), whereas PBS was applied as a control (control group). The OVA oral challenge was performed 21 days after the start of the application, and both blood and skin samples were collected. Additionally, the number of scratching was measured 12-h period post-oral challenge. The measurements of OVA-specific IgE and IgG levels in the blood confirmed epicutaneous sensitization. Significantly increased scratching was observed in the OVA group compared to the control group at the 2-h post-oral challenge. DFS staining and immunostaining (major basic protein: MBP) revealed that eosinophils were migrated and degranulated in the OVA group at the 2-h post-oral challenge. These results suggest that ingestion of allergen after epicutaneous sensitization induces itching by the migration of eosinophils into the skin and their degranulation, which releases MBP.

Food allergy, Epicutaneous sensitization, Skin itching

発表責任者：服部秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3D2p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D2 会場

Interleukin-13 は、マウス小腸オルガノイドにおいて抗菌ペプチド産生を誘導する
Interleukin-13 induces the production of antimicrobial peptides in mouse small intestinal organoids.
○石井 南葵[1]、松井 伸祐[2]、山本 祥也[1]、岩槻 健[2]、鈴木 卓弥[1] ([1]広島大学大学院統合生命科学研究科、[2]東京農業大学大学院応用生物科学研究科)
○ YOSHIKI ISHII[1], SHINSUKE MATSUI[2], YOSHINARI YAMAMOTO[1], KEN IWATSUKI[2], TAKUYA SUZUKI[1] ([1]The Univ. of Hiroshima, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

腸管上皮のパネート細胞や杯細胞は複数の抗菌ペプチドを産生し、外来微生物の排除を行うことで生体防御に重要な役割を担っている。これまでの私たちの研究において、インドオオバコ（*Plantago ovata Forssk.*）の種皮に由来する食物繊維サイリウムの摂取が、マウス小腸上皮における抗菌ペプチド産生（RELMβや SPRR2A）を増大させること、この作用には 2 型自然リンパ球（ILC2）が分泌する IL-13 が関与することを明らかにしてきた（第 77 回日本栄養・食糧学会大会)。しかしながら、IL-13 による抗菌ペプチドの発現調節の分子機序は未解明である。そこで本研究は、マウス小腸オルガノイドを用いて、IL-13 が誘導する抗菌ペプチドの発現上昇メカニズムの解明を目的とした。まず、マウス（C57BL/6J 系、メス、10 週齢）の小腸組織からクリプトを単離し、小腸オルガノイドを樹立した。この小腸オルガノイドに IL-13 を作用させたところ、抗菌ペプチド RELMβと SPRR2A の産生が増大した（定量 PCR 法およびウェスタンブロット法)。また、この IL-13 による抗菌ペプチド産生は、JAK1/2 および PI3K シグナル経路の阻害（Ruxolitinib、Wortmannin）により低下した。以上の結果から、小腸上皮において、IL-13 は JAK1/2 と PI3K のシグナル経路を介して抗菌ペプチド産生を高めることが示唆された。より詳細なメカニズムについて現在検討中である。

Antimicrobial proteins, which rapidly kill or inactivate microorganisms, play a crucial role in the intestinal immune defense system. Previously, our study suggested that psyllium fiber increases the IL-25 production in intestinal tuft cells and that the tuft cell-derived IL-25 stimulates ILC2 (group 2 innate lymphoid cell) to produce IL-13, which subsequently induces the production of antimicrobial proteins such as RELMβ and SPRR2A in Paneth and goblet cells. In this study, we investigated the mechanism underlying the IL-13-mediated antimicrobial protein production in mouse small intestinal organoids. We found that IL-13 upregulated the RELMβ and SPRR2A expression in the intestinal organoids. This upregulation was sensitive to the inhibition of JAK1/2 and PI3K signaling pathways (Ruxolitinib and Wortmannin). In conclusion, IL-13 induces antimicrobial proteins through JAK1/2 and PI3K signaling in mouse intestinal organoids. Additional mechanisms underlying IL-13-induced upregulation of antimicrobial proteins are under investigation.

Antimicrobial proteins, Type 2 immunity, Mouse intestinal organoid

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3D2p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D2 会場

マスト細胞による脂肪細胞の分化・成熟の抑制作用
Inhibitory effect of mast cells on adipocyte differentiation/maturation
○秋田 梨沙、江原 舜樹、鈴木 明日香、祖父江 春菜、中西 祐輔、高橋 恭子（日大生物資源）
○Risa AKITA, Shunki EHARA, Asuka SUZUKI, Haruna SOBUE, Yusuke NAKANISHI, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

近年、マスト細胞の多彩な生理調節作用が注目されている。これまでに、マスト細胞が脂肪細胞の分化・成熟に対して細胞間の物理的接触を介した促進作用と液性因子の産生を介した抑制作用を示すことを報告した。さらに、抑制作用を示す因子は、熱およびプロテアーゼ感受性で＞100 k Da の因子であることを明らかにした。本研究では、マスト細胞による脂肪細胞の分化・成熟の抑制機構を明らかにすることを目的とした。マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC）の培養上清＞100 k Da 区画からイムノグロブリン除去、還元、アルキル化、トリプシン処理後に LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行った。候補分子としてヒストン H2B が同定されたため、BMMC の培養上清に対して抗ヒストン H2B 抗体を用いた除去処理を行い、マウス線維芽細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導系に添加して、adiponectin および aP2 の発現量を解析した。その結果、除去処理を行った培養上清では対照の培養上清と比較して adiponectin および aP2 の発現抑制作用が低減した。これらの結果から、マスト細胞がヒストンを含む細胞外トラップ様の高分子複合体を放出して脂肪細胞の分化・成熟を抑制する可能性が示唆された。

The various physiological roles of mast cell have been attracting attention in recent years. We previously reported that mast cells showed both promoting and inhibitory effects on adipocyte differentiation/maturation through physical cell-cell interaction and soluble factor production, respectively. The inhibitory soluble factor produced from mast cells was shown to be heat and protease-sensitive and >100kDa. — The purpose of this study is to elucidate the mechanism underlying the mast cell-mediated suppression of adipocyte differentiation/maturation. The >100kDa fraction of culture super supernatant of mouse bone marrow-derived mast cells (BMMCs) was subjected to immunoglobulin removal, reduction, alkylation, and trypsin treatment, followed by proteome analysis by LC-MS/MS. Since histone H2B was identified as a candidate, culture supernatant depleted with anti-histone H2B antibody was added to the in vitro differentiation system of mouse fibroblast cell line 3T3-L1 into adipocyte. The results showed that control supernatant but not the supernatant with depletion treatment suppressed adiponectin and aP2 expression, — suggesting that an extracellular trap-like high molecular mass complex containing histones released from mast cells may suppress adiponectin differentiation/maturation.

mast cell, adipocyte, differentiation

発表責任者：高橋恭子（takahashi.kyoko@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D3a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D3 会場

リン酸欠乏下におけるイネの SQDG 合成能欠損変異体のリピドーム解析
Lipidomic analysis of rice mutants of deficient in SQDG biosynthesis grown under phosphorus-limited conditions

○背戸 美紗代[1]、浜崎 大輔[1]、高野 耕司[2]、西澤 具子[2]、庄司 翼[3]、勝崎 裕隆[1]、斉藤 和季[2]、岡咲 洋三[1] ([1]三重大院生資、[2]理研 CSRS、[3]富山大和漢研)
○ Misayo SETO[1], Daisuke HAMASAKI[1], Kouji TAKANO[2], Tomoko NISHIZAWA[2], Tsubasa SHOJI[3], Hirotaka KATSUZAKI[1], Kazuki SAITO[2], Yozo OKAZAKI[1] ([1]Mie Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Univ. of Toyama)

近年、リン欠乏時にはリン脂質から糖脂質への膜の質的転換（脂質リモデリング）が引き起こされることが明らかとなり、膜脂質代謝のリン欠乏への応答が植物の生存に重要な役割を果たすことが示唆されている。リン欠乏条件下での脂質リモデリングに関与する糖脂質としてスルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)が知られており、その生合成遺伝子の機能を欠損するシロイヌナズナの変異体の一部はリン欠乏条件下で野生型と比べて生育が悪化することが分かっている。本研究では、SQDG 合成酵素遺伝子(*SQD2*)を欠損したイネの変異体の脂質分析を行った。イネの変異体と野生型をリン酸を含むリン十分条件で 1 週間栽培した後、リン欠乏の条件で 3 週間栽培した。LC-MS を用いて脂質を分析したところ、リン十分条件およびリン欠乏条件のいずれにおいても、変異体では SQDG の蓄積がほとんど見られなかった。一方、リン欠乏条件下で栽培した変異体では SQDG の類縁体であるグルクノシルジアシルグリセロール(GlcADG)という糖脂質の増加が観察された。シロイヌナズナでは GlcADG と SQDG は共に配糖化酵素である SQD2 が合成を触媒しており、シロイヌナズナの *sqd2* 変異体には GlcADG と SQDG が蓄積しないことが分かっている。今回の結果、イネとシロイヌナズでは GlcADG の合成経路に違いがあることが示された。

Recently, it has been suggested that changes of membrane lipid composition (lipid remodeling) from phospholipids to glycolipids induced under phosphorus (P) deficiency plays an important role in plants to survive the stressed growth conditions. Sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) is a glycolipid involved in lipid remodeling under phosphorus-deficient conditions, and some Arabidopsis loss-of-function mutants of its biosynthesis gene have been found to show growth defects compared with the wild type under P-limited conditions. In this study, we analyzed the lipid remodeling in the rice mutants lacking the biosynthesis-related gene of SQDG under P limitation. The lipidomic analysis revealed that no accumulation of SQDG in the mutant under P-deficient conditions. In contrast, an increase in glucuronosyl diacylglycerol (GlcADG), an analog of SQDG, was observed in the mutant grown under P-deficient conditions. In Arabidopsis, both GlcADG and SQDG are biosynthesized by the glycosyltransferase SQD2, and the Arabidopsis sqd2 mutant does not accumulate GlcADG and SQDG. The present results indicate that there are differences in the GlcADG synthesis pathway between Arabidopsis and rice.

lipidome, phosphorus deficiency, glycolipid

発表責任者：岡咲洋三（yozo.okazaki@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3D3a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D3 会場

イネに含まれるアシル化 MGDG 合成酵素活性の検出

Occurrence of enzymatic activity to synthesize acyl-MGDG in rice leaves

○中村 早希[1]、浜崎 大輔[1]、高野 耕司[2]、庄司 翼[3]、勝崎 裕隆[1]、斎藤 和季[2]、岡咲 洋三[1]([1]三重大院生資、[2]理研 CSRS、[3]富山大和漢研)
○ Saki NAKAMURA[1], Daisuke HAMASAKI[1], Kouji TAKANO[2], Tsubasa SHOJI[3], Hirotaka KATSUZAKI[1], Kazuki SAITO[2], Yozo OKAZAKI[1] ([1]Mie Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Univ. of Toyama)

植物の葉緑体の膜はその多くがモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)という糖脂質で占められている。アシルモノガラクトシルジアシルグリセロール (AMGDG)は MGDG がアシル化された糖脂質であり、ストレス応答に何らかの形で関わっていると推測されているが、具体的な生理学的機能は不明である。また、AMGDG の合成には Acylated Galactolipid Associated Phospholipase 1 (AGAP1)という酵素が関与しており、MGDG へのアシル基供与体が MGDG そのものであることが分かっている。しかし、これらの知見は大部分がシロイヌナズナにおいて確認されただけで、農作物におる存在や役割等はよく分かっていない。これまで行われたイネのリピドーム解析の結果から、主要栄養素のひとつであるリンが欠乏するストレス条件下で AMGDG と推定される脂質がイネの葉に蓄積することが分かっている。そこで本研究ではリン欠乏条件下での AMGDG と AGAP1 の関係を調べるため、イネの葉の AGAP1 活性の検出を試みた。イネの地上部から酵素を抽出し、緩衝液中で MGDG と 22℃で 30 分間反応させた。酵素反応後の生成物を LC-MS で分析した結果、反応生成物は MGDG から生成した AMGDG であることが分かった。

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) is the one of the main constituents of the chloroplast membrane lipids. Acylated monogalactosyldiacylglycerol (AMGDG) is an acylated form of MGDG and is thought to be involved in the stress responses, but its specific physiological function still remains unknown. AMGDG is synthesized from two molecules of MGDG by Acylated Galactolipid Associated Phospholipase 1 (AGAP1). However, most of these findings have only been confirmed in *Arabidopsis*, and their presence and roles in agricultural crops are not well understood. Lipidome analysis has shown that AMGDG accumulates in rice leaves under phosphorus (P) deficiency. In this study, we tried to detect AGAP1 activity in rice leaves to investigate the relationship between AMGDG and AGAP1 under P-deficient conditions. The enzyme was extracted from leaves of rice plants and reacted with MGDG. LC-MS analysis of the reaction products showed that reaction products were AMGDG, suggesting that there could be found the AGAP1 like enzyme in rice leaves.

galactolipid, head-group acylation, phosphorus deficiency

発表責任者：岡咲洋三（yozo.okazaki@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3D3a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D3 会場

アメリカハマグルマ地上部に含まれる昆虫摂食阻害物質

Insect Antifeedants in Aerial Part of Sphagneticola trilobata

○成田 覚、森本 正則、辰巳 剛、松田 一彦 (近畿大農)
○Satoru Narita, Masanori Morimoto, Takeshi Tatsumi, Kazuhiko Matsuda (Kindai Univ.)

アメリカハマグルマ（*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski syn. *Wedelia trilobata* (L.) Hitche）は，沖縄地方に園芸植物として導入されたが，現在では南西諸島において野生化し在来植生への影響が懸念されることから緊急対策外来種となっている。一方，本種の近縁種であるクマノギク（*S. calendulacea* (L.) Pruski syn. *W. chinensis* (Osbeck) Merr.）は，南西諸島以北の本州太平洋側にも分布する在来種で絶滅危惧種に指定されている地域もある。また，アメリカハマグルマがクマノギクよりもハスモンヨトウ幼虫に対する食害抵抗性が高いことが報告されている[1)]。本研究では，アメリカハマグルマ繁茂の要因の一つとして植食性昆虫に対する食害抵抗性を予想し，本種とクマノギクの成分比較による食害抵抗性因子の特定を目的とした。調製した各種溶媒抽出物の比較から，アメリカハマグルマに多く含有される化合物を単離・同定を行ったところ，その多くはカウレン型ジテルペンカルボン酸であり，ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）幼虫を用いた摂食阻害活性試験において，弱い昆虫摂食阻害活性を示した。これらジテルペン類の生物活性は弱いながらも植物体には多く含まれることから，アメリカハマグルマの食害抵抗性に関与している可能性が示唆された。

In Japan, the alien weed, *Sphagneticola trilobata* syn. *Wedelia trilobata*, Asteraceae is invaded in southern parts of Japan. Qi reported that this species showed higher tolerance than Asian native congener, *S. calendulacea* syn. *W. chinensis* to damage from herbivores such as *Spodoptera litura* larvae. Actually, this alien species *S. trilobata* without feeding damage was observed in the habitat. We presumed that this species used secondary metaboliets for avoidance of damage from herbivores. The plant materials of these species were extracted by hexane and methanol, respectively. The constituents were isolated and identified as several diterpenes based on their spectroscopic data. The insect antifeedant activities of extracts and isolated terpenes were evaluated by antifeedant test against *S. litura* larvae. Though these extracts and terpenes showed moderately antifeedant activity and the content of terpenes was abundant in the plant, these terpenes maybe played a role of chemical defense for herbivore's attack.

1) Qi, S.-S. *et al.*, Allelopathy confers an invasive *Wedelia* higher resistance to generalist herbivore and pathogen enemies over its native congener. *Oecologia* **2020,** *192*, 415-423.

Allelopathy, Antifeedant, Alien weed

発表責任者：成田 覚（2333670009s@nara.kindai.ac.jp）

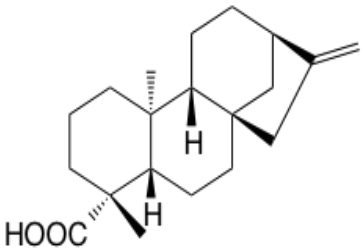
講演番号：3D3a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D3 会場

海浜植物ネコノシタに含まれる昆虫摂食阻害活性物質

Insect antifeedants in *Melanthera prostrata*

○森本 正則、石川 藍梨、松田 一彦 (近畿大農)
○Masanori MORIMOTO, Airi ISHIKAWA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

ネコノシタ（*Melanthera prostrata* (Hemsl.) W.L.Wagner et H.Rob. syn. *Wedelia prostrata* (Hook. et Arn.) Hemsl）は，キク科の海浜植物でハマグルマとも呼ばれ，近年雑草化が問題となっている外来雑草であるアメリカハマグルマ（*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski syn. *Wedelia trilobata* (L.) Hitche）と近縁の植物である。近年，ネコノシタを食害するスペシャリストとして小型の蛾類であるネコノシタトリバ（*Hellinsia muraseae* Mono & Yoshiyasu）が発見された。この様なスペシャリストが存在する植物種の多くは，農業害虫に代表される雑食性昆虫に対して食害抵抗性を持つことが知られている。その様な観点から本研究では，ネコノシタが生産する化合物のハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）幼虫に対する食害抵抗性を評価した。本種の植物表面は，ワックスや高級アルコールで構成される厚いクチクラ層で覆われ，葉部では気孔が表面にも確認された。この厚いクチクラ層も食害抵抗性や水分保持に有効であることは予想できるが，その他の化学的な防御物質についての知見を得るために抽出物を調製・成分探索を実施した。その結果，本種地上部ヘキサン抽出物の主成分として*ent*-カウレン酸とその誘導体が単離・同定できた。得られた化合物のハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性について評価し，これらの化合物の本種における食害抵抗性への寄与を考察した。



Melanthera prostrata (Hemsl.) W.L.Wagner et H.Rob. syn. *Wedelia prostrata* (Hook. et Arn.) Hemsl is Asteraceae weed in beach habitat. And this species is closely related with invasive alien plant species, *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski syn. *Wedelia trilobata* (L.) Hitche in Japan. Recently, it was discovered that *M. prostrata* had a specialist lepidopteran herbivore, *Hellinsia muraseae* Mono & Yoshiyasu. In many cases, the plant damaged from a specialist has a defense system against generalist herbivores. Thus the hexane extract was prepared and several constituents were isolated from this extract. Isolated compounds were identified as *ent*-kaurenoic acid and its derivatives by their spectroscopic data. The insect antifeedant activity of these secondary metabolites were evaluated against *S. litura* larvae.

Melanthera prostrata, insect antifeedants, diterpene

発表責任者：森本正則（masanori@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D3a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D3 会場

コマツナ内生菌 Arthrobacter sp. BR2S-6 株からの植物免疫を活性化する成分の精製

Purification of a plant immunity-activating component from Arthrobacter sp. BR2S-6

○篠原 正賢、島脇 遼、中島 将博、橋本 研志、朽津 和幸、古屋 俊樹（東京理科大院・創域理工）
○ Masataka Shinohara, Ryo Shimawaki, Masahiro Nakajima, kenji Hashimoto, Kazuyuki Kuchitsu, Toshiki Furuya (Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

【背景・目的】ある種の植物内生菌は植物の免疫機能を向上させることから、微生物農薬としての利用に期待が寄せられている。我々はこれまでに、植物培養細胞のエリシター誘導性の活性酸素種（ROS）生成を植物免疫の指標とした微生物評価系を確立し、本手法を用いて植物免疫活性化内生菌 *Arthrobacter* sp. BR2S-6 株をコマツナから取得している [1)]。本株をシロイヌナズナに内生させると、シロイヌナズナのトマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌に対する耐病性が向上することも明らかにした。本研究では、BR2S-6 株が植物免疫を亢進する成分の同定を目指し、解析を進めた。
【方法・結果】BR2S-6 株は、タバコ BY-2 細胞のエリシター誘導性 ROS 生成を亢進する [1)]。BR2S-6 株の培養液を細胞と細胞外成分に分けたところ、ROS 生成亢進活性は細胞だけでなく細胞外成分にも検出された。さらに、細胞外に存在する活性成分は熱によって失活する高分子化合物であることが明らかとなり、タンパク質である可能性が示唆された。そこで、硫安分画によるタンパク質の精製と LC-MS/MS によるアミノ酸配列解析を行ったところ、興味深いことに活性成分はプロテアーゼ様タンパク質であることが示唆された。現在、当該タンパク質をコードする遺伝子を大腸菌内で発現させ、異種発現タンパク質を用いてより詳細な解析を進めている。

Microorganisms that activate plant immune responses are useful for application as biocontrol agents in agriculture to minimize crop losses. We have established a method to detect plant immunity-activating microorganisms using elicitor-induced production of reactive oxygen species (ROS) in cultured plant cells as a marker of plant immune activation, and obtained *Arthrobacter* sp. BR2S-6.[1)] In this study, we analyzed the plant immunity-activating components produced by strain BR2S-6. The ROS-enhancing activity of strain BR2S-6 was detected in extracellular components. We purified a ROS-enhancing protein from extracellular components by ammonium sulfate fractionation and analyzed the amino acid sequence by LC-MS/MS, which interestingly suggested that the active component was a protease-like protein.

1) Kurokawa M, Nakano M, Kitahata N, Kuchitsu K, Furuya T, Sci Rep, 11, 7396 (2021).

biocontrol, endophyte, plant immunity

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3D3a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D3 会場

トウモロコシ実生のみどりの香り受容に関する構造活性相関解析
Structure-activity relationship analysis of green leaf volatile perception in maize seedlings
○松井 健二[1]、鷹取 雄介[1]、田中 康大[1]、藤田 賢也[1]、伊達 みのり[1]、渡辺 文太[2] ([1]山口大院創成科学、[2]慈恵医大)
○ Kenji Matsui[1], Yusuke Takatori[1], Yasuhiro Tanaka[1], Kenya Fujita[1], Minori Date[1], Bunta Watanabe[2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]The Jikei Univ.)

植物が食害を受けると食害特異的な揮発性化合物を生成し、放散する。まだ食害を受けていない近隣の植物はこうして放散された揮発性化合物を受容し、予見される食害に対して防衛能力を高めることがある。(*Z*)-3-ヘキセニルアセテート (Z3HAC) などのみどりの香りはこうした植物間コミュニケーションを媒介するが植物がどのような仕組みで Z3HAC を受容するのかは明らかでない。私達はトウモロコシ実生が Z3HAC に感度良く応答し、シスタチン遺伝子発現を誘導することからいくつかの Z3HAC 関連化合物を用いてトウモロコシ実生のみどりの香り受容における構造活性相関解析を実施した。 Z3HAC のエステル結合をエーテルに変換すると遺伝子誘導能を失った。一方エステルの酸部分を改変しても誘導能に大きな変化がなかった。さらに官能基がアルコールになった(*Z*)-3-ヘキセノール (Z3HOL) は Z3HAC と同程度の遺伝子発現誘導能を示した。Z3HOL で 3 位の二重結合は必須で、そのα側、ω側の鎖長はともに 3 炭素でなければならなかった。こうしたことからトウモロコシ実生は 3-ヘキセノールを特異的に受容することが明らかとなった。ただしこうした構造特異性は香り化合物曝露開始後 120 分で明確であったが香り化合物曝露 20 分後では確認できなかった。トウモロコシ実生には少なくとも 2 つの香り化合物受容システムが存在することが示唆される。

When a plant is damaged by feeding, it produces and releases feeding-specific volatile compounds. Neighboring plants may perceive these volatiles and increase their defense level. Green leaf volatiles such as (*Z*)-3-hexenyl acetate (Z3HAC) mediate such plant-plant communication, but it is not clear how plants perceive Z3HAC. We performed structure-activity relationship analysis of Z3HAC in the perception of green leaf volatiles by maize seedlings using several Z3HAC-related compounds. Changing the ester linkage of Z3HAC to ether resulted in the loss of the gene induction ability. Modification of the acid moiety of the ester little changed the inducibility. (*Z*)-3-Hexenol (Z3HOL) showed similar gene-inducibility as Z3HAC. The double bond at position 3 was required for Z3HOL, and both the α- and ω-side chain lengths had to be 3 carbons. These results indicate that maize seedlings specifically perceive 3-hexenol. This structural specificity was clear at 120 min after the start of exposure, but was not confirmed after 20 min of exposure. This suggests that maize seedlings have at least two different volatile perception systems.

green leaf volatiles, plant-plant communication, structure activity relationship

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3D3a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D3 会場

イネにおける遺伝子発現と根圏微生物叢の統合解析

Integrated analysis of rhizosphere microbiome and host trancriptome in rice

○山崎 真一[1]、山本 敏央[2,3]、林 誠[4]、市橋 泰範[1]（[1]理研 BRC、[2]農研機構、[3]岡山大、[4]理研 CSRS）
○ Shinichi YAMAZAKI[1], Toshio YAMAMOTO[2,3], Makoto HAYASHI[4], Yasunori ICHIHASHI[1]
([1]RIKEN, BRC, [2]NARO, [3]Okayama Univ., [4]RIKEN, CSRS)

イネ（*Oryza sativa*）は日本の農業における重要作物の 1 つであり、多くの遺伝学的、生理学的、栄養学的な解析が行われている。一方で、地下部にある多様な根圏微生物がホスト植物であるイネに与える影響についてはあまりよくわかっていない。本研究では、イネの栽培期間中において、根圏微生物叢の動態とイネの遺伝子発現の動態を追跡することにより、水田におけるイネと根圏微生物叢の相互作用を網羅的に明らかにすることを目的とした。圃場は沖積土と黒ぼく土、イネ品種はコシヒカリとタカナリ、時系列 4 ステージ（幼苗期、栄養生長期、生殖生長期、成熟期）において根圏微生物叢を 16S rRNA, ITS amplicon-seq 解析を用いて、葉の遺伝子発現を RNA-seq 解析を用いて推定した。微生物叢解析の結果、コシヒカリとタカナリでは根圏における鉄還元細菌の相対頻度に統計的な有意差が認められた。共起ネットワークに基づく微生物叢と遺伝子発現のマルチオミクス解析の結果、根圏の鉄還元細菌を含む微生物コミュニティと葉の鉄イオン恒常性に関わる遺伝子共発現モジュールに関連があることが明らかとなり、根圏微生物がイネの鉄栄養に影響を与える可能性が示唆された。

Rice (*Oryza sativa*) is one of the most important crops in Japanese agriculture and has been the subject of many genetic, physiological, and nutritional analyses. On the other hand, it is still poorly understood how the diverse rhizosphere microbes affect the host rice plant. The objective of this study was to comprehensively clarify the interaction between rice and rhizosphere microbiota in the paddy field by tracking the dynamics of rhizosphere microbiota and rice gene expression during the rice cultivation period. We estimated rhizosphere microbiome using 16S rRNA and ITS amplicon-seq analysis and leaf transcriptome using RNA-seq analysis of rice cultivars Koshihikari and Takanari in four time-series stages (seedling stage, vegetative adult stage, reproductive adult stage, and pre-harvest stage) in alluvial soil and andosol. Microbiome analysis showed a statistically significant difference in the relative abundance of iron-reducing bacteria in the rhizosphere between Koshihikari and Takanari. Multi-omics analysis of microflora and gene expression based on co-occurrence networks revealed an association between a rhizosphere microbial community containing iron-reducing bacteria and a gene co-expression module involved in iron ion homeostasis in leaves, suggesting that rhizosphere microbes might influence iron nutrition in rice.

Rice, Microbiota, Transcriptome

発表責任者：山崎真一（shinichi.yamazaki.ss@riken.jp）

講演番号：3D3a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D3 会場

生物界間接合のカギを握る供与菌染色体遺伝子のゲノムワイドな探索

Identification of key genes in bacterial donor chromosome that are crucial for trans-kingdom conjugation -a genome-wide screening-

○守口 和基[1,2]、中村 和之[1]、高橋 雄大[2]、井上 侑哉[1]、清川 一矢[1]、鈴木 克周[1]（[1]広島大院統合生命、[2]広島大理）

○Kazuki Moriguchi[1,2], Kazuyuki Nakamura[1], Yudai Takahashi[2], Yuya Inoue[1], Kazuya Kiyokawa[1], Katsunori Suzuki[1] ([1]Graduate School of Integrated Life Science, Hiroshima Univ., [2]School of Science, Hiroshima Univ.)

IncPα（IncP-1α）型プラスミドはシュードモナドータ門細菌を広く宿主とする広宿主域プラスミドとして知られており、抗生物質耐性遺伝子などを広く拡散させる。そのプラスミド伝達域はシュードモナドータ門を超え、古細菌や真核生物にも及ぶ。この広範囲に及ぶ伝達には、プラスミドがコードする接合関連遺伝子群（*tra*, *trb* 遺伝子群）が必要なことが知られているが、供与菌の染色体にコードされる遺伝子の関与については解析が進んでいない。今回我々の研究グループでは、IncPα 型プラスミドの接合伝達に関与する供与菌側染色体遺伝子の解析を、大腸菌ノックアウト変異株を供与菌、出芽酵母を受容菌に用いた生物界間接合系によってゲノム網羅的に進めた。

3884 変異株からのスクリーニングの結果、生物界間接合効率低下変異体としてΔ*priA* 及びΔ*aceE* 変異株が単離された。これら変異株ではプラスミドを持たせた場合に生育阻害が観察されることから、プラスミドの複製・維持が阻害されることにより生物界間接合伝達効率が低下したと推測した。しかし、大腸菌間の接合伝達効率に有意な低下は観察されず、生物界間接合特異的な低下であることが明らかになった。

IncPα（IncP-1α）type plasmids are known for their broad host range among bacteria in Pseudomonadota, and spread various genes such as antibiotic resistance genes. However, the transfer range of these plasmids is wider than their host range, and includes some archaea and eukaryotes. For the transfer, plasmid-encoded genes such as *tra* and *trb* genes are required, however, the role of genes encoded on the donor chromosome has not been well studied. Therefore, we performed a genome-wide screening using a trans-kingdom conjugation system to identify such genes. This system uses *Escherichia coli* knock-out (KO) mutants as donors and *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 as a recipient.

From the 3,884 KO mutants screened, we identified two mutants, Δ*priA* and Δ*aceE*, that showed reduced trans-kingdom conjugation efficiency. These mutants also showed growth defects when carrying plasmids used in the screening. These results suggest that the decreased trans-kingdom conjugation efficiency may be due to defects in plasmid replication or maintenance. However, when a *E. coli* strain was used as a recipient, there was no significant difference in conjugation efficiency between the two donor mutants and their parental strain. This suggests that the decreased conjugation efficiency in these mutants is specific to trans-kingdom conjugation.

Trans-kingdom conjugation, Horizontal gene transfer, IncPα plasmid

発表責任者：守口和基（kmoriguc@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3D3a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 D3 会場

植物発酵物（FBP）による青枯病防除効果の作用機序解明
Functional investigation of Fermented Botanical Product against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacaerum*.

○水野 邑里[1]、竹中 航平[1]、館内 雄介[1]、緋田 安希子[2]、加藤 純一[2]、藤岡 耕太郎[1]、鳥居 英人[1]
([1]万田発酵株式会社、[2]広大院統合生命)
○Yuri MIZUNO[1], Kohei TAKENAKA[1], Yusuke TATEUCHI[1], Akiko HIDA[2], Junichi KATO[2], Kotaro FUJIOKA[1], Hideto TORII[1] ([1]Manda Fermentation Co., Ltd., [2]Hiroshima Univ.)

青枯病は土壌伝染性の細菌である *Ralstonia solanacearum*（*Rs*）によって引き起こされる重要な植物病害の 1 つであり、53 科 200 種を超える広い宿主範囲を示す。植物発酵物（FBP： Fermented Botanical Product）は、41 種類以上の果実類・穀類・海藻類・野菜類などを 3 年以上発酵・熟成した発酵物である。前大会では FBP の施用がトマトを含む 10 科の植物の青枯病防除に有効であること、トマト根のリグニンの産生を促進させて発病抑制する可能性を報告した。本研究では、特に青枯病被害が多いナス科に対する FBP の防除効果や作用機序解明を目的として検証を行った。FBP はトマト以外のナス科(ナス、ピーマン、パプリカ)に対しても防除効果を示した。次に水または 0.5% FBP を 48 時間浸漬処理したトマト根を RNA-seq 解析した結果、Phenylalanine ammonia lyase (PAL)を含む、複数のリグニン合成関連遺伝子の発現量が FBP 区で上昇した。さらに *Rs* 感染条件下の土壌細菌叢解析および土壌中の耐熱性菌数を測定した結果、青枯病菌への拮抗作用が報告されているバチルス属菌の割合とバチルス属を含む耐熱性細菌数が FBP 区で増加した。以上から、FBP はリグニン合成などの植物免疫に関わる遺伝子発現へ作用することや、土壌細菌叢への作用を介して青枯病防除することが示唆された。
Bacterial wilt is one of the most important plant diseases caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), which have a wide host range of over 200 species in 53 families. Fermented Botanical Product (FBP) is fermented and aged for more than 3 years from more than 41 kinds of fruits, grains, seaweeds and vegetables. Previously, we reported that FBP application is effective in controlling bacterial wilt in 10 families including tomatoes, and that FBP may control bacterial wilt by increasing the lignin content in tomato roots. This study focused to verify the efficacy of FBP in controlling bacterial wilt on Solanaceae plants and to elucidate their mechanism of action. FBP was confirmed to control bacterial wilt on eggplant, bell pepper, and paprika. Also, RNA-seq analysis of tomato roots soaked in water or 0.5% FBP for 48 hours confirmed that several genes involved in lignin synthesis, including phenylalanine ammonia lyase (PAL), were activated by FBP. Furthermore, we analyzed the soil microbiome and quantified the number of thermotolerant bacteria in the soil after inoculating tomatoes with *Rs*. The results showed that the FBP group increased the percentage of *Bacillus* spp. and the number of thermotolerant bacteria, including *Bacillus* spp. that have been reported to have antagonistic effects on the *Rs*. These results suggested that FBP controls bacterial wilt through its effect on gene expression involved in plant immunity, such as lignin synthesis, and through its effect on the soil microbiome.

Bacterial wilt, Ralstonia solanacearum, Fermented Botanical Product

講演番号：3D3a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 D3 会場

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来の鞭毛タンパク質 flagellin の菌株間に存在するイネ免疫の誘導特異性決定機構
Mechanism of specific plant immune induction by flagellins isolated from *Acidovorax avenae*
○松村 ひかり[1]、村上 貴彦[1]、桂木 雄也[2]、平井 洋行[1]、中川 幸彦[1]、蔡 晃植[1,2,3] ([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○HIKARI MATSUMURA[1], TAKAHIKO MURAKAMI[1], YUYA KATSURAGI[2], HIROYUKI HIRAI[1], YUKIHIKO NAKAGAWA[1], FANG-SIK CHE[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-sci. and Tech., [2]Dept. of Bio-sci., Nagahama Inst. of Bio-sci. and Tech., [3]GERI, Nagahama Inst. of Bio-sci. and Tech.)

イネは植物病原細菌 *Acidovorax avenae* の非病原性 N1141 菌株の flagellin を認識して免疫反応のひとつである PAMPs-triggered immunity (PTI)を誘導するが、病原性 K1 菌株の flagellin は認識できず PTI を誘導しない。そこで、両 flagellin 間に存在する PTI 誘導の特異性決定機構について調べるため、両 flagellin の発現タンパク質を作製しイネに処理したところ、どちらの発現タンパク質もイネの PTI を誘導した。次に、両 flagellin に付加している糖鎖を調べたところ、N1141 flagellin には 178 番目、183 番目、351 番目の Thr 残基に質量 551 の糖鎖が付加しており、K1 flagellin には 178 番目、183 番目、212 番目の Ser 残基と 351 番目の Thr 残基に質量 540 の糖鎖が付加していた。さらに、この糖鎖の構造解析の結果、両糖鎖は 3 糖で構成され、非還元末端の糖のみが異なっていることも明らかになった。そこで、糖鎖が欠失した flagellin を作成したところ、糖鎖欠失 N1141 flagellin だけでなく糖鎖欠失 K1 flagellin も PTI を誘導した。また、互いの糖鎖を交換した flagellin を作製したところ、N1141 型糖鎖 K1 flagellin は PTI を誘導したが、K1 型糖鎖 N1141 flagellin は PTI を誘導しなかった。両 flagellin の非還元末端糖のみを欠失した flagellin はどちらも PTI を誘導したことから、両 flagellin の PTI 誘導の特異性は糖鎖の非還元末端糖に依存することが示された。そこで、イネに N1141 flagellin と K1 flagellin を処理し、処理後の flagellin について調べたところ、N1141 flagellin は処理直後から認識部位である CD2–1 を含むいくつかのペプチド断片へと分解されたが、K1 flagellin は分解されなかった。このことから、K1 flagellin は糖鎖構造の違いにより分解されず、その結果認識部位である CD2–1 フラグメントが生成しないため、PTI を誘導できない可能性が示された。

Rice PTI is induced by N1141 flagellin, but not K1 flagellin. Analysis using recombinant N1141 and K1 flagellins, site mutagenesis flagellins and sugar chain-deleted flagellin revealed that the sugar chain of K1 flagellin prevent the flagellin recognition and PTI induction. To clarify the molecular mechanism of the recognition inhibition by the sugar chain, degradation of N1141 and K1 flagellin by rice was examined. Treatment of rice cells with N1141 flagellin produced CD2–1 fragment, a recognition site, but no such fragment was produced from K1 flagellin.

flagellin, PTI, sugar chain

発表責任者：松村ひかり（b119100@m.nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：3D3a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 D3 会場

共生菌由来の側根形成を誘導する低分子化合物の探索

Isolation of Lateral Root-Inducing Compounds from the Endophytic Fungus

○松浦 大空、小川 拓水、岡澤 敦司、太田 大策（大阪公大院農）
○Hirotaka MATSUURA, Takumi OGAWA, Atsushi OKAZAWA, Daisaku OHTA (Osaka Met. Univ.)

植物は，根圏の生物的・非生物的刺激に対して，根系を介して応答する．根圏には病原微生物の他に，高等植物体内に共生して宿主に有益な効果をもたらす菌類や細菌が存在する．これらの微生物はエンドファイトと総称される．本研究で用いる *Serendipita indica* は宿主植物の根の内部で共生する担子菌に属するエンドファイトであり，宿主に対して生育促進効果をもたらすことが報告されている．先行研究から *S. indica* を含むいくつかのエンドファイトが発根促進を誘導することが報告されているため，本研究では *S. indica* 由来の側根形成を誘導する化合物の同定を試みた．透析チューブ（分画分子量 3500）に封入した *S. indica* を液体培地で培養して培養液のみ（*S. indica* culture media, SCM）を回収した．オーキシンの蓄積を可視化できる *DR5::GUS* シロイヌナズナを利用して SCM の側根誘導活性を定量的に評価したところ， SCM の濃度依存的に側根誘導部位が増加した．これらのことから，SCM 中に拡散した低分子化合物が側根形成を誘導することが示唆された．本研究では HPLC を利用した側根形成を誘導する化合物の精製条件を検討し，*S. indica* 由来の低分子化合物の単離，同定を試みる．これらの低分子化合物について，バイオスティミュラントとしての活用や持続可能な農業に向けた人工的な化学農薬の削減が期待される．

Plants recognize biotic and abiotic stimulation of rhizosphere through their roots. Some fungi and bacteria have been shown to beneficial effect on host plants as opposite to pathogenic microorganisms and symbiotically interact with host plats in rhizosphere. The microorganisms living within the roots of host plants are known as endophytes. *Serendipita indica* is an endophytic fungus and symbiotically exists within roots of host plants, facilitating growth and stress tolerance of hosts. In this study, *S. indica* was encapsulated in a dialysis membrane tube (3500 Da) and cultivated in liquid medium to obtain (*S. indica* cultivation medium, SCM). Auxin-responses induced by SCM were visualized using *DR5::GUS Arabidopsis thaliana*. Quantitative measurement of lateral root (LR) formation in A. thaliana suggested that SCM contained diffusible compounds inducing LR. In this study, isolation and identification of the diffusible compounds with HPLC produced by *S. indica* that induce LR in A. thaliana is ongoing. LR-inducing diffusible compounds will be utilized as a biostimulant which has a lower impact on the environment and contribute to reducing the usage of synthetic pesticides and fertilizers for sustainable agriculture.

endophyte, plant roots, diffusible small compounds

講演番号：3D3a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 D3 会場

寄生雑草ヤセウツボにおける炭素収奪経路の解明
Analysis of Carbon Deprivation Pathways in The Parasitic Weeds Orobanche minior
○雑賀 恵梨[1]、松本 萌[3]、1 小川 拓水[3]、福崎 英一郎[2]、太田 大策[3]、岡澤 敦司[3] ([1]大阪府大生命環境、[2]大阪大院工、[3]大阪公大)
○Eri SAIGA[1], Moe MATSUMOTO[3], Takumi OGAWA[3], Eichiro FUKUZAKI[2], Daisaku OHTA[3], Atsushi OKAZAWA[3] ([1]Osaka Pre. Univ., [2]The Univ. of Osaka, [3]Osaka Met. Univ.)

一般に植物は独立栄養植物だが、ハマウツボ科（Orobanchaceae）ハマウツボ属（*Orobanche* sp.）は光合成能を失った全寄生植物であるため、宿主の栄養に依存して生活している。ハマウツボ科の植物は世界中で作物の収量減少の原因となっており、特にアフリカにおいて大きな被害を与えている。しかし、ハマウツボ科がどのような代謝メカニズムで宿主から栄養を収奪しているかは未解明であり、代謝メカニズムの解明は食料安全保障や SDGs の達成のための課題となっている。本研究では寄生植物にヤセウツボ（*Orobanche minor*）、宿主にムラサキツメクサ(*Trifolium pratense*) を用いて寄生系を確立し、ヤセウツボにおけるムラサキツメクサからの炭素収奪代謝経路の解明を目標として研究を進めている。先行研究において、ライゾトロンで生育させたムラサキツメクサとヤセウツボの GC-MS による一次代謝物のメタボロミクスが行われ、その結果両者の一次代謝物は明確に区別されることが明らかとなった。主成分分析の PC3 に最も寄与していたガラクチノールは糖転流に関わる代謝物として知られているため、現在はガラクチノールの代謝に着目してヤセウツボの生育段階および器官毎の代謝物量の変化を解析している。さらに、安定同位体 ^{13}C を用いたトレーサー実験をもとにヤセウツボ中の炭素の流れを明らかにする。

In general, plants are autotrophy, but *Orobanche* sp. (Orobanchaceae) is a holoparasite which lacks photosynthesize and thus depends on the nutrition of its host for survive. Orobanchaceae is causing crop yield loss around the world, especially in Africa. However, the metabolic mechanisms of carbon deprivation from the host by Orobanchaceae remain poorly understood. Revealing these mechanisms is a challenge for achieving food security and the SDGs. In this study, we established a parasitic system by using *Orobanche minor* as a parasitic plant and *Trifolium pratense* as a host. We are investigating the metabolic pathway of carbon deprivation from *T. pratense* by *O. minor*. In previous study, metabolomics of the primary metabolites of *T. pratense* and *O. minor* grown in rhizotrons was performed using GC-MS, and the results of PCA showed that the primary metabolites of both were clearly distinct. Galactinol, which had the highest contribution to PC3, is known to be a metabolite involved in the sugar transport. Therefore, we are currently comparing changes in metabolite levels in *O. minor* at different growth stages and organs, focusing on the galactinol metabolism. In addition, we will determine the flow of carbon deprivation in *O. minor* using tracer experiments with the stable isotope ^{13}C.

parasitic weeds, metabolic pathway, carbon deprivation

発表責任者：雑賀恵梨（sec02037@st.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3D3a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 D3 会場

根圏合成コミュニティにおいて根粒共生を促進する微生物の解析
Analysis of microbes that promote rhizobial symbiosis in rhizosphere synthetic community
○野村 結南[1]、頼永 萌々佳[1]、西岡 友樹[2]、玉木 秀幸[2]、壽崎 拓哉[1]、竹下 典男[1] ([1]筑波大・生命環境系、[2]産総研・生物プロセス)
○Yuina NOMURA[1], Momoka YORINAGA[1], Tomoki NISHIOKA[2], Hideyuki TAMAKI[2], Takuya SUZAKI[1], Norio TAKESHITA[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]AIST)

根圏には根が放出する成分を養分とする微生物が集合し、植物の生育に影響を与える。なかでも根粒菌は、マメ科植物の根に根粒を形成して窒素固定を行い宿主植物の生育を促進する。メタゲノム解析により、根圏に存在する微生物の種類や割合が明らかになってきたが、植物・微生物間や微生物同士の相互作用の理解は限定的である。これまで、圃場由来の土壌で生育させたミヤコグサの根圏から細菌 45 属 159 株と、糸状菌 *Fusarium oxysporum* (Fo 株)を単離した。滅菌したバーミキュライトを用いてミヤコグサをポット栽培し、細菌群と Fo を任意の組み合わせで加えることで根圏合成コミュニティを構築し、植物の生育や根圏の細菌叢解析を行った。本研究では、この根圏合成コミュニティに、ミヤコグサ根粒菌である *Mesorhizobium loti* を接種し、根粒共生を促進する微生物を探索した。根粒菌と細菌群を、ミヤコグサに接種してポット栽培したところ、根粒形成と植物の生育促進を確認した。根圏細菌叢をアンプリコン解析によって比較し、共起ネットワーク解析により細菌叢形成に重要な細菌群を明らかにした。そこから選抜した細菌を根粒菌と共にミヤコグサに接種したところ、植物の生育・根粒形成が促進された。一方、Fo はミヤコグサの生育を促進することが示されていたが、根粒菌と共にミヤコグサに接種すると、さらに植物の生育・根粒形成の促進が確認できた。今後、根粒共生を促進する微生物の分子機構を解析する。

There are many microbes in the rhizosphere, which use nutrients released by roots and play an important role in plant health. Especially, rhizobia promote host plant growth by forming nodules on legume roots. Metagenomic analysis has revealed the proportions of various microbes in the rhizosphere, but interactions among them are unknown well. We isolated bacterial 45 genera 159 strains and the fungus *Fusarium oxysporum* (strain 'Fo') from the rhizosphere of *Lotus japonicus*. We established "synthetic community" by inoculating them to pot-growing *L. japonicus*. We added *Mesorhizobium loti*, the rhizobia of *L. japonicus*, to this model to analyze microbes that promote rhizobial symbiosis. Rhizobacterial communities with and without the rhizobia were analyzed by amplicon and network analyses, suggesting that some bacteria are important for the microbiota formation with the rhizobia. Fo, which promotes the growth of plant, further promoted plant growth and nodule formation when inoculated with the rhizobia. We'll analyze the molecular mechanisms by the microbes that promote the rhizobial symbiosis.

microbiota, rhizobia, symbiosis

講演番号：3D3a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 D3 会場

微生物接種したダイズにおける 1 細胞レベルの根毛遺伝子発現解析

Single cell level root hairs RNA-seq in soybeans inoculated with microbe

○蘇 千雅[1]、松永 浩子[2,3]、SAMUEL Ashok[2]、奥平 美里[2]、濱崎 英史[4]、松井 南[4,5]、竹山 春子[1,2,3,6] ([1]早大院・先進理工、[2]早大・ナノライフ創新研、[3]産総研・早大 CBBD-OIL、[4]理研・CSRS、[5]横浜市大・木原生物学研、[6]早大・生命動態研)

○ Qianya SU[1], Hiroko MATSUNAGA[2,3], Ashok SAMUEL[2], Misato OKUDAIRA[2], Hidefumi HAMASAKI[4], Minami MATUSI[4,5], Haruko TAKEYAMA[1,2,3,6] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]CSRS, RIKEN, [5]Kihara Inst. Biol. Res., Yokohama City Univ., [6]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

ダイズと根粒菌の共生は、収量・品質の向上に繋がる。この共生関係は、根粒菌が根表面の根毛に感染することから始まる。根粒菌感染時、根毛内の転写状態が変化することが知られており、詳細な感染機構の理解には、根毛レベルでの遺伝子発現動態を捉えることが有効である。

感染機構の解明を目指した先行研究では、数万本以上の根毛を 1 つの解析対象として遺伝子発現解析を行っていたため、様々な感染段階の根毛を区別し解析を進めることが困難であった。そこで本研究では、根毛 1 本レベルでの RNA-seq 法の開発、及び根粒菌感染機構の解明を目指した。

本実験では根粒菌（*Bradyrhizobium japonicum* USDA110）を接種したダイズ及び、非接種のダイズを用意した。2 日間の培養後、根毛 1 本レベルを微小組織採取装置で採取し RNA-seq を行った。

その結果、先行研究より感染ダイズ特異的に発現する遺伝子を 20 倍以上検出することができた。加えて根毛 1 細胞レベルの RNA-seq を解析した結果、非感染細胞・感染前細胞・感染細胞と継時的に変化する根毛感染動態の詳細な遺伝子発現の遷移を捉えることが出来た。

本研究は内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（JPJ009237、管理法人:生研支援センター）によって実施されました。

Soybean can improve yield and quality by symbiosis with rhizobia. This symbiosis begins when rhizobia infect root hairs on the soybean root surface. To elucidate the detailed infection mechanism, it is effective to conduct RNA-seq at the root hair level.

In previous studies, RNA-seq was performed on more than thousands of root hairs, making it difficult to distinguish root hairs at various infection stages. In this study, we aimed to develop an RNA-seq method at the single cell level root hair and to understand the rhizobial infection mechanism.

In this experiment, soybean inoculated with rhizobia and soybean inoculated with rhizobia were prepared. After 2 days incubation, single-cell level root hairs were collected using a microdissection system and RNA-seq was performed.

As a result, single cell level root hair RNA-seq could extract 20 times more genes specifically expressed in infected soybeans than in the previous study. In addition, this method could reveal a detailed transition of infection dynamics in root hairs.

soybean, root hairs, rhizobia

発表責任者：竹山春子（haruko-takeyama@waseda.jp）

講演番号：3D3p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D3 会場

Relationship among arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization rate, plant growth, nutrient uptakes, and soil bacterial activities

○YIHAO HUANG, Asuka Okazaki, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo (Ritsumeikan University)

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) undoubtedly increase phosphorus and nitrogen uptakes in plants. However, the colonization of AMF in plant root and bacterial biomass have been not deeply understood. The objectives of this study were to investigate the colonization rate of AMF in relation to plant growth, nutrient uptake, and soil bacterial biomass. Cultivation experiment was conducted on SUSUKI (Miscanthus sinensis) for three months. Plants were cultivated in pot added with AMF and no AMF (control treatment). During cultivation, total bacterial biomass and phosphorus circulation activities were measured weekly, and nitrogen circulation activities and AMF colonization were measured biweekly. Plant growth, phosphorus uptake, nitrogen uptake in plant were also determined.

Total bacterial biomass was strongly correlated with phosphorus circulation and nitrogen circulation as well as AMF colonization rate in eight weeks. Dry weight and stem length in AMF treatment were higher than those in the control treatment. Phosphorus uptake in AMF treatment was significantly enhanced, while nitrogen uptake was not different between two treatments. For bacterial activities, both phosphate and nitrogen circulation activities in AMF treatment were higher than those in the control. The change of bacterial community in these two treatments will be investigated.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), nutrient uptakes, soil bacterial activities

講演番号：3D3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D3 会場

大腸菌染色体挿入法を用いたアピゲニンの生産

Production of apigenin using *Escherichia coli* chromosome insertion method

○小林 美稀[1]、石水 毅[2]、駒 大輔[3]、大橋 貴生[1] ([1]摂南大院、[2]立命館大、[3]大阪産業技術研)
○Miki KOBAYASHI[1], Takeshi ISHIMIZU[2], Daisuke KOMA[3], Takao OHASHI[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Ritsumei Univ., [3]ORIST)

【背景】植物特化代謝産物の一種であるフラボノイドは、その多くが単糖やオリゴ糖が結合したフラボノイド配糖体として多種多様な構造と機能を有する。フラボノイド配糖体の一種であるアピインはパセリやセロリ等のハーブ植物に多く含まれる。アピインは抗不安作用等の機能性があると考えられているが、機能性に果たす糖鎖部分の役割は未解明である。我々は、先行研究においてアピイン生合成遺伝子群を導入した組換え大腸菌を用いて、アグリコンアピゲニンを基質としたアピイン発酵生産を達成した。本研究では、L-フェニルアラニン（L-Phe）を基質としたアグリコンであるアピゲニンの発酵生産を目的とし、6 つのアピゲニン生合成遺伝子を大腸菌ゲノムに挿入してアピゲニン生産株の構築を試みた。

【方法・結果】大腸菌を宿主とし、アピゲニン合成遺伝子にフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、ケイ皮酸-4-水酸化酵素、4-クマル酸 CoA リガーゼ、カルコン合成酵素、カルコン異性化酵素、フラボン合成酵素 I を使用した。大腸菌で Red リコンビナーゼを発現させ、各アピゲニン合成遺伝子断片を相同組換えにて大腸菌ゲノムに挿入した。その後、アピゲニン合成遺伝子 6 種全ての単一遺伝子挿入株を取得し、バクテリオファージに感染させ溶菌したライセート溶液を用いて P1 形質導入を行い多重遺伝子挿入株を構築した。各組換えアピゲニン合成タンパク質の発現は、SDS-PAGE にて確認した。次に、この大腸菌多重挿入株を生体触媒とし、基質 L-Phe を添加しアピゲニンの発酵生産を行った。生成物の逆相 HPLC 解析の結果、アピゲニンと共溶出するピークを確認した。今後の展開として、本研究で構築したアピゲニン生産株にアピイン合成必須遺伝群を大腸菌ゲノムに導入することでアピインの多量生産系の確立を目指す。

Apiin, one of plant-specific metabolites, is abundant in herbal plants. In a previous study, we achieved the production of apiin from the aglycone apigenin using recombinant *Escherichia coli*. In this study, we attempted to produce apigenin from L-phenylalanine (L-Phe) using the recombinant *E. coli* simultaneously expressing six apigenin biosynthetic genes. The recombinant *E. coli* was constructed using red recombinase system, combined with the transduction by P1 bacteriophage. Apiin production was conducted using the recombinant *E. coli* and L -Phe. Product analysis was performed by RP-HPLC, resulting in a detection of a peak co-eluting with apigenin standard, which pave the way for the apiin production in a recombinant *E. coli*.

Escherichia coli, Apigenin, Flavonoid

発表責任者：大橋貴生（takao.ohashi@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3D3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D3 会場

鉄栄養変化がイネ体内の鉄恒常性に及ぼす影響
Effects of iron nutritional changes on iron homeostasis in rice.
○岡村 幸輝、高橋 啓太、長坂 征治（東洋大院）
○Tomoki Okamura, Keita Takahashi, Seiji Nagasaka (Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ)

世界の土壌の約 3 分の 1 はアルカリ性土壌であり、アルカリ性土壌では鉄が難溶性の水酸化第二鉄($Fe(OH)_3$) となるため、植物は必須元素である鉄を十分に利用できない。イネ科植物はムギネ酸類を土壌に分泌することで、不溶化した 3 価鉄を 3 価鉄―ムギネ酸錯体として吸収する独自の鉄吸収機構（StrategyⅡ）を有しており、高いアルカリ耐性を持つことが知られている。ムギネ酸類は、鉄吸収機能に加え植物体内においてもさまざまな金属と錯体を形成することで、金属輸送に関与することが示唆されている。本研究では、イネをアルカリ条件下及び鉄栄養変化条件下で水耕栽培し、植物組織及び道管液中のデオキシムギネ酸（DMA）、ニコチアナミン（NA）、金属含有量の変化を分析した。鉄欠乏処理区の根と葉では、対照区と比べて DMA 濃度が 2 倍程度に上昇し、導管液では 20 倍程度の上昇が認められた。一方で、鉄過剰処理区の根、及び導管液中の DMA 濃度は対照区と有意な差を示さなかったが、葉の DMA 濃度は鉄欠乏処理区よりも高い値を示した。鉄欠乏処理区の植物に注目すると、葉身の切除後に 1 時間で溢出した導管液中の DMA 量は、根組織中の DMA 量の 3 分の 1 に達していることから、DMA の多くが植物体内を輸送されていることが示唆された。現在、組織中、道管液中の金属濃度の分析結果と合わせて植物体内での金属輸送について解析を進めている。

About 30% of the world's soils are alkaline, and iron deficiency occurs in alkaline soils because of the low solubility of iron in the form of ferric hydroxide. Graminaceous plants have a unique Fe absorption mechanism (Strategy II). They secrete mugineic acids to the rhizosphere to form trivalent iron and mugineic acids complexes for iron uptake. It is also thought that mugineic acid forms complexes with various metals in the plant body and is involved in metal transport. Rice plants (*Oryza sativa* 'Nipponbare') were grown hydroponically under alkaline, iron-deficient or iron-overload conditions, and we measured the concentration of deoxymugineic acid (DMA), nicotianamine (NA), and various metal contents in tissue and xylem sap. In the iron-deficient treatment, DMA concentrations in tissues were twice as high as in the control, and conduit sap exhibited a 20-fold increase. In the iron-overloaded treatment, DMA concentrations in roots and xylem sap showed no significant difference from the control, while leaves exhibited higher concentrations than in the iron-deficient treatment. Combining these results with those of metal concentrations, we are currently analyzing the metal transport within the plants.

alkaline stress, Iron deficiency, mugineic acid faimily phytosiderophore

発表責任者：岡村幸輝（s39102200052@toyo.jp）

講演番号：3D3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D3 会場

鉄過剰条件におけるイネの鉄輸送に関与する化合物の同定
Identification of compounds involved in iron transport in rice under excess iron conditions
○高橋 啓太、岡村 幸輝、長坂 征治（東洋大院生命）
○Keita TAKAHASHI, Tomoki OKAMURA, Seiji NAGASAKA (Grad. Sch. of Life Sci., Toyo Univ)

イネ科植物は、根からムギネ酸類を分泌し、鉄を 3 価鉄－ムギネ酸錯体として吸収する機構（Strategy II）を持つため、アルカリ土壌などの鉄欠乏条件に対する耐性が高いことが知られている。一方、酸性土壌での鉄の溶出などによる鉄過剰ストレス条件下における鉄の吸収や輸送形態については未解明な点が多い。鉄過剰条件でイネを栽培し導管液中のデオキシムギネ酸（DMA）と鉄濃度を比較したところ、DMA 量に対して鉄の量が高くなっていた。導管液は約 pH4.8 であり水酸化第二鉄の溶解度から予想されるよりも多くの鉄が溶解しているため、鉄は Fe-DMA 錯体以外の形態で可溶化して輸送されている可能性が示唆された。本研究では鉄の溶解に関与する化合物の特定を試みた。

鉄過剰条件で栽培したイネの導管液をサイズ排除 HPLC で分画し、各画分の金属含量を ICP-MS で測定したところ、鉄は 44 番目、マンガンは 35 番目の画分に分離された。一方で各画分を QTOF 型質量分析で測定したところ、DMA が 43 番、ニコチアナミン（NA）は 37 番に分離されていた。それぞれの溶出画分が異なるため、DMA、NA は鉄、マンガンの輸送に直接関与していないことが示唆された。現在金属が分離された画分を中心に、金属の溶解に関与している化合物の同定を進めている。

Graminaceous plants, including rice, secrete mugineic acids to tolerate iron-deficient conditions like alkaline soils. However, iron uptake and transport under excess iron conditions, such as acidic soils, still need to be clarified. When rice was cultivated under excess iron conditions, the iron exceeded the amount of the deoxymugineic acid (DMA) in xylem sap. The pH of the xylem sap was about 4.8, and more iron was dissolved than expected from the solubility of $Fe(OH)_3$, suggesting that iron may be solubilized and transported in a form other than the Fe-DMA complex. In this study, we attempted to identify compounds involved in iron dissolution.

The xylem sap from rice grown under excess iron conditions was fractionated by SEC-HPLC, and the metal contents of each fraction were determined by ICP-MS. Iron was detected in the 44th fraction and manganese in the 35th. Conversely, when each fraction was analyzed by QTOF-MS, DMA and nicotianamine (NA) were detected in the 43rd and 37th, respectively. Sicne DMA and NA were separated into different fractions from metals, they are not directly involved in the dissolution of iron and manganese. Currently, we are focusing on the fraction from which metals are fractionated and attempting to identify the compounds involved in metal dissolution.

fractionation of xylem sap, iron chelator, compound analysis

発表責任者：高橋啓太（s39102200175@toyo.jp）

講演番号：3D3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D3 会場

Synechocystis sp. PCC 6803 の光合成に関わるイオン輸送体の解析
Involvement of ion transport protein in photosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803
○浜本 晋[1,2]、神保 晴彦[3]、田野井 慶太朗[1]、田中 寛[4]、川崎 寿[1,2]([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]東大院・総合文化、[4]東工大院・化生研)
○ Shin HAMAMOTO[1,2], Haruhiko JIMBO[3], Keitaro TANOI[1], Kan TANAKA[4], Hisashi KAWASAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo, [3]Grad. Sch. Arts Sci., Univ. of Tokyo, [4]Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

光合成において、ATP 合成反応に利用されている H^+駆動力は、チラコイド膜を挟んだ H^+勾配と膜電位の和であるため、膜電位の調節を担うイオン輸送体は光合成の制御に重要な役割を果たしている。光環境への適応に関わる三つのイオン輸送体がシロイヌナズナでは報告されている一方で、シアノバクテリアでは光合成制御を担うイオン輸送体の報告は極めて少ない。本研究では、植物のチラコイド膜イオン輸送体の *Synechocystis* sp. PCC 6803 におけるホモログである Stc1 の光合成への影響を明らかにするために Stc1 の詳細な解析を行なった。大腸菌を発現系とした Stc1 のイオン輸送活性を ICP-MS で解析したところ K^+の取込みが確認された。さらに、Stc1 を発現した大腸菌を用いて電気生理学的解析手法であるパッチクランプ法による Stc1 の測定を行なった結果、Stc1 は陽イオン透過活性とともに弱い電位依存的な特性を示した。Stc1-6×His tag を発現した *Synechocystis* sp. PCC 6803 のチラコイド膜画分と細胞膜画分を単離して抗 His tag 抗体を用いて解析したところ、チラコイド膜画分のみから Stc1 が検出された。次に、*stc1* の単一遺伝子欠損株を BG11 培地で培養したところ野生型と比較して生育が抑制されたが、KCl の添加により生育が回復した。さらに、*stc1* 欠損株の光合成活性を測定したところ、光化学系 II から光化学系 I への電子伝達速度の低下によって光合成活性が抑制されていた。以上の結果より、Stc1 はチラコイド膜に局在して K^+濃度の調節を行うことにより光合成活性を制御する新規の調節因子であることが示唆された。

In photosynthesis, ion transporter responsible for regulating membrane potential play an crucial role in photosynthesis. In this study, we performed analysis of Stc1, a homologue of the plant membrane ion transporter in *Synechocystis* sp. PCC 6803, to determine its effect on photosynthesis. Stc1 was heterologously expressed in *E. coli* to examine the ion transport activity and showed cation transport activity. Plasma membrane and thylakoid membrane fraction were obtained from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and localization of Stc1 was analyzed and Stc1 was detected only in the thylakoid membrane fraction. Next, *stc1* mutant was cultured in BG11 medium and growth was suppressed compared to the wild type, though the growth was restored by the addition of KCl. Furthermore, photosynthetic activity of the *stc1* deficient strain was suppressed. These results suggest that Stc1 is a novel regulator of photosynthetic activity by localizing to the thylakoid membrane and regulating K^+ concentration.

ion transport, photosynthesis

発表責任者：川崎寿（ukawasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D3p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D3 会場

ブラシノステロイド新規シグナル伝達因子 BPG4 による葉緑体ホメオスタシス維持メカニズムの解明
Analysis for the molecular mechanism to maintain chloroplast homeostasis by a novel BR signaling factor BPG4

○立花 諒[1]、阿部 晋[2,3]、丸上 萌々[2,3]、山上 あゆみ[1]、明間 莉乃[1]、大橋 隆生[1]、西田 快世[1]、野崎 翔平[4]、宮川 拓也[1]、田之倉 優[5]、Kim Jong-Myong[3,5,6]、関 原明[3]、稲葉 丈人[7]、松井 南[3]、伊福 健太郎[8]、久城 哲夫[2]、浅見 忠男[5]、中野 雄司[1]([1]京大院生命科学、[2]明治大院農、[3]理研・CSRS、[4]筑波大・院生命環境、[5]東大・院農学生命、[6]アクプランタ株式会社、[7]宮崎大農、[8]京大院農)
○Ryo TACHIBANA[1], Susumu ABE[2,3], Momo MARUGAMI[2,3], Ayumi YAMAGAMI[1], Rino AKEMA[1], Takao OHASHI[1], Kaisei NISHIDA[1], Shohei NOSAKI[4], Takuya MIYAKAWA[1], Masaru TANOKURA[5], Jong-Myong Kim[3,5,6], Motoaki SEKI[3], Takehito INABA[7], Minami MATSUI[3], Kentaro IFUKU[8], Tetsuo KUSHIRO[2], Tadao ASAMI[5], Takeshi NAKANO[1] ([1]Grad. Sch. Biostudies., Kyoto Univ., [2]Sch. Agri., Meiji Univ., [3]CSRS, RIKEN, [4]Sch. Life and Environmental sci., Tsukuba Univ., [5]Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [6]Ac-Planta Inc., [7]Dept. Agri. Univ., Miyazaki Univ., [8]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

植物ホルモンの一種であるブラシノステロイド（BR）は、植物の成長制御や葉緑体発達の制御などの様々な生理活性を持つことが知られている。BR 欠損植物体は内生クロロフィル量が増加した濃緑色形態を示すことから、BR シグナルは葉緑体発達を抑制すると考えられているが、その分子機構には未解明な点が多い。そこで、理化学研究所 FOX（Full-length cDNA Over eXpressing）ラインから BR 生合成阻害剤 Brz 存在下でも濃緑色形態を示さず低緑化形態を示す変異体 *bpg4-1D*（*Brz-insensitive-pale green 4-1D*）を選抜し、その変異原因遺伝子である *BPG4* について解析を進めている。
BPG4 高発現株 *BPG4-OX* は低緑色形態を示すのに対し、*BPG4* 破壊株 *bpg4* は濃緑色形態を示すことから、BPG4 は内生クロロフィル量を抑制する機能を持つと考察された。Y2H 法、Transient assay 法などにより、BPG4 は葉緑体発達のマスター転写因子 GLK1/2 と核内で相互作用しその転写活性を抑制することにより、光合成関連遺伝子の発現を網羅的に抑制していることが明らかとなった。また、BR 欠損および光照射が、*BPG4* 発現を活性化することについても明らかとなった。さらに、BPG4 の生理学的意義について、BPG4 が活性酸素発生量や光合成活性に寄与するとの仮説を基に研究を進めている。BPG4 の機能、発現制御から考察された「BPG4 による葉緑体制御の分子機構」と「BPG4 の生理学的意義」を統合した作業仮説を報告予定である。
Brassinosteroid (BR) is a kind of phytohormone, which has various activities such as promotion of plant growth, stress resistance, and chloroplast development, and so on. It is well observed that Brz, BR biosynthesis inhibitor, treatment increases chlorophyll contents and promotion of chloroplast development in leaves. However, the molecular mechanism of regulation of chloroplast development in BR signaling has not been revealed yet. To reveal the mechanism, we identified *bpg4-1D* (*Brz-insensitive-pale green 4-1D*), which showed lower greening than WT in Brz condition, and analyzed the function of *BPG4*, the causal gene of *bpg4-1D*.
BPG4 overexpressed transformants, *BPG4-OX,* showed pale green leaves, and suppressed expressions of chlorophyll biosynthesis genes. *BPG4* loss-of-function mutant showed the opposite phenotype against *BPG4-OX*. These results suggested that BPG4 had negative function for chlorophyll biosynthesis and chloroplast development. Detailed analysis for the molecular mechanism and physiological significance of *BPG4* is in progress.

chloroplast, signaling, brassinosteroid

発表責任者：中野雄司（nakano.takeshi.6x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D3p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D3 会場

塩化コリンと *N*-アリルグリシンによって誘導される植物の生長促進と光合成促進の分子機構
Molecular mechanism of growth and photosynthesis promotion caused by choline chloride and *N*-allylglycine

○池田 直樹[1]、上杉 晃作[1]、神村 麻友[2]、蔡 晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大院バイオ、[2]長浜バイオ大バイオ、[3]長浜バイオ大 GERI）
○Naoki IKEDA[1], Kousaku UESUGI[1], Mayu KAMIMURA[2], Fang-sik CHE[1,2,3] ([1]Grad. school of Bio-science, Nagahama Insti. bio-sic. and tech., [2]Bio-science, Nagahama Insti. bio-sic. and tech., [3]GERI, Nagahama Insti. bio-sic. and tech.)

塩化コリンと *N*-アリルグリシンはコムギプロトプラストの光合成を促進する。そこで、塩化コリンと *N*-アリルグリシンの生育に与える影響を調べるため、*Arabidopsis thaliana* と *Brassica rapa* に処理したところ、乾燥重量が約 15%から 25%増加した。次に、塩化コリンと *N*-アリルグリシンによる乾燥重量の増加と光合成促進との関係を調べるために、光合成能力を保持しているシロイヌナズナ T87 培養細胞と光合成能力がないシロイヌナズナ YG-1 培養細胞に塩化コリンまたは *N*-アリルグリシンを処理したところ、シロイヌナズナ T87 培養細胞では乾燥重量が約 5%増加したが、YG-1 培養細胞では増加しなかった。また、シロイヌナズナ T87 培養細胞を暗黒下で培養した場合でも乾燥重量の増加は認められなかった。そこで、乾燥重量の増加が認められた *B. rapa* に両化合物を処理し、処理後 3 日目と 6 日目における光合成を測定したところ、どちらの化合物処理でも約 20%増加していた。これらの結果から塩化コリンと *N*-アリルグリシンによる乾燥重量の増加は、光合成の促進によってもたらされていることが示された。次に、この光合成促進の機構を明らかにするために、塩化コリンまたは *N*-アリルグリシンを *B. rapa* に処理し発現変動する遺伝子の解析を行った。その結果、塩化コリンと *N*-アリルグリシン処理後 3 日目と 6 日目に、光合成電子伝達系のタンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇していた。さらに、シロイヌナズナ T87 培養細胞において、早期に発現変動する遺伝子について調べたところ、処理後 6 時間までに、いくつかの葉緑体機能型の転写因子をコードする遺伝子の発現が上昇していた。これらの結果は、塩化コリンと *N*-アリルグリシンが転写因子の発現を促進することで、光合成電子伝達系の遺伝子発現を増加させている可能性を示唆する。

Choline chloride and *N*-allylglycine promoted the growth of *A. thaliana* and *Brassica rapa*. Such growth promotion was not observed in cultured cells without photosynthesis ability, indicating that choline chloride and *N*-allylglycine induced growth promotion is caused by photosynthesis stimulation. Transcriptome analysis showed that treatment of choline chloride and *N*-allylglycine were upregulated photosynthetic electro transport system genes and several plastid-located transcription factor genes. These results suggest that transcription of photosynthetic electro transport system genes was increased by transcription factors upregulated by choline chloride and *N*-allylglycine.

choline chloride, N-allylglycine, photosynthesis

発表責任者：池田直樹（b116011@m.nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：3D3p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D3 会場

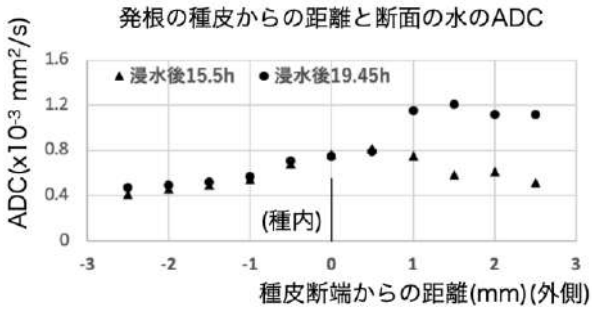
向日葵の種の発根断面の ^{1}H-MRI にる水の拡散係数の計測

Measurement of water diffusion coefficient in ^{1}H-MRI of rooting section of sunflower seeds.

○梅田 雅宏、河合 裕子（明治国際医療大）
○MASAHIRO UMEDA, YUKO KAWAI (Meiji Univ Integrative Med)

植物の根の水動態についてはマンガンイオンやガドリニウムイオンを用いた有効形質膜透過係数の計測が試みられている。我々は 4.7T-MRI と直径 10mm の小コイルを用いて、向日葵の種の発根を 2-4 時間毎に連続的に観察し、発根の断面の水の根の軸方向の見かけの拡散係数(ADC)を経時的に計測した。0.5mm の厚さで複数の MRI を撮像した。向日葵の種は装置内(室温)で 11.5h 時間ほどで発根した。種皮から 2.5mm ほど発根した時(15.5h▲)の根の先端部分から種子内へ 3mm(座標では-3mm)までの先端部分と、4 時間後(19.45h ■)の ADC を図に示す。4 時間後の根端は観測範囲から外れて得られていない。成長ゾーン根端付近は ADC が小さく、それに続く成熟ゾーン(Gambetta GA, et al., Plant Physiology 2013)では ADC が大きくなり、さらに種子の端から中心に向かって ADC が小さくなる傾向を示した。様々な水状態で拡散係数の変化を調べることで、根の先端部における水輸送の機能詳細が解明できると考えられる。

T The water dynamics of plant roots has been attempted to measure the effective plasma membrane permeability using manganese and gadolinium ions. We used a 4.7T-MRI and a small 10 mm diameter coil to continuously observe root development of sunflower seeds every 2-4 h and to measure the axial apparent diffusion coefficient (ADC) of water in the root axial direction in the root section over time. 0.5 mm thick multiple MRI images were taken. Sunflower seeds rooted after about 11.5 h in the apparatus (room temperature). The figure shows the ADC from the tip of the root to 3 mm (-3 mm in coordinates) into the seed when it rooted 2.5 mm from the seed coat (15.5h ▲) and 4 h later (19.45h ■) The root tip after 4 h was not obtained because it was out of the observation range. The ADC was small near the growing zone root tip, followed by a larger ADC in the mature zone (Gambetta GA, et al., Plant Physiology 2013), and then a trend of smaller ADC from the seed edge to the center. Investigating changes in diffusion coefficients under various water conditions could elucidate the functional details of water transport at the root tip.



Root Development, ADC, water transport

発表責任者：梅田雅宏（ume@meiji-u.ac.jp）

講演番号：3D3p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 D3 会場

Cryo-EM structure of a photosystem I supercomplex from oleaginous green alga *Coccomyxa subellipsoidea*

○Pi-Cheng TSAI, Fusamichi AKITA, Jian-Ren SHEN (RIIS, The Univ. of Okayama)

Coccomyxa subellipsoidea is an oleaginous non-motile unicellular green microalga isolated from Antarctica. It is an attractive candidate for producing biomass and CO2 biofixation. *C.subellipsoidea* is the first polar green alga to have its genome sequenced. The environment of the Antarctic is low temperatures, low humidity, and alternating long periods of sunlight and darkness. Low temperatures may induce excess of electrons then generating reactive oxygen species which are harmful to the photosystem and the cell. The proteins of photosynthesis may have changes to adapt polar environment. Photosystems I (PSI) is a natural light-energy converter that is highly conserved from cyanobacteria to vascular plants. Besides photosystems, the outer light-harvesting complexes (LHC) peripherally associated with photosystems, which also contain chlorophyll and carotenoid pigments, and absorb a large part of the light.

According to the genomic sequence, compared with the *Chlamydomonas reinhardtii*, reaction center subunit N of PSI (PsaN) is lacking in *C.subellipsoidea*, which is related with interaction with electron transporter, plastocyanin (Pc). It is reported that the interaction between the PSI and Pc is electrostatic and hydrophobic interactions. Also, the energy transfer pathway and the distribution of chlorophyll in *C.subellipsoidea* should be different.

Here, we have purified PSI-LHCI supercomplex from *C.subellipsoidea*. The protein was purified with sucrose density gradient and size-exclusion chromatography after being solubilized from the thylakoid membrane. The UV-vis spectrum of the protein showed that the Q band was shifted to 680 nm. It indicated that the protein was PSI-LHCI supercomplex. The final structure of the protein is under reconstruction.

photosystem, oleaginous microalga, structure

講演番号：3D3p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 D3 会場

ダイズに対する化学肥料代替としてのリサイクルリン施用効果の検証
Examination of Effect of Recycled Phosphorus as a Chemical Fertilizer Substitute for Use on Soybeans

○中務 友明[1]、花田 晶子[1,2]、明戸 剛[1]、新垣 篤史[2]、田中 剛[2] ([1]太平洋セメント株式会社、[2]東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻)
○Tomoaki NAKATSUKA[1], Akiko HANADA[1,2], Tsuyoshi AKETO[1], Atsushi ARAKAKI[2], Tsuyoshi TANAKA[2] ([1]Taiheiyo Cement Corporation, [2]Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan;)

我が国のリン利用において、「水溶性リン酸の過剰施肥によるリンの水域への流出」と「自給体制の構築」が課題である。農業・食品に関わるリン輸入量約 40 万トン-P/年のうち、下水道への流入量は約 5 万トン-P/年で、そのうちの肥料等へのリサイクルは約 0.5 万トン-P/年に留まっている。以上のことから排水からのリン回収技術が注目されている。肥料利用可能なリン回収資材の一つとして、非晶質ケイ酸カルシウム水和物(a-CSHs)があり、HAP 法等と比較して運転管理が簡便で、消化液等の高濃度の炭酸存在下でもリン回収率が大きく低下しないなど優れた性能が実証試験で示されている。

a-CSH によるリン回収は、ク溶性リン酸肥料活用によるリンの水域への流出抑制、自給率の向上に貢献可能である。本試験では、リン回収物のリン肥料としてのダイズへの施用効果について検討した。

その結果、リン回収物施肥による土壌中の有効態リン酸量は、汎用の水溶性リン酸肥料である過リン酸石灰施肥より高い値を示し、また、汎用肥料と同等以上のダイズ生育効果を示した。したがって、a-CSH を用いて排水からリンを回収し肥料利用することで、リンの資源循環が可能であり、施肥効果から化学肥料代替として有効であることが示唆された。

本研究は、内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業によって実施された。

In terms of phosphorous use, Japan faces the issues of water-soluble phosphoric acid flowing into water bodies due to excessive fertilization and the building of a self-sufficiency system. Technology to recover phosphorus from sewage is gaining prominence. Amorphous calcium silicate hydrate (a-CSH) is a material that enables phosphorus recovery for fertilizer use. Its operational management is simpler than the HAP method and studies have shown its excellent functionality.

Phosphorus recovery using a-CSH may help reduce phosphorus flow into water bodies and enhance self-sufficiency through use of citric acid-soluble phosphorus fertilizers. In this study, fertilizer made with recovered phosphorus was used on soybeans.

Effective phosphoric acid levels in the soil were found to be higher with recovered phosphorus than with the general-purpose water-soluble fertilizer calcium superphosphate, with growth promotion at least equivalent to general-purpose fertilizer. This showed that recovering phosphorus from sewage with a-CSH for fertilizer use may enable phosphorus resource circulation as an effective substitute for chemical fertilizers.

phosphorus fertilizer, recovered phosphorus, amorphous calcium silicate hydrate

発表責任者：中務 友明（Tomoaki_Kasuga@taiheiyo-cement.co.jp）

講演番号：3D3p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 D3 会場

フラボノイド代謝における鍵酵素と生成物特異性を制御するタンパク質の複合体結晶構造
The Crystal Structure of Chalcone Synthase Complexd with Chalcone Isomerase-like Protein
○今泉 璃城[1]、和氣 駿之[2]、竹下 浩平[3]、安田 あおい[1]、松浦 滉明[3]、中多 舜[1]、坂井 直樹[3]、片岡 邦重[1]、高橋 征司[2]、山本 雅貴[3]、山下 哲[1]、中山 亨[2] ([1]金沢大院自然科学、[2]東北大院工、[3]理研 RSC)
○Riki Imaizumi[1], Toshiyuki Waki[2], Kohei Takeshita[3], Aoi Yasuda[1], Hiroaki Matsuura[3], Shun Nakata[1], Naoki Sakai[3], Kunishige Kataoka[1], Seiji Takahashi[2], Masaki Yamamoto[3], Satoshi Yamashita[1], Toru Nakayama[2] ([1]Kanazawa Univ., [2]Tohoku Univ., [3]RIKEN SPring-8 Center)

フラボノイドは，植物が生存戦略として独自に進化させてきた植物特化代謝産物の一種であり，フラバン(C6-C3-C6)を骨格とするフェノール性化合物の総称である．その優れた抗酸化能や，ヒトが摂取した場合に発現する様々な生理活性から，医薬品や化粧品等へ活用されている一方，有機合成が困難であるものについては，今後も植物資源からの供給に依存せざるを得ない．また，微生物を宿主としたフラボノイド生産も試みられているが，原料からの変換効率等に改善の余地が残されている．

フラボノイド生合成の初発段階を担うカルコン合成酵素(CHS)は，p-クマロイル CoA に対して、3 分子のマロニル CoA を順次縮合し，伸長したテトラケチドを活性部位で環化させ，フラボノイドの共通前駆体であるテトラヒドロキシカルコン(THC)を生成する．しかし，組換え型 CHS による試験管内の反応では，テトラケチド中間体がラクトン化することによって，多量の副生成物が生じることが示されている. 我々はこれまでに, カルコン異性化酵素類似タンパク質(CHIL)が上記のような CHS の酵素活性の曖昧さを矯正し，THC 生成を促進することを報告している．しかしながら，両者の相互作用様式や, 複合体の量論比などの詳細は不明であった. 本発表では, CHS-CHIL 複合体の結晶化と，X 線結晶構造について報告し，CHIL と CHS の相互作用について議論したい.

Flavonoids are involved in the plant-specialized metabolites which are phenolate compounds with flavane backbones. Flavonoids are applied to medicine and cosmetics owing to their antioxidant activities and other various bioactivities. Because many kinds of flavonoids are difficult to synthesize by organic chemistry, the supply of rare compounds still depends on the natural resources. Productions of some flavonoids in microorganisms are challenging because of their low yields. Chalcone synthase (CHS) catalyzes condensation reactions of three molecules of malonyl CoA to p-coumaroyl CoA to produce tetrahydroxy chalcone (THC) as a common precursor of flavonoids, via a cyclization of the tetraketide intermediate. However, a recombinant CHS tends to produce a large amount of by-product via a lactonization of the intermediate. We previously reported that chalcone isomerase-like protein (CHIL) rectify the promiscuous chalcone synthase activity. However, the details of interaction between the CHS and CHIL and its stoichiometry remains unclear. This time, we report the X-ray crystallography of the CHS-CHIL complex to discuss the interaction between CHS and CHIL.

Flavonoid, Protein-Protein complex, X-ray Crystallography

講演番号：3D3p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 D3 会場

天然ゴム貯蔵粒子をコートする膜タンパク質の精製と立体構造解析

Purification and Structural Analysis of a Membrane Protein Involved in Coating of Natural Rubber Particles

○宮原 一真[1]、吉田 城啓[1]、黒澤 悠太郎[1]、林 文晶[2]、山口 晴彦[3]、服部 良一[4]、齋尾 智英[4]、竹下 浩平[5]、宮城 ゆき乃[3]、高橋 征司[6]、片岡 邦重[1]、山下 哲[1] ([1]金沢大院自然科学、[2]理研 BDR、[3]住友ゴム工業（株）、[4]徳島大先端酵素学研究所、[5]理研 RSC、[6]東北大院工)

○ Kazuma MIYAHARA[1], Kunihiro YOSHIDA[1], Yutaro KUROSAWA[1], Humiaki HAYASHI[2], Haruhiko YAMAGUCHI[3], Yoshikazu HATTORI[4], Tomohide SAIO[4], Kohei TAKESHITA[5], Yukino MIYAGI[3], Seiji TAKAHASHI[6], Kunishige KATAOKA[1], Satoshi YAMASHITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Kanazawa Univ., [2]RIKEN, BDR, [3]Sumitomo Rubber Industries, LTD., [4]Inst. Adv. Med. Sci., Tokushima Univ., [5]RIKEN, RSC, [6]Grad. Sch. Eng. Tohoku Univ.)

天然ゴムはゴム生産植物が生体防御等のために高蓄積するイソプレンポリマーである。天然ゴムは化学構造上，疎水性が高いため，ゴム生産植物であるパラゴムノキのラテックスにおいて，脂質一重膜および様々な膜タンパク質によって囲まれたゴム粒子(Rubber Particle, RP)として乳化していることが知られている。パラゴムノキの RP 膜に結合している膜タンパク質のなかで，最も多量に存在する Rubber Elongation Factor（REF）は，ゴムの乳化に機能するだけでなく，ゴム合成酵素複合体のサブユニットと相互作用することが見出されている。また，生理的な条件での構造変化を示唆する報告もあり，RP 形成に関連した機能が予想されているが，その詳細は明らかになっていない。本研究では，大腸菌異種発現系によって，REF を封入体として高蓄積させ，界面活性剤の存在下でリフォールディングにより精製し，キャラクタリゼーションと立体構造解析を試みた。REF はイオン交換樹脂への吸着性の異なる複数の画分に分離され，それらは末端構造の多型によるものであることが示唆された。また，^{15}N 標識体や，^{13}C-^{15}N 二重標識体を用いた多次元 NMR により，全体構造に関する知見が得られたので報告する。

Natural rubber (NR) is an isoprene polymer that is highly accumulated by rubber-producing plants for their biological defense. Because NR is highly hydrophobic, it exists as rubber particles (RP), that are emulsified by the surrounding lipid monolayer and various membrane proteins, in the latex of the Para rubber tree. Among the RP-bound membrane proteins of the Para rubber tree, rubber elongation factor (REF), the most abundant protein in the latex, has been found to function in emulsifications of NR and to interact with the subunit of the rubber synthase complex. The other reports suggested that REF undergoes conformational changes under physiological conditions, which might be related to RP formations, although the details have not yet been clarified. In this study, REF was purified by a refolding method in the presence of a detergent from a highly accumulated inclusion body by in the Escherichia coli expression system and the purified REF was used for characterizations. In addition, multidimensional NMR of ^{15}N labeled and ^{13}C-^{15}N double-labeled REF were performed.

natural rubber, membrane protein, NMR

講演番号：3D3p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 D3 会場

脂質単層膜粒子を導入した無細胞タンパク質発現系の構築

Establishment of cell-free translation system with artificial lipid monolayer particles.

○黒岩 風[1]、須田 啓[1]、矢吹 眞帆[1]、辻 季美江[2]、山口 晴彦[3]、豊田 正嗣[1]、金子 康子[4]、山下 哲[5]、高橋 征司[6]、戸澤 譲[1]([1]埼玉大・院・理工、[2]埼玉大・科学分析支援センター、[3]住友ゴム工業（株)、[4]埼玉大・教育、[5]金沢大・院・自然科学、[6]東北大・院・工)

○Fu KUROIWA[1], Hiraku SUDA[1], Maho YABUKI[1], Kimie TSUJI[2], Haruhiko YAMAGUCHI[3], Masatsugu TOYOTA[1], Yasuko KANEKO[4], Satoshi YAMASHITA[5], Seiji TAKAHASHI[6], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Saitama Univ., [2]Comprehensive Analysis Center for Science, Saitama Univ., [3]Sumitomo Rubber Ind., Ltd., [4]Fac. Educ. Saitama Univ., [5]Grad. Sch. Sci. Tech. Kanazawa Univ., [6]Grad. Sch. Eng. Tohoku Univ.)

天然ゴムの主骨格はイソペンテニル二リン酸（IPP）の *cis*-1,4 重合によって生合成され、脂質単層膜で囲まれた構造であるゴム粒子に貯留される。我々はナノディスクをコムギ無細胞翻訳系に添加した *in vitro* 膜タンパク質再構成系を確立することで、パラゴムノキでは HRT1 と HRBP、グアユールでは PaCPT と PaCBP が、ポリイソプレン合成のコアユニットであることを報告した（Kuroiwa, *Sci. Rep.*, 2022）。

今回我々は、人工的な脂質単層膜粒子（Lipid monolayer particle; LMP）を調製し、無細胞翻訳系に添加することにより、脂質単層膜にタンパク質を再構成する技術を確立した。この系により、REF/SRPP ファミリーによる脂質単層膜粒子の安定化作用を確認することに成功した。また、LMP はプレニルトランスフェラーゼ複合体の活性を再構成する足場として利用できることも確認した。ゴム粒子や脂肪滴、プラストグロビュールなどの脂質単層膜構造体は、生体内において疎水性代謝物の合成と貯留の場として重要な役割を担う。今回構築した LMP 系は、それらの構造体に関連するタンパク質群の解析を行うための新たなプラットフォームとしての応用が期待できる。

Natural rubber is an isoprenoid with a backbone structure comprising a polymerized isopentenyl pyrophosphate (IPP) with a *cis*-1,4 configuration. Natural rubber is stored in rubber particles, unique organelles surrounded by a lipid monolayer membrane. We previously reported that combinations of HRT1 and HRBP from Para rubber tree and PaCPT and PaCBP from guayule are the core units of polyisoprene synthesis based on a cell-free translation system using nanodiscs (Kuroiwa, *Sci. Rep.*, 2022).

In this study, we established the lipid monolayer particle (LMP)-supplemented cell-free translation system as a novel technology for protein expression on lipid monolayer structures. Based on this system, we could observe the positive effect of the REF/SRPP family on the stabilization of lipid monolayer particles *in vitro*. Further, we found the LMP could be used as a scaffold for reconstitution of the prenyltransferase complex. Lipid monolayer structures such as rubber particles, lipid droplets, and plastoglobuli play as sites for synthesizing and storing hydrophobic metabolites in plants. We expect that the LMP system is a potent platform for *in vitro* analysis of the proteins associated with those structures.

cell-free translation, membrane protein, natural rubber

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3D3p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 D3 会場

脂質単層膜粒子を導入した無細胞タンパク質発現系によるストリゴラクトン生合成系の解析
Analysis of strigolactone biosynthesis system by cell-free protein expression system using lipid monolayer particles
○清水 匠、黒岩 風、戸澤 譲 (埼大院理工)
○Takumi Shimizu, Fu Kuroiwa, Yuzuru Tozawa (The Univ. of Saitama)

ストリゴラクトンは植物体の発達に重要な役割を果たす植物ホルモンであり、根から滲出して土壌中の有用な菌との共生、根寄生雑草の寄生に関わるシグナル物質としても機能する。ストリゴラクトン中間体のカーラクトン(CL)は、β-カロテンを基質として D27、CCD7、CCD8 の酵素反応により合成される。我々はそれらの酵素の葉緑体局在、代謝物の物性などから、これらの酵素は葉緑体内の脂質単層膜構造であるプラストグロビュールで機能しているという仮説を立てた。

また我々は新たに人工的な脂質単層膜粒子(Lipid monolayer particle; LMP)を開発し、LMP 上にタンパク質を再構成するシステムを確立した。このシステムを用いて CL 合成を担うシロイヌナズナ由来の酵素の膜結合能を検証した結果、D27 および CCD7 は LMP に対する顕著な親和性があることを確認した。一方で AtCCD8 は LMP への親和性は確認されなかった。本研究の結果は、CL 生合成に関わる我々の仮説を裏付ける足掛かりとなり、今後より詳細な解析を進め CL 生合成の全様の解明を目指す。

Strigolactones are plant hormones that play an essential role in the development of plant bodies and also function as signaling substances involved in symbiosis with beneficial fungi in the soil and parasitism of root parasitic weeds by exuding from the roots. Carlactone (CL), a strigolactone intermediate, is synthesized by the enzymatic reaction of D27, CCD7, and CCD8 using β-carotene as a substrate. Based on the chloroplast localization of these enzymes and the physical properties of their metabolites, we hypothesized that these enzymes function in plastoglobules, lipid monolayers within chloroplasts.

We have also developed an artificial lipid monolayer particle (LMP) and established a system to reconstitute proteins on the LMP. Using this system, we verified the membrane-binding ability of Arabidopsis enzymes responsible for CL synthesis and confirmed that D27 and CCD7 have a marked affinity for LMPs. On the other hand, AtCCD8 was not found to have an affinity for LMP. The results of this study support our hypothesis regarding CL biosynthesis, and we intend to analyze the details further to elucidate the whole picture of CL biosynthesis in the future.

Strigolactone, lipid monolayer, cell-free protein expression system

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3D4a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D4 会場

シロイヌナズナの亜ヒ酸・カドミウム応答におけるオーキシンの異なる役割

Different roles of auxin homeostasis in arsenite and cadmium responses of Arabidopsis

○浦口 晋平、齋藤 光莉、大城 有香、中村 亮介、高根沢 康一、清野 正子 (北里大薬)
○Shimpei Uraguchi, Hikari Saito, Yuka Ohshiro, Ryosuke Nakamura, Yasukazu Takanezawa, Masako Kiyono (Kitasato Univ.)

世界各地で土壌や作物の有害金属汚染が問題となっており、我々の健康リスクとなっている。植物の有害金属ストレスに対する応答機構の理解は、不良土壌における植物生産の維持や有害金属による健康リスクの低減を実現する上で重要である。本研究では、カドミウムおよび亜ヒ酸ストレス応答におけるオーキシンの役割についてシロイヌナズナの変異株を用いて検討した。亜ヒ酸やカドミウムに対して超感受性を示す *cad1-3* における遺伝子発現解析をしたところ、亜ヒ酸ではオーキシン合成関連遺伝子が抑制される傾向を示したが、カドミウムでは一部の合成関連遺伝子が誘導された。続いて、オーキシンの生合成および受容体の変異株を用いて亜ヒ酸やカドミウムに対する応答を検証したところ、オーキシン生合成の第一段階を担う TAA1 の変異株 *wei8-1* がカドミウム感受性を示した。さらに、オーキシン受容体変異株 *tir1-1*、*tir1-1/afb2-3* もカドミウム感受性を示した。一方、これら変異株は亜ヒ酸に対しては感受性を示さなかった。以上より、カドミウムストレスに対するシロイヌナズナの応答において、オーキシンの恒常性は重要な役割を果たす一方で、亜ヒ酸応答ではその役割が異なることが示唆された。

Toxic metal contamination of soil and crop products is a potential health risk in the world. Advancing our understanding of plant metal stress responses is important for quantitatively and qualitatively better plant production under metal-contaminated soils. In this study, we aimed to examine the possible involvement of auxin homeostasis in arsenite and cadmium stress responses in Arabidopsis. We first examined transcriptional responses of auxin-related genes in the root tip of *cad1-3*, a metal-hypersensitive mutant. Arsenite stress tended to suppress the auxin synthesis genes, whereas cadmium stress partially induced the auxin synthesis genes. We then examined mutant phenotypes of auxin synthesis genes and receptor genes. *wei8-1,* a mutant of TAA1 which is responsible for the first step of IAA synthesis showed enhanced sensitivity to cadmium stress. Auxin receptor mutant lines *tir1-1* and *tir1-1/afb2-3* also showed cadmium-hypersensitivity. On the other hand, these mutants did not show significant growth differences to the wild-type under arsenite stress conditions. These results suggest different roles of auxin homeostasis in cadmium and arsenite stress responses.

toxic metal, auxin, Arabidopsis

発表責任者：浦口晋平（uraguchis@pharm.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3D4a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D4 会場

in planta Particle Bombardment（iPB）法による実用メロン品種のゲノム編集法の開発と高付加価値化の研究

Approach toward highly commercial values of muskmelon through *in planta* Particle Bombardment（iPB）

○浦野 薫[1]、佐々木 健太郎[1]、耳田 直純[2]、野中 聡子[3,4]、江面 浩[2,3,4]、今井 亮三[1,3]（[1]農研機構・生物研、[2]サナテックシード（株）、[3]筑波大・生命環境系、[4]つくば機能植物イノベーション研究センター）

○ Kaoru URANO[1], Kentaro SASAKI[1], Naozumi MIMITA[2], Satoko NONAKA[3,4], Hiroshi EZURA[2,3,4], Ryozo IMAI[1,3] ([1]Genome-Edited Crop Development Group, NARO, [2]Sanatech Seed Co.,Ltd., [3]Institute of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [4]Tsukuba Plant Innovation Research Center)

メロンは難培養性のため、汎用性のあるゲノム編集技術の開発には至っていない。我々が開発した iPB（*in planta* particle bombardment）法は、外来 DNA フリーで組織培養が不要なゲノム編集技術である。我々は iPB 法をメロンに適用させることにより、メロンの高効率なゲノム編集技術の開発を試みた。発芽直後の種子胚茎頂に対し、パーティクルガンで金粒子にコートした CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質を導入した。 ターゲット遺伝子として果実の日持ち性に関わる *ACO1*（エチレン生合成遺伝子）および健康機能性成分 GABA の蓄積に関わる *GAD1*（GABA 生合成遺伝子）を用いた。導入胚より成長させた植物体の第 5-7 葉を用いて CAPS 解析した結果、*ACO1*、*GAD1* ともに約 5%の効率で変異が検出された。キメラ性を解除した変異個体となる次世代においては、それぞれ、打ち込み茎頂あたり約 1 %と 2/%の効率で変異体を得ることができた。*aco1* 変異系統については、原品種と比較して果実追熟の遅延とエチレン放出量の著しい低下が確認された。*gad1* 変異系統については現在解析を進めている。以上の結果から、メロンに iPB 法を適用することにより、高効率でゲノム編集個体が取得できること、並びに実用形質の改変が可能であることが実証された。

Melon is one of the recalcitrant crops that are difficult to apply genome editing. *In planta* particle bombardment (iPB) is a non-culture DNA-free method for genome editing in a variety of plants including recalcitrant crops. We applied the iPB method for genome editing of muskmelon genes, *ACO1* (ethylene biosynthetic enzyme gene) involved in a fruit shelf life, and *GAD1* involved in GABA accumulation. CRISPR/Cas9-coated gold particles were introduced into shoot apical meristems of germinated seeds, and grown plants were subjected to mutation detection by CAPS assay. We successfully obtained genome-edited melons for *ACO1* and *GAD1* at efficiencies of 1% and 2%, respectively. Phenotyping analysis of the *aco1* mutants showed that the melon fruit ripening after harvest was delayed and the ethylene release was significantly reduced in the *aco1* mutants compared with that in wild-type plants. Phenotyping analysis of the *gad1* is currently in progress. These results demonstrate that the iPB method can improve the quality of melon through highly efficient genome editing.

Genome editing, Melon, Ethylene

発表責任者：今井亮三（rzi@naro.affrc.go.jp）

講演番号：3D4a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D4 会場

in planta Particle Bombardment 法によるソバのゲノム編集系の開発
Development of genome editing methods in buckwheat using *in planta* Particle Bombardment
○手塚 大介[1]、平山 裕美子[1]、ルオ ウェイフェン[1]、勝 賢二郎[2]、鈴木 達郎[2]、今井 亮三[1] ([1]農研機構・生物研、[2]農研機構・九沖農研)
○Daisuke Tezuka[1], Yumiko Hirayama[1], Weifeng Luo[1], Kenjiro Katsu[2], Tatsuro Suzuki[2], Ryozo Imai[1] ([1]Institute of Agrobiological Sciences, NARO, [2]Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO)

【背景・目的】普通ソバ（*Fagopyrum esculentum*）は他殖性作物であり，効率的な品種改良が難しい．ゲノム編集等の新たな育種技術への期待も大きいが，難培養性のためゲノム編集個体の作出が困難である．我々は培養を経ずに植物体を直接ゲノム編集する手法，*in planta* Particle Bombardment（iPB）法をコムギで開発した．iPB 法は茎頂分裂組織（SAM）にゲノム編集酵素を直接導入する手法であり，原理的には様々な作物へ応用可能である．本研究では iPB 法を用いて，ソバにおけるゲノム編集系を確立することを目的とした．標的遺伝子には，機能欠損によりモチ性獲得が期待される顆粒性デンプン合成酵素遺伝子 *GBSSa*, *GBSSb* を用いた．
【方法・結果】植物材料には自殖ソバ系統の IH3 および 18Nde6 を用いた．18Nde6 は IH3 を背景とする *GBSSa* 欠損株である．*GBSSa* と *GBSSb* の両遺伝子の欠損が，モチ性獲得に必要と考えられている．吸水 4 日後までのソバ幼苗から子葉と第 1 葉を切除し SAM を露出させた．*GBSSb* を標的とする CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質を iPB 法により SAM へ導入した．導入後の幼苗を育成し，第 5 葉を用いて遺伝子型を解析した．複数の iPB 条件を検討し，IH3 を背景とするゲノム編集当代が 10 個体，18Nde6 を背景とするゲノム編集当代が 34 個体得られた．またゲノム編集当代の作出効率は最大で 27.4%であった．当代はキメラ変異個体となるため，次世代での変異体選抜を行い，IH3 を背景とするゲノム編集当代 4 個体から *GBSSb* 変異を有する独立 2 系統を取得することに成功した．現在はモチ性ソバの創出を目指し，18Nde6 を背景とする *GBSSb* 変異株の選抜を継続している．以上本研究では，iPB 法をソバに適用することで，ソバにおけるゲノム編集系の開発に世界で初めて成功した．

Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) is recalcitrant to culture-based transformation and genome-editing. Here, we developed a genome editing method for buckwheat for the first time using *in planta* Particle Bombardment (iPB). With the iPB method, 27.4% plants ('IH3') grown from the bombarded shoot apical meristems showed *GBSSb* mutations. Subsequent selection for inheritance of the mutations to the next generation identified two independent *GBSSb* mutant lines. The mutations were also introduced into the '18Nde6' line that carries the *GBSSa* mutation. Screening of *GBSSa*, *GBSSb* double mutants, expected to produce waxy starch, is underway.

Buckwheat, Genome editing

講演番号：3D4a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D4 会場

TALEN タンパク質を用いた遺伝子組換えを使わない植物ゲノム編集技術の確立
Establishment of protein-based genome editing in plants by direct TALENs delivery

ルオ ウェイフェン[1]、○竹元 廣大[1]、横井 彩子[1]、加藤 悦子[2]、鈴木 喜大[3]、鈴木 麟太郎[1]、佐々木 健太郎[1]、今井 亮三[1] ([1]農研機構・生物機能利用研究部門、[2]東洋大・食環境科学、[3]農研機構・高度分析センター)
Weifeng LUO[1], ○Kodai TAKEMOTO[1], Ayako NISHIZAWA-YOKOI[1], Etsuko KATOH[2], Nobuhiro SUZUKI[3], Rintaro SUZUKI[1], Kentaro SASAKI[1], Ryozo IMAI[1] ([1]Institute of Agrobiological Science, NARO, [2]Faculty of Food and Nutritional Sciences, Toyo University, [3]Research Center for Advanced Analysis, NARO)

一般的な植物のゲノム編集は、CRISPR/Cas9 等ゲノム編集ツールを遺伝子組換え技術を用いて一旦ゲノムに導入する。そのため、ゲノム編集による実用品種の創出にあたっては、導入 DNA の不在性の証明が不可欠である。また、社会受容性においても課題を残しており、遺伝子組換えを使わないゲノム編集技術の開発が待望されている。我々は、ゲノム編集ツールを植物茎頂に導入する技術を開発し、培養を使用しない植物体の直接ゲノム編集技術、*in planta* particle bombardment (iPB)法を確立している。iPB 法では、DNA、RNA に加え、タンパク質の導入が可能である。本研究では、ゲノム編集酵素の一種である TALEN タンパク質を用いた iPB 法の確立を試みた。TALEN はタンパク質のみでゲノム編集が可能であり、これと iPB 法を組み合わせることで、遺伝子組換え技術を用いないゲノム編集が可能となる。今回の発表では、コムギのジベレリン生合成酵素 *GA20ox* の 1 つ(*TaSD1*)を標的とした TALEN を設計し、精製タンパク質を iPB 法により導入することにより、ゲノム編集個体を作出することに成功した結果について報告する。

Generally, plant genome editing involves the introduction of genome editing tools such as CRISPR/Cas9 genes into genome using recombinant DNA technology. To create commercial varieties through genome editing, it is, therefore, essential to prove the absence of the introduced DNA. In addition, social acceptability remains an issue, and the development of genome-editing technology that does not use genetic recombination is long awaited. We have developed a technology to introduce genome-editing tools into plant shoot apical meristems and established a direct genome-editing technique, *in planta* particle bombardment (iPB), which does not require cell cultures. The iPB method can introduce proteins in addition to DNA and RNA. In this study, we attempted to establish an iPB method using TALEN proteins to attain genome-editing without recombinant DNA technology. In this presentation, we report the results of designing TALENs targeting *TaSD1*, one of the wheat gibberellin biosynthetic genes *GA20ox*, and successfully generating genome-edited individuals by introducing the purified protein by the iPB method.

genome editing, TALEN, wheat

講演番号：3D4a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D4 会場

コナラ属植物のイソプレン生産機構の解明
Molecular mechanisms of isoprene production in *Quercus*

○小板 青空[1]、福島 健児[2]、永野 惇[3,4]、佐竹 暁子[5]、三浦 謙治[6]、棟方 涼介[1,7]、矢﨑 一史[1]([1]京大・生存研、[2]Wurzburg 大、[3]慶應大、[4]龍谷大、[5]九大、[6]筑波大、[7]JST・さきがけ)
○Sora KOITA[1], Kenji FUKSHIMA[2], Atsushi NAGANO[3,4], Akiko SATAKE[5], Kenji MIURA[6], Ryosuke MUNAKATA[1,7], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, [2]University of Wurzburg, [3]Keio University, [4]Ryukoku University, [5]Kyushu University, [6]University of Tsukuba, [7]JST-PRESTO)

植物が大気中に放出する揮発性有機化合物（Volatile Organic Compound, VOC）は、生合成後に細胞外へ放出され、外敵の忌避や花粉媒介者の誘因といった生物間相互作用に関与する。さらに近年、植物の放出する VOC は、植物周辺の範囲に留まらずに大気中で変換され、気候にまで影響を及ぼしていることが知られてきた。具体的には、VOC はその化学反応性の高さによりエアロゾルを形成し、雨雲の形成促進や大気の冷却などに寄与する（Fig.1）。実際、植物が大気中に放出する VOC を全球レベルで見ると、フラックスは年間 10^9 t（炭素換算）に及び、イソプレン（C5）はその約半分を占めることが知られる。北半球ではブナ科のコナラ属などがイソプレンを放出する主要な植物系統の 1 つであるため、コナラ属植物のイソプレン放出機構を調べることは、植物由来 VOC の気候への影響を明らかにする上で重要である。これまでに、イソプレン合成酵素遺伝子は他の植物科で同定されてきたが、コナラ属においては未知であった。そこで本研究では、コナラ属植物のイソプレン生産機構の解明を目的とし、コナラ（*Q. serrata*）のトランスクリプトーム及びゲノムデータから TPS ファミリーの解析を行い、イソプレン合成酵素の遺伝子同定を目指した。

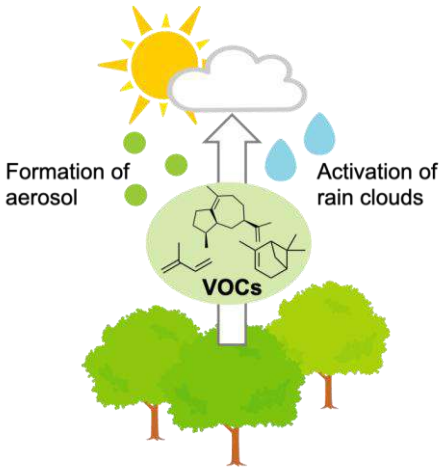


Fig. 1 VOC の大気への影響

Plant-derived volatile organic compounds (VOCs) contribute to the interaction between plants and other organisms. Moreover, VOCs influence the environments close to the plants, and also the quality of atmosphere to affect climate conditions. For example, VOCs promote the formation of aerosols and clouds to bring rain (Fig. 1). The annual global flux of total VOCs was estimated to be 10^9 tons (C equivalent), with isoprene representing ca. half of this amount. The genus *Quercus* (Fagaceae) is one of the main isoprene emitters in the Northern Hemisphere. Thus, elucidating the mechanism of isoprene emission in this genus is essential in clarifying the effects of VOCs on the global climate, while this gene remained unknown in *Quercus* spp. In this study, we aimed to identify isoprene synthase gene from this genus, using transcriptomic data of *Q. serrata*.

Plant, *Quercus*, Climate

講演番号：3D4a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D4 会場

シロイヌナズナ種内雑種で見られる非相加的発現遺伝子とバイオマス増大との関係解析
Analysis of the relationship between non-additively expressed genes found in *Arabidopsis* intraspecific hybrids and biomass heterosis

○山口 真明[1]、杉 直也[1,2]、鈴木 穣[3]、草野 都[1,4]、柴 博史[1,5]（[1]筑波大院生命、[2]横市木原研究所、[3]東大院新領域、[4]理研 CSRS、[5]筑波大 T-PIRC）
○ MASAAKI YAMAGUCHI[1], NAOYA SUGI[1,2], YUTAKA SUZUKI[3], MIYAKO KUSANO[1,4], HIROSHI SHIBA[1,5] ([1]Univ. of Tsukuba Env., [2]Yokohama city Univ., [3]The Univ. of Tokyo, [4]RIKEN CSRS, [5]Univ. of Tsukuba T-PIRC)

雑種強勢とは、異なる種間や種内交配で得られた F_1 雑種において、両親系統と比較してバイオマス増大等がみられる重要農業形質である。これまでにも雑種強勢のメカニズム解明を目指して、シロイヌナズナやトウモロコシ等を用いた比較トランスクリプトーム解析が行われ、光合成関連遺伝子やホルモン生合成遺伝子等の発現の変動が報告されているが、F_1 雑種の表現型との因果関係には不明な点が多い。演者らは、シロイヌナズナ F_1 雑種実生で見られる顕著なバイオマス増大に着目しその制御メカニズムを明らかにする目的で、トランスクリプトーム比較解析を行い、バイオマス増加を制御する新規因子の特定を目指した。

F_1 雑種と両親系統では、発芽時期や成長速度に違いがあることが報告されている。そのため各遺伝子型間の生長のずれを考慮して、播種後 13,15,17 日経過した各実生から RNA-seq データを取得、比較解析し、サンプル間における生育ステージのずれに起因した遺伝子発現差異を排除し、F_1 雑種において非相加的な発現を示す遺伝子を抽出した。過去に F_1 雑種で窒素代謝経路の活性化が示唆されていた事から、上記トランスクリプトーム解析で抽出されてきた窒素代謝に関わる非相加的発現遺伝子であるアスパラギン合成酵素 1 (AT3G47340)に着目し、過剰・欠損変異体を用いてバイオマス増大との関連性を調べた。本報では、得られた結果をもとにシロイヌナズナ種内雑種の雑種強勢で見られるバイオマス増大の制御メカニズムについて議論したい。

Heterosis is an important agronomic trait in which F_1 hybrids show increased biomass compared to their parents. In this study, we investigated the mechanism of the biomass increase in *Arabidopsis thaliana* F_1 hybrids by comparative transcriptome analysis to elucidate a potential novel regulator of biomass increase.

It has been reported that there is a difference in the developmental rate between F_1 hybrids and their parents. In this study, we obtained RNA-seq data from seedlings 13, 15, and 17 days after sowing, grown in a cultivation system that minimized the growth gap as much as possible. Further analysis was performed to eliminate differences in gene expression caused by differences in growth stages among the samples, and to extract genes that showed non-additive expression in F_1 hybrids. Since activation of nitrogen metabolic pathways has been suggested in F_1 hybrids in the past, we focused on *ASPARAGINE SYNTHASE 1*(AT3G47340), a non-additively expressed gene involved in nitrogen metabolism which have been extracted from the transcriptome analysis, and investigated its relationship with biomass increase using overexpressor and deficient mutants. Based on the results obtained, we would like to discuss the regulatory mechanism of biomass increase observed in *Arabidopsis* intraspecific F_1 hybrids showing heterosis.

heterosis, transcriptome, non-additively expressed genes

発表責任者：山口　真明（s2230360@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3D4a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D4 会場

雑種強勢を示すシロイヌナズナ F1 雑種における光呼吸時に生じる NH4+の再同化機構に関する研究
Study on the mechanism of reassimilation of photorespiratory ammonium in intraspecific Arabidopsis F1 hybrids showing heterosis

○平山 十右子[1]、山口 真明[1]、野崎 雪乃[1]、桾澤 都月[2]、杉 直也[3]、LE Quynh[4]、鈴木 穣[5]、草野 都[1]、柴 博史[1,6] ([1]筑波大院・理工情報生命学術院、[2]筑波大生物資源、[3]横浜市大・木原生研、[4]トゥイロイ大、[5]東大院・新領域、[6]筑波大つくば機能植物イノベーション研究センター)
○Touko HIRAYAMA[1], Masaaki YAMAGUCHI[1], Yukino NOZAKI[1], Miduki GUMIZAWA[2], Naoya SUGI[3], Quynh LE[4], Yutaka SUZUKI[5], Miyako KUSANO[1], Hiroshi SHIBA[1,6] ([1]Tsukuba Univ. The Graduate School of Science and Technology, [2]Tsukuba Univ. Collage of AgroBiological Resource sciences, [3]Yokohama City Univ. Kihara Institute for Biological Research, [4]Thuyloi University, [5]The Univ. of Tokyo. Graduate School of Frontier Sciences, [6]T-PIRK)

雑種強勢は、種間または種内系統の交配で得られる雑種第一代(F_1)において、両親系統と比較してバイオマスの増大や環境ストレス耐性向上が見られる現象である。この現象は農業上重要であるが、未だ具体的機構は不明な点が多い。先行研究で、シロイヌナズナ Col-0 系統および C24 系統と交雑で得られた F_1 雑種のメタボローム解析が行われ、F_1 雑種特異的な 2-OG の蓄積低下が確認されている。2-OG は、TCA 回路の中間代謝物であり、GS/GOGAT 経路を介して窒素代謝に関係することから、本研究では、窒素代謝と F_1 雑種特異的なバイオマス増大の関係を明らかにすることを目指した。

シロイヌナズナ Col-0 系統、C24 系統および相互交配で得た F_1 雑種を材料とした。まず GS/GOGAT 経路で同化される NH_4^+を測定し、雑種特異的な NH_4^+の変化があるかどうかを確かめた。NH_4^+の多くが光呼吸経路に由来することから、光呼吸を抑制した際の NH_4^+濃度についても調べた。その結果、F_1 雑種では光呼吸によって生じた NH_4^+が親系統よりも効率的に再同化される可能性を示した。また 2-OG および NH_4^+の同化に関与しうる *GS1;1~1;5*,*GS2*,*GLU1*,*GLU2* および *GDH1,2* の発現量を解析したところ、F_1 雑種特異的な発現亢進を示したのは *GDH1,2* のみであった。また、これらの発現は光呼吸を抑制すると低下し、親系統と同程度になった。以上のことから、バイオマス増大につながる雑種特異的な光呼吸由来 NH_4^+の同化に、GDH が関与している可能性が示された。

Heterosis is a phenomenon that hybrids show superior biomass and stress tolerance over their parents. The mechanism of heterosis hasn't fully explained yet. In a previous study, metabolomic analysis of F_1 hybrids obtained from crosses with *Arabidopsis thaliana* Col-0 and C24 lines showed a reduced accumulation of 2-OG specific to F_1 hybrids. As 2-OG is an intermediate metabolite of the TCA cycle and is related to nitrogen metabolism via the GS/GOGAT pathway, this study aimed to determine the relationship between nitrogen metabolism and F_1 hybrid-specific biomass increase. Measurements of NH_4^+ assimilated by the GS/GOGAT pathway using Col-0, C24 and F_1 hybrids as material showed that NH_4^+ generated by photorespiration may be reassimilated more efficiently in F_1 hybrids than in the parental lines. We therefore examined several genes that could be involved in 2-OG and NH_4^+ assimilation and found that only *GDH1,2* showed F_1 specific up-regulation. These results indicate that GDH may be involved in the hybrid-specific assimilation of photorespiration-derived NH_4^+ that leads to biomass increase.

heterosis, nitrogen metabolism, Glutamate Dehydrogenase

講演番号：3D4a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D4 会場

酸化ヌクレオチド除去に関与するトマト Nudix hydrolase の探索
Identification of nudix hydrolase that eliminates oxidized nucleotide in tomato

○横山 聡太郎、力石 和英、杉本 学 (岡山大植物研)
○Sotaro Yokoyama, Kazuhide Rikiishi, Manabu Sugimoto (Okayama Univ.)

生物的、非生物的環境ストレスで生じる活性酸素種により細胞内で生成する酸化ヌクレオチドは DNA や RNA に取り込まれ突然変異や生育異常を引き起こす要因となり、植物の生育に及ぼす影響が懸念される。本研究では、毒性分子やシグナル分子を分解し、生物的・非生物的ストレスに対する応答・防御に重要な役割を持つ Nudix hydrolase (NUDX) について、酸化ヌクレオチドを除去するトマト由来 NUDX 遺伝子の探索と機能について解析した。

データベースから得られた 15 種類の SlNUDX 遺伝子のうち、酸化ヌクレオチド 8-oxo-dGTP を加水分解するシロイヌナズナ由来 AtNUDX1 に 57%の相同性を示し 8-oxo-dGTP サブファミリーに分類されるタンパク質をコードするマイクロトム NUDX 遺伝子 *SlNUDX1* を得た。*SlNUDX1* を大腸菌で発現させ精製した SlNUDX1 は Mg^{2+}存在下 pH 8.0 で 8-oxo-dGTP を加水分解した。UV-C を照射したマイクロトム葉における *SlNUDX1* の発現量をリアルタイム PCR で測定したところ、AtNUDX1 と同様に発現誘導は認められなかった。

Oxidized nucleotides produced by reactive oxygen species generated by biotic and abiotic stresses are incorporated into DNA and RNA in cells, causing mutation and growth inhibition. Nudix hydrolase (NUDX) hydrolyzes toxic molecules, cell signaling molecules, metabolic intermediates or coenzyme. Therefore, NUDX plays an important role in response and defense against biotic and abiotic stresses. In this study, we identified and analyzed the function of the NUDX gene that removes oxidized nucleotides in tomato.

The NUDX gene, *SlNUDX1*, which encodes a protein classified into the 8-oxo-dGTP subfamily, was obtained from 15 kinds of SlNUDX genes in the Micro-Tom database. SlNUDX1 showed 57% identity to AtNUDX1 from *Arabidopsis*, which hydrolyzes the oxidized nucleotide 8-oxo-dGTP. *SlNUDX1* was expressed in *Escherichia coli* and the protein was purified. SlNUDX1 hydrolyzed 8-oxo-dGTP in the presence of Mg^{2+} at pH 8.0. Real-time PCR analysis showed that the expression of *SlNUDX1* was not induced in the leaves irradiated with UV-C as same as *AtNUDX1*.

nudix hydrolase, Micro-Tom, oxidized nucleotide

発表責任者：杉本学（manabus@rib.okayama-u.ac.jp）

講演番号：3D4a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 D4 会場

生殖様式の転換に関わるコケ植物苔類の性決定遺伝子発現制御の解析
Regulation of sex-determining gene expression in liverwort related to the transition of reproductive system.
○安居 佑季子[1]、田中 知葉[1]、下川 瑛太[1]、井上 慎子[1]、嶋村 正樹[2]、河内 孝之[1] ([1]京都大・院・生命科学、[2]広島大・院・統合生命科学)
○Yukiko YASUI[1], Tomoha Tanaka[1], Eita Shimokawa[1], Chikako Inoue[1], Masaki Shimamura[2], Takayuki Kohchi[1] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

固着生活を営む植物は、置かれた環境に適した繁殖戦略をもつ。コケ植物は単相世代が優勢であり、雌雄異株の種が多く存在する。コケ植物苔類のモデル、ゼニゴケは性染色体をもつ雌雄異株の植物である。近年、我々はゼニゴケの雌の性染色体（U 染色体）上にコードされる性決定因子 BASIC PENTACYSTEIN ON THE U CHROMOSOME (BPCU) を同定している。ゼニゴケでは *BPCU* 遺伝子をもつ個体が雌となる。一方、ゼニゴケの近縁種アカゼニゴケは高山などに生息する雌雄同株の植物で、その性分化が季節依存的であることが知られる。本研究では、生殖様式の転換に関わる分子機構を理解することを目的に雌雄同株アカゼニゴケの性分化機構の解析を行なった。アカゼニゴケは春にまず雄の生殖器托が、その後に雌の生殖器托が形成される。我々はこれまでに実験室環境下においてアカゼニゴケが雌雄の生殖器托を形成するそれぞれの環境条件を見つけている。またそれらの環境条件によってゼニゴケの性決定遺伝子 *BPCU* のオーソログ遺伝子の発現が制御されていることが示唆されている。本発表では、雌雄同株アカゼニゴケと雌雄異株ゼニゴケの性分化制御の違いを *BPCU* の発現制御に着目して議論したい。

Plants, being sessile organisms, have developed reproductive strategies adapted to their surroundings. Liverworts have a haploid-dominant life cycle and majorities of them are dioicous. *Marchantia polymorpha*, a model liverwort, is dioicous with sex chromosomes. Recently, we identified the sex-determining gene, *BASIC PENTACYSTEIN ON THE U CHROMOSOME* (*BPCU*) responsible for feminization on the female-specific U chromosome in *M. polymorpha*. On the other hand, *Marchantia quadrata*, is a monoicous plant found in high-altitude areas, developing male and female sexual organs in a seasonally alternate manner. In this study, we analyzed the mechanism of sexual differentiation in *M. quadrata* to gain insights into the molecular mechanisms involved in the transition of reproductive system in liverwort. *M. quadrata* initially develops male reproductive organs in the spring, followed by female reproductive organs. We identified laboratory conditions under which *M. quadrata* forms male and female reproductive organs respectively. Moreover, it was suggested that *BPCU* expression is regulated by these environmental conditions. In this presentation, we will discuss the differences in the regulatory mechanisms of sexual differentiation between monoicous *M. quadrata* and dioicous *M. polymorpha*, focusing on the regulation of *BPCU* expression.

reproductive system, sex chromosomes, Liverworts

発表責任者：安居佑季子（yasui.yukiko.7a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D4a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 D4 会場

ジャトロファにおける花成因子 *FT* 遺伝子群の発現挙動の解析
Analysis of expression profile of the flowering locus T (FT) gene family in Jatropha
○河合 弘太、友岡 楓、安藤 佑紘、明石 欣也（鳥取大院・持社創生）
○Kota Kawai, Kaede Tomooka, Yukihiro Ando, Kinya Akashi (Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ.)

乾燥耐性を有する油糧植物ジャトロファは，軽油代替のバイオ燃料源として注目されるが，着花頻度の低さが課題となっている。先行研究において，開花因子 *FT* の相同遺伝子 *JcFT* を過剰発現させたジャトロファにおいて開花促進が報告されているが，自然界における *FT* 発現様式や開花との関係は不明である。そこで本研究では，鳥取大学内の非加温型ガラス室内で栽培したジャトロファを対象に，*FT* 遺伝子群の発現挙動を 2021 年において調査した。このガラス室内では，落葉状態で越冬した後，5 月に萌芽し 6 月に開花のピークを迎え，その後 9 月まで栄養成長と生殖成長が同時進行し，12 月に落葉した。そこで 6, 9, 11 月の 3 時期における *JcFT*, *JcTFL1a*, *JcTFL1b*, *JcTFL1c*, *JcMFT* の 5 相同遺伝子の発現を RT-qPCR により解析した。6 月期に発現の組織特異性を解析したところ，*JcTFL1a* と *JcTFL1b* は茎頂で高く発現するのに対し，*JcFT* は若葉および花で，*JcTFL1c* は花で高発現していた。9 月期においても遺伝子発現パターンは類似していたが，茎頂において *JcTFL1a* と *JcTFL1b* の遺伝子発現が亢進していた。各遺伝子の概日挙動を 9 月期の若葉で調査したところ，*JcFT* を含む多くの遺伝子では午前 6 時に最も高いのに対し，*JcTFL1c* は午前 9 時に発現量が高くなる傾向が見られた。11 月では，若葉において *JcFT* および *JcTFL1c* の発現量が顕著に高まることが観察された。これらの結果から，*JcFT* が促進因子として，*JcTFL1* 群が抑制因子として開花を制御するモデルが考えられた。

Jatropha, a drought-tolerant oilseed plant, has attracted attention as an alternative biofuel source for diesel oil. In this study, gene expression patterns of *FT* family in Jatropha were examined in a non-heated glasshouse at Tottori University in 2021. In this glasshouse, Jatropha sprouted in May and reached flowering peak in Jun., followed by simultaneous vegetative and reproductive growth until Sep., and then deciduous in Dec. Gene expression of five *FT* homologs were examined in Jun., Sep., and Nov. by RT-qPCR. In Jun., expression of *JcTFL1a* and *JcTFL1b* were high in the shoot apex, whereas *JcFT* was highly expressed in young leaves and flowers and *JcTFL1c* in flowers. Similar pattern was observed in Sep., but *JcTFL1a* and *JcTFL1b* were more strongly up-regulated in the stem apex. The circadian behavior was examined in young leaves in Sep., which revealed the expression levels of most genes, including *JcFT*, were highest at 6:00 a.m., while *JcTFL1c* tended to be higher around 9:00 a.m. In Nov., the expression levels of *JcFT* and *JcTFL1c* were significantly higher in the young leaves. These analyses suggested a model that JcFT and JcTFL1s may act as positive and negative factors, respectively, in Jatropha flowering.

Jatropha, flowering, FT

発表責任者：明石欣也（akashi.kinya@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3D4a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 D4 会場

シロイヌナズナの種間不和合性に関わる新規転写調節因子 SPRI2 の機能解析

Functional study of the novel transcription regulatory factor SPRI2 involved in interspecies incompatibility in Arabidopsis.

○伊藤 星太郎[1]、山本 絵里[1]、Tangpranomkorn Surachat[1]、木村 友香[1]、加藤 義宣[1,2]、新留 真紀[1]、高山 誠司[1]、藤井 壮太[1,3] ([1]東大院農、[2]JST さきがけ、[3]サントリーSunRiSE)
○SEITARO ITO[1], Eri Yamamoto[1], Surachat Tangpranomkorn[1], Yuka Kimura[1], Yoshinobu Kato[1,2], Maki Niidome[1], Seiji Takayama[1], Sota Fujii[1,3] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]JST PRESTO, [3]Suntory Rising Stars Encouragement Program in Life Sciences)

植物のめしべには同種花粉の他，異種花粉などの粒子が運搬される．そのため，めしべは異種と同種の花粉を識別し，異種の花粉を選択的に排除する機構を備えている．この機構の多くが未解明であったが，これを応用できれば，種間の壁を超えた多様な育種などの技術開発につながると考えられる．そこで我々はめしべが異種の花粉を選択的に排除する機構を解明するため，ゲノムワイド関連解析によって SHI ファミリーと呼ばれる zinc finger 型新規転写因子群に属する Stigmatic PRIvacy 2 (SPRI2)を見出した．SPRI2 を機能欠損した変異体は，野生型であれば排除できるはずの異種花粉が排除できなくなっていた．しかし，SPRI2 が植物体内でどのように機能しているかは不明であったため，SPRI2 が異種の花粉を排除する機構の解明を目的に研究を行なった．

SPRI2 の細胞内局在を確かめると，SPRI2 は核内の粒状構造体に局在していた．この構造体の性質を調査した結果，本構造体は液-液相分離によって形成されることが示唆された．また，SPRI2 の液-液相分離には N 末端領域に存在するプリオン様ドメイン（PrLD）が関与しており，PrLD による液-液相分離が SPRI2 の転写調節活性に必要十分であると推察された．さらに，SPRI2 が構造体内で相互作用する因子を探索した結果，SPRI2 のパラログであり異種花粉の排除に寄与する SPRI2-like をはじめ，複数の因子と相互作用することが明らかになった．

以上の研究から，SPRI2 は PrLD による液-液相分離によって転写ファクトリーを形成し，異種の排除に必要な反応を担うと考えられた．今後は SPRI2 を人為制御することで新しい作物を作り出す技術へと発展することが期待される．

Plant pistils receive heterospecific pollen that may be carried by a pollinator. Therefore, plants have acquired mechanisms to reject heterospecific pollen. If this mechanism can be applied, it holds the potential for elucidating diverse breeding and speciation mechanisms that transcend interspecific barriers. While much of this mechanism remains unclear, we identified Stigmatic PRIvacy 2 (SPRI2), which belongs to the SHI-family transcription factors. This study aims to elucidate the mechanism by which SPRI2 rejects heterospecific pollen.

Through live cell imaging, it was revealed that SPRI2 localizes to speckles in the nucleus. Investigation into the nature of these speckles suggested their formation through liquid-liquid phase separation (LLPS). Furthermore, it was discovered that the LLPS of SPRI2 involved a prion-like domain (PrLD) situated in the N-terminal region. It was inferred that LLPS mediated by PrLD is both necessary and sufficient for the transcriptional regulation of SPRI2. Additionally, it was suggested that SPRI2 forms complexes with multiple factors.

These findings lead to the hypothesis that SPRI2 induces LLPS through the functionality of PrLD, forming complexes with multiple factors, including SPRI2-like, to mediate the transcriptional reactions necessary for the rejection of heterospecific pollen.

Interspecies incompatibility, Reproduction, Plant

発表責任者：藤井 壮太（a-fujii@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D4a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 D4 会場

アマ科植物における異形花型自家不和合性制御遺伝子の解析
Analysis of genes regulating heteromorphic self-incompatibility in *Linum perenne*

○板倉 健[1]、村瀬 浩司[1,2]、山口 真明[3]、加藤 義宣[1]、安山 成基[1]、藤井 壮太[1]、柴 博史[3]、高山 誠司[1] ([1]東大院農、[2]国立研究開発法人科学技術振興機構、[3]つくば機能植物イノベーション研究センター)
○ Ken ITAKURA[1], Kohji MURASE[1,2], Masaaki YAMAGUCHI[3], Yoshinobu KATO[1], Naruki YASUYAMA[1], Sota FUJII[1], Hiroshi SHIBA[3], Seiji TAKAYAMA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]JST, [3]T-PIRC)

アマ科の *Linum perenne* には、雌ずいが長く雄ずいが短い花のみをつける L(Pin)型と、雌ずいが短く雄ずいが長い花のみをつける S(Thrum)型とが存在する。*L. perenne* はまた同形花由来の花粉を拒絶する自家不和合性を持ち、これらの性質は異形花型自家不和合性と呼ばれる。この現象は *S* 遺伝子座によって制御されており、遺伝子型 *Ss* は S 型、*ss* は L 型の形質を示す。*S* 遺伝子座上には少なくとも、雌ずいの長さ、雌ずいの自家不和合性、花粉の自家不和合性、花粉の大きさと形、雄ずいの長さの 5 つの要素を制御する遺伝子が存在するとされているが、これらの本体は不明であった。

本研究では *L. perenne* における異形花型自家不和合性の制御因子を明らかにするために、ゲノムサイズ 30 倍相当のナノポアリードをアセンブルし、3.5 Mb の *S* 遺伝子座と 350 kb の *s* 遺伝子座配列を得た。*S* 遺伝子座上には *TSS1*、*TPC1*、*TWD1* の 3 遺伝子が存在し、*s* 遺伝子座には遺伝子がコードされていなかった。*TWD1* のゲノム断片を L 型 (*ss*)に導入した形質転換体の花は雄ずいと雌ずい両方が長い表現型を示した。また、*TWD1* 導入株の雌ずいは L 型の花粉を拒絶し L 型の表現型を示したが、花粉は S 型の雌ずいに拒絶され、S 型の表現型を示した。この結果は *TWD1* が S 型株において雄ずいの伸長、S 型の花粉側自家不和合性決定因子の発現および L 型の花粉側自家不和合性決定因子の抑制を行なっていることを示している。

Linum perenne, a member of the Linaceae family, has two types of flowers: the L-styled (Pin), which bears only flowers with long pistils and short stamens, and the S-styled (Thrum), which bears only flowers with short pistils and long stamens. *L. perenne* is also self-incompatible, rejecting pollen derived from isomorphic flowers. This system is referred to as heteromorphic self-incompatibility (HSI). HSI is controlled by a single locus consisting of two alleles, *S* and *s*. Plants with genotype *Ss* show S-styled phenotypes and genotype *ss* show L-styled phenotypes. *S*-locus genes regulating HSI remain unknown.

In this study, to clarify the regulators of HSI in L. perenne, we assembled Nanopore reads and obtained a 3.5 Mb *S*-locus and a 350 kb *s*-locus sequence. Three genes, *TSS1*, *TPC1*, and *TWD1*, were present on the *S*-locus, while no gene was encoded on the *s*-locus. Transgenic plants were generated by introducing a genomic fragment of *TWD1* into L-styled (*ss*) plants, and the function of *TWD1* was revealed by the experiments of the transformants.

self-incompatibility, supergene, heteromorphic self-incompatibility

講演番号：3D4p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D4 会場

アマ科植物の異形花型不和合性における Thrum 特異的遺伝子のゲノム編集による解析
Analysis of genome editing plants targeting for the Thrum specific gene in heteromorphic self-incompatibility in *Linum perenne*.

○田中 麻紀[1]、村瀬 浩司[1]、山口 真明[2]、板倉 健[1]、加藤 義宣[1]、藤井 壮太[1]、柴 博史[2]、高山 誠司[1]、木村 友香[1]、長江 拓也[1] ([1]東大院農、[2]筑波大院)
○Maki TANAKA[1], Koji MURASE[1], Masaaki YAMAGUCHI[2], Ken ITAKURA[1], Yoshinobu KATO[1], Sota FUJII[1], Hiroshi SHIBA[2], Seiji TAKAYAMA[1], Yuka KIMURA[1], Takuya NAGAE[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]The Univ. of Tsukuba)

アマ科のペレニアルフラックスは、雄蕊が長く雌蕊が短い花のみをつける個体 Thrum と雄蕊が短く雌蕊が長い花のみをつける個体 Pin の 2 種類に分かれ、自己と異なる花型由来の花粉を受容し、自己と同じ花型由来の花粉を拒絶する異形花型不和合性である。異形科型自家不和合性は *S* と *s* の二つの対立遺伝子からなる *S* 遺伝子座によって制御されており、*Ss* の場合は Thrum、*ss* の場合は Pin となる。

これまでにペレニアルフラックスのゲノム配列が明らかにされており、*S* 遺伝子座には *TWD1*、*TSS1*、*TPC1* の 3 つの遺伝子があることがわかっている。その一つである *TWD1* は Thrum の花糸や柱頭で特異的に発現しており、異形花型自家不和合性を制御する遺伝子の候補として有力である。そこで、異形花型自家不和合性の機構解明を目的として、Thrum の *TWD1* をゲノム編集によってノックアウトした形質転換体を作製し、その形質転換体の表現型の観察を行った。

Linum perenne has heteromorphic self-incompatibility with two flower types controlled by the *S*-locus, which consists of two alleles, *S* and *s*. Individuals with genotype *Ss* are Thrum, which produces only flowers with long stamens and short pistils. Individuals with genotype *ss* are Pin, which produces only flowers with short stamens and long pistils. The pistils accept pollen from another flower type and rejects pollen from the same flower type as itself.

Three genes, *TWD1*, *TSS1* and *TPC1*, have been found from the *S*-locus region of *L. perenne* genome sequence. *TWD1* is specifically expressed in filaments and stigmas of Thrum plants, therefore, *TWD1* is a good candidate of the *S*-locus gene involved in heteromorphic self-incompatibility. To reveal the mechanism of heteromorphic self-incompatibility, we generated transformants knocked out the *TWD1* gene by genome editing, and observed the phenotype of the transformants.

heterostyly, self-incompatibility, genome editing

講演番号：3D4p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D4 会場

センブリカルスの有用物質生産系の開発に向けた培養条件の確立 I
Establishment of the culture systems for the production of useful compounds in the calli of *Swertia japonica*, I

○松本 紘汰、棟方 快徒、原 光二郎、小峰 正史、川上 寛子（秋田県大院生物資源）
○ Kota MATSUMOTO, Kaito MUNAKATA, Kojiro HARA, Masashi KOMINE, Hiroko KAWAKAMI (Akita Pref. Univ.)

センブリ（*Swertia japonica*）は日本固有の民間薬として知られる有用植物である。センブリの有用物質を大量生産することを目的として、これまで、センブリ不定根が主成分の Swertiamarin (SW）や Gentiopicroside (GE）を産生することを明らかにしてきた。しかし、カルスでは効率的にセコイリドイドを産生可能な培養条件は明らかになっていない。本研究では光条件がカルスのセコイリドイド生産へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。10 μM NAA と 100 μM KIN、3% ショ糖を含む Lloyd McCown's Woody Plant 寒天培地にセンブリカルスを植え付け、RGB 比を 2:3:1（白色光）、1:0:0、3:0:1、1:0:1、1:0:3、0:0:1 に調整した光を照射した試験区において、25℃の人工気象器内で 4 週間培養した。その後、カルスを凍結乾燥した後にメタノールで抽出し、LC-ESI-MS で SW 及び GE 含有量を定量した。その結果、SW と GE 共に白色光照射区で最も多く、赤色光の割合が増えるにつれて減少した。次に、白色光照射区で光強度を 0 から 25.1 W/m²の範囲でカルスを培養した結果、18.1 W/m²区までの範囲では光強度が強くなるほど SW 及び GE 含有量が増加した。さらに、セコイリドイド生合成関連遺伝子の発現量を測定した結果、0 W/m²区と比較すると、セコロガニン合成酵素（SLS）と予想される遺伝子の発現が 11.0、18.1 W/m²区で顕著に増加した。以上より、光条件を制御することによってセンブリカルスでセコイリドイド類を産生可能であることを初めて示した。

Swertia japonica is an important medicinal plant in Japan. In this study, we investigated the effects of light conditions on production of secoiridoids in the cell suspension culture of *S. japonica*. The calli were treated with some light conditions adjusted with six different radiation intensities (0 - 25.1 W/m^2) or six different combinations of red, green, and blue (RGB): 2:3:1(white), 1:0:0(red), 0:0:1(blue) 3:0:1, 1:0:1 and 1:0:3(three purple light conditions). The methanol extracts of calli were analyzed by LC-ESI-MS. Furthermore, the expression of genes related to secoiridoids biosynthesis were analyzed by qRT-PCR. As the results, productions of SW and GE were enhanced by increasing radiation intensities up to 18.1 W/m². Moreover, SW and GE were the most produced in the calli treated in white light, on the other hands, the contents of these compounds were decreased by increasing the ratio of red light. The expression of genes expected to be secologanin synthase (SLS) significantly increased in the 11.0 and 18.1 W/m². These results suggested that regulation of light conditions was useful for production of secoiridoids in calli of *S. japonica*.

Swertia japonica, Secoiridoids, Light conditions

発表責任者：川上　寛子（khiroko@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3D4p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D4 会場

二次代謝活性化によるセンブリカルスの有用物質生産系の開発
Development of the production system for useful compounds by activation of secondary metabolism with the calli of *Swertia japonica*
○棟方 快徒、松本 紘汰、川上 寛子、小峰 正史、原 光二郎（秋田県大院生物資源）
○ Kaito MUNAKATA, Kota MATSUMOTO,, Hiroko KAWAKAMI, Masashi KOMINE, Kojiro HARA (Akita Pref. Univ.)

センブリ（*Swertia japonica*）は日本固有の民間薬として利用される有用植物である。天然植物体が持つ有効成分として主成分の secoiridoid、xanthone、flavonoid が知られている。しかし、カルスによる効率的な有用物質生産系は確立されていない。そこで本研究では、傷害応答及びエピジェネティック機構に注目し、センブリカルスの二次代謝へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。ジャスモン酸メチル（MeJA）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の SAHA、DNA メチル基転移酵素阻害剤の 5-アザシチジン（AzaC）を、終濃度が 5 μM または 50 μM となるように液体培地に添加し、25℃の人工気象器内で 7 または 14 日間振盪培養した。回収したカルスを凍結乾燥し、メタノールで抽出後、LC-ESI-MS で swertiamarin（SW）及び gentiopicroside（GE）含有量を定量した。また、SW の生合成に関連する酵素（7DLH, SLS）の遺伝子発現を qRT-PCR で解析した。その結果、MeJA 、SAHA、AzaC のいずれの処理においても 14 日目には SW 含有量が顕著に増加した。一方、5 μM の SAHA 及び AzaC により GE 含有量の減少がみられた。また、50 μM の AzaC により 7DLH 及び SLS の遺伝子発現が抑制された。以上より、センブリカルスの SW 及び GE の生合成経路において、エピジェネティック制御の関与が初めて示唆された。

Swertia japonica is an important plant used as traditional folk medicines in Japan. Secoiridoids, xanthones and flavonoids are known as the main active compounds of *S. japonica*. However, an efficient system for producing these beneficial substances in the callus culture has not been established. Therefore, the aim of this study is to clarify the effects of reagents related to wound response or epigenetic regulation on the secondary metabolism of *S. japonica* calli. A methyl jasmonate (MeJA), a histone deacetylase inhibitor SAHA, or a DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine (AzaC) was added to a liquid media at final concentrations of 5 μM or 50 μM. After 7- or 14-day shaking culture in a growth chamber at 25℃, the callus was collected, freeze-dried and extracted with methanol for analyses of the swertiamarin (SW) and gentiopicroside (GE) contents by LC-ESI-MS. Additionally, the gene expression of enzymes (7DLH, SLS) for the SW biosynthesis were examined by qRT-PCR. The results showed that SW content increased significantly on the 14 days in all treatments of MeJA, SAHA, and AzaC. On the other hand, 5 μM of SAHA or AzaC caused a decrease in GE content. Furthermore, the gene expression of 7DLH and SLS was suppressed by 50 μM AzaC. These results suggest the involvement of epigenetic regulation in the biosynthetic pathway of SW and GE of *S. japonica* calli for the first time.

Swertia japonica, secondary metabolism, epigenetic regulation

発表責任者：原光二郎（kojiro_h@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3D4p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D4 会場

アグロ浸潤法によるベンサミアナタバコ葉における植物インスリン「コロソリン酸」の異種生産
Heterologous production of corosolic acid, a “phyto-insulin”, in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves

○關 光[1,2]、JUTAPAT Romsuk[1]、三浦 謙治[3]、村中 俊哉[1,2]([1]阪大院・工・生物工学、[2]大阪大学先導的学際研究機構、[3]筑波大学生命環境系)
○ Hikaru SEKI[1,2], Romsuk JUTAPAT[1], Kenji MIURA[3], Toshiya MURANAKA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., [2]Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

熱帯性植物のバナバ（*Lagerstroemia speciosa*）の葉から抽出されるコロソリン酸は，血糖低下を促進するホルモンであるインスリンと同様な作用を持つことから日本国内で機能性表示食品として使用されているトリテルペノイドである．コロソリン酸はメバロン酸経路を経て合成される炭素数 30 の化合物である 2,3-オキシドスクアレンが環化されて生成するトリテルペンの一種のα-アミリンが，さらに 28 位および 2 位炭素に特異的な水酸化反応を受けて生合成される．バナバ葉におけるコロソリン酸含量は個体群によって乾燥重量あたり 0.05mg/g から 8.7 mg/g と幅があることが報告されている（Jayakumar et al., 2014).本研究では，アグロ浸潤法によるベンサミアナタバコ葉におけるコロソリン酸生合成酵素の一過性発現によって，ベンサミアナタバコに内在の基質からコロソリン酸を異種生産することに成功した．植物細胞核内で自己複製するジェミニウイルスレプリコン型バイナリーベクター（つくばシステムベクター）にコロソリン酸生合成に関わる 5 個の生合成酵素(HMG-CoA 還元酵素，α-アミリン合成酵素，CYP716A12，CYP716C53，およびシトクロム P450 還元酵素)遺伝子をそれぞれ挿入しアグロバクテリウムに導入した．各遺伝子を保持する 5 種のアグロバクテリウムを混合しベンサミアナタバコ葉に接種した．接種 7 日後に葉を回収し，抽出物中のコロソリン酸量を測定した結果，上記のバナバ成熟葉における最も高い含有量の約 1.5 倍に匹敵する乾燥重量あたり 12.8 mg/g のコロソリン酸を生産することに成功した．

Corosolic acid, a pentacyclic triterpenoid contained in the mature leaves of *Lagerstroemia speciosa* commonly known as ‘Banaba’, has recently attracted attention for its insulin-like properties, but without induction of anti-insulin antibodies. In the present study, we used the Tsukuba system, which is an agroinfiltration-based transient protein expression system based on the geminivirus replicon vector pBYR2HS, to produce corosolic acid in *Nicotiana benthamiana* leaves by co-expressing its biosynthetic enzymes, a feedback regulation-deficient form of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, α-amyrin synthase , CYP716A12 , CYP716C53, and cytochrome P450 reductase. Corosolic acid accumulated at 12.8 mg/g dry weight in *N. benthamiana* leaves at seven days after agroinfiltration, which is approximately 1.5 times higher than the reported highest level found in matured Banaba leaves (Jayakumar et al., 2014). These results indicate the advantage of our strategy for high-titer production of bioactive triterpenoids, such as corosolic acid.

Nicotiana benthamiana, heterologous production, terpene

発表責任者：關　光（hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3D4p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D4 会場

ゲノム編集藻類の屋外培養を可能にする外来遺伝子フリーゲノム編集システムの開発

Development of transgene-free genome-editing systems which enable outdoor cultivation of genome edited algae

○栗田 朋和[1]、岩井 雅子[2]、岡崎 久美子[3]、前田 真一郎[4]、高見 明秀[4]、坂本 敦[3]、太田 啓之[2,5]、佐久間 哲史[3]、山本 卓[1,3] ([1]広島大ゲノムイノベーションセンター、[2]ファイトリピット・テクノロジーズ(株)、[3]広島大院統合生命、[4]マツダ(株)、[5]東工大生命理工)
○Tomokazu KURITA[1], Masako Iwai[2], Kumiko Okazaki[3], Shinichiro Maeda[4], Akihide Takami[4], Atsushi Sakamoto[3], Hiroyuki Ohta[2,5], Tetsushi Sakuma[3], Takashi Yamamoto[1,3] ([1]Hiroshima Univ., Genome Editing Innovation Center, [2]Phytolipid Technologies Co., Ltd., [3]Grad. Sch. of Inte. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [4]Mazda Motor Corporation, [5]Tokyo Inst. of Tech., Sch. of Life Sci. and Tech.)

気候変動の抑制は喫緊の課題であり大気中の CO_2 の削減が求められている。微細藻類は光合成により CO_2 を吸収して燃料に変換可能な油脂を多量に蓄積するため注目されている。一方で藻類由来の燃料は化石燃料に比べて生産コストが高くゲノム編集による生産性の向上が進められているが、微細藻類における低コストでの藻類培養には屋外培養が不可欠であるため、外来遺伝子を除去するシステムも必須である。我々は、油脂を最も多く蓄積する微細藻類の一種であるナンノクロロプシスにおいて高い変異導入活性を持つ TALEN ベクターに出芽酵母のセントロメア・複製起点様配列(CEN/ARS)を持たせることで変異導入後に脱落可能なベクターシステムを構築した。さらに CEN/ARS ベクターを利用して内在性の配列のみが任意の位置に挿入できる外来遺伝子フリーのノックインシステムも開発した。これらのシステムは今後の高機能藻類開発の基盤技術となると考えられる。

Climate change is the pressed issues, and the elimination of CO_2 is required. Microalgae accumulate large amounts of lipids which can be converted into fuels via photosynthesis accompanied by CO_2 assimilation. However, the production cost of algal fuels is much higher than that of fossil fuels and the improving production cost by genome-editing has been progressed so far. Because outdoor culture is indispensable to culture algae with low cost, transgene removing systems are also essential. We developed highly active TALEN vectors containing yeast centromere and autonomous replication sequence (CEN/ARS) in one of the highest lipid accumulation alga, *Nannochloropsis*. These vectors can be removed from algal cells after mutagenesis. In addition, transgene-free knock-in systems which enable to insert endogenous gene into an arbitrary locus were also developed. These transgene-free systems will become future generic technology for development of high-performance alga.

Genome editing, Transgene-free, Nannochloropsis

発表責任者：栗田朋和（kuri616@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3D4p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D4 会場

ゲノム編集作物開発に有用な多重ゲノム編集用プラスミドセットと簡便高密度水耕栽培法

A simple set of plasmids for multiple genome editing and a method for high-density crop hydroponics in a plant incubator

○黒田 昌治、パク ヒョンジュン、及川 鉄男（農研機構生物研）
○Masaharu Kuroda, Hyungjun Park, Tetsuo Oikawa (NARO Inst. Agrobiol. Sci.)

我々は、以前に開発した制限酵素のみで遺伝子多重連結ができるバイナリーベクター[1]を基盤として、独自のイネ用ゲノム編集ベクターセットを作製した。バイナリーベクター上に guide RNA やヌクレアーゼを迅速に超多重連結できるように設計してあり、多様な標的配列に対してより複雑な改変を施すことができる。

また、植物体が大きくて種子の収穫まで時間がかかる作物を効率的に栽培するために、イネをベースとして簡便に植物体を高密度に水耕栽培する方法（Single-tube hydroponics）を開発した [2,3]。この方法は、豆類、ピーマン等野菜類やムギ類栽培にも活用できることがわかりつつあり、ゲノム編集研究をはじめとした作物の基礎研究全般に極めて有用である。

なお本研究の一部は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」（JPJ007097）の支援を受けて行なった。

[1] Kuroda M.(2010) Biosci. Biotechnol. Biochem.74, 2348-2351 [2] Kuroda M.(2015) Biosci. Biotechnol. Biochem.79, 63-67 [3] (in Japanese) http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2014/narc14_s11.html

We have developed a new sets of plasmids for multiple genome editing using CRISPR/Cas9 systems based on our previously reported vectors [1]. Our system enables insertion of multiple guide RNAs and nucleases into one binary vector, so promotes the efficient production of various genome-editing lines.

Usually, cultivation of crops requires considerable space, facilities, and long time for seed harvest. We newly developed a versatile method for high-density crop cultivation in a plant incubator termed 'Single-tube hydroponics'[2,3], and continue to improve it. Our method can be used for cultivation of various crops and vegetables, and will assist the genome-editing research.

This research was supported by the research program on development of innovative technology grants (JPJ007097) from the Project of the Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (BRAIN) .

genome editing, transgenic, hydroponics

発表責任者：黒田昌治（kurodama@affrc.go.jp）

講演番号：3D4p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D4 会場

植物による動物型化糖鎖をもつタンパク質生産
Production of glycoproteins in plant with modified glycans
○大窪 華和[1]、梶浦 裕之[2]、三﨑 亮[2]、藤山 和仁[2]([1]阪大院工、[2]阪大生国セ)
○Kana OKUBO[1], Hiroyuki KAJIURA[2], Ryo MISAKI[2], Kazuhito FUJIYAMA[2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech)

近年、組換えタンパク質の生産宿主として、植物が注目されている。植物での組換えタンパク質生産時の懸念事項として、タンパク質上の糖鎖の構造が植物と動物で異なることに起因し、植物型の糖鎖をもつ医療用等の組換えタンパク質が動物に対して適応しない点が挙げられる。そこで、植物で生産される組換えタンパク質の糖鎖構造の動物型化が望まれる。

本研究では動物型糖鎖に特有のガラクトース残基に着目し、糖鎖修飾経路の改変と最適化をとおし植物での動物型糖鎖をもつ組換え糖タンパク質の生産を目指す。動物由来のガラクトース転移酵素とそのバリアント、さらにモデルタンパク質として抗体をタバコ近縁種 *Nicotiana benthamiana* で一過的に共発現させた。糖鎖構造解析の結果、動物型のガラクトース残基が結合した糖鎖構造をもつ抗体の発現が確認できた。今後、植物型糖鎖に特有の糖残基を付加する糖転移酵素の欠損株等の利用により、植物によるさらに動物型化された糖鎖構造をもつ組換えタンパク質生産を試みる。

Plants have recently attracted attention as a host for recombinant protein production. Plants have a high protein expression capacity and can be used to produce proteins at low cost. However, there is concern that proteins with plant-specific glycans might induce allergenic symptom to humans, and therefore, the plant-specific glycan structures should be modified into mammalian-specific glycans.

In this study, we focused on galactose residues of glycans and tried to produce proteins with mammalian-specific glycan structures in plant. Mammalian-derived galactosyltransferases and antibodies as model proteins were transiently co-expressed in *Nicotiana benthamina*. Glycan analysis demonstrated that the produced antibody was modified with galactose residue(s) at the non-reducing terminal of glycans. This result indicated that the recombinant proteins with glycans similar to those of the mammals could be produced in plants by introducing mammalian glycosyltransferases. Further modification of glycan structure on recombinant proteins using the plant-specific glycosylationdeficienct mutants would be desired.

Glycosylation, Transient expression in plants, Antibody

発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3D4p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D4 会場

Towards Microneedle Array-assisted Delivery in Rice: Assessment of Multiplex CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes Activities Targeting *OsPDS*

○NAZRUL HISHAM BIN NAZARUDDIN[1,2], AYANA YAMAGISHI[1,2], CHIKASHI NAKAMURA[1,2]
([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]AIST)

Genome editing by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) has emerged as a powerful tool for crop improvement. This technology allows for precise modifications to be made in the crop genome, targeting specific genes that control economically-important traits such as yield, disease resistance, and nutritional content. The commonly used transformation techniques rely on integrating exogenous DNA into the rice genome, which potentially leading to unintended genetic changes and regulatory challenges. To address these concerns, the use of *in vitro* pre-assembled CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes (RNPs) offer a promising platform for DNA-free genome editing. Among the emerging RNP delivery systems, microneedle array (MNA)-assisted delivery has shown great potential for delivering RNPs directly into plant tissues. We broaden the MNA toolkit for DNA-free genome editing in a monocot model plant, rice (*Oryza sativa* L.), in addition to our previous studies in dicots. Prior to MNA-assisted RNPs delivery to rice, the efficiency of RNPs was initially evaluated. In this study, we aimed to assess the efficiency of multiplex genome editing by targeting the rice phytoene desaturase (*OsPDS*) gene in rice. To evaluate the effectiveness of this approach, we performed an *in vitro* nuclease assay and an *in vivo* protoplast transfection using dual- and triple-guided RNPs. The *in vitro* nuclease assay revealed substantial nuclease activity, with over 95% cleavage efficiency achieved when using two or more guide RNAs. Furthermore, Sanger sequencing revealed that dual- and triple-guided RNPs induced indel with up to 107 bp deletion after *in vivo* protoplast transfection, with editing efficiencies of 38% and 19%, respectively. These results provide valuable insights into the feasibility of using multiplex RNPs targeting a single gene for increasing the probability of generating mutant plants via MNA-assisted RNPs delivery in the future.

CRISPR, Ribonucleoprotein Complex (RNP), Rice

発表責任者：Chikashi Nakamura（chikashi-nakamura@aist.go.jp）

講演番号：3D5a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D5 会場

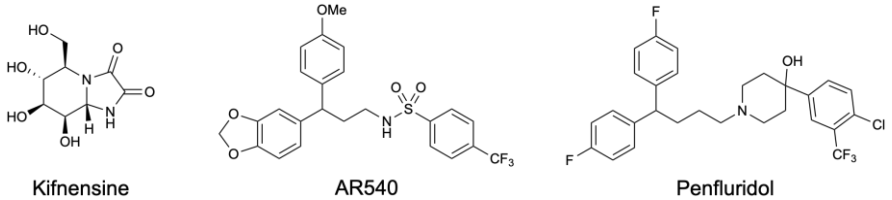
がん腫瘍微小環境の破壊を目指した細胞接着阻害剤：非天然型ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の開発

Cell Adhesion Inhibitors for Disrupting the Tumor Microenvironment: Development of an Unnatural Inhibitor of Golgi Mannosidase

荒田 七星[1]、本多 航[2]、夏 智弘[2]、平野 貴子[1,2]、○袴田 航[1,2] ([1]日大・生資科、[2]日大院・生資科)
Nanase Arata[1], Wataru Honada[2], Haozhi Xia[2], Takako Hirano[1,2], ○Wataru Hakamata[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Graduate School of Nihon Univ.)

がん治療の大きな障害の一つに腫瘍微小環境（Tumor microenvironment: TME）がある。TME は腫瘍への抗がん剤の送達を困難し、治療効果を大幅に低下させる。TME を超えて抗がん剤を腫瘍内部に到達させるため、腫瘍を構成するがん細胞間の細胞接着を不全とし TME の破壊を目指した。がん細胞同士の接着には細胞表面糖鎖が重要な役割を担っており、ゴルジ体マンノシダーゼ（GM）の阻害は細胞表面糖鎖を未成熟とし細胞接着不全を誘起する。しかし、既知の GM 阻害剤は複雑な天然物（Kifnensin）であったため、非天然型でドラッグライクな構造を有する GM 阻害剤（AR540 等）を報告した（*Bioorg. Med. Chem.*, **28**, 115492, 2020, 特願 2023-073745）。これら阻害剤の細胞接着不全活性を擬似的な TME として卵巣がん細胞のスフェロイドで評価した。その結果、細胞毒性を示さず細胞接着不全によりスフェロイドを崩壊させ、その崩壊が GMII (*MAN2A1-2*, GH38) 阻害ではなく GMI (*MAN1A1-3*, GH47) 阻害に基づくことを明らかにした。さらに、新規非天然型 GM 阻害剤として AR540 に構造の類似した統合失調症治療薬 Penfluridol のスフェロイド崩壊活性についても報告する。

The tumor microenvironment, TME, presents one of the most significant challenges in cancer chemotherapy. It impedes the delivery of anticancer drugs to the tumor, significantly reducing their therapeutic benefits. Our goal is to overcome TME by disrupting cell adhesion among cancer cells that constitute the tumor, thus destroying TME and enabling anticancer drugs to penetrate the tumor. Cell surface glycans have a significant function in facilitating cancer cell adhesion. Inhibition of Golgi mannosidase (GM) results in a loss of the mature glycans on the cell surface, leading to the failure of cell adhesion. Known GM inhibitors, Kifnensine, are complicated natural products. We developed non-natural GM inhibitors, such as AR540, with drug-like structures. The inhibitors were evaluated for cell adhesion inhibitory activity in OVCAR-3 cell spheroids as a pseudo-TME. The results demonstrated their disruption of spheroids through cell adhesion inhibition without cytotoxicity. The disruption is based on GMI (*MAN1A1-3*, GH47) inhibition instead of GMII (*MAN2A1-2*, GH38) inhibition. Additionally, we report the spheroid disruption of Penfluridol, which is a schizophrenia drug structurally analog to AR540, acting as a novel non-natural GM inhibitor.



Cancer, Tumor microenvironment, Golgi mannosidase

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D5a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D5 会場

細胞老化関連創薬を目指した新規老化関連糖質分解酵素の探索

Screening for novel senescence-associated glycosidase for cellular senescence-related drug discovery

○夏 浩智[1]、那須田 悠太[2]、羽切 保乃華[2]、平野 貴子[1,2]、袴田 航[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科）
○Haozhi Xia[1], Yuta Nasuda[2], Honoka Hakiri[2], Takako Hirano[1,2], Wataru Hakamata[1,2] ([1]Graduate School of Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

日本のみならず中国でも高齢化は大きな社会問題になっており、高齢者の健康寿命延伸は重要な課題の一つとなっている。近年、個体老化と細胞老化の関連が盛んに研究され、老化を疾患の一つと捉える考えが定着してきた。特に、老化細胞特異的に細胞死を誘導する「セノリティック薬」や老化細胞の細胞老化関連分泌形質を阻害する「老化細胞阻害（セノモルフィック）薬」が世界中で開発されている。このような老化関連創薬においては細胞の老化を検出することが基本となる。細胞老化の検出には、5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside（X-Gal）を基質とした老化関連酸性-β-ガラクトシダーゼ（SA β-Gal）の過剰発現の検出が一般的である。そこで我々は、細胞老化をより定量的かつ高感度に検出するために、SA β-Gal に代わる老化関連糖質分解酵素の探索とそれに用いる蛍光基質の開発を行っている。開発した蛍光基質[1)-3)]を用いて老化細胞の検出を実施した結果、α-L-フコシダーゼ活性が SA β-Gal 活性よりも高い活性を示した。今後は本結果に基づき、ヒト培養細胞を用いたセノリティック薬や老化細胞阻害薬のリード化合物探索を行う予定である。

Aging has become a major social issue in Japan and China, and extending the healthy life expectancy of older people has become one of the most critical issues. In recent years, the relationship between individual aging and cellular senescence has been actively studied, and the idea of aging as a disease has taken hold. In particular, "Senolytic drug" that induce cell death specifically in senescent cells and "Senomorphic drug" that inhibit ASAP of senescent cells are being developed worldwide. Detecting cellular senescence is fundamental to such senescence-related drug discovery. The detection of senescence-related acid-β-galactosidase (SA β-Gal) overexpression using 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-Gal) as a substrate has been commonly used to detect cellular senescence. To detect cellular senescence more quantitatively and sensitively, we are screening for an alternative senescence-associated glycosidase to SA β-Gal and developing fluorescent substrates for the enzymes. The detection of senescent cells using the developed fluorescent substrates[1)-3)] showed that the activity of α-L-fucosidase was higher than that of SA β-Gal. Based on these results, we plan to screen for lead compounds for Senolytic and Senomorphic drugs using human cultured cells.

References: 1) W. Hakamata et al, *Bioorg. Med. Chem*. 2016, 2) W. Hakamata et al, *ACS. Med. Chem. Lett*. 2019, 3) W. Hakamata et al, *Chem.Pharm. Bull.* 2020.

cellular senescence, SA ß-Gal, Senolytic drug

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D5a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D5 会場

Vibrio 属新規ウルバン資化細菌のウルバン分解酵素の解析
Analysis of ulvan lyases in newly isolated ulvan-utilizing bacteria belonging to the genus *Vibrio*
○大西 浩平、長江 麻弥、田邊 海晴、木村 友紀（高知大農林海洋）
○Kouhei OHNISHI, Maya NAGAE, Kaisei TANABE, Yuki KIMURA (Kochi Univ.)

緑藻アオサ属の細胞壁成分であるウルバンは、主に硫酸化ラムノースとウロン酸からなる２糖を基本単位とする硫酸化多糖である。ウルバン分解の初発酵素は、ラムノースとウロン酸間のβグリコシド結合を切断する ulvan lyase である。またそれ以外のウルバン分解に関連する酵素群も含め、その構造遺伝子はゲノム上に polysacchaaride utilzaion locus (PUL)として存在している。

我々は、これまでに緑藻ミナミアオサとミナミアオノリから抽出したウルバンを唯一の炭素源として生育する海洋性細菌を単離してきたがほとんどが *Alteromonas* 属であった。ウルバン資化細菌のゲノム解析や異種発現した ulvan lyase の解析から、これら資化細菌は PL (polysaccharide lyase)24, PL25 ファミリーに属する３種類の UllA, UllB, UllC を持つことを明らかにしてきた。

本発表では、新たに *Vibrio* 属に属するウルバン資化細菌を単離したので報告する。ゲノム解析の結果、新規資化細菌は非常にコンパクトな PUL を持つこと、また ulvan lyase として UllB と UllC の２種類しか持たないことが明らかとなった。*Alteromonas* 属細菌においては、UllA が菌体外に分泌されウルバン分解を行っている一方で、*Vibrio* 属細菌では UllB が分泌されている可能性がある。実際に UllB にはシグナル配列が存在している。現在新規 ulvan lyase の性状解析を行っている。

Ulvan, a cell wall component of the green alga, is a sulfated polysaccharide whose basic unit is a disaccharide composed mainly of sulfated rhamnose and uronic acid. The primary enzyme for ulvan degradation is ulvan lyase, which cleaves the β-glycosidic bond between sulfated rhamnose and uronic acid. The structural genes for ulvan degradation exist as a PUL on the genome.

We have isolated marine bacteria utilizing ulvan as a sole carbon source. They belong to the genus *Alteromonas*. Genome analysis of ulvan-utilizing bacteria and heterologous expression of ulvan lyases have revealed that these bacteria have three types of ulvan lyases, UllA, UllB, and UllC, which belong to the PL (polysaccharide lyase)24 and PL25 families.

In this presentation, we report the isolation of new ulvan-utilizing bacteria belonging to the genus *Vibrio*. Genome analysis revealed that the newly isolated bacteria have a very compact PUL and only two types of ulvan lyases, UllB and UllC. UllA has been demonstrated to be secreted for ulvan degradation in *Alteromonas* sp., while UllB could be secreted in *Vibrio* sp. A signal sequence was found in *Vibrio* UllB. We are currently analyzing the properties of these novel ulvan lyases.

ulvan, sulfated polysaccharide, degradation

発表責任者：大西浩平（kouheio@kochi-u.ac.jp）

講演番号：3D5a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D5 会場

霊長類腸内に棲息するビフィズス菌のユニークな植物由来糖質代謝経路
Novel pathway of primate-gut associated bifidobacteria to utilize plant-derived glycans
○井上 萌[1]、小酒井 智也[1]、佐々木 優紀[1]、中島 有登[1]、阪中 幹祥[1]、藤田 清貴[2]、片山 高嶺[1] ([1]京大院生命、[2]鹿大院農)
○Moe INOUE[1], Tomoya KOZAKAI[1], Yuki SASAKI[1], Aruto NAKAJIMA[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Kiyotaka FUJITA[2], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagoshima Univ.)

ビフィズス菌は 100 以上の(亜)種から構成されており、昆虫から霊長類まで多岐にわたる宿主動物の腸管内に棲息している。近年のゲノム解析の結果から、これらのビフィズス菌種は異なる宿主動物のそれぞれの食性に適応してきたこと、すなわち、異なる宿主の食餌成分に含まれる難消化性糖質を利用するために、それぞれのビフィズス菌種がユニークな糖質分解酵素を適応進化させてきたことが推察されている。

本研究では、一部の霊長類がヒトとは異なる食性、特に樹木の滲出物（植物由来糖質）を主食とすることに着目し、これまで殆ど理解されていない「霊長類由来ビフィズス菌における糖質代謝機構」を解明することを目指した。まず、植物由来糖質を炭素源としていくつかの霊長類由来ビフィズス菌を用いてスクリーニングおよび比較ゲノム解析を行ったところ、資化性菌のゲノムにおいてのみ特定の糖質加水分解酵素および糖質輸送体遺伝子が保存されていることを見出した。そこで、これらの糖質加水分解酵素および糖質輸送体の機能を生化学・遺伝学的に解析し、当該酵素の植物由来糖質資化における重要性を明らかにした。本発表では、これらの成果について報告すると共に、今回同定した代謝経路が他の腸内細菌の有する既知の代謝経路と如何に異なるのかに言及することで、霊長類由来ビフィズス菌の独自の適応進化戦略について考察したい。

The genus *Bifidobacterium* comprises over a hundred (sub)species that inhabit the intestinal tract of different host animals, spanning from insects to humans. Recent genomic analysis suggests that bifidobacterial (sub)species have adapted to the feeding habits of different host animals, i.e., each (sub)species has acquired a distinct gene set required for the utilization of host diet-derived carbohydrates. In this study, through a comparative genomic analysis of plant glycan utilizing- and non-utilizing strains, we revealed that non-human primate gut-associated bifidobacterial species possess an unprecedented pathway for the utilization of undigestible plant-derived glycans consumed by their hosts. Genetic and biochemical analyses led to the identification of novel enzymes responsible for the degradation of those glycans. In this talk, we will report these findings to highlight the unique adaptation strategy these bifidobacterial species adopted and show how the identified pathway we have elucidated differs from the pathways that other gut bacteria have evolved.

Bifidobacteria, Glycoside hydrolase, Transporter

発表責任者：片山　高嶺（katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D5a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D5 会場

Bifidobacterium bifidum 由来 GH101 酵素の機能解析
Functional analysis of a GH101 enzyme from Bifidobacterium bifidum
○桝本 麗花子[1]、小酒井 智也[1]、阪中 幹祥[1]、芦田 久[2]、片山 高嶺[1]、加藤 紀彦[1] ([1]京大院生命、[2]近畿大院・生物理工)
○Rikako MASUMOTO[1], Tomoya KOZAKAI[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Hisashi ASIDA[2], Takane KATAYAMA[1], Toshihiko KATOH[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kindai Univ.)

哺乳動物の腸内に広く生息しているビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* は、腸管粘液の主成分であるムチン糖タンパク質の *O*-結合型糖鎖を標的とする多種類の糖質加水分解酵素（glycoside hydrolase：GH）を発現する。本研究では *O*-結合型糖鎖のコア 1 構造（T 抗原：Galβ1-3GalNAc-α-Ser/Thr）に作用する GH101 エンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ（EngBb）の酵素活性が本菌の腸内定着や菌叢形成に及ぼす影響の解明を試みた。まず、組換え酵素の発現精製を行い、本酵素がブタ胃由来ムチン（PGM）から Galβ1-3GalNAc（ガラクト-*N*-ビオース：GNB）を遊離することを確認した。次に、EngBb の生理機能を解明する目的で本遺伝子の欠損株および GNB トランスポーター欠損株を作製し、これらの欠損株を PGM 添加培地で培養した。その結果、各欠損株ではムチン構成糖の遊離パターンに差異が生じること、またトランスポーター欠損株では遊離 GNB が培地中に顕著に蓄積すること確認された。現在、野生株および各欠損株のマウス投与実験を行うことで、GNB が菌叢形成に与える影響を検討している。

Bifidobacterium bifidum, which colonizes the intestinal tract of various mammals, expresses numerous extracellular glycoside hydrolases (GHs) targeting *O*-linked glycans of mucin glycoproteins. In this study, we aimed to understand how GH101 endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase (EngBb) is involved in the gut colonization by *B. bifidum* and how the enzyme activity influences microbiota formation in the gut. First, we recombinantly expressed and purified EngBb of *B. bifidum* and, using the preparation, we confirmed its Galβ1-3GalNAc (galacto-*N*-biose, GNB)-releasing activity using porcine gastric mucin (PGM) as a substrate. Then, to examine the physiological role of the enzyme, the corresponding gene as well as the GNB transporter gene were inactivated. The mutants showed distinct patterns in the release of mucin *O*-glycan-constituting sugars when grown in the medium supplemented with PGM. In addition, a large amount of GNB accumulated in the culture supernatant of the GNB transporter mutant. We are currently analyzing fecal samples collected from mice administered with WT- or mutant *B. bifidum* strains to examine the potential impact of GNB on the composition of the gut microbiome.

Bifidobacterium bifidum, Glycoside hydrolase, Galacto-N-biose

講演番号：3D5a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D5 会場

Arthobacter sp. KI72 由来ナイロン分解酵素 NylC の基質認識に関わるアミノ酸残基の特定
Identification of Amino Acid Residues Involved in the Substrate Recognition of Nylon-Degrading Enzyme NylC from *Arthobacter* sp. KI72

○飯笹 さやか、加藤 太一郎（鹿児島大院理工）
○Sayaka IIZASA, Dai-ichiro KATO (Grad. Sch. Sci. and Eng. Kagoshima Univ.)

Arthobacter sp. KI72 は、6-ナイロンの構成ユニットである 6-アミノカプロン酸（Ahx）オリゴマーを唯一の炭素源・窒素源とした培地で増殖できる土壌細菌である。我々は、*Arthobacter* sp. KI72 由来のナイロン分解酵素 NylC（ArNylC）に注目した。ArNylC は、直鎖または環状の 3 量体以上の Ahx オリゴマーに対してエンド型の加水分解活性を示す。ArNylC に 4 アミノ酸変異を導入した ArNylC-GYAQ は、高い耐熱性を示すことが報告されている（*Tm* = 85℃）[1]。しかし Ahx の認識に直接関わるアミノ酸残基は未だ特定されていない。

Leucobacter triazinivorans は難培養放線菌の一種であり、ArNylC と 92%のアミノ酸配列相同性を示す LtNylC を持つ。しかし、LtNylC のナイロン分解活性は ArNylC に比べてかなり低い。そこで我々は、ArNylC-GYAQ のアミノ酸配列を参考に、LtNylC にアミノ酸変異導入を試みた。その結果、ArNylC と同じく、LtNylC-GYA は高い耐熱性を示した（*Tm* = 86℃）。更に、V111G 変異の導入により、ナイロン分解活性の付与に成功した。次いで、F128L/I144V の 2 アミノ酸変異を追加で導入した LtNylC-GYAGLV は、80℃以上の耐熱温度を保持したまま、長鎖 Ahx ポリマーに対しても ArNylC と同程度の分解活性を示すことが分かった（*Tm* = 84℃）。本研究により、Ahx 認識に関わるアミノ酸として、111 位、128 位、144 位に位置する 3 アミノ酸の重要性を示唆する結果が得られた。

Arthobacter sp. KI72 is a soil bacterium that can grow on media containing 6-aminocaproic acid (Ahx) oligomers, the constituent units of 6-nylon, as the sole carbon and nitrogen source. We focused on the nylon-degrading enzyme NylC from *Arthobacter* sp. KI72 (ArNylC), which exhibits endo-type hydrolytic activity against linear or cyclic trimeric or larger Ahx oligomers. Previous studies identified that 4 amino acid mutations of NylC from *Arthrobacter* sp. KI72 (ArNylC-GYAQ) enhanced the thermostability by 35ºC (*Tm* = 85℃)[1]. However, the amino acids directly involved in the recognition of Ahx have not yet been identified.

Leucobacter triazinivorans is a species of difficult-to-culture actinomycete whose genome carries the gene encoding a protein, LtNylC. Although LtNylC shows 92% amino acid sequence homology to ArNylC, its nylon-degrading activity is much lower than that of ArNylC. Similarly to ArNylC-GYAQ, 3 amino acid mutations of LtNylC (LtNylC-GYA) enhanced the thermostability by 34ºC. Additionally, a further mutation, V111G (LtNylC-GYAG), resulted in an increase in nylon-degrading activity. Furthermore, F128L/I144V double-mutations on LtNylC-GYAG resulted in the Ahx polymers-degradation activity. Our results suggest the importance of 3 amino acids: G111, L128, and V144, in Ahx recognition by NylC.

[1] S. Negoro, *et al*., *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*, 5079-5090.

Hydrolytic enzyme, Nylon-degrading activity, NylC

講演番号：3D5a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D5 会場

Se 循環に関わる新奇トリメチルセレノニウムメチル基転移酵素 TmsA の基質特異性
Substrate specificity of TmsA, a novel trimethylselenonium methyltransferase, involved in environmental selenium cycling

○曽羽 香南子[1]、越智 杏奈[1]、井上 真男[1,2]、青野 陸[1]、佐藤 総一[3]、小椋 康光[4]、三原 久明[1]([1]立命大・生命、[2]立命大・R-GIRO、[3]東洋大・理工、[4]千葉大・院薬)
○Kanako SOWA[1], Anna OCHI[1], Masao INOUE[1,2], Riku AONO[1], Soichi SATO[3], Yasumitsu OGRA[4], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Toyo Univ., [4]Grad. Sch. Pharm., Chiba Univ.)

必須微量元素セレン（Se）は過剰量では毒性を示す。高等動物は糖やメチル基を付加することで余剰 Se を弱毒化し、環境中に排出する。我々は、メチル化 Se の 1 つであるトリメチルセレノニウム（TMSe）を分解・資化する土壌細菌 *Aminobacter* sp. m3 株の分離培養に成功し、TMSe 資化遺伝子群を同定している。本遺伝子群にはジメチルスルホニオプロピオン酸（DMSP)-テトラヒドロ葉酸（THF）メチル基転移酵素 DmdA に相同性を示す TmsA がコードされており、本研究では TmsA が TMSe-THF メチル基転移酵素ではないかと仮説を立て、その基質特異性の解明を試みた。

TmsA は、TMSe、トリメチルスルホニウム（TMS)、トリメチルスルホキソニウム（TMSO）に対して高い THF メチル基転移活性を示したが、DMSP に対する活性は微弱であった。特に TMSe に対しては、TMS や TMSO の 20-30 倍の代謝回転数を示し、本酵素は TMSe を最良の基質とした。次に、TmsA の予測構造と DmdA の X 線結晶構造を比較したところ、活性部位に Glu と Tyr が保存されており、TmsA における各残基の変異体は TMS に対する活性を大きく低下させた。さらに TmsA は、DmdA において DMSP を認識する Arg を持たず、代わりに Tyr と Trp によって狭い基質結合部位を形成すると予測された。Tyr と Trp それぞれの変異体では TMS に対する活性が大きく低下した。よって、TmsA は DmdA との共通祖先から TMSe を基質とするように進化したと考えられた。

Aminobacter sp. m3 is a soil bacterium that degrades trimethylselenonium (TMSe), a detoxification metabolite of selenium excreted from animals. We have identified a TMSe-assimilating gene encoding the methyltransferase TmsA, which has weak homology to the dimethylsulfoniopropionate (DMSP)-THF methyltransferase DmdA. Here, we show that TmsA exhibited high activities toward TMSe, trimethylsulfonium (TMS), and trimethylsulfoxonium (TMSO) but showed a faint activity toward DMSP. It showed the highest turnover number for TMSe. Structural comparison revealed the conservation of Glu and Tyr in the active sites of TmsA and DmdA, and mutants of each of these residues in TmsA showed greatly reduced activity toward TMS. TmsA was predicted to lack an Arg that contributes to DMSP recognition in DmdA, instead forming a narrow substrate binding site by Tyr and Trp. Substitution of each of these Tyr and Trp by Ala in TmsA greatly reduced the activity against TMS. These results suggest that TmsA evolved from a common ancestor with DmdA to use TMSe as the best substrate.

selenium, methyltransferase, one carbon metabolism

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3D5a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D5 会場

ブロッコリーGAPC の触媒システイン残基の S-セラニル化が酵素機能に及ぼす影響

Effects of S-selanylation of catalytic cysteine residue on enzyme function of GAPC from broccoli.

○武田 徹[1,2]、南 裕子[2]、大沼 貴之[1,2,3]（[1]近畿大農、[2]近畿大院バイオ、[3]近畿大アグリ技研）
○Toru Takeda[1,2], Yuko Minami[2], Takayuki Ohnuma[1,2,3] ([1]Kindai Univ., [2]Grad School Kindai Univ., [3]ATIRI Kindai Univ.)

ブロッコリーの細胞質局在 NAD 依存グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPC）は翻訳後修飾によりセレン（Se）を結合することで *S*-セラニル化酵素を生成し、その結果、酵素活性が上昇することをネイティブおよび組換え酵素の両方で確認している。そこで本研究では、*S*-セラニル化 GAPC の酵素機能に及ぼす影響を詳細に検討した。

GAPC 遺伝子（Bo5g017500）を pRam N-His Kan ベクターに組み込み、大腸菌 10G 株で発現させることで組換え GAPC を得た。単一にまで精製した組換え酵素を、グルタチオンセレノトリスルフィドと反応させて *S*-セラニル化 GAPC を得た。G3P に対する *S*-セラニル化 GAPC の K_m 値は GAPC に比べて 1.3 倍低くなり、V_{max} は 1.5 倍上昇していた。また、NAD^+に対す K_m 値に変化は認められなかったが、V_{max} は 1.1 倍上昇していた。酵素単独および G3P と結合している状態の熱安定性を比較したところ、*S*-セラニル化タンパク質で熱変性中点の低下が認められた。さらに、*S*-グルタチオン化酵素で認められた凝集反応は、*S*-セラニル化酵素で認められなかった。以上のことから、S-セラニル化はタンパク質構造にほとんど影響を及ぼすことなく、触媒部位に生成したセレノール基の高い求核性が G3P との反応性を高め、その結果、酵素活性が上昇したものと考えられる。

In this study, we investigated the effects of *S*-selanylation of catalytic cysteine residue on enzyme function of GAPC from broccoli.

Recombinant GAPC was obtained by incorporating the GAPC gene (Bo5g017500) into the pRam N-His Kan vector and expressing it in *E.coli* strain 10G. The purified recombinant enzyme was reacted with glutathione selenotrisulfide to obtain *S*-selanylated GAPC. The specificity constant (kcat/*K*m) for glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) of GAPC and *S*-selanylated GAPC were 71.6 sec^{-1}/M and 181 sec^{-1}/M. When comparing the thermostability of the enzyme alone and in combination with G3P, a decrease in the midpoint of thermal denaturation was observed for *S*-selanylated proteins. Furthermore, the insoluble aggregate reaction observed with *S*-glutathionylation enzyme was not observed with *S*-selanylation enzyme. From the above, *S*-selanylation has almost no effect on the protein structure, and the high nucleophilicity of the selenol group generated at the catalytic site increases the reactivity with G3P, resulting in an increase in enzyme activity.

GAPC, selenium, broccoli

発表責任者：武田　徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D5a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 D5 会場

組換え大腸菌における海洋細菌由来ポリアミド 4 分解酵素の発現と諸性質解明

Expression and characterization of polyamide 4-degrading enzyme from marine bacterium in recombinant *E. coli*

○齋藤 祐介[1]、山田 美和[2] ([1]岩手大院・農、[2]岩手大・農)
○Yusuke Saito[1], Miwa Yamada[2] ([1]Iwate Univ., [2]Fac. Agric., Iwate Univ.)

我々は、海洋プラスチックごみ問題の解決に向けて、海洋環境からポリアミド 4(PA4)の分解酵素(Nyl4A$_{pa}$)を新たに見出した(Y. Saito et al., Polym. Degrad. Stab., 2023)。Nyl4A$_{pa}$は、高分子の PA4 を素早く低分子量体まで分解でき、基質特異性改変によって難分解性のポリアミド 6 も分解できる可能性があるため、プラスチックごみ問題の解決策として有望な酵素である。Nyl4A$_{pa}$ の活性向上や基質特異性改変に向け、我々は本酵素遺伝子のクローニングと組換え大腸菌における発現系の構築に成功したが(2023 年農芸化学会)、本研究では、本酵素を大腸菌で発現させるために最適な培地の検討と、His タグを用いた精製系の構築を試みた。これまで酵素発現させる際の培養では、海洋細菌の培養でよく用いられる Marine broth を使用していたが、酵素の大量生産に向けて LB 培地での培養を検討した。組換え大腸菌を各培地で培養し、一時的に低温(15℃)にさらすことで酵素の発現誘導を行った。培養後、培養液上清、菌体破砕液の可溶性画分、不溶性画分を PA4 分解活性測定と SDS-PAGE に供した。その結果、Marine broth で培養した大腸菌の菌体破砕液可溶性画分でのみ Nyl4A$_{pa}$ の機能的な発現が確認された。続いて、組換え Nyl4A$_{pa}$ の Ni-NTA superflow によるアフィニティ精製を試みた。まず、In-Fusion 反応で Nyl4A$_{pa}$ の C 末端に His タグを付与した pColdⅣ-*nyl*4A$_{pa}$-His を構築し、大腸菌 BL21 (DE3)を形質転換した。組換え大腸菌を Marine broth で培養することで酵素を発現させた。培養・集菌後、菌体破砕液を一晩人工海水で透析した。透析後の破砕液を限外ろ過して、人工海水から 10 mM イミダゾール含有 buffer に置換し、酵素を樹脂と結合させた。最後に 250 mM のイミダゾールで酵素を溶出した結果、電気泳動的に単一に精製できた。この際の収率は 28%、精製度は 93 倍であった。また、組換え酵素とオリジナル菌から精製した酵素の諸性質を比較した結果、オリジナル菌から精製した酵素よりも比活性はわずかに低下したが、最適温度や最適 pH はほぼ同じであった。以上のことから、今後の Nyl4A$_{pa}$ の酵素工学に向けたプラットフォームを構築することができた。

In this study, we determined the medium for functional expression of PA4-degrading enzyme (Nyl4A$_{pa}$) in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). When transformants were cultured in LB or Marine broth medium, Marine broth was suitable for functional expression of Nyl4A$_{pa}$. Next, we purified Nyl4A$_{pa}$ with a His-tag at the C-terminus expressed in recombinant *E. coli* by Ni-NTA superflow. The optimal temperature and pH of the recombinant enzyme were similar to those of the enzyme from *Pseudoalteromonas* sp. Y-5. Thus, we established a platform for enzymatic engineering of Nyl4A$_{pa}$.

Polyamid 4, Nylon, Recombinant expression

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3D5a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 D5 会場

ヒトピルビン酸キナーゼ M1 を ATP 再生酵素とするリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法
Recombinase polymerase amplification using human pyruvate kinase M1 as ATP-regenerating enzyme

○兒島 憲二[1]、森本 健太[2]、JUMA Kevin Maafu[2]、滝田 禎亮[2]、齋藤 一樹[1]、柳原 格[3]、藤原 伸介[4]、保川 清[2] ([1]姫獨大薬、[2]京大院農、[3]大阪母子医療セ、[4]関学大生命環境)
○Kenji KOJIMA[1], Kenta MORIMOTO[2], Kevin Maafu JUMA[2], Teisuke TAKITA[2], Kazuki SAITO[1], Itaru YANAGIHARA[3], Shinsuke FUJIWARA[4], Kiyoshi YASUKAWA[2] ([1]Himeji Dokkyo Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka Women's and Children's Hosp., [4]Kwansei Gakuin Univ.)

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）は、リコンビナーゼ（Rec）、1 本鎖 DNA 結合タンパク質（SSB）、鎖置換型 DNA ポリメラーゼ（Pol）、ATP 再生酵素により、約 41℃の一定温度で 20 分程度のうちに標的 DNA を増幅し、オンサイトでの核酸検査への応用が期待されている。我々は Rec、SSB、Pol の生産と改良、RPA 反応条件の最適化を行ってきた［1–4］。本研究では、従来 ATP 再生酵素として使われてきたウサギクレアチンキナーゼ（CK）の代わりに、ヒトピルビン酸キナーゼ M1（PKM）の利用を検討した。大腸菌 BL21(DE3)を宿主として PKM を発現させ、菌体可溶性画分からクロマトグラフィーにより精製し、600 mL の培養液から 0.6 mg の PKM を得た。PKM とホスホエノールピルビン酸（PEP）を用いて RPA を 41℃で 30 分間行ったところ、PKM と PEP の最適濃度は 20 ng/μL と 10 mM であり、検出感度は CK とホスホクレアチンを用いた RPA より 10 倍高かった。48～72℃で 10 分間熱処理した PKM または CK を用いて RPA を行ったところ、DNA の増幅が検出できた最も高い熱処理温度は PKM が 64℃、CK が 56℃であった。PKM は、CK よりも RPA の検出感度を高めることができ、熱安定性も高かったことから、オンサイトでの RPA により適していると考えられた［5］。

Recombinase polymerase amplification (RPA) can amplify target DNA in about 20 min at an isothermal temperature around 41ºC using recombinase (Rec), single-stranded DNA binding protein (SSB), strand displacing DNA polymerase (Pol), and ATP-regenerating enzyme, making it a promising technology for on-site nucleic acid tests. We have produced Rec, SSB, and Pol, and optimized the reaction conditions with them [1–4]. In this study, we investigated the use of human pyruvate kinase M1 (PKM) as an alternative to rabbit creatine kinase (CK), which has been used for ATP regeneration. Recombinant PKM was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified from its soluble fraction by chromatography, and 0.6 mg of PKM was obtained from a 600 mL-culture. The optimal concentrations of PKM and PEP in RPA were 20 ng/μL and 10 mM, respectively. The sensitivity of RPA with PKM and PEP was 10-fold higher than that with CK and phosphocreatine. When PKM and CK were heat-treated for 10 min prior to the RPA reaction, the heat treatment temperatures at which DNA amplification no longer occurred were 64°C for PKM and 56°C for CK. In conclusion, PKM was considered more suitable for on-site RPA than CK due to its higher thermal stability and effectiveness in improving sensitivity. [1] *J. Biosci. Bioeng.*, **131**, 219–224 (2021), [2] *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **567**, 195–200 (2021), [3] *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 2847–2856 (2022), [4] *J. Biosci. Bioeng.*, **135**, 282–290 (2023), [5] *J. Biosci. Bioeng.*, **136**, 341–346 (2023)

recombinase polymerase amplification, pyruvate kinase, nucleic acid amplification

発表責任者：兒島憲二（kojima@gm.himeji-du.ac.jp）

講演番号：3D5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D5 会場

グルタチオン加水分解酵素 GGP1 の機能と構造
Structural basis of glutathione hydrolase GGP1 from *Arabidopsis thaliana*
○曽根 康世[1]、伊藤 岳洋[2]、大津 直子[2]、伏信 進矢[1,3] ([1]東大院・農、[2]農工大院・連農、[3]東大・CRIIM)
○Kosei Sone[1], Takehiro Ito[2], Naoko Ohstu[2], Shinya Fushinobu[1,3] ([1]Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Sch. Agri., Tokyo Univ. Agri. Tech, [3]CRIIM, Univ. Tokyo)

シロイヌナズナのγ-glutamyl peptidase 1 (GGP1)はグルタチオン(GSH, γ-Glu-Cys-Gly)のγ-Glu-Cys 間のイソペプチド結合を加水分解する。GGP1 は GSH だけでなくその抱合体も加水分解し、一次代謝だけではなく二次代謝にも関わる。本研究では大腸菌で組換え発現した GGP1 を結晶化し構造解析を行った。変異体も用いてリガンドフリー、Glu 複合体、チオエステル中間体、非活性状態の四つの構造を解明した。GGP1 は C26 ファミリーに属するシステインペプチダーゼであり、ファミリー内で保存されている求核性触媒残基の C109 と、それを補助する H201 および E203(触媒三残基)が結晶構造においても確認された。また、H201N 変異体を用いることで、結晶化に加えた Glu と C109 がチオエステル結合している共有結合中間体が得られた。C109 の近くには、別のシステイン(C163)が存在しており、結晶を酸化条件におくことでこれらがジスルフィド結合を形成した不活性状態の構造が得られた。このことは、酸化状態においては不活性型された GGP1 が細胞内の還元状態を維持するグルタチオンの分解を妨げる可能性を示唆している。

γ-Glutamyl peptidase 1 (GGP1) from *Arabidopsis thaliana* hydrolyzes the isopeptide bond between γ-Glu and Cys of glutathione (GSH, γ-Glu-Cys-Gly). GGP1 also hydrolyzes GSH conjugates and has dual roles in the primary and secondary sulfur metabolisms. Here, we crystallized *Escherichia coli* recombinant GGP1 and solved the X-ray crystal structures in four forms: ligand-free, Glu complex, thioester intermediate, and inactive state. GGP1 is a cysteine peptidase belonging to the C26 family. The conserved nucleophile residue (C109) and the associated residues on the catalytic triad (H201 and E203) were identified in the crystal structure. Using the H201N mutant, we obtained the covalent intermediate structure in which C109 and Glu added in the crystallization were thioester-linked. Another cysteine (C163) is present near C109, and by placing the crystals under oxidative conditions, an inactive disulfide-bonded structure was obtained. This state suggests that inactive GGP1 may prevent the degradation of GSH, which has the function of an antioxidant, under oxidative conditions.

γ-glutamyl-peptidase, glutathione, crystal structure

発表責任者：曽根康世（koseisone1821@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D5 会場

セリンプロテアーゼ *Staphylococcus* exfoliative toxin ExhC の立体構造解析
Structural analysis of the serine protease *Staphylococcus* exfoliative toxin ExhC
○佐藤 柊[1]、小薗 拓馬[1]、西河 淳[1]、郭 旭[2]、F. S. ラガブ ロカイア[2]、西藤 公司[2]、殿塚 隆史[1]([1]東京農工大院農応用生命化学、[2]東京農工大院農共同獣医)
○Shu SATO[1], Takuma KOZONO[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Xu GUO[2], Rokaia F. S. RAGAB[2], Koji NISHIFUJI[2], Takashi TONOZUKA[1] ([1]Applied Biological Chemistry Program, School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Cooperative Division of Veterinary Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

【緒言】ブドウ球菌 *Staphylococcus* が産生する表皮剥脱毒素(Exfoliative toxin: ET)は、皮膚の剥離を伴う疾患の病原性因子として同定されている。ET は、皮膚の細胞接着タンパク質であるデスモグレイン-1(Dsg-1)を特異的に分解するセリンプロテアーゼで、Dsg-1 の分解により皮膚の細胞接着を喪失させ、表皮の剥離を誘導する。ET は特定の動物種由来の Dsg-1 のみを分解するという極めて狭い範囲の特異性を持つが、その厳密な基質認識を可能にするメカニズムは未知である。本研究では、厳密な基質認識を可能にする構造的な決定因子を探ることを目的として、ブタ Dsg-1 を特異的に分解する *S. hyicus* 由来の ET である ExhC について、X 線結晶構造解析により立体構造を決定した。
【方法と結果】ExhC 遺伝子を pET28a に組み込んだプラスミドにより大腸菌を形質転換し、酵素を発現させた。酵素は Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、結晶化した。高エネルギー加速器研究機構 PF BL-5A ビームラインにて X 線回折強度を測定し、ExhC の立体構造を決定した。ExhC は、立体構造が既知の ET と同様、二つの β-バレルが垂直に配置したキモトリプシン型の立体構造を持っていた。また、特異性の異なる他の ET と比較すると、いくつかのループやアミノ酸残基に違いが見られ、詳細は現在解析中である。

[Introduction] Exfoliative toxins (ETs) have been identified as a virulence factor produced by Staphylococci. ETs are serine proteases which specifically cleave the skin cell adhesion molecule desmoglein-1 (Dsg-1), and cleavage of Dsg-1 by ETs leads to skin exfoliation. ETs cleave Dsg-1 in a species-specific manner and recognize only a narrow range of substrates, but the detailed molecular mechanism underlying this strict substrate recognition remains to be elucidated. Here we determined the crystal structure of ExhC, an ET from *S. hyicus* which specifically cleave swine Dsg-1, with the aim of exploring structural determinants of ETs' strict substrate recognition.
[Methods and results] ExhC was expressed in *E. coli* transformed with expression vector pET28a carrying ExhC gene. The enzyme was purified by Ni-NTA affinity chromatography and crystallized. X-ray diffraction data was collected at BL-5A beamline at KEK PF. Like other ETs, ExhC had chymotrypsin-like structural motif with two β-barrels whose axes are roughly perpendicular. ExhC showed some differences in amino acid residue or loop conformation compared to other ETs.

exfoliative toxin, Staphylococcus hyicus, serine protease

発表責任者：佐藤 柊（s235793z@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：3D5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D5 会場

リボヌクレオチドレダクターゼをノックアウトした大腸菌の生育評価と代替経路導入の検証
Growth evaluation of Escherichia coli with knockout of deoxyribonucleotide reductases and verification of alternative pathway introduction

○出口 賢児[1]、斯 大勇[1]、堀之内 伸行[1]、小園 祥子[1]、竹内 道樹[1]、日比 慎[2]、ポール アンソニー[3]、小川 順[1] ([1]京大院農、[2]富山県立大工、[3]オークランド大学)
○Kengo DEGUCHI[1], Dayoung Si[1], Nobuyuki Horinouchi[1], Syoko Kozono[1], michiki Takeuchi[1], Makoto Hibi[2], Anthony M. Poole[3], Jun Ogawa[1] ([1]The Univ. of Kyoto, [2]The Univ. of Toyama Pre., [3]The Univ. of Auckland)

デオキシリボヌクレオチドは、代謝が明らかにされている全ての生物において、リボヌクレオチドレダクターゼ (RNR)によってリボヌクレオチドから合成される。そのため、RNA ワールド仮説において、DNA は RNA から派生したとされている。しかし、我々は可逆的なヌクレオシド分解系として知られる DERA 経路の各酵素の機能を活用することで、RNR 触媒反応を介さないデオキシリボヌクレオシドの生合成に成功した。そこで、DNA の分子起源の多様性を想定し、本研究では RNR 触媒反応を介さない経路でデオキシリボヌクレオシドを合成して生育する大腸菌の構築を目指した。

まず、大腸菌が有する三組の RNR 酵素遺伝子 (*nrdAB*, *nrdEF*, *nrdDG*) を全て破壊した 3Δ 株を構築した。3Δ 株は生育において、デオキシリボヌクレオシドのうち、デオキシシチジンを要求し、さらにニコチンアミドをはじめとした数種のビタミン類を必要とすることが観察された。現在、DERA 経路の酵素遺伝子を高発現する 3Δ 株などを用いて、DERA 経路によるデオキシシチジン合成条件について検討している。

All organisms, whose metabolic pathways have been clarified, enzymatically synthesize deoxyribonucleotides as constituent molecules of DNA by the reduction of ribonucleotides catalyzed by ribonucleotide reductase (RNR). Therefore, the RNA world hypothesis states that DNA is derived from RNA. However, we succeeded in biosynthesizing deoxyribonucleosides without involving RNR-catalyzing reaction by utilizing the functions of each enzyme in the DERA pathway known as a nucleoside degradation system. Therefore, this study aimed to construct *E. coli* that can grow by synthesizing deoxyribonucleosides only through a route that does not involve RNR-catalyzing reaction to demonstrate the possibility that DNA is biosynthesized independently from other than RNA.

First, we constructed a 3Δ strain in which all three sets of RNR enzyme genes (*nrdAB*, *nrdEF*, *nrdDG*) in *E. coli* were disrupted. It was observed that the 3Δ strain requires deoxycytidine among deoxyribonucleosides for growth, and requires several vitamins including nicotinamide. We are currently investigating the conditions for deoxycytidine synthesis via the DERA pathway using the 3Δ strain, which highly expresses DERA pathway enzyme genes.

Rebonucleotide redactase, DERA pathway, deoxyribonucleoside

講演番号：3D5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D5 会場

Kluyveromyces lactis 由来ラクターゼ製剤中に存在するラクターゼ不安定化因子の精製と諸性質の解明

Identification and characterization of proteinase B as an unstable factor for neutral lactase in the enzyme preparation from *Kluyveromyces lactis*

○菅原 麻美[1]、吉川 潤[2]、堀口 博文[1] ([1]合同酒精株式会社、[2]現　東京農業大学)

○Asami SUGAWARA[1], Jun YOSHIKAWA[2], Hirofumi HORIGUCHI[1] ([1]GODO SHUSEI Co., Ltd., [2]Tokyo University of Agriculture)

産業用酵素であるラクターゼ製剤は主に牛乳に含まれる乳糖を分解するために使用され、ラクターゼ製剤の安定性は品質保証の上で重要な要素である。我々は、SDS-PAGE 上でラクターゼ(β-galactosidase)の一次構造が分断しているとラクターゼの熱安定性が低くなることを見出した。そこで、本研究ではラクターゼを不安定化させる因子を精製・同定し、その諸性質を解明した。

ラクターゼを不安定化させる因子は何らかのプロテアーゼであると推察し、その精製はラクターゼの生産菌である *Kluyveromyces lactis* の培養液を開始試料として各種クロマトグラフィーに供して行った。なお、活性測定は精製ラクターゼを基質として 30℃で反応させ、反応 1 時間当たりに SDS-PAGE 上で酵素無添加のときと比較してラクターゼのバンド(120 kDa)の強度が 20%減少している酵素量を 1 ユニットと定義した。電気泳動的に単一に精製し、BLAST 検索によって *Saccharomyces cerevisiae* 由来 proteinase B (PRB)と相同性が高いタンパク質と推定された。分子質量は SDS-PAGE によって 30 kDa と推定され、最適 pH は 8.0、最適温度は 40℃であった。また、Fe^{2+}イオンや Cu^{2+}イオン、セリンプロテアーゼ阻害剤によって阻害され、Ca^{2+}イオンによって活性化した。また、この精製 PRB と精製ラクターゼを反応させるとラクターゼが分断し、そこにプロテアーゼインヒビターを添加することで分断が抑制されることを確かめた。

The stability of the commercial lactase preparation is important for dairy industry. An unstable factor for neutral lactase in the enzyme preparation from *Kluyveromyces lactis* was investigated. We found that lactase had lower the stability when fragmented bands of lactase were confirmed on SDS-PAGE. We studied that the unstable factor of lactase was identified and then characterized.

The unstable factor of lactase was purified by various types of chromatography with culture broth of *K. lactis*. The purified solution is electrophoretically homogeneous, and we identified as a hypothetical protein in *K. lactis* similar to proteinase B (PRB) from *Saccharomyces cerevisiae* using BLAST search. The molecular mass of protease was estimated to be approximately 30 kDa with SDS-PAGE. The optimal pH and temperature of protease were pH 8.0 and 40°C, respectively. The activity was strongly inhibited by Fe^{2+}, Cu^{2+}, and a serine protease inhibitor, but activated by Ca^{2+}. Lactase fragmentation was accelerated by the addition of purified PRB to the lactase preparation and was suppressed by protease inhibitors.

Kluyveromyces lactis, lactase, proteinase

発表責任者：堀口　博文（h-horiguchi@oenon.jp）

講演番号：3D5p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D5 会場

アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)の硫酸化解析
Tyrosine sulfation of the angiotensin-converting enzyme 2
○黒木 勝久[1]、出向 みほ[1]、遠藤 順子[1]、池田 有輝[1]、柳井 健太郎[1]、寺本 岳大[2]、角田 佳充[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1] ([1]宮崎大農、[2]九大院農)
○Katsuhisa KUROGI[1], Miho Demukai[1], Yoriko Endo[1], Yuki Ikeda[1], Kentaro Yanai[1], Takamasa Teramoto[2], Yoshimitsu Kakuta[2], Masahito Suiko[1], Yoichi Sakakibara[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Kyushu Univ.)

アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)は血圧制御と新型コロナウイルス感染に関わるカルボキシペプチダーゼである。血液凝固やウイルス感染に関わる翻訳後修飾の一つにチロシン硫酸化が知られている。硫酸基は陰イオン性のため、チロシン硫酸化は基質タンパク質の相互作用や機能の制御を担っている。触媒酵素であるチロシンタンパク質硫酸転移酵素(Tyrosylprotein sulfotransferase : TPST)の基質は硫酸化部位であるチロシンを含む motif 配列が知られており、チロシン硫酸化部位予測ツール(sulfinator)解析により、ACE2 の硫酸化が予測された。ACE2 のチロシン硫酸化を酵素的に検討したところ、硫酸化が確認されたことから、本発表では酵素的なチロシン硫酸化の報告を行う。予想されたチロシン硫酸化部位を含む 3 種類のペプチドを遺伝子工学的に大腸菌にて調製し、これを基質として、リコンビナント TPST 酵素(TPST1,TPST2)を用いて ACE ペプチドに対するチロシン硫酸化を解析した。その結果、TPST1 と TPST2 の両方の酵素ともチロシン残基の-1 に酸性アミノ酸残基を有していた 2 種類のペプチドに対する硫酸化を確認した。また、質量分析計を用いた解析において、2 種類のペプチドのチロシン硫酸化を確認した。Kinetics 解析の結果、4 つのチロシン残基を含んでいるペプチドに対する親和性が特に高いことが明らかにされた。チロシン残基をフェニルアラニンに置換したペプチドを用いて解析した結果、硫酸化されうる部位を絞り込むことが出来た。次に ACE2 タンパク質全長を用いて硫酸化を行い、SDS-PAGE にて硫酸化の確認を行った。その結果、ACE2 タンパク質に対する硫酸化を確認することができた。以上の結果から、ACE2 はチロシン硫酸化による翻訳後修飾を受ける可能性示された。

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a carboxypeptidase involved in the regulation of blood pressure and interaction with SARS-CoV-2. Tyrosine sulfation, a post-translational modification, plays a role in the interaction with virus such as HIV. Sulfinator search, prediction tool of tyrosine sulfation sites, detected several tyrosine residues in human ACE2. In this study, we report the sulfation of ACE2 peptides and protein. Enzymatic assay has shown that both two TPST isoforms displayed the sulfating-activity toward two ACE2 peptides containing tyrosine residues and revealed the tyrosine-sulfated restudies. ACE2 protein has been also demonstrated to be sulfated by enzymatic assay and MS analysis. These results suggest that tyrosine sulfation of ACE2 may occur *in vivo* and function in the regulation of blood pressure and SARS-CoV-2 infection.

Post-translational modification, Sulfation, ACE2

発表責任者：黒木勝久（katsu1982@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3D5p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D5 会場

組換え生産したヒメツリガネゴケ由来ペルオキシダーゼ（rPrx34）はルミノールと強く反応し、ポリマーを形成する。

Recombinant peroxidase from *Physcomitrium patens* strongly responds to luminol and forms polymer.

○伊藤 健司[1]、松本 虎太郎[2]、秋田 求[2]（[1]近畿大院 生物工学、[2]近畿大 生物工）
○Kenji ITO[1], Kotaro Matsumoto[2], Motomu Akita[2]（[1]Major Biotech. Sci., Kindai Univ, [2]Dept. Biotech. Sci., Kindai Univ.）

大腸菌で組換え生産した *Physcomitrium patens* のペルオキシダーゼ（rPrx34）は、代表的なペルオキシダーゼ基質数種に対する高い触媒効率と保存時の pH に対する高い耐性を有していた。従って、rPrx34 はペルオキシダーゼを用いる多くの反応への利用が期待できる酵素であると考え、さらなる特徴づけを行うことで利用可能性を明らかにしている。rPrx34 はルミノールとの反応性も高い。すなわち、rPrx34 をルミノールと反応させた場合の化学発光量は、HRP を反応させた場合の約 1000 倍であった。このとき、rPrx34 とルミノールの反応液は茶色を呈するようになったが、HRP では色の変化は見られなかった。この反応の至適 pH は pH6.0 で、反応速度が過酸化水素とルミノールのそれぞれに依存することから、他の基質と同様に Ping-pong bibi 機構による反応であると考えられた。さらに、この反応液を長時間置くと濃緑色の沈殿物が生成された。LC-MS 解析により、この生成物はルミノールの重合体であることがわかった。本発表では、ルミノールと rPrx34 の反応に注目してその詳細を報告する。

A recombinant protein of a Physcomitrium patens peroxidase (rPrx34), produced in E. coli, exhibited high catalytic efficiency against several typical peroxidase substrates and high tolerance to extreme pH during storage. Therefore, we think that rPrx34 is a promising enzyme for use in many reactions that peroxidases have been used. We examined further characterization to clarify its potential use. rPrx34 is highly reactive to luminol. That is, when rPrx34 reacted with luminol, the amount of chemiluminescence was about 1000 times higher than that of the reaction by HRP and luminol. The solution after the reactions by rPrx34 and luminol became brown in color, while no color change was observed by HRP and luminol. The optimum pH for this reaction was pH 6.0, and the reaction rate depended on concentrations of hydrogen peroxide and luminol, suggesting that the reaction is done by the Ping-pong bibi mechanism as other substrates. Furthermore, a dark green precipitate was formed when the reaction solution was allowed to sit for an extended period. LC-MS analysis showed that this precipitate was a polymer from luminol. In this presentation, we will focus on the reaction of luminol under rPrx34 catalyst and report its details.

Peroxidase, polymerization, chemiluminescence

発表責任者：伊藤 健司（2144710002a@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3D5p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D5 会場

立体選択的 5-hydroxylysine 合成酵素及び脱水素酵素の発見と機能解析

Discovery and functional analysis of stereoselective 5-hydroxylysine synthases and dehydrogenases

○川合 誠司[1]、勝山 陽平[1,2]、原 良太郎[3]、若松 美紀[4]、阪本 剛[4]、高松 杏壮[5]、井浦 崇敦[5]、小川 順[6]、大西 康夫[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]京大院農・産業微生物、[4]三菱ケミカル・SIC、[5]API コーポレーション・技術セ、[6]京大院農・応用生命)
○ Seiji KAWAI[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Ryotaro HARA[3], Miki WAKAMATSU[4], Takeshi SAKAMOTO[4], Kyota TAKAMATSU[5], Takanobu IURA[5], Jun OGAWA[6], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Ind., Microbiol., Grad., Sch., Agric., Kyoto Univ., [4]SIC, Mitsubishi Chemical Corp., [5]Tech. Div., API Corp., [6]Div., Appl., Life Sci., Grad., Sch., Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】5-hydroxylysine は医薬品前駆体として注目されているが、立体選択的な L-Lys の 5 位水酸化反応は有機化学的に難易度が高い。また、本反応を触媒する酵素の報告例は alazopeptin 生合成経路の初発反応を担う AzpK のみであるが、*in vitro* では活性を検出できていない。[1]
【結果・考察】ゲノムデータベース上の alazopeptin 生合成遺伝子群（BGC）の比較解析の結果、*Actinosynnema mirum* と *Pseudomonas psychrotolerans* が有する BGC 内には *azpK* ホモログの代わりにα-ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子（*azpK2*, *Pp_azpK2*）が存在した。それぞれの組換え酵素の *in vitro* 解析の結果、AzpK2 は(*2S,5S*)-5-hydroxylysine を、Pp_AzpK2 は(*2S,5R*)-5-hydroxylysine をそれぞれ L-Lys より合成することが示された。また、alazopeptin 生産菌 *Streptacidiphilus griseoplanus* 由来の AzpJ は(*2S,5S*)-5-hydroxylysine を、*P. psychrotolerans* が有する AzpJ ホモログ（Pp_AzpJ）は(*2S,5R*)-5-hydroxylysine を特異的に酸化して 5-oxolysine を合成した。AzpJ 及び Pp_AzpJ とのカップリング反応を利用することで、ゲノムデータベースから抽出した多数の AzpK2 ホモログの機能を解析し、反応性の高いホモログ酵素を選抜した。本研究で発見した酵素群は立体選択的な 5-hydroxylysine のバイオ生産に有用である。

Stereoselective synthesis of 5-hydroxylysine is challenging from the viewpoint of organic chemistry. AzpK, which is responsible for the biosynthesis of alazopeptin, is the only enzyme reported to synthesize 5-hydroxylysine, but its activity has not been detected *in vitro*. Comparative analysis of alazopeptin biosynthetic gene clusters (BGCs) using the genome database revealed that BGCs in *Actinosynnema mirum* and *Pseudomonas psychrotolerans* possessed genes encoding α-ketoglutarate-dependent dioxygenases (*azpK2*, *Pp_azpK2*) instead of the *azpK* homolog. Recombinant AzpK2 and Pp_AzpK2 synthesized (*2S,5S*)-5-hydroxylysine and (*2S,5R*)-5-hydroxylysine, respectively, from L-lysine *in vitro*. In addition, AzpJ from the alazopeptin producer and AzpJ homolog from *P. psychrotolerans* selectively oxidized (*2S,5S*)-5-hydroxylysine and (2*S*,5*R*)-5- hydroxylysine, respectively, to synthesize 5-oxolysine. Using coupling reactions with AzpJ and Pp_AzpJ, we analyzed the functions of AzpK2 homologs and selected high-reactivity homologs.

[1] S. Kawai *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021, 60, 10319-10325

5-hydroxylysine, hydroxylase, dehydrogenase

講演番号：3D5p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 D5 会場

放線菌由来 P450（CYP105A1）の R84A 変異体による非ステロイド性抗炎症薬 （NSAIDs)の代謝
Metabolism of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by the R84A mutant of actinomycete-derived P450 (CYP105A1)

○滝田 禎亮[1]、和田 萌加[1]、山形 昌也[1]、鎌田 成栄[1]、水谷 公彦[1]、三上 文三[3,4]、余語 祐哉[2]、安田 佳織[2]、濱田 昌弘[2]、榊 利之[2]、保川 清[1]([1]京大院農、[2]富山県立大、[3]京大生存圏研、[4]京大エネルギー研)
○ Teisuke TAKITA[1], Moeka WADA[1], Masaya YAMAGATA[1], Seiei KAMATA[1], Kimihiko MIZUTANI[1], Bunzo MIKAMI[3,4], Yuya YOGO[2], Kaori YASUDA[2], Masahiro HAMADA[2], Toshiyuki SAKAKI[2], Kiyoshi YASUKAWA[1] ([1]Kyoto Univ. Grad. Sch. Agric., [2]Toyama Pref. Univ. Fac. of Eng., [3]Kyoto Univ. RISH, [4]Kyoto Univ. IAE)

医薬品開発において、ヒト P450 による代謝様式の解明は重要である。代謝物は有機化学的合成やヒト P450 発現細胞を用い調製されているが問題点が多い。CYP105A1 は *Streptomyces griseolus* 由来の水溶性 P450 である。本研究では、*Rhodococcus erythropolis* に R84A 変異体を発現させ、その菌体抽出物を用いて非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）である、diclofenac（DIF）、mefenamic acid（MLF）、flufenamic acid（FLF）を反応させた。各代謝物を、HPLC で精製し、^{1}H-NMR 解析したところ各基質は特徴的な位置で水酸化されていた。さらに、大腸菌に野生型（WT）および R84A を発現させ、Ni 担体で精製した各酵素を結晶化し、NSAIDs をソーキングした。回折データの測定は SPring-8 の BL26B1 で行い、分子置換により構造を決定した。WT/DIF、WT/FLF、R84A/DIF および R84A/FLF 複合体の構造を、それぞれ 1.40Å、1.47Å、1.55Åと 1.68Åの分解能で精密化した。各基質の反応後の水酸基の位置とヘム鉄近傍への配置の様子は、DIF では一致したが、FLF では一致しなかった。また、DIF では WT と R84A での結合様式が異なっていた。

In drug development, elucidation of the metabolic mode by human P450 is important. Metabolites have been prepared using organic chemical synthesis or human P450-expressing cells, but there are many problems. CYP105A1 is a water-soluble P450 derived from *Streptomyces griseolus*. In this study, we expressed the R84A mutant in *Rhodococcus erythropolis* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as diclofenac (DIF), mefenamic acid (MLF), and flufenamic acid (FLF) were metabolized by its bacterial cell extract. Each metabolite, purified by HPLC, was analyzed by ^{1}H-NMR, indicating that each substrate was hydroxylated at a characteristic position. Further, the wild type (WT) and R84A were expressed in *Escherichia coli*, and each enzyme, purified with a Ni column, was crystallized and soaked with NSAIDs. Diffraction data was measured using BL26B1 at SPring-8, and the structures were determined by molecular replacement. The WT/DIF, WT/FLF, R84A/DIF and R84A/FLF complex structures were refined at resolutions of 1.40 Å, 1.47 Å, 1.55 Å and 1.68 Å, respectively. The position of the hydroxyl group of each substrate after reaction and the arrangement near the heme iron were consistent in DIF, but not in FLF. Furthermore, in DIF, the binding mode between WT and R84A was different.

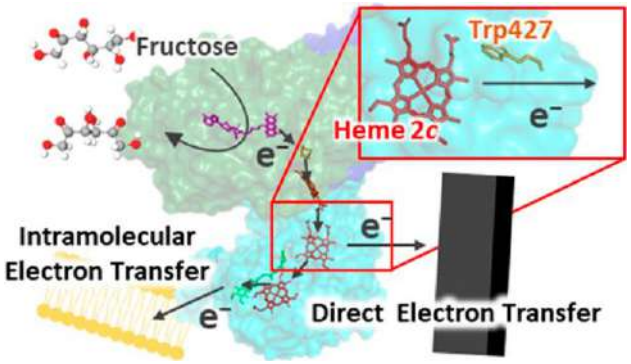
P450, CYP105A1, non-steroidal anti-inflammatory drugs

講演番号：3D5p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 D5 会場

構造生物学と電気化学で解明する酢酸菌由来フルクトース脱水素酵素の直接電子移動

Structural and electrochemical discussion on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis by fructose dehydrogenase from Gluconobacter japonucus

○鈴木 洋平[1]、宋和 慶盛[1]、加納 健司[2]、北隅 優希[1]、白井 理[1]([1]京大院農、[2]京大産官学連携本部)
○Yohei SUZUKI[1], Keisei SOWA[1], Kenji KANO[2], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ, [2]Center for Advanced Science and Innovation, Kyoto Univ)



FDH の DET 型反応及び生体内における ET 経路

酸化還元酵素反応と電極反応の共役系を“酵素電極反応”と呼称する．特に，酵素が電極と直接電子移動を行う“直接電子移動（DET）型反応”は，電子メディエータが不要なため，生体/環境適合性と設計自由度に優れた理想的なバイオセンサを設計できる．一方，DET型反応の報告例は少なく，その反応機構の詳細は不明である．本研究では，DET型反応のモデル酵素として，*Gluconobacter japonicus*由来のフルクトース脱水素酵素（FDH）に着目する．これまで，電気化学的手法により本酵素のDET型反応機構が推定されてきたが，立体構造が不明なために，電子移動（ET）経路の定量的考察や，優れたDET型活性の起源解明が困難であった．そこで，クライオ電子顕微鏡法によるFDHの立体構造解明を試みた．取得した構造情報（PDB: 8JEJ）に基づき，FDHのDET型反応経路を熱力学的・速度論的観点から考察した．また，酵素の表面電荷を考慮した電気化学測定によって， heme 2*c*を電極活性部位として特定した．さらに，酵素内部に存在する芳香族アミノ酸残基に着目し，酵素工学的アプローチを行った．野生型FDH及び各アラニン置換変異体の電気化学的特性を数理モデルによって定量的に解析し，heme 2*c*から電極までの経路上に位置するトリプトファンが大きな長距離電子移動速度をもたらし，DET型反応を促進することを明らかにした．

Bioelectrocatalysis is the utilization of redox enzymes as catalysts at the electrode. Direct electron transfer (DET)-type bioelectrocatalysis, in which enzymes can exchange electrons directly with electrodes, is suitable for constructing an ideal system owing to mediator-less configuration. However, there have been few reports of DET-type bioelectrocatalysis, so the unique mechanism of the reaction has yet to be elucidated. We focused on the membrane-bound fructose dehydrogenase (FDH) from *Gluconobacter japonicus*, which is known as a model enzyme for DET-type reactions. The previous study estimated the electron transfer (ET) pathway of the DET-type reaction with electrochemical analysis. However, the entire 3D structure of FDH remained unknown, so a quantitative discussion of its reaction took much work. In this study, we elucidated the 3D structure of FDH using cryo-electron microscopy (PDB: 8JEJ). The electrostatic charge distribution on the FDH surface and electrochemical results support the idea that heme 2*c* is the electrode-active site of FDH. Focusing on aromatic residues, we constructed variants where the corresponding residues were each replaced with alanine. Based on the bioelectrochemical and kinetic analysis, we elucidated the enhancement of ET by the tryptophan located in the middle of the ET pathway from heme 2*c* to the electrode.

bioelectrocatalysis, electron transfer, cryo-electron microscopy

発表責任者：鈴木洋平（suzuki.yohei.74m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D5p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 D5 会場

Myrothecium verrucaria 由来ビリルビンオキシダーゼの *Aspergillus* 属糸状菌での高生産と特性解析

High production and characterization of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* in *Aspergillus* sp.

○加戸 悠[1,2]、仙波 弘雅[1]、山田 浩之[1]、坪井 宏和[1]、坊垣 隆之[1]、幸田 明生[1]、片岡 邦重[3]、高木昌宏[4]、辻野 義雄[1,2,4] ([1]大関総研、[2]神戸大院科技イノベ、[3]金沢大理工、[4]北陸先端大マテリアル)

○ Haruka KADO[1,2], Hironori SEMBA[1], Hiroyuki YAMADA[1], Hirokazu TSUBOI[1], Takayuki BOGAKI[1], Akio KOUDA[1], Kunishige KATAOKA[3], Masahiro TAKAGI[4], Yoshio TSUJINO[1,2,4] ([1]Ozeki corp., [2]Grad. Sch. Kobe Univ., [3]Kanazawa Univ., [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Technol., JAIST)

【背景】糸状菌 *Myrothecium verrucaria* 由来のビリルビンオキシダーゼ（BOD）は分子内に活性に必須な分光学的・磁気的性質の異なる 3 種、4 個の銅を含むマルチ銅オキシダーゼである。本講演では、*Aspergillus* 属菌での BOD の生産性増強、酵素特性の解析に加え、最適な活性向上条件についての検討結果を発表する。

【方法】BOD 高生産を目的に *Aspergillus* 属菌を用いる異種遺伝子発現ベクターを構築した。さらに BOD の安定化、活性化に関する条件を、還元剤添加と保存温度を中心に検討した。

【結果・考察】糸状菌を用いた発現系により、1 g/L 以上に生産性を向上させることができた。生産した BOD に還元剤を添加し、脱酸素条件下に保管することで、活性が安定に保持され、保存中に比活性が向上することを見出した。比活性向上前後での BOD の銅含量に変化は見られなかった。また、反応速度論解析の結果、活性向上前後での K_m 値は変化しなかったが、k_{cat} 値が 2 倍以上向上した。この結果から、*Aspergillus* 属菌で発現した BOD は一部が触媒活性を持たない状態で発現しており、還元条件下に保管することで活性化することが示唆された。

(Purpose) Bilirubin oxidase (BOD) from *Myrothecium verrucaria* is a multi-copper oxidase containing 3 or 4 copper ions with different spectroscopic and magnetic properties. Here, we present the results of the optimal conditions for enhancement of enzymatic properties.

(Method) We constructed a heterologous gene expression vector using *Aspergillus* sp. for high BOD production. The conditions for stabilization and activation of BOD were investigated, focusing on the addition of reducing agents and storage temperatures.

(Results and Discussion) The new expression system was able to increase productivity to > 1 g/L. By adding reducing agents to the produced BOD, we found that the activity was stable and the specific activity increased during storage. No change was observed in the copper content of BOD before and after the specific activity was improved. Kinetic analysis showed that the K_m value did not change, but the k_{cat} value improved by more than 2-fold. These results suggested that the BOD expressed in *Aspergillus* sp. is partially catalytically inactive state and can be activated by storage under reducing conditions.

Bilirubin oxidase, Aspergillus sp., activation

講演番号：3D5p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 D5 会場

Pseudomonas sp. SCT 株由来の異化的ヨウ素酸還元酵素 Idr に関する研究
Purification of dissimilatory iodate reductase, Idr, from *Pseudomonas* sp. SCT
○佐藤 陽彦[1]、久保 拓舞[2]、天知 誠吾[2] ([1]千葉大園芸、[2]千葉大院園芸)
○Haruhiko SATO[1], Takuma KUBO[2], Seigo AMACHI[2] ([1]Fac. of Hort., Univ. Chiba, [2]Grad. Sch. of Hort., Univ. Chiba)

Pseudomonas sp. SCT 株は、ヨウ素酸（IO_3^-）を最終電子受容体として嫌気呼吸を行うヨウ素酸呼吸細菌である。先行研究から、SCT 株のヨウ素酸呼吸には新規 DMSO 還元酵素ファミリータンパクを含むタンパク質複合体 IdrABP_1P_2 が関与することが明らかとなっている。そこで、SCT 株の Idr タンパク質複合体のサブユニット組成や生化学的な特性を解明するため、各種クロマトグラフィー（DEAE-650M、Sephacryl S-300）を用いて Idr 複合体の精製を行った。精製タンパクを HPLC に供した結果、Idr 複合体の分子量は 193 kDa と推定され、Idr 複合体は IdrA、B、P_1、P_2 各 1 分子からなるヘテロテトラマーと考えられた。さらに、還元型メチルビオロゲンとヨウ素酸を用いた活性測定を行い、Idr の基質特異性、酵素の至適条件の検討を行った。その結果、Idr はヨウ素酸以外の基質（硝酸、臭素酸、塩素酸、過塩素酸）の還元反応を触媒しなかった。また、反応温度、pH の至適条件を調べ、同条件において Lineweaver-Burk の式に基づいて Idr のヨウ素酸に対するミカエリス定数（K_m 値）を算出した。

Pseudomonas sp. SCT is an iodate-reducing bacterium that uses iodate as the sole electron acceptor for anaerobic respiration. Previous studies have shown that the protein complex IdrABP_1P_2 is involved in the iodate respiration by SCT. In this study, to clarify the subunit composition and biochemical properties of Idr, we purified the Idr complex by using several chromatographies (DEAE-650M and Sephacryl S-300). The molecular weight of the purified protein was estimated to be 193 kDa, suggesting that the Idr complex is a heterotetramer consisting of one molecule each of IdrA, B, P_1, and P_2. In addition, the substrate specificity of Idr and the optimal conditions for enzymatic activity were determined using reduced methyl viologen and iodate as the substrates. The results showed that Idr does not catalyze the reduction of substrates other than iodate including nitrate, bromate, chlorate, and perchlorate. The optimum conditions for reaction temperature and pH were also determined, and under the same conditions, the Michaelis constant (K_m) of Idr for iodate was calculated using the Lineweaver-Burk equation.

iodate, respiration, Idr

講演番号：3D5p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 D5 会場

酵素活性と基質への結合親和性に関するバイオインフォマティクス解析

Bioinformatic Analysis on the Relationship between the Binding Affinity and Catalytic Activity of Enzymes

○田村 太陽[1,2]、大岡 英史[2]、藤島 皓介[1,3]（[1]慶應大、[2]理研 CSRS、[3]東工 ELSI）
○Taiyo TAMURA[1,2], Hideshi OOKA[2], Kosuke FUJISHIMA[1,3] ([1]Keio Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Tokyo Tech. ELSI)

酵素と基質の親和性を表すミカエリスメンテン定数(K_m)は，酵素活性を左右する重要なパラメーターである。一方で，生物代謝においてK_mがどのように最適化されてきたかは明らかではない．近年になり，セルラーゼの酵素活性があるK_mにおいて最大となり，活性測定を行った基質濃度が大きいほど，K_mの最適値も大きくなることが実験的に報告された．その物理的な起源として，K_mと速度定数k_{cat}が相関することが挙げられる。しかし，このような相関関係が酵素全般において一般的に成立することは示されていない．
以上を踏まえ，本研究ではK_mとk_{cat}のデータを酵素データベース BRENDA から取得し、酵素毎に相関関係を評価した．さらに，K_mとk_{cat}の関係性に影響する酵素反応全体の自由エネルギー変化を考慮することで，相関関係をより明確にすることを試みた．本発表では、これまでに得られた結果と今後の方向性について報告する．

The Michaelis-Menten constant（K_m）characterizes the affinity between an enzyme and its substrate. It is known to markedly influence enzymatic activity, but so far, it is not clear how K_m has been optimized in biological metabolism. Recently, several experimental studies have shown that the activity of cellulase is maximized at a K_m which is neither too large nor too small. Furthermore, the optimum K_m shifted positively as the substrate concentration was increased. The physical origin of this optimality is the correlation between K_m and the rate constant (k_{cat}). However, the existence of such correlation has not been established for enzymes in general.
Therefore, in this study, we have obtained K_m and k_{cat} data from the enzyme database “BRENDA”, and have evaluated the correlation for each enzyme. In addition, we have attempted to clarify the correlation by considering the free energy change of the entire enzymatic reaction, which controls the relationship between K_m and k_{cat}. In this presentation, we will discuss our results so far as well as future directions.

enzymes, kinetics, computational models

発表責任者：田村太陽（tamura_taiyo@keio.jp）

講演番号：3D5p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 D5 会場

放線菌由来 hydrazidase のパラベン分解活性に関する解析

Characterization of hydrazidases from Actinomycetes catalyzing parabens

○竹野谷 美穂子、伊藤 晋作、佐々木 康幸、矢嶋 俊介（東農大生命）
○mihoko TAKENOYA, shinsaku ITO, Yasuyuki SASAKI, shunsuke YAJIMA (Life Sci., Tokyo Univ. of Agri.)

2 種類の放線菌において、amidase signature family に分類されヒドラジド分解活性を示した酵素が、パラベン分解活性を有することを確認したことを報告する。

人工合成ヒドラジド 4-hydroxybenzoicacid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH)を唯一の炭素源として *Microbacterium hydrocarbonoxydans* が単離され、ヒドラジド分解酵素 Hydrazidase (MhHyd)が同定された。MhHyd は自然界では何を基質とするのか。パラベンは果実に自己防御物質として含まれることから、当該菌が土壌中のパラベンを資化する可能性を考えた。MhHyd の基質として 3 種類のパラベン化合物を用いた。その結果、全てに対し HPLC によって分解産物である 4-hydroxybenzoic acid (HBA)を検出した。また、*Pseudonocardia acaciae* 由来で、MhHyd とアミノ酸配列の相同性が 57.7%の Amidase (PaAm)を用い、hydrazidase 活性とパラベン分解活性を確認した。PaAm も MhHyd と同様に分解活性を示したが、活性の強さに差がみられ、その要因を検討するために X 線結晶構造解析により構造を比較した。全体構造は良く重なったが、活性部位入口付近の構造に違いが見られ、活性に影響している可能性が考えられた。

We report that enzymes from two species of actinomycetes, which belong to amidase signature family, have shown a paraben degradation activity in addition to hydrazide-degradation, Hydrazidase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans* (MhHyd) had been isolated from the medium containing an artificial compound, 4-hydroxybenzoicacid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH) as the sole carbon source. In nature, some fruits contain parabens as a self-protectant. Then, we hypothesized that *M. hydrocarbonoxydans* may have a possibility to catabolite parabens. Three kinds of parabens were used as substrates for MhHyd. As a result, MhHyd catalyzed all of them to produce 4-hydroxybenzoic acid (HBA), which were detected by HPLC. Another amidase from *Pseudonocardia acaciae* (PaAm), which has 57.7% amino acid sequence homology with MhHyd was cloned and also showed hydrazidase and paraben degradation activities as MhHyd, but with different kinetic parameters. Then, X-ray crystal structures were compared to investigate it. The overall structure of PaAm was well overlapped with that of HyHyd. However, there was a difference near the entrance of the active site slightly. It may have affected the activity.

Kinetic parameters, X-ray crystal structures, hydrazide and amidase

講演番号：3D6a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D6 会場

骨格筋における新たなカルシウムイオン制御因子の発見
Discovery of a Novel Calcium Ion Regulator in Skeletal Muscle

○佐々木 崇、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Takashi SASAKI, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

骨格筋は、活動電位に応じ筋小胞体から放出される Ca^{2+}によって収縮し、筋小胞体膜上に存在するカルシウムイオンポンプ SERCA によって Ca^{2+}が再び筋小胞体内部に取り込まれることで弛緩する。我々は後述する一連の実験から、骨格筋において Ca^{2+}シグナルを制御する新たなタンパク質を見出し、これを Muscle-specific Ca^{2+} regulator （Mcare）と名付けた。

Mcare は骨格筋特異的に発現する膜貫通タンパク質であり、筋小胞体に局在することが確認された。培養骨格筋細胞 C2C12 myotubes に対し電気刺激を与えると細胞質における Ca^{2+}濃度の一過的な上昇が誘導されるが、Mcare を過剰発現した細胞ではこの応答が有意に減弱した。ドッキングシミュレーションや共免疫沈降実験より Mcare と SERCA の相互作用が確認されたことから、Mcare は SERCA に直接結合し活性化することにより Ca^{2+}シグナルを制御しているものと考えられる。次に生体における Mcare の役割を明らかにするため、Mcare 欠損（KO）マウスを作出し表現型の解析を行った。KO マウスは WT マウスと比較して進行性の筋量・筋力の低下を示したことから、Mcare が骨格筋の恒常性維持に必須の役割を果たすことが明らかとなった。

以上の結果は、Mcare が骨格筋における新規の Ca^{2+}シグナル制御タンパク質であることを示しており、Ca^{2+}恒常性破綻に起因する筋疾患や筋萎縮の予防・治療に向けた標的分子となる可能性がある。

Skeletal muscle contracts by Ca^{2+} released from the sarcoplasmic reticulum (SR) and relaxes when Ca^{2+} is uptake into the SR by SERCA. We identified a new protein that regulates Ca^{2+} signaling in skeletal muscle and named it muscle-specific Ca^{2+} regulator (Mcare).

Mcare is a transmembrane protein specifically expressed in skeletal muscle and was found to localize to the SR. Electrical stimulation of C2C12 myotubes induced a transient increase in cytosolic Ca^{2+} concentration, but this response was significantly attenuated by Mcare. Docking simulations and co-immunoprecipitation experiments confirmed the interaction between Mcare and SERCA, suggesting that Mcare regulates Ca^{2+} signaling by binding to and activating SERCA. Next, to clarify the role of Mcare in vivo, we generated Mcare-deficient (KO) mice and analyzed their phenotype. KO mice showed progressive loss of muscle mass and strength compared to WT mice, indicating that Mcare plays an essential role in maintaining skeletal muscle homeostasis.

skeletal muscle, calcium ion, C2C12

発表責任者：佐々木　崇（atsasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D6a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D6 会場

骨格筋における新規カルシウムイオン制御因子の発現制御機構解析

Analysis of the expression mechanisms of novel calcium ion regulatory factor in skeletal muscle

○魯 意、山内 祥生、佐藤 隆一郎、佐々木 崇（東大院・農生科・応生化）
○Yi LU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO, Takashi SASAKI (The Univ. of Tokyo)

骨格筋は、ヒトの高い基礎代謝の維持や運動に必須の組織であり、カルシウムイオンは骨格筋の機能制御において重要な役割を果たすことが明らかにされている。本研究では、カルシウムイオンを制御することで、骨格筋の機能維持に有効であることが当研究室で明らかにされた新規タンパク質 Muscle-specific Ca^{2+} regulator (Mcare)に着目し、その発現に影響を与える因子や経路の特定を試みた。

まず細胞質と筋小胞体の間のカルシウムイオン循環に焦点を当て、筋小胞体でカルシウムイオン濃度の低下により生じる小胞体ストレスや、細胞質中のカルシウムイオンによって引き起こされるアポトーシスが Mcare 遺伝子の発現を低下させることを明らかにした。また、Mcare は速筋特異的に発現しているため、Sine oculis homeobox 等の速筋特異的また高発現な転写因子が Mcare 遺伝子の発現を促進する可能性を検討した。

これにより、Mcare の発現制御機構を明らかにすることで、骨格筋機能の分子メカニズムの解明や骨格筋関連疾患の予防を実現することを目指している。

Skeletal muscle is known as the essential organization for maintaining high basal metabolism and facilitating exercise in humans, and calcium ion plays a crucial role in regulating its function. In this study, we focus on Muscle-specific Ca^{2+} regulator (Mcare), a novel protein demonstrated to effectively maintain skeletal muscle function by regulating calcium ion. We aim to identify factors or pathways influencing its gene expression.

We initially centered on calcium ion circulation between cytoplasm and sarcoplasmic reticulum and discovered that endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by cytoplasmic calcium ion reduced Mcare gene expression. Meanwhile, since Mcare only expresses in fast-twitch myofiber, we explored the upregulation effects of several transcription factors that are highly expressed in fast-twitch myofiber, such as Sine oculis homeobox.

Through this research, we try to elucidate molecular mechanisms of skeletal muscle function and prevent muscle-related diseases by regulating the expression of Mcare.

skeletal muscle, calcium ion, ER stress

講演番号：3D6a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D6 会場

骨格筋における Store Operated Calcium Entry 応答性遺伝子の探索

Search for Store Operated Calcium Entry Responsive Genes in Skeletal Muscle

○後藤 舞奈、山内 祥生、佐藤 隆一郎、佐々木 崇（東大院・農生科・応生化）
○Maina GOTO, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO, Takashi SASAKI (The Univ. of Tokyo)

骨格筋量の維持のためには運動が効果的であることが知られている。運動による新たな筋機能制御経路として Store Operated Calcium Entry (SOCE)と呼ばれる Ca^{2+}流入機構に着目した。SOCE は正常な筋肉の成長に必要であるが、どのような機構で骨格筋機能を制御しているかは不明な点が多く残されている。本研究では、SOCE が筋機能を制御する分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

SOCE による骨格筋機能制御機構の解明のため、C2C12 筋管細胞に SOCE 誘導剤である Thapsigargin(Tg)を添加したサンプルについて、RNA sequence を用いて網羅的に解析し、新規 SOCE 応答性遺伝子を同定した。同定した遺伝子について、Tg 添加により発現が上昇すること及び運動後の mouse 骨格筋において発現が上昇することを確認した。また、SOCE 応答性遺伝子は、短時間の高強度走行運動、長時間の低強度走行運動どちらでも発現が上昇することも明らかにした。これらの遺伝子は SOCE による骨格筋機能制御に関わることが予想されるため、今後発現制御機構や機能の解析をすることで、筋機能制御への理解が深まることが期待される。

Exercise is known to be effective in maintaining skeletal muscle mass. We focused on the Ca2+ influx mechanism called Store Operated Calcium Entry (SOCE) as a new pathway to regulate muscle function by exercise; SOCE is necessary for normal muscle growth, but the mechanism by which it regulates skeletal muscle function remains largely unknown. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms by which SOCE regulates muscle function.

To elucidate the mechanism of skeletal muscle function regulation by SOCE, samples of C2C12 myotubular cells supplemented with the SOCE inducer Thapsigargin (Tg) were analyzed using RNA sequences to identify novel SOCE-responsive genes. We confirmed that the expression of the identified genes was upregulated by the addition of Tg and in mouse skeletal muscle after exercise. We also found that the SOCE-responsive genes were upregulated during both short-duration high-intensity and long-duration low-intensity running exercise. Since these genes are expected to be involved in the regulation of skeletal muscle function by SOCE, regulatory mechanisms of their expression and function will deepen our understanding of the regulation of muscle function.

skeletal muscle, exercise, Store operated calcium entry

講演番号：3D6a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D6 会場

廃用性筋萎縮モデルマウスにおける線維化関連因子の発現の特徴について
Expression of fibrosis-related factors in the mouse disuse muscle atrophy model
○阿部 瑞樹[1]、松本 乃乃花[1]、天部 雅貴[2]、森田 暁大[2]、増澤(尾﨑) 依[3]、細野 崇[2,3]、関 泰一郎[2,3]
([1]日大・生資科・生命化、[2]日大院・生資科・応生科、[3]日大・生資科・バイオ)
○ Mizuki ABE[1], Nonoka MATSUMOTO[1], Masaki AMABE[2], Toshihiro MORITA[2], Yori MASUZAWA(OZAKI)[3], Takashi HOSONO[2,3], Taiichiro SEKI[2,3] ([1]Nihon Univ., Dept. Chem. Life Sci., [2]Nihon Univ. Grad. School, [3]Nihon Univ., Dept. Biosci.)

【目的】加齢に伴う筋萎縮では細胞間隙が増加し、間隙での脂肪形成や線維化により筋線維の割合は減少する。一方、廃用性筋萎縮では、筋性拘縮の結果、筋は線維化するものの、筋力低下との関係は不明である。筋肉以外の組織では、血栓の分解・除去を担う線溶系因子が線維化に関与することが知られているが、廃用性筋萎縮におけるこれら因子の関与は不明である。本研究では、坐骨神経切除による骨格筋萎縮モデルマウスを用いて、細胞外マトリックスの産生や分解に関与する線溶系因子の機能について明らかにし、廃用性筋萎縮における筋肉の線維化の意義について明らかにすることを目的とした。【方法】C57BL/6J オスマウスを吸入麻酔下で片足の坐骨神経を切除することにより、筋萎縮モデルマウスを作製した。２週間後、ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋を回収し、PAI-1, uPA をはじめとした各種線溶系因子、線維化関連因子などの遺伝子発現を Real-time PCR により解析した。【結果】除神経肢のヒラメ筋重量は偽手術肢よりも低下傾向を示し、腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋重量は有意に低下した。腓腹筋では、E_3ユビキチンリガーゼ MuRF-1 と Atrogin-1, 線溶阻害因子である PAI-1, 線維化シグナルである TGFβ の遺伝子発現量は有意に増加した。また、炎症性サイトカインである IL-6 や線溶活性化酵素 uPA の遺伝子発現は、増加傾向を示した。現在、筋肉組織の線維化についてさらに検討を行っている。【結語】坐骨神経切除による筋萎縮では、PAI-1, TGFβ をはじめとする線維化関連因子の発現亢進が認められた。

This study aimed to clarify the pathophysiological relevance of muscle fibrosis in disuse muscle atrophy. We employed a mouse model of skeletal muscle atrophy to evaluate the role of fibrinolytic factors involved in the metabolism of the extracellular matrix. The sciatic nerve in one leg was excised to establish muscle atrophy. The hindlimb muscles were removed at 2 weeks after the operation for the analyses by real-time PCR. Hindlimb skeletal muscle weight was significantly decreased by denervation. In the gastrocnemius muscle, the levels of mRNAs encoding MuRF-1 and Atrogin-1 (E_3 ubiquitin ligase), PAI-1 (a fibrinolytic inhibitor), and TGF-β (a central mediator of fibrogenesis) were significantly increased. Additionally, IL-6 (an inflammatory cytokine) as well as uPA (a plasminogen activator) showed an increase, but it was not significant. In this muscle atrophy model established by denervation, PAI-1 and other fibrosis-related factors were potently induced by muscle atrophy. We are currently investigating the fibrosis in the muscle tissues.

Fibrinolysis, muscle atrophy, denervation

発表責任者：関泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D6a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D6 会場

各種筋萎縮モデルマウスにおける骨格筋の萎縮と筋萎縮関連因子の発現の特徴について

Characterization of mouse models for skeletal muscle atrophy induced by tail suspension, denervation, or dexamethasone.

○松本 乃乃花[1]、阿部 瑞樹[1]、天部 雅貴[2]、森田 暁大[2]、増澤（尾﨑） 依[3]、細野 崇[2,3]、関 泰一郎[2,3] ([1]日大・生資科・生命化、[2]日大院・生資科・応生科、[3]日大・生資科・バイオ)
○ Nonoka MATSUMOTO[1], Mizuki ABE[1], Masaki AMABE[2], Toshihiro MORITA[2], Yori MASUZAWA（OZAKI）[3], Takashi HOSONO[2,3], Taiichiro SEKI[2,3] ([1]Nihon Univ., Dept. Chem. Life Sci., [2]Nihon Univ. Grad. School, [3]Nihon Univ., Dept. Biosci.)

【目的】近年、尾懸垂や除神経による廃用性筋萎縮モデル、合成グルココルチコイド Dexamethasone（Dex）の投与により誘発される筋萎縮モデルが広く研究に利用されている。これらのモデルを用いた研究の多くは、Atrogin-1 や MuRF-1 などの筋萎縮関連因子の遺伝子やタンパク発現量を測定しているが、萎縮した筋重量との相関が明確に議論されているものは少ない。本研究では、これら 3 種の筋萎縮モデルにおける骨格筋重量の変化と筋萎縮関連遺伝子の発現に加え、筋原線維タンパク質の合成量・分解量を測定し、各筋萎縮モデルの特徴を明らかにしようとした。【方法と結果】（実験 1）C57BL/6J オスマウス（以下マウス）の尾を懸垂することで後肢を非荷重として 14 日間飼育した。各種骨格筋重量を測定後 Atrogin-1, MuRF-1 の mRNA 発現量は qPCR により測定した。その結果、ヒラメ筋の重量のみが減少したが、Atrogin-1, MuRF-1 の mRNA 発現量に変化はなかった。（実験 2）マウスの坐骨神経を切断し、14 日間飼育した後、実験 1 と同様な解析を行ったところ、後肢骨格筋の重量が減少し、Atrogin-1, MuRF-1 mRNA 発現量は増加した。（実験 3）マウスに Dex（20 mg/kg b.w., *i.p.*）を 10 日間毎日投与した後、実験 1 と同様な解析を行った。その結果、ヒラメ筋以外の後肢骨格筋の重量が減少し、Atrogin-1, MuRF-1 mRNA 発現量は増加した。現在、これらのモデルにおいて重水を用いた安定同位体標識法による筋原線維タンパク質の合成と分解について検討を行っている。【結語】筋萎縮モデルにおける各種骨格筋の萎縮と筋萎縮関連因子の発現の特徴が明らかとなった。

Mouse muscle atrophy models induced by tail suspension, denervation, or dexamethasone (Dex) have been widely used in research. This study was aimed to characterize the muscle atrophy model by measuring myofibrillar protein synthesis and its degradation, as well as the expression of muscle atrophy-related genes. In muscle atrophy caused by tail suspension, only soleus muscle weight decreased, but no change was observed in the mRNA expression levels of Atrogin-1 and MuRF-1. Cutting the sciatic nerve in mice decreased skeletal muscle mass in the hind limbs, but increased expression levels of atrogin-1 and MuRF-1 mRNA. Intraperitoneal administration of Dex decreased the weight of hindlimb skeletal muscles other than the soleus. Dex increased the levels of Atrogin-1 and MuRF-1 mRNA in the muscles. We are currently studying the synthesis and degradation of myofibrillar proteins using stable isotope labeling in these models.

muscle atrophy, dexamethasone, tail suspension

発表責任者：関 泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D6a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D6 会場

酢酸イソアミルの香り知覚に寄与するヒト嗅覚受容体の同定
Identification of an olfactory receptor involved in the odor perception of isoamyl acetate
○伊原 さよ子[1]、新村 芳人[2]、白須 未香[1]、岡本 雅子[1]、小川 芳幸[3]、高山 文博[3]、東原 和成[1] ([1]東大院農、[2]宮崎大農、[3]株式会社 NTT データ経営研究所)
○Sayoko Ihara[1], Yoshihito Niimura[2], Mika Shirasu[1], Masako Okamoto[1], Yoshiyuki Ogawa[3], Fumihiro Takayama[3], Kazushige Touhara[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Miyazaki, [3]NTT DATA INSTITUTE OF MANAGEMENT CONSULTING, Inc.)

酢酸イソアミル(IAA)は、バナナ香を呈する香り物質であり、吟醸酒などアルコール飲料の成分として果実香に寄与するなど、食品の風味に大きく影響する。これまで、IAA の香りの受容機構は不明であったが、我々は今回、IAA 香り知覚に関わるヒト嗅覚受容体(OR)を見出したため、報告する。OR 遺伝子多型と香り知覚の関連を探るため、約 1400 人を対象とした 60 種類の香り物質に対する官能評価と OR 遺伝子多型の相関解析を実施した結果、IAA に対する、強度、好き嫌い、リフレッシュ効果、等の香り知覚の評定に対し、複数の OR 遺伝子一塩基多型(SNP)に有意な相関が検出された。これらの遺伝子は連鎖不平衡の関係にあり、培養細胞を用いた受容体活性測定の結果、特定の OR にのみ、IAA への応答が検出された。また、この応答は、上述の評定値と相関を示す SNP がもたらすアミノ酸変異の導入により消失した。応答しない多型をもつ被験者はもたない被験者に比べ、上述の IAA 香り知覚の評定値が低いことに加え、果実らしさ、甘さを感じにくい傾向があることも明らかとなった。この OR のリガンド選択性を IAA の構造類似体に対して調べた結果、知覚における類似度が高い物質に応答が検出された。以上より、今回見出した OR は、IAA の香り知覚に大きく寄与する受容体と考えられる。

Isoamyl acetate (IAA) is well known for its characteristic banana flavor, and is deeply related to the deliciousness of foods. However, the mechanism of peripheral perception of IAA odor has been unclear. Here we report the identification of a human olfactory receptor (OR) involved in IAA odor perception. In association analysis between a large-scale odor survey and the OR genotypes of subjects, we found a correlation between IAA odor perception and SNPs in multiple OR genes in a linkage disequilibrium relationship. Of these ORs, only a certain OR showed a response to IAA in an in vitro cell-based assay, which was abolished by introduction of mutation corresponding to the SNP found to be correlated to IAA perception. Subjects with the nonfunctional OR alleles were less likely to perceive fruitiness and sweetness of IAA than subjects with the functional OR alleles. The OR also responded to compounds that were similar in odor quality to IAA. These results suggest that the OR found in this study may be a key OR for odor perception of IAA.

olfactory receptor, genetic variation, odor perception

発表責任者：東原和成（ktouhara@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D6a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D6 会場

栄養、熱及びその複合刺激による骨格筋マイオカインの動態変化
Regulation of myokines by nutrition, heat and their combined stimuli in mouse skeletal muscle
○矢澤 望実[1]、水関 祐歩[2]、石内 友里[2]、平岩 絵梨花[1]、篠崎 綾香[1]、村田 圭吾[2]、根建 拓[2]([1]東洋大生命科、[2]東洋大院生命科)
○Nozomi YAZAWA[1], Yuho MIZUSEKI[2], Yuri ISHIUCHI[2], Erika HIRAIWA[1], Ayaka SHINOZAKI[1], Keigo MURATA[2], Taku NEDACHI[2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo University)

骨格筋はマイオカインと呼ばれるタンパク質やペプチドを分泌するが、これまで運動効果の全身伝播という観点から主に運動依存的なマイオカインの分泌制御についての知見が集積しつつある。一方、骨格筋への他の刺激、例えば、栄養条件の変化あるいは熱刺激に応答したマイオカインの発現制御については未だ不明な点が多い。本研究では、運動依存的に分泌量が減少するマイオカインとして当研究室が同定した CXCL10 と CCL5 に着目し、栄養、熱、さらにはその複合刺激に応答した発現分泌制御を明らかにすることを目的とした。まず、C2C12 細胞を用いて CXCL10 および CCL5 の解析を行ったところ、細胞外グルコースあるいは飽和脂肪酸濃度の上昇に従って両マイオカインの分泌量が増加することが明らかとなった。一方、暑熱刺激を負荷すると運動刺激と同様、CXCL10 および CCL5 の分泌量は減少することが分かった。以上の結果は動物実験でも確認されたため、現在、熱、栄養の複合刺激の効果を解析している。まとめると、骨格筋マイオカインである CXCL10 および CCL5 は運動だけでなく、熱や栄養によっても制御され、総合的に分泌量が調節されていることが示唆された。

Skeletal muscle secretes proteins and peptides called myokines. Although the exercise-dependent regulation of myokine secretion has been extensively studied, the regulation of myokine expression in response to other stimuli, such as changes in nutritional conditions or heat stimuli, is still unknown. In this study, we focused on CXCL10 and CCL5, which we identified as myokines, which expressions were suppressed by exercise, and elucidate the regulation of their expression in response to nutrition, heat and their combined stimuli. First, we found that the secretion of both CXCL10 and CCL5 increased in response to elevation of extracellular glucose or saturated fatty acid concentration. On the other hand, heat stimulation decreased the secretion of CXCL10 and CCL5. Since these results were also confirmed in animal experiments, we speculated that the skeletal muscle myokines CXCL10 and CCL5 are regulated not only by exercise but also by heat and nutrition, and that their secretion is comprehensively controlled.

Myokine, Heat, Nutrition

講演番号：3D6a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D6 会場

暑熱順化における骨格筋マイオカインの動態変化

Regulation of myokines by heat acclimation in mouse skeletal muscle

○工藤 優華[1]、水関 祐歩[2]、村田 圭吾[2]、根建 拓[2] ([1]東洋大生命、[2]東洋大院生命)
○Yuka KUDO[1], Yuho MIZUSEKI[2], Keigo MURATA[2], Taku NEDACHI[2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo University)

近年、熱中症の対策として暑熱に慣れる、すなわち暑熱順化が注目されているが、暑熱順化に至る生理学的基盤については不明な点が多く残っている。最近、我々は、暑熱刺激に応答して骨格筋から分泌されるタンパク質群（総称してマイオカイン）の質的量的な変化が生じることを明らかにした。一方、暑熱順化時におけるマイオカインの動態は未だに不明である。そこで本研究では、暑熱順化によるマイオカイン制御の詳細を明らかにすることを目的とした。まず、マウス暑熱順化モデルを構築した後、様々な暑熱刺激によるマイオカイン発現分泌量を測定した。単回の暑熱刺激によってマイオカインのひとつである CCL5 遺伝子の骨格筋発現量は有意に減少したが、暑熱順化を行うことでこの減少が促進される傾向がみられた。また、単回の急性暑熱はマウス血中 CCL5 濃度を増加させるが、暑熱順化マウスでは血中 CCL5 濃度がむしろ減少していることも確認された。最後に、マウス C2C12 筋管細胞への慢性暑熱刺激によって CCL5 分泌量と遺伝子発現が漸減することも分かった。

以上、骨格筋由来 CCL5 発現分泌は暑熱順化によって減少することが初めて明らかになり、暑熱順化段階（熱中症耐性）のバイオマーカーとして有望であることが示唆された。

Heat acclimation is known as a countermeasure for heat stroke, but the physiological basis for heat acclimation remains largely unknown. In this study, we aimed to elucidate regulation of skeletal muscle-derived proteins (myokine) during the heat acclimation. We initially established a mouse heat acclimation model and measured the myokine expression under various heat stimuli. The CCL5 gene expression in skeletal muscle was significantly decreased by a single heat stimulus, and this decrease seems to be accelerated by heat acclimation. We also observed that a single bout of acute heat stimuli increases CCL5 levels in mouse blood, whereas heat-acclimatized mice have rather decreased levels of CCL5 in their blood. Finally, we found that chronic heat stimulation of mouse C2C12 myotubes progressively decreased CCL5 secretion and gene expression. In conclusion, we found that heat acclimation decreases skeletal muscle-derived CCL5 expression, which may become an useful biomarker to measure the heat acclimation.

heat acclimation, myokine, CCL5

講演番号：3D6p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D6 会場

大腸菌の細胞壁合成に必須な脂質フリッパーゼ MurJ を阻害する抗菌ペプチド Lys^M の生化学的解析

Biochemical research of the antibiotic peptide Lys^M that inhibits lipid II flipping by *E. coli* MurJ.

○甲賀 栄貴、Napathip LERTPREEDAKORN、田中 宏幸、宮崎 亮次、塚崎 智也（奈良先端大）
○Hidetaka KOHGA, Napathip LERTPREEDAKORN, Hiroyuki TANAKA, Ryoji MIYAZAKI, Tomoya TSUKAZAKI (NAIST)

真正細菌の脂質フリッパーゼ MurJ は、細胞膜に存在し、細胞質で合成されるペプチドグリカン前駆体（Lipid II）をペリプラズム側に反転させる必須の役割を持つため、MurJ の機能阻害は細胞溶解を引き起こす。近年では、ファージ由来の溶菌ペプチド LysM が MurJ を阻害することで大腸菌の溶菌を促すことが報告されており、MurJ は新たな抗生物質のターゲットとなりうる。MurJ は、一般的なトランスポーターのように細胞質に V 字型に開いた Inward 構造、ペリプラズム側に開いた Outward 構造を交互に繰り返すダイナミックな構造変化を伴いながら LipidII を輸送するとされている。これらの構造変化過程の詳細は不明であったが、大腸菌 MurJ の X 線結晶構造解析により Inward 構造、Outward 構造のどちらでもない中間状態である Squeezed 型の MurJ の新規構造を決定した。詳細な構造比較からアップデートした MurJ による LipidII の輸送モデルを提唱した（Kohga et al., Structure, 2022）。つづいて、MurJ と溶菌ペプチド LysM の関係性についても詳細に調べており、本発表では、MurJ フリッパーゼの輸送メカニズム、及び、抗菌ペプチド LysM の MurJ 阻害メカニズムについての新たな知見について発表する。

The bacterial peptidoglycan enclosing the cytoplasmic membrane is a fundamental cellular architecture. The integral membrane protein MurJ plays an essential role in flipping the cell wall building block Lipid II across the cytoplasmic membrane for peptidoglycan biosynthesis. MurJ transports Lipid II by rocker switch model with conformational changes between the inward(-facing) and outward(-facing) form. Lys^M protein derived from a lysis gene of *Levivirus* phage M (*lys^M*), completely blocks the lipid II transport activity mediated by *Escherichia coli* MurJ. However, the details of these structural change processes were unclear.

Here, we report an unprecedented crystal structure of *Escherichia* coli MurJ in a “squeezed” form (Kohga et al., ***Structure***, 2022). In this study, we compare our determined structures with available MurJ structures, discuss the structural changes of MurJ, and propose an updated model for Lipid II flipping. Furthermore, we have investigated the relationship between MurJ and the Lys^M peptide in detail, and we will report new insight into the mechanism of MurJ inhibition by Lys^M at this meeting.

Transporter, Antibiotic peptide, Structural analysis

発表責任者：甲賀栄貴（kohga.hide@bs.naist.jp）

講演番号：3D6p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D6 会場

脂質代謝制御因子 MIG12 のユビキチン化修飾機構解析
Analysis of ubiquitination of MIG12, a regulator of lipid metabolism
○行川 朋花[1]、西山 僚介[2]、鈴木 司[1]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]([1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化)
○Tomoka NAMEKAWA[1], Ryosuke NISHIYAMA[2], Tsukasa SUZUKI[1], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Agric. chem., Tokyo Univ. of Agric)

【目的】LXR (Liver X Receptor)は、脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は、LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、本遺伝子が脂肪酸合成系酵素の一つである ACC のポリマー化を亢進し、その酵素活性を上昇させることを示してきた。本研究では MIG12 のユビキチン（Ub）化に着目し、MIG12 が Ub 化を受けるかどうか、さらには Ub 化により MIG12 の機能が影響を受けるかについて検討した。
【方法】MIG12 タンパク質がプロテアソーム経路による分解を受けるかを検討するため、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下でシクロヘキシミド chase assay を行った。次に、MIG12(C 末端 Flag タグ)と Ub(N 末端 HA タグ)発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入し、MG132 処理後に抗 Flag 抗体で免疫沈降を行った。抗 HA 抗体でイムノブロットを行い、外因性 MIG12 が Ub 化を受けるか検討した。また、抗 MIG12 および抗 Ub 抗体を用いて、内因性 MIG12 が Ub 化を受けるかについて検討した。
【結果】MG132 処理により MIG12 タンパク質の分解が抑制された。また、外因性および内因性 MIG12 において、MG132 処理によりポリ Ub 化の促進が観察された。抗 K48Ub 抗体を用いて検討を行ったところ、内因性および外因性 MIG12 のポリ Ub 化は K48 ユビキチン鎖を含んでいることが明らかになった。MIG12 はリジン残基を 7 個有しており、それぞれのリジン残基の変異体 MIG12 を用いて現在検討を行っている。また、ポリ Ub 化が MIG12 の機能へおよぼす影響についても検討中である。

We have identified MIG12 as a novel target gene of LXR and have shown that MIG12 increases its enzymatic activity via promoting ACC polymerization. In this study, we investigated whether MIG12 is polyubiquitinated and whether polyubiquitination of MIG12 affects its function.
MG132 treatment inhibited degradation of MIG12 protein. Increased polyubiquitination was observed with MG132 treatment in both exogenous and endogenous MIG12. Examination with anti-K48Ub antibody revealed that polyubiquitination of endogenous and exogenous MIG12 involves the K48 ubiquitin chain. Mutant MIG12 of each lysine residue and the effect of polyubiquitination on MIG12 function are currently under investigation.

MIG12, ACC, Ubiquitin

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：3D6p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D6 会場

ホタテ(*Mizuhopecten yessoensis*)におけるシステンリッチのメタロチオネイン様カドミウム結合タンパク質の同定と機能解析

Identification and functional analysis of cysteine-rich metallothionein-like cadmium-binding protein in *Mizuhopecten yessoensis*

○鄭 澤華[1]、加藤 由悟[1]、根岸 瑠美[2]、胡桃坂 仁志[2]、中木戸 誠[3]、津本 浩平[3]、鈴木 道生[1]([1]東大院農、[2]東大定量研、[3]東大院工)

○Zehua Zheng[1], Yugo Kato[1], Lumi Negishi[2], Hitoshi Kurumizaka[2], Makoto Nakakido[3], Kouhei Tsumoto[3], Michio Suzuki[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The Univ. of Tokyo, [2]Institute for Quantitative Biosciences, The Univ. of Tokyo, [3]School of Engineering, The Univ. of Tokyo)

ホタテ貝(*Mizuhopecten yessoensis*)は、カドミウム(Cd)などの重金属を蓄積しやすい。本研究は、ホタテ貝の Cd 結合タンパク質の分離、精製を行い、その物質を同定し、それらの化学形態を明らかにした。ホタテ貝を組織ごとに分けて解剖し、Cd 濃度を測定したところ、中腸腺抽出物水溶性画分に Cd 結合物質が多く含むことが分かった。Cd 結合物質の大きさを推定するために HPLC-ICP-MS ゲルろ過カラムを用いて Cd 結合物質の解析を行った結果、高分子と低分子の 2 つ Cd 結合タンパク質が存在し、低分子成分は熱安定性タンパク質であることがわかった。HPLC を用いて低分子の Cd 結合画分を分取し、LC-MS/MS 解析に供したところ、低分子 Cd 結合タンパク質は Cysteine-rich の新規タンパク質（myCRP と命名）である可能性が考えられた。定量 PCR によりホタテ貝の各組織での遺伝子発現量を確認したところ、myCRP はホタテ貝の中腸腺にて特異的に発現することが確認された。myCRP の配列を組込んだプラスミドを大腸菌に形質転換し、作成した組換え myCRP(rmyCRP)を利用し、更なる機能解析を行った。等温滴定熱分析（ITC）により、9 つの Cd イオンが rmyCRP の 1 分子に結合することが明らかになった。抗体を用いた定量分析より、*M. yessoensis* は 132.2 nmol/g の myCRP を含んでいた。その結果、myCRP への Cd 結合量は、myCRP と結合した Cd 全体の 93.7%を占めることが分かった。この新知見は、Cd に対する無脊椎動物の防御機構に関する新たな手掛かりをもたらしている。

Scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) are likely to accumulate heavy metals such as cadmium (Cd). In this study, we separated and purified the Cd binding proteins of scallops. We dissected scallops by tissue and measured Cd concentrations. In order to estimate the size of the Cd binding molecules, HPLC-ICP-MS gel filtration column was used. Cd binding fraction was isolated using HPLC and analyzed by LC-MS/MS. Cd binding protein was identified as novel protein (myCRP) were consisted with Cysteine-rich domain. Gene expression levels in scallop tissues were determined by quantitative PCR. myCRP was found to be expressed specifically in the midgut glands of scallops. Further functional analysis was performed using recombinant myCRP(rmyCRP) using *E. coli.* The ITC measurement revealed that 9 Cd ions bind to 1 molecule of rmyCRP. Quantitative analysis using antibody showed that *M. yessoensis* contained 132.2 nmol/g of myCRP. We found that Cd binding to myCRP accounted for 93.7% of all Cd bound to myCRP. The findings provide new insights into the mechanisms by which invertebrates defend against Cd.

cadmium-binding protein, heavy mental, Bivalvia

講演番号：3D6p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D6 会場

自己免疫疾患において観察されたリジンモノメチル化の特異的変化

Specific changes in lysine monomethylation observed in autoimmune diseases

○山口 公輔、内田 浩二（東大院農）
○Kousuke YAMAGUCHI, Koji UCHIDA (The Univ. of Tokyo)

自己免疫疾患とは、本来異物の排除を担う免疫系が自己分子を攻撃してしまう疾患群の総称である。その原因として近年、「タンパク質の翻訳後修飾（PTMs）の異常」が病因となる可能性が指摘されている。特に強直性脊椎炎においては PTMs の異常が網羅的に探索されており、システインカルボキシエチル化が自己抗体の産生を誘発することが示されている。一方で、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）における PTMs の異常を解析した例は少ない。そこで本研究では、アダクトーム解析を用いて SLE における PTMs を解析し、病態形成との関わりを明らかにすることを目的とした。まず、SLE モデルマウス（MRL/*lpr*）の各臓器からタンパク質を調製し、リジン及びヒスチジンに対するアダクトーム解析を行った。その結果、野生型マウスと比較して SLE モデルマウスでは様々な PTMs に差異が認められたが、特に脾臓タンパク質においてリジンモノメチル化が減少していた。また、同位体希釈法による絶対定量及び抗モノメチルリジン抗体を用いたウエスタンブロット解析からも、リジンモノメチル化タンパク質の減少が確かめられた。次いで、脾臓ライセートを分画し被モノメチル化タンパク質を探索したところ、SLE モデルマウスでは複数のタンパク質中のモノメチルリジンが減少していること、またその１つにヒストンがあることが示唆された。今後は、モノメチルリジンの減少が SLE の病態形成に寄与するメカニズムを明らかにしたい。

Dysregulation of posttranslational modifications (PTMs) potentially causes autoimmune diseases. For example, carboxyethylated cysteine can serve as a neoantigen and induce the production of autoantibodies in ankylosing spondylitis patients. However, there have been few approaches to profiling the PTMs in systemic lupus erythematosus (SLE), a typical autoimmune disease characterized by multiple autoantibodies. In this study, using SLE model mice (MRL/*lpr*), we performed adductome analysis for lysine and histidine to screen PTMs associated with SLE and observed significant changes in PTMs on these amino acids. Based on two independent methods (immunoblotting and mass spectrometry), we confirmed that lysine monomethylation was most prominently decreased in the spleen of SLE mice. In addition, we analyzed the proteins that underwent the reduced methylation of lysine and identified histone as one of the target proteins. We are currently studying the relationship between the decrease in the monomethyllysine of histone and the pathogenesis of SLE.

Systemic lupus erythematosus, Adductome analysis, Monomethyllysine

講演番号：3D6p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D6 会場

小胞体ストレス依存的な PGRN の発現制御およびその生理的意義
Regulation of PGRN by ER stress in HT22 cells

○王 泊鈞[1]、沈 玉菠[2]、根建 拓[2] ([1]東洋大生命、[2]東洋大院生命)
○Bojun WANG[1], Yubo SHEN[2], Taku NEDACHI[2] ([1]Faculty School of Life sciences,Toyo University, [2]Graduate School of Life sciences,Toyo University)

プログラニュリン（PGRN）をコードする GRN 遺伝子の変異は、前頭側頭葉認知症（FTLD）などの神経変性疾患と連関する。当研究室では、神経細胞における酸化ストレスが PGRN 発現誘導を促進することを見出したが、他のストレス依存的な PGRN 発現制御や生理的役割については不明な点が多く残っている。本研究は、マウス海馬由来細胞 HT22 細胞を用いて、小胞体（ER)ストレス依存的な PGRN 産生制御およびその生理的意義を解明することを目的とした。まず、HT22 細胞に ER ストレスを誘導すると PGRN の発現量が増加することが明らかとなった。また PGRN 遺伝子ノックダウンを用いて ER ストレス依存的な PGRN 発現増加の生理的意義を探索したところ、発現増加した PGRN はフィードバックを稼働して ER ストレスを調節するとともに、オートファジーの調節を行っている可能性が示唆された。以上、ER ストレスによる神経細胞内 PGRN 発現量の増加は、ER ストレス応答因子およびオートファジー関連因子の発現量を制御し、神経細胞の機能を総合的に調節している可能性が考えられた。

Mutations in the GRN gene encoding progranulin (PGRN) have been linked to neurodegenerative diseases such as FTLD. We previously found that oxidative stress in neurons promotes the induction of PGRN; however, other stress-dependent regulation of PGRN expression and its physiological role remain unclear. In this study, we attempted to elucidate the endoplasmic reticulum (ER) stress-dependent regulation of PGRN production and its physiological significance using mouse hippocampal-derived HT22 cells. We initially found that induction of ER stress in HT22 cells increased PGRN expression. We next explored the physiological significance of the ER stress-dependent PGRN induction by knockdown of the PGRN gene, and found that the increased PGRN modulated ER stress and autophagy. Overall, the ER stress-induced increase in PGRN expression regulate the expression of ER stress response factors and autophagy-related factors, and may comprehensively regulate neuronal functions.

PGRN, ER stress, Autophagy

講演番号：3D6p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D6 会場

小胞体ストレスセンサーIRE1 による活性酸素種の直接的感知と分子シャペロンによるその制御

Direct sensing of reactive oxygen species by the endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 and its regulation by molecular chaperones

○松崎 元紀[1,2,3]、金村 進吾[4]、齋尾 智英[1]、稲葉 謙次[3,5]、奥村 正樹[2,3]（[1]徳大先端酵素、[2]東北大学際研、[3]東北大多元研、[4]関学大理、[5]九大生医研）

○ Motonori MATSUSAKI[1,2,3], Shingo Kanemura[4], Tomohide Saio[1], Kenji Inaba[3,5], Masaki Okumura[2,3] ([1]Tokushima Univ. IAMS, [2]Tohoku Univ. FRIS, [3]Tohoku Univ. IMRAM, [4]Kwansei Gakuin Univ., [5]Kyusyu Univ.)

哺乳動物細胞の小胞体（ER）は、インスリンなどの分泌タンパク質を産生するオルガネラである。新生タンパク質の生産時に起きる活性酸素種の生成は、ミスフォールドしたタンパク質の蓄積（ER ストレス）に繋がるため、細胞は ER ストレスを感知し、応答を制御するセンサー inositol requiring enzyme 1 (IRE1) を持っている。我々は IRE1 によるミスフォールドタンパク質ストレス感知が、多量体形成を介することを明らかにしつつある (投稿準備中)。一方で、IRE1 による酸化ストレス感知の分子機構や、分子シャペロンの中でも、protein disulfide isomerase (PDI) ファミリー酵素によるその制御は不明な点が多い。本研究では、IRE1 内腔ドメインによる活性酸素種の直接的感知、および分子シャペロンによる多量体形成制御について、Clear Native-PAGE 法による会合状態分布解析、および SDS-PAGE 法による分子間ジスルフィド結合形成解析を用いて検討した。その結果、リコンビナント IRE1 内腔ドメインは、システイン残基によって直接的に活性酸素種を感知できることがわかった。また、PDI ファミリー酵素はその効率を変化させた。これらの結果から、IRE1 は、分子シャペロンと協調することで、酸化ストレスに対する ER ストレス応答を制御することが示唆された。

The endoplasmic reticulum (ER) in mammalian cells is an organelle that produces secreted proteins. Reactive oxygen species (ROS) are generated during the production of nascent proteins, causing the accumulation of misfolded proteins, resulting in ER stress. To regulate the ER stress response, cells possess a sensor called inositol requiring enzyme 1 (IRE1). We are currently investigating the molecular mechanism of misfolded protein stress sensing by IRE1, with oligomerization playing a crucial role (*in preparation*). However, the mechanism of oxidative stress sensing remains unclear. Furthermore, the impact of protein disulfide isomerase (PDI) family enzymes on IRE1 oligomerization is also unknown. In this research, we examined the ability of the IRE1 lumenal domain to directly detect ROS and how molecular chaperones regulate it. We employed ClearNative-PAGE to analyze distribution of oligomeric states and SDS-PAGE to examine intermolecular disulfide bond formation. Our findings suggest that its cysteine residues enable the IRE1 lumenal domain to directly sense ROS, and its efficiency was altered by PDI family enzymes. These results indicate that IRE1 cooperates with molecular chaperones to regulate the ER stress response to oxidative stress.

endoplasmic reticulum stress sensor, endoplasmic reticulum stress response, reactive oxygen species

講演番号：3D6p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D6 会場

ダイズシストセンチュウの温度走性撹乱物質の探索

Explore for thermotaxis disruptive agents to soybean cyst nematode

○福田 純太、佐々木 康幸、矢嶋 俊介、伊藤 晋作（東農大院バイオ）
○Junta Fukuda, Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima, Shinsaku Ito (The Tokyo Univ. of Agric.)

ダイズシストセンチュウ（Soybean cyst nematode）はマメ科植物の根に寄生し、作物の収量減少を引き起こす害虫である。今回我々はこの防除のため、昆虫において重力や振動を感知するタンパク質である TRP-V チャネルに着目した。TRP-V チャネルはモデルセンチュウである *Caenorhabditis elegans* においては温度感知を行うことが知られており、そのアゴニストは昆虫の行動撹乱を介した殺虫剤として使用されている。本研究では SCN の新規殺線虫剤の創薬の可能性を検討するために、TRP-V チャネルアゴニストの SCN の 2 期幼虫の行動への効果を検証した。

温度走性アッセイにより 2 期幼虫は 30℃刺激を忌避する負の温度走性を示すことが明らかになっている。そこで *C. elegans* において TRP-V チャネルアゴニストとして知られているバニロイド化合物である capsaicin と vanillyl butyl ether を 2 期幼虫に処理して温度走性試験を行ったが、温度走性への影響は無かった。続いて、アブラムシの TRP-V チャネルの選択的アゴニストとして知られている afidopyropen を処理すると負の温度走性が低下したが移動率には変化が無かったため、afidopyropen は SCN の温度走性を撹乱させることが明らかになった。

Soybean cyst nematode (SCN) is a pest of legume that causes serious yield losses. We focused on TRP-V channels, a target protein of insecticides that disrupt aphid behavior. TRP-V channels are known to sense gravity and vibration in insects and temperature in *Caenorhabditis elegans*. In this study, we explored for substances that disturb the thermotaxis of 2nd stage juveniles with the aim of discovering new nematicides to SCN. Thermotaxis assays have shown that 2nd stage juveniles exhibit negative thermotaxis. Then, capsaicin and vanillyl butyl ether, vanilloid compounds known as TRP-V channel agonists in *C. elegans*, did not change thermotaxis of 2nd stage juveniles. Treatment of afidopyropen, which is a selective agonist of TRP-V channels in aphids, reduced negative thermotaxis.

Nematode, TRP-Vchannel, Thermosensing

講演番号：3D6p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D6 会場

食用培養肉に向けた無血清筋成熟誘導培地の探索

Serum-free medium for muscle maturation in cultured steak

○野田 笙太[1,2]、澤山 淳[3]、古橋 麻衣[4]、池尾 聡[2]、竹内 昌治[1,2,3,4] ([1]東京大学大学院 総合文化研究科、[2]東京大学 生産技術研究所、[3]東京大学大学院 情報理工学系研究科、[4]東京大学大学院 工学系研究科)

○Shota Noda[1,2], Jun Sawayama[3], Mai Furuhashi[4], Satoshi Ikeo[2], Shoji Takeuchi[1,2,3,4] ([1]Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, [2]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, [3]Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo, [4]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

近年、新たな食肉生産方法として培養肉の実用化が期待されている。倫理的背景から動物血清を使わない条件において生体骨格筋の構造を模倣した 3 次元筋組織の構築することが求められる。先行研究ではウシ初代筋細胞を用いて cm サイズの 3 次元筋組織が構築されたが、無血清での分化培養及び筋線維の成熟には至っていない。そこで本研究では、3 次元骨格筋組織における筋線維の成熟を目指し、無血清培地における筋成熟誘導及び筋成熟に最適な組織形状を検討した。

筋成熟を誘導する培地として、ホルモンカクテルを添加した新規無血清培地と、従来のウマ血清添加の分化培地とを比較した。マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて 3 次元筋組織を構築し、新規無血清培地にて培養したところ、筋線維直径が増加し、電気刺激応答時の筋収縮量が増大することを見出した。加えて、3 次元筋組織の幅を小さくすることによって、筋線維が高密度で形成され、筋収縮量が増大することが明らかとなった。これらの結果から、本研究で見出した新規無血清培地と組織形状によって 3 次元骨格筋組織の筋成熟を誘導できることが示唆された。

The practical application of cultured meat has garnered attention as a novel method in meat production. Ethical considerations require the construction of 3D muscle tissue that mimics the structure of living skeletal muscle under conditions without animal serum. In previous research, 3D muscle tissue with cm-scale was successfully constructed using bovine primary muscle cells, but serum-free differentiation culturing and maturation of muscle fibers have not been achieved. Therefore, in this study, we aimed to achieve serum-free maturation of muscle fibers in 3D skeletal muscle tissue.

We investigated a novel serum-free medium for muscle maturation and explored tissue shape. Comparing a novel medium with a hormone cocktail to a conventional differentiation medium supplemented with horse serum, we used the C2C12 myoblast cell line to construct 3D muscle tissues. Culturing with the novel medium increased muscle fiber diameter, leading to augmented muscle contraction during electrical stimulation. Further optimization, reducing the width of muscle tissues, enhanced muscle fiber densely formation and increased contraction. These findings suggest that the identified novel serum-free medium in this study may induce muscle maturation in 3D skeletal muscle tissues.

Cultured meat, Srum-free differentiation, 3D muscle tissue

発表責任者：野田 笙太（ndshota@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D6p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 D6 会場

In vitro におけるヒト iPS 細胞由来星細胞が膵がん抗がん剤感受性に及ぼす影響解析
In vitro analysis of the effect of human iPSC-derived stellate cells on anti-cancer drug sensitivity in pancreatic cancer cells.
○加茂 皓基[1]、米谷 達哉[2]、千葉櫻 拓[1]([1]東農大院・バイオ、[2]東農大院・健康)
○KOKI KAMO[1], TATUYA KOMETANI[2], TAKU THIBAZAKURA[1] ([1]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Nutr. Sci. Food Safety, Tokyo Univ. Agric.)

膵臓がんは予後が極めて悪く、罹患時からの５年生存率は 10%未満である。この要因としては、膵臓がんの構造的特徴に起因している。近年の研究によれば、膵臓がん細胞を取り巻く間質細胞・細胞外基質ががん細胞の遊走・浸潤を促進し、抗がん剤耐性の獲得に寄与していることが示唆され、これが膵臓がん治療を難しくしている。それらの一つとして注目されるのが「星細胞」であり多くの研究がなされている。しかし、マウス由来細胞やモデルマウスを用いた研究が多いため、ヒトの生体内における星細胞-膵がん細胞間相互作用は未知の部分が多い。よって本研究では、「ヒト」星細胞に焦点を当て、ヒト iPS 細胞由来星細胞と膵がん患者検体 6 検体を用い、in vitro での膵臓がん組織再構築系の確立と星細胞が膵がん細胞の抗がん剤耐性に及ぼす影響を解析した。結果として、6 検体の内 3 検体（膵がん細胞）において、星細胞の分化状態によって膵がん細胞への影響が異なり、静止期星細胞は膵がん細胞の増殖に、活性化星細胞は抗がん剤耐性の獲得に寄与していることが示唆された。この研究は、膵臓がんにおける抗がん剤耐性獲得のメカニズムの理解に寄与し、治療の発展に向けて重要な知見を提供するものと考えられる

Pancreatic cancer has a dire prognosis, with a 5-year survival rate below 10% due to its structural characteristics. Recent research indicates that stromal cells and the extracellular matrix around pancreatic cancer cells play a role in cancer cell migration, infiltration, and the development of chemoresistance, complicating treatment. Stellate cells have been investigated extensively, but the interaction between stellate cells and pancreatic cancer cells in the human body remains unknown.This study focused on human stellate cells, using induced pluripotent stem cell (iPS cells)-derived stellate cells and samples from six pancreatic cancer patients. The goal was to establish an in vitro pancreatic cancer tissue reconstruction system and analyze how stellate cells influence the acquisition of chemoresistance in pancreatic cancer cells. Results from six cancer cells indicated that the impact on cancer cells varied with the differentiation state of stellate cells. Quiescent stellate cells promoted pancreatic cancer cell proliferation, while activated stellate cells were implicated in the development of chemoresistance. This research should enhance our understanding of chemoresistance mechanisms in pancreatic cancer, providing vital insights for treatment advancements.

cancer cells, iPS cells, in vitro

発表責任者：加茂　皓基（11623008@nodai.ac.jp）

講演番号：3D6p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 D6 会場

ヒト肝臓オルガノイドの培養技術開発と生理機能評価

Culture Methods Development and Physiological Function Evaluation of Human Liver Organoids

○XIA Chen、髙橋 裕、久保山 文音、廣 佳穂里、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院農）
○Chen XIA, Yu TAKAHASHI, Ayane KUBOYAMA, Kahori HIRO, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

ヒト肝臓オルガノイド（human liver organoid, HLO）は、生体内の肝臓に類似した構造、機能を有すると考えられており、従来の培養細胞に代わる新たな実験ツールとして注目を集めている。しかし、HLO の培養には様々な増殖因子が必要となり、培養コストが高いといった課題がある。本研究では、特に高額な R-spondin-1、hepatocyte growth factor、fibroblast growth factor （FGF）-7、および FGF10 を同時に分泌する L-RHF2 細胞を樹立し、その培養上清を組み換えタンパク質の代わりに増殖用培地に用いることで、HLO における大幅な培養コストの削減に成功した。また、増殖用培地から成熟用培地に切り替えることで、インスリン応答性や脂質蓄積といった、成熟化した肝細胞機能を評価できることが示された。さらに、HLO では脂質代謝関連遺伝子の発現量が高く、HepG2 細胞とは異なりヒト生体肝細胞と同様に生理的な超低密度リポタンパク質を分泌することが明らかとなった。また、一般的に三次元構造体であるオルガノイドに対する高効率な遺伝子導入は困難であるが、HLO を一過的に二次元培養することで、HLO への高効率な遺伝子導入法を確立した。本研究で構築した HLO を扱うための基盤技術を活用することで、今後、ヒト肝細胞の生理機能の解明や肝疾患に対する新規予防法、治療法の開発に繋がることが期待される。

A human liver organoid (HLO) is a miniaturized model of the liver in vitro for representing human liver physiology. However, cultivating HLOs has posed a challenge due to the necessity of adding various growth factors, resulting in a high culture cost. To resolve this problem, we utilized a conditioned medium of L cells that simultaneously overexpress R-spondin1, hepatocyte growth factor, fibroblast growth factor (FGF) 7, and FGF10 for HLO growth, as an alternative to recombinant proteins. Matured HLO induced by switching the medium from growth medium to maturation medium showed sufficient liver function, including insulin responsiveness and lipid accumulation. Also, HLOs highly expressed lipid metabolism-related genes and secreted mature very low-density lipoprotein, unlike HepG2 cells. Furthermore, efficient gene transduction into HLOs was achieved via transient two-dimensional culture. This study lays the groundwork for utilizing HLOs in basic and applied research, contributing to clarifying the mechanism of human liver function and diseases.

Human liver organoid, iPS cell, hepatocyte

講演番号：3D6p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 D6 会場

培養肉作製へ有用な果実抽出液の探索

Exploration of fruit extracts for cultured meat production

○角野 陽奈美[1]、野田 笙太[2,3]、古橋 麻衣[5]、池尾 聡[3]、澤山 淳[4]、竹内 昌治[2,3,4,5]([1]三田国際学園高等学校、[2]東京大学大学院 総合文化研究科、[3]東京大学 生産技術研究所、[4]東京大学大学院 情報理工学系研究科、[5]東京大学大学院 工学系研究科)
○ Hinami Kadono[1], Shota Noda[2,3], Mai Furuhashi[5], Satoshi Ikeo[3], Jun Sawayama[4], Shoji Takeuchi[2,3,4,5] ([1]MITA International School, [2]Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, [3]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, [4]Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo, [5]Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

近年、持続的な食糧の生産方法として培養肉が注目されている。培養肉の作製には食肉の可食部分から採取した細胞を増殖、分化させる過程が含まれるが、動物由来成分の使用に伴う倫理問題、細胞培養に用いる培地のコストなどが課題となっている。そこで本研究では、培地成分の代替として果実抽出液に着目し、筋芽細胞への増殖効果を検討した。まず、先行研究でヒトハイブリドーマ HB4C5 細胞への増殖促進効果が確認された 6 種類の果実について抽出液を調製し、筋芽細胞の増殖培地に添加したところ、マンゴー果実抽出液が筋芽細胞の増殖を促進することが示された。さらに、増殖後の細胞は筋管に分化することを確認した。これらのことから、培地成分の代替としてマンゴー果実抽出液が有用である可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、細胞増殖に影響を与えるマンゴー果実由来の成分の特定を行いたい。

In recent years, cultured meat has emerged as a promising method for sustainable food production. The process involves the proliferation and differentiation of cells which were harvested from edible portions of meat. However, ethical concerns related to the use of animal-derived components and challenges such as the cost of cell culture medium have arisen. In this study, fruit extracts were focused on as an alternative to traditional culture medium components and investigated its growth-promoting effects on myoblast. Initially, six fruit extracts were prepared previously shown to enhance the proliferation of human hybridoma HB4C5 cells in the previous research. Then, fruit extracts were added to the growth medium, and mango fruit extract exhibited the most significant growth-promoting effect on myoblast. Finally, it was confirmed that the proliferated cells were differentiated into myotube. These results suggest the potential utility of mango fruit extract as an alternative to conventional culture medium components. Building upon these findings, We aim to identify specific components in mango fruit extract that influence cell proliferation.

Cultured meat, *Mangifera indica*, Cell proliferation

発表責任者：角野陽奈美（hkado0709@gmail.com）

講演番号：3D6p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 D6 会場

DAAO Engineering for Specific D-Alanine Detection: A single-molecule display approach

○Kalhari Munaweera, Kakeru Ikeda, Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano (Graduate school of Bioagricultural sciences, Nagoya University)

D- Alanine (D-Ala) is one of the D-Amino acids that are increasingly recognized for the pivotal roles in diverse physiological processes and as markers for various health risks. Extensive investigations have highlighted potential associations between the levels of D-Ala in body fluids and diseases such as dementia and severe viral infections. Quantitative measurement of D-Ala in biological samples holds paramount importance for the early diagnosis and treatment of these conditions. However, currently used HPLC methods for D-Ala measurement are both expensive and time-consuming. Therefore, this study aims to develop inexpensive and simple enzyme-based detection of D-Ala incorporating D-amino acid oxidase (DAAO) specifically reacting on D-Ala.

However, since natural DAAO reacts on a wide range of D-amino acids, our current study concentrates on the engineering of DAAO specific for D-Ala. Selection following the mutagenesis is carried out through the application of a novel *in vitro* single-molecule display technique. The technique utilizes a puromycin molecule to establish a covalent link between the protein and its corresponding mRNA, forming a stable complex allowing for the exploration of large mutant libraries. In the enzyme activity-based selection, DAAO variants are screened for specific activity in the presence of D-Ala, and pulled-down using streptavidin-coated magnetic beads for library enrichment. Subsequent reverse transcription and PCR amplification of the enriched library is employed to obtain input DNA library for the next selection round. The selection efficiency is tested on the model library consisting of different molar ratios of wild-type and inactive DAAO. We have demonstrated the enrichment of wild-type DAAO gene from 1:10 and 1:100 model libraries. Following the model screening, several key residues that are suspected to influence the substrate specificity were mutated by incorporating NDT codons into the DAAO gene, followed by the selection. We expect to obtain DAAO variant with high specificity for D-Ala for the future use in enzymatic D-Ala measurement kits. Furthermore, the universal design of this technique will enable engineering of other enzymes with relevant biotechnological applications.

Enzyme engineering, mRNA/cDNA display, DAAO

発表責任者：Damnjanovic Jasmina（jasmina@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3D7a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 D7 会場

Heterologous expression of the Cameria cinensis ammonium transporter CsAMT1.3, the major transporter in tea leaves

○Han WANG, Suguru OKUDA, Hideaki ITOH, Ken OKAMOTO, Peng LU, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

Tea (*Camellia sinensis*) is an ammonium-preferring plant species and CsAMT1.3 is an ammonium (NH_4^+) transporter (AMT) belonging to the AMT1 subfamily. CsAMT1.3 is mainly expressed in tea leaves and is highly relevant to the accumulation of amino acids in tea leaves. CsAMTs are considered the group of membrane proteins involved in nitrogen transportation, absorption, and metabolism in tea plants. Particularly in tea growth, nitrogen absorption, and metabolism directly influence the concentrations of free amino acids such as glutamine, glutamate, and theanine in tea leaves, which subsequently affect the umami flavor and the quality of the tea product. The identified tea tree CsAMTs genes are still relatively limited, and research on its structure and affinity substrate is also desired. Relevant research at this stage mainly focuses on gene cloning, bioinformatics analysis, and gene expression analysis.

Our research focuses on structural and functional analysis of CsAMT1.3. First, we aim to optimize the plasmid construct and overexpress the protein, we are trying to establish a feasible expression system by *E.coli* and HEK293 cells.

The following plasmids were constructed: pBAD-CsAMT-His10, pET28a-CsAMT-LE-mNGFP-His8, pHEK-CsAMT-LE-mNGFP-His8. For *E.coli* expression system, the gene of CsAMT1.3 was vectored by pBAD and pET28a into strains, C41(DE3)ΔacrB, BL21(DE3), KRX, C43(DE3), AD494(DE3), and Rosetta(DE3). The culture was induced with the serial concentration of inducer at different temperature and time. For the HEK293 expression system, the HEK293 cells were transfected by a GFP-fused plasmid. To solubilize and stabilize the membrane protein, detergent and glycerol were added to buffers. Ni-NTA chromatography was applied. To determine the protein, Western blot was performed with anti-His6.

The expression level of CsAMT1.3 was checked, only the GFP can be detected by fluorescence observation and western blot with anti-His6.

AMT, Protein expression, Protein purification

講演番号：3D7a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 D7 会場

Biochemical and biophysical analyses reveal weak and transient interaction between bacterial cellulose synthase (Bcs) subunits E and F

○Audrey Mae Orillaza[1], Hideaki Itoh[1], Peng Lu[1], Ken Okamoto[1], Michio Suzuki[2], Suguru Okuda[1], Koji Nagata[1] ([1]Laboratory of Food Biotechnology and Structural Biology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [2]Laboratory of Analytical Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

The bacterial cellulose synthase EFG (BcsEFG) complex plays an important role in the survival of Enterobacteriaceae. It is responsible for the distinct phosphoethanolamine (pEtN) modification of enterobacterial cellulose that promotes cell surface adhesion, persistence, and pathogenicity. Prior research has demonstrated a direct *in vivo* interaction between BcsEFG and has suggested a potential signal transduction pathway that regulates the synthesis of pEtN-cellulose. In order to elucidate the proposed mechanism, further investigation of the dynamics of their interaction is deemed necessary.

In the present study, we performed several biophysical analyses to characterize the binding affinity, stoichiometry, and stability of the BcsEF complex. We used a full-length polyhistidine-tagged BcsE and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled BcsF peptide. Using pull-down assay, size exclusion chromatography (SEC) and fluorescence spectroscopy, a weak binding between the BcsE and F subunits in a possible 1:1 molar stoichiometric ratio was observed. On one hand, SEC coupled with blue native PAGE revealed that the BcsEF complex was highly unstable in the presence or absence of cyclic-di-GMP, an intracellular messenger known to bind with BcsE. These clearly point to the characteristic weak and transient interaction of proteins involved in a signaling cascade. To gain full understanding of this phenomena, structural and functional analyses must be performed.

bacterial cellulose synthase, signal transduction, biophysical and biochemical analyses

講演番号：3D7a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 D7 会場

Identification of a novel subtilisin-derived peptide with cytotoxic activity
○Sibo WEI, Li LI, Michio SUZUKI, Peng LU, Suguru OKUDA, Ken OKAMOTO, Hideaki ITOH, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

Subtilisin, first discovered from *Bacillus subtilis*, is a 275-amino-acid serine protease that is secreted by certain types of soil bacteria. A peptide that could disrupt the membrane of *Streptococcus pneumoniae* [1] and was cytotoxic against tumor cell lines but not normal cell lines [2] was found. It corresponded to the C-terminal 45-amino acid residues of subtilisin NAT and was named as “natto peptide”.

During the purification of the natto peptide, we discovered a unique short peptide. To purify the peptide, Subtilisin Carlsberg (Sigma-Aldrich) was dialyzed against Milli-Q water and subjected to reverse-phase chromatography using an ODS column. The primary structure of this peptide was then analyzed by Edman degradation and MALDI-TOF MS. The peptide had a molecular mass of 3,225 Da and was identified as the N-terminal 31-amino acid residues of subtilisin Carlsberg, which has not been reported previously. Therefore, we named this peptide “SL-3 peptide”.

The SL-3 peptide contains several cationic (pI=9.83) and hydrophobic amino acid residues. The cytotoxic activity of the peptide was evaluated by its effect on two cancer cell lines, Caco-2 and HeLa, and one normal cell line, WI-38. The synthetic SL-3 peptide killed all the three cell lines in a concentration-dependent manner. Because of its comparable toxicity towards cancer and normal cell lines, the SL-3 peptide was identified as a cytoxic peptide. Meanwhile, a liposome disruption assay was performed using a cancer cell-like liposome model, suggesting that SL-3 peptide may kill cells by disrupting the cell membrane.

[1] Kitagawa M, et al. (2017) Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, natto, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains. *AMB Express* **7**, 127.
[2] Hatakeyama S, et al. (2016) Studies on the anticancer mechanisms of the natto extract. *J Soc Mater Eng Resour Jpn* **27**, 15–19.

cytotoxic activity, Subtilisin Carlsberg, novel peptide

講演番号：3D7a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 D7 会場

The cytotoxicity, localization, and interaction with host-protein of proteins encoded by ORFs from ASFV strain Georgia

○ Yuxue NIU[1], Hayato MASUTANI[1], Shiho SAITO[1], Peng LU[1], Ken OKAMOTO[1], Suguru OKUDA[1], Michio SUZUKI[1], Takehiro KOKUHO[2], Hideaki ITOH[1], Koji NAGATA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]NARO)

African Swine Fever (ASF) is one of the most devastating diseases in pigs, which leads to hemorrhagic symptoms and has caused a large commercial loss in the global pig industry. Despite the current vaccine efforts, combating the various strains remains a challenge due to the complex genome of the virus. The African swine fever virus (ASFV) contains more than 150 open reading frames (ORFs), with most functions yet to be identified.

In a prior genomic investigation comparing five ASFV strains, it was discovered that 19 short genes encoding small proteins were exclusively annotated in high-virulence strains (HG2018, GRG2018, and HLJ2018), while remaining absent in low-virulence strains (OURT88/3 and BA71V) (Lu *et al*., 2023). Additionally, another research found that 4 out of the 47 MGFs from the Georgia2007/1 strain have cytotoxicity (Masutani *et al.*, to be published). These ORFs are worth being investigated as candidates for vaccine development due to their potential association with toxicity.

In the current study, the 23 ORFs (19 short genes and 4 MGFs) were expressed in the pig kidney cell line LLC-PK1. The cytotoxicity of the 19 short genes was clarified by MTT assay. The subcellular localization of their corresponding proteins was analyzed. Furthermore, the interactions between host cell proteins and the 23 ORF proteins will be investigated through immunoprecipitation (IP). This study may help replenish functional annotations of the ASFV genome and provide theoretical evidence for selecting target genes for the ASF vaccine and drug development.

Reference:

Lu P, Zhou J, Wei S, et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of African swine fever virus strains. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2023;21:4322-4335.

ASFV, ORF, cytotoxicity

発表責任者：NIU Yuxue（niuyuxue2022@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D7a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 D7 会場

アクロレイン-リジン付加体に対する抗体による抗原認識機構の解析

Analysis of the antigen recognition mechanism by antibody against acrolein-lysine adduct

○牧野 航大、隋 苗苗、齋藤 志ほ、奥田 傑、伊藤 英晃、岡本 研、鈴木 道生、陸 鵬、内田 浩二、永田 宏次（東大院農）
○Kodai MAKINO, Miaomiao SUI, Shiho SAITO, Suguru OKUDA, Hideaki ITO, Ken OKAMOTO, Michio SUZUKI, Peng LU, Koji UCHIDA, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

アクロレインは、生体内の酸化ストレスに伴う脂質過酸化反応で生じる高反応性のα,β-不飽和アルデヒドであり、タンパク質中リジン残基に付加し機能を阻害する。2 つの主要な付加様式が知られ、ともに mAb5F6 により認識される付加体を形成する。この抗体は体内のアクロレイン・酸化ストレスレベルを推定する重要なマーカーとして用いられるが、2 つのエピトープへの認識機構や相互作用様式は検討されていない。本研究ではこの抗原-抗体間相互作用を明らかにすることを目的とし、構造解析に向き大腸菌生産可能なフラグメント抗体“Fv-clasp”の調製およびそれを用いた解析を行った。

既報の方法、すなわち封入体を完全変性ののちリフォールディングを行う方法では十分量の目的抗体を調製することが困難であったため、今回私たちは新たに、穏和な条件を用いた封入体からの調製手順を検討し、より簡便な手順で目的抗体を調製した。また大腸菌生産した目的のフラグメント抗体が、想定された通りに抗原への結合活性を有していることが確認されたため、現在構造解析を目指して結晶化条件を探索している。

Acrolein is a highly reactive α,β-unsaturated aldehyde produced in lipid peroxidation reactions associated with oxidative stress *in vivo* that adds to lysine residues in proteins and inhibits function. Two major modes of addition have been reported, both of which form adducts that are recognized by mAb5F6. This antibody is used as an important marker to estimate the level of acrolein oxidative stress in the body, but the recognition mechanism and mode of interaction with the two epitopes have not been investigated. In this study, we aimed to elucidate this antigen-antibody interaction using a fragment antibody, Fv-clasp, which is *E. coli*-producible and suitable for structural analysis.

Since it was difficult to prepare a sufficient amount of the target antibody by the previously reported method, i.e., refolding after complete denaturation of the inclusion body, we investigated a new preparation procedure from the inclusion body under mild conditions and prepared the target antibody by a simpler procedure. We have confirmed that the fragment antibody produced in *E. coli* has antigen-binding activity as expected, and we are currently investigating crystallization conditions for structural analysis.

acrolein, Fv-clasp, X-ray crystallography

講演番号：3D7a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 D7 会場

アルデヒド修飾アミノ酸 Methylglyoxal-arginine の mAb 6B による認識機構の可視化

Visualization of the Recognition Mechanism of Aldehyde-modified Amino Acid Methylglyoxal-arginine by mAb 6B

○野坂 柚奈、隋 苗苗、齋藤 志ほ、陸 鵬、伊藤 英晃、岡本 研、鈴木 道生、奥田 傑、内田 浩二、永田 宏次（東大院農）
○Yuzuna NOSAKA, Miaomiao SUI, Shiho SAITO, Peng LU, Hideaki ITOH, Ken OKAMOTO, Michio SUZUKI, Suguru OKUDA, Koji UCHIDA, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】生体内の糖化反応（メイラード反応）では、アミノ基とカルボニル基が非酵素的に反応してアマドリ転位物を生じ、一部は脱水や酸化によって AGEs (Advanced Glycation End-products) に転じる。AGEs は加齢や糖尿病などの病態によって蓄積が進み、タンパク質の立体構造の変化や AGE 受容体への結合を介して老化関連疾患の発症に関与する。本研究では、AGEs の一つである Methylglyoxal-arginine のモノクローナル抗体 mAb 6B による認識機構を解明し、mAb 6B の老化関連疾患病態マーカーや抗体医薬品としての応用に資する知見を得ることを目的とする。
【方法】抗原認識領域を含んだ、mAb 6B の一部である Fv-clasp 6B を、大腸菌を用いて発現させ、精製した後、X 線結晶構造解析のための結晶化を試みた。
【結果・今後の展望】Fv-clasp 6B 単体の結晶が得られ、現在 X 線結晶構造解析に向けて、結晶の高品質化に取り組んでいる。また同時に、抗体–抗原複合体の結晶作製に用いる Methylglyoxal-arginine の化学合成を行っている。
【Background, Objective】In glycation reactions (Maillard reaction) *in vivo*, amino and carbonyl groups react non-enzymatically to form Amadori rearrangements, some of which are converted to AGEs (Advanced Glycation End-products) by dehydration and oxidation. The accumulation of AGEs is accelerated by aging and pathological conditions such as diabetes. AGEs are involved in the development of age-related diseases through changes in protein conformation and binding to AGE receptors. The purpose of this study is to elucidate the recognition mechanism of methylglyoxal-arginine, one of AGEs, by the monoclonal antibody mAb 6B, and to obtain knowledge that will contribute to the application of mAb 6B as a pathological marker and an antibody drug for age-related diseases.
【Methods】Fv-clasp 6B, a portion of mAb 6B, containing the antigen recognition region, was expressed using E. coli. Purified Fv-clasp was attempted to crystallize for X-ray crystallography.
【Results, Future Prospects】The crystals of Fv-clasp 6B alone were obtained, and we are currently working on improving the quality of the crystals for X-ray crystallography. At the same time, the chemical synthesis of methylglyoxal-arginine for the preparation of antibody-antigen complex crystals is underway.

structural biology, glycation, X-ray crystallography

講演番号：3D7a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 D7 会場

アフリカ豚熱ウイルスの高効率 DNA 複製に重要と考えられるチミジンキナーゼの調製

Preparation of the thymidine kinase that may be important for highly efficient DNA replication of African swine fever virus

○神 さくら[1]、髙田 幸之介[1]、劉 暢[1]、奥田 傑[1]、岡本 研[1]、伊藤 英晃[1]、鈴木 道生[1]、陸 鵬[1]、國保 健浩[2]、永田 宏次[1] ([1]東大院農、[2]農研機構)

○ Sakura KAMI[1], Kounosuke TAKADA[1], Chang LIU[1], Suguru OKUDA[1], Ken OKAMOTO[1], Hideaki ITOH[1], Michio SUZUKI[1], Peng LU[1], Takehiro KOKUHO[2], Koji NAGATA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]NARO)

【背景】アフリカ豚熱とはアフリカ豚熱ウイルスによって引き起こされるウイルス性の疾患である。主に豚やイノシシに見られ、強い伝染性と高い致死率が特徴である。日本は清浄国であるものの、日本を取り巻くアジアの国々をはじめとして世界各地で感染が確認されている。そのためアフリカ豚熱への対応策が必要とされている。

【目的】本研究ではアフリカ豚熱ウイルス複製に重要な役割を果たすタンパク質の阻害剤探索を最終目標とし、そのためにアフリカ豚熱ウイルスの複製に重要と考えられるタンパク質の作製を目的とした。

【方法】大腸菌を用いて対象タンパク質を発現させ、精製を行った。

【結果】発現条件・精製条件の検討を行うことでより良い条件の探索を行った。その結果機能解析に十分と考えられる量および純度のタンパク質を得ることができた。

【今後の展望】本研究で発現させたタンパク質を用いて、機能解析手法の確立、及び阻害剤探索を行うことでアフリカ豚熱発生時の有効な対処法の開発につながると考えられる。

【Background】African Swine Fever (ASF) is a viral disease caused by the African Swine Fever Virus (ASFV). It is mainly seen in pigs and wild boars, and it is characterized by severe contagiousness and a high mortality rate. Although Japan is a country completely free of the disease. However, the disease has been confirmed in many parts of the world, including Asian countries surrounding Japan. Therefore, measures against ASF are necessary.

【Objective】The ultimate goal of this study is to search for inhibitors of the protein that plays an important role in the DNA of ASFV replication. To achieve this goal, I aimed to make the protein that is thought to be important for the DNA of ASFV replication.

【Methods】The target protein was expressed by *Escherichia coli* and purified.

【Results】Better conditions of expression and purification were sought. Thus, the protein of sufficient quantity and purity for functional analysis was obtained.

【Future Prospects】The protein expressed in this study will be used to establish a method for functional analysis and to search for inhibitors, which may lead to the development of effective measures against ASF outbreaks.

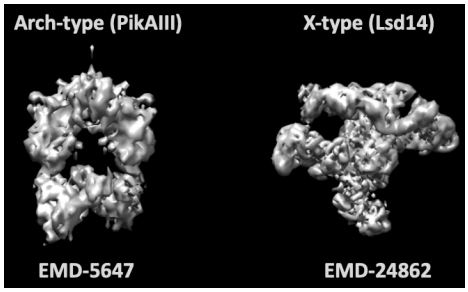
thymidine kinase, African swine fever virus, DNA replication

講演番号：3D7a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 D7 会場

モジュラーポリケチド合成酵素の立体構造推定
Structure Estimation of Modular Polyketide Synthases

○齋藤 怜奈[1,2]、武田 知己[1,2]、湯澤 賢[1,2]（[1]慶大・先端生命研、[2]慶大院・政策メディア・先端生命）
○Rena SAITO[1,2], Tomoki TAKEDA[1,2], Satoshi YUZAWA[1,2] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Syst. Biol. Prog. Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ.)

モジュラーポリケチド合成酵素（Polyketide synthases; PKSs）は，抗生物質など薬剤の生合成を担う巨大な酵素である．またモジュラーPKS の機能改変により新たな薬剤を生み出す試みが行われている．しかしながら同酵素のサイズが巨大である故に，構造においては依然として不明な点が多くある．タンパク質の機能はその構造と密接な関係にあるため，標的酵素の構造を明らかにすることが重要となる．先行研究で報告された 2 種類のモジュラーPKS のサブユニットの立体構造解析では，どの酵素も KS，AT，KR，ACP ドメインのみから構成されているにもかかわらず，全体の構造が大きく異なっていた（Dutta *et al.*, Nature 2014, Bagde *et al.*, Science 2021）．構造解析されたモジュラーPKS の構造は大きく 2 つに分けられ，Lsd14 の X 型と PikAIII のアーチ型が挙げられる．



そこで我々では，モジュラーPKS の構造変化に寄与する要因の推定を目的とした．我々はドメイン間リンカー領域に着目し，Lsd14 と PikAIII を含む 599 個のモジュラーPKS のドメイン間リンカーを対象とした大規模な *in silico* 解析を行なった．その結果，KS-AT リンカーは，α ヘリックスや β シートの数によって 4 種類に，AT-KR リンカーにおいては 3 種類に分類できることが分かった．また，AT-KR リンカーにおいては構造をとらないリンカーも存在した．今後は一部のリンカーをタンパク質として精製し，各種バッファー条件における構造を円偏光二色性測定法によって解析し，*in silico* 解析の妥当性を検証するとともに，モジュラーPKS の構造多様性に寄与する要因を明らかにする．

Modular polyketide synthases (PKSs) are large enzymes that synthesize antibiotics and other drugs, and offers wealth of engineering opportunities for the production of new drugs. However, PKS engineering has been hampered by the lack of a structural information, which is crucial for protein engineering. In previous studies, structural analysis of the subunits of two modular PKSs showed that the overall structures are very different, albeit each enzyme consists of the same type of protein domains (= KS, AT, KR, and ACP domains) (Dutta *et al.*, Nature 2014, Bagde *et al.*, Science 2021). Their structures can be divided into two categories: the X-type of Lsd14 and the arch-type of PikAIII.

In order to elucidate the factors that contribute to the structural differences of the PKSs, we have focused on interdomain linkers of the PKSs and performed in silico structural analysis of KS-AT and AT-KR linkers of 599 modular PKSs, including Lsd14 and PikAIII. We found that the KS-AT linker can be classified into four types based on the number of α-helices and ß-sheets, and the AT-KR linker into three types. We also found that some AT-KR linkers were random coil. To further investigate the structures of interdomain linkers and validate our *in silico* analysis, we plan to analyze structures of selected linkers in various buffer conditions in vitro by CD spectroscopy, which may give some factor contributing to the structural diversity of the modular PKSs.

Modular polyketide synthases, Inter domain linkers, Large scale analysis using AlphaFold

講演番号：3D7a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 D7 会場

シガテラ中毒の治療のためのヒト化抗シガトキシン抗体の創製

Humanization and characterization of an anti-ciguatoxin CTX3C antibody

○山口 亜佐子、相野 弘明、円谷 健、平間 正博、藤井 郁雄（阪公大理）
○Asako YAMAGUCHI, Hiroaki AINO, Takeshi TSUMURAYA, Masahiro HIRAMA, Ikuo FUJII (Osaka Metropolitan Univ.)

シガテラは主に熱帯・亜熱帯海域で頻発する食中毒である。渦べん毛藻類が産生するシガトキシン（CTX）が原因毒素であり、食物連鎖を介して魚類に移行し、これらの魚を食べることにより消化器系・神経系の深刻な症状を引き起こす。回復には数ヶ月から数年もの期間が必要であるが、現在では有効な治療法がないため、新たな治療薬開発が望まれている。これまで、シガトキシンの一種 CTX3C の左側・右側それぞれを特異的に認識するマウス由来モノクローナル抗体 10C9・3D11 が作製され、これら２つの抗体の投与によりマウス体内で効果的に CTX 毒性を中和することが確認された。しかしマウス抗体はその免疫原性のため、治療薬としてヒトに利用することができない。

そこで本研究では、シガテラ治療薬開発を目指してマウス抗体 10C9・3D11 のヒト化を行なった。ヒト抗体 germline 配列をフレームワーク（FW）として、マウス抗体の相補性決定領域 CDR を移植した。次にヒト FW 中に残すマウス由来アミノ酸（backmutation）を同定し、抗原結合に関係する重要な残基を決定した。設計したヒト化抗体 10C9Fab および 3D11Fab はマウス抗体と同様の高い結合活性を維持していた。さらに免疫原性を低下させるために最適化ヒト化抗体の作製を検討した。

Ciguatera fish poisoning (CFP) is a human intoxication caused by ingesting tropical and sub-tropical fishes. The causative toxins Ciguatoxins (CTXs), produced by dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus*, are accumulated in fish through the food chain. Currently, no specific treatment for CFP has been devised. To directly detect CTXs from fishes, we have generated two mouse monoclonal antibodies 10C9 and 3D11, which bind to the left wing and the right wing of ciguatoxin CTX3C with high affinity, respectively. Interestingly, the 10C9/3D11 mixed antibodies exhibited a neutralizing activity against CTX *in vitro* and *in vivo*.

In this study, toward the development of therapeutic antibodies for CFP, the humanization of the mouse antibodies 10C9 and 3D11 were examined by using complementary determining region loop grafting to the framework regions of human germline sequences. The backmutation residues involved in binding affinity and specificity were identified. Designed humanized 10C9Fab and 3D11Fab maintained a high binding affinity, respectively. In addition, the humanized antibodies were optimized to minimize a number of the backmutations for reduced immunogenicity.

humanization, antibody, ciguatoxin

発表責任者：山口亜佐子（asako.yn@omu.ac.jp）

講演番号：3D7a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 D7 会場

スギヒラタケが引き起こす急性脳症に関与する毒性タンパク質の生化学的研究
Biochemical research on toxic proteins involved in acute encephalopathy caused by the mushroom *Pleurocybella porrigens*

○佐藤 匠[1]、中村 瑠奈[1]、茅谷 佳祐[1]、小野 晶子[1,2]、田中 裕基[1]、崔 宰熏[3,4,5]、道羅 英夫[3,5]、平井 浩文[3,4,5]、深沢 嘉紀[1]、河岸 洋和[3,5]、鈴木 智大[1,5] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]森林総合研究所、[3]静岡大・グリーン研、[4]静岡大・農、[5]静大・キノコ科研)
○Takumi SATO[1], Luna NAKAMURA[1], Keisuke KAYATANI[1], Akiko ONO[1,2], Yuki TANAKA[1], Jae-Hoon CHOI[3,4,5], Hideo DOHRA[3,5], Hirofumi HIRAI[3,4,5], Yoshinori FUKASAWA[1], Hirokazu KAWAGISHI[3,5], Tomohiro SUZUKI[1,5] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]FFPRI, [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Fac. of Agr., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. for Mushoom Sci., Shizuoka Univ.)

2004 年、東北・北陸地方を中心にスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）の摂取が原因と予想される急性脳症が相次いだ。これまでに本研究室ではマウスに毒性を示す糖タンパク質（pleurocybelline: PC）とスギヒラタケレクチン（PPL）を混合することでプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊すること、その後スギヒラタケ中に存在する低分子化合物（pleurocybellaziridine: PA）がマウス脳に流入し毒性を示す可能性を明らかにした[1)]。しかしながら PC は難溶性のためその一次アミノ酸配列が不明であったが、PC と類似した性質を示す候補タンパク質（PP-13k）を発見し、その構造が PPL の *C* 末端アミノ酸配列が 11 アミノ酸残基欠損したタンパク質であること、を明らかにした[2)]。そこで本研究ではプロテアーゼ活性発現メカニズム解明のため、PPL のアミノ酸欠損変異体（*C* 末端側 3, 6, 9, 11 アミノ酸欠損変異体）の大腸菌を用いた異種発現を試みた。pCold-GST vector に目的遺伝子を挿入後、大腸菌に形質転換し、GST 融合タンパク質として異種発現を行った結果、全ての組換えタンパク質の発現に成功した。得られた組換えタンパク質を用いて、PPL との混合状態でのプロテアーゼ活性を評価した。さらに、PPL および PP-13k の 3 次元構造を Alphafold2 を用いて予測し、アミノ酸欠損に伴う構造変化を解析した。

The mushroom *Pleurocybella porrigens* has been consumed as a foodstuff for a long time in Japan. In 2004, acute encephalopathy was found to be caused by eating this mushroom. Previously, our research group succeeded in the purification of a lethal glycoprotein to mice, named pleurocybellin (PC) and lectin (PPL) from this mushroom. PC and PPL formed a complex and the complex of the two components exhibited proteolytic activity. However, the amino acid sequence of PC remained unknown since the glycoprotein was only slightly soluble in any solvents and buffers employed. Recently, we revealed that a protein, designated PP-13k, lacking 11 amino acid residues in the *C*-termini of PPL exhibits protease activity when mixed with PPL. To elucidate the molecular mechanism of this protease activity, we tried to construct heterologous expression systems of recombinant proteins lacking the *C*-terminal amino acid residues of PPL. As a result, all recombinant proteins were successfully expressed and their protease activities when mixed with PPL were evaluated.

1) Suzuki, T., *et al.*, Toxicon, 221, 106958 (2023), 2)中村ら、日本農芸化学学会 2021 年度大会

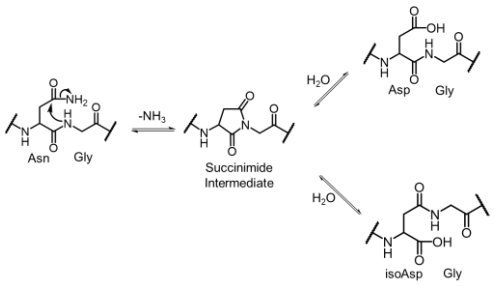
Pleurocybella porrigens, complex, protease activity

講演番号：3D7a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 D7 会場

脱アミド化したβ2-ミクログロブリンの全合成
Total Synthesis of Deamidated β2-Microglobulin

○川上 隆治、高尾 敏文、伊藤 駿、北條 裕信（阪大　蛋白研）
○Ryuji KAWAKAMI, Toshifumi TAKAO, Shun ITO, Hironobu HOJO (Osaka Univ. Institute of Protein Reserch)

β2-ミクログロブリン（β2m）は主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス I 分子を構成する、99 残基からなるタンパク質である。β2m はアミロイド線維を形成することが知られており、透析治療を長期間受けている患者では透析関連アミロイドーシス（DRA）を引き起こすことがある。DRA の患者の一部からは脱アミド化した β2m が見つかっている。



脱アミド化はタンパク質分子内で起こる反応であり、スクシンイミド中間体を経てアスパラギン（Asn）がアスパラギン酸（Asp）またはイソアスパラギン酸（isoAsp）に変換される。この反応は、一般にアスパラギン–グリシン（Asn-Gly）配列で起こりやすいことが知られている。β2m には Asn-Gly 配列が 2 カ所あり、それぞれで脱アミド化が進行することが先行研究にて明らかになっている[1]。しかし、脱アミド化した β2m と DRA との関連性は明らかになっていない。

そこで本研究では、脱アミド化した β2m を化学合成により全合成し、構造解析などを通して DRA との関連性を明らかにすることを目的としている。本大会では合成結果について報告する。

β2-microglobulin (β2m) is a component of the class I major histocompatibility complex (MHC-I) and consists of 99 amino acid residues. β2m is known to form amyloid fibrils that cause dialysis-related amyloidosis (DRA), which is a complication of long-term hemodialysis. The β2m fibrils extracted from DRA patients contained deamidated products.

Deamidation is an intramolecular reaction in which Asn residue is converted to Asp or isoaspartic acid (isoAsp) via a five-membered succinimide intermediate. In general, deamidation occurs most rapidly with Asn-Gly sites. β2m has two Asn-Gly sites, and previous studies have shown that deamidation occurs in each of these.[1] On the other hand, the relevance of deamidated β2m and DRA is unknown.

In this study, we aimed to prepare deamidated β2m by chemical synthesis and to clarify the relationship between deamidated β2m and amyloid fibril formation. The result of the synthesis will be presented in this symposium.

[1] M. Fukuda, T. Takao, *Anal. Chem.,* 2012, 84, 10388-10394.

isoaspartic acid, β2-microglobulin, selenocysteine

発表責任者：北條裕信（hojo@protein.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3D7a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 D7 会場

ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*）の子実体特異的タンパク質がもつ生体防御機能の解析
Analysis of host defense activity of a fruiting body-specific protein from the edible mushroom, *Agrocybe cylindracea*

○蔵谷 大和[1]、宮原 浩二[1]、松本 顕[2]、浴野 圭輔[1]、岩田 眞人[3]、太田 広人[1]、安藤 祥司[1]（[1]崇城大・生物生命、[2]順天堂大・医、[3]アイエムビー（株））
○Yamato KURATANI[1], Koji MIYAHARA[1], Akira MASTUMOTO[2], Keisuke EKINO[1], Makoto IWATA[3], Hiroto OHTA[1], Shoji ANDO[1] ([1]Fac. Biotech. Life Sci., Soji Univ.,, [2]Fac. Med., Juntendo Univ.,, [3]IMB Co., Ltd.)

Pri3 遺伝子は、食用キノコの一つであるヤナギマツタケ種群（*Agrocybe aegerita* complex）の子実体原基で特異的に発現することが報告されたが、コードするタンパク質（95 アミノ酸残基）の機能は不明であった。私たちはこれまでに福岡県産ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*）の *Pri3* 遺伝子をクローニングし、原基ではなく幼若な子実体の傘の表面近くで特異的に発現することを見いだした。また、*Pichia* 酵母を用いて調製した組換え PRI3 タンパク質が、糸状菌 *Aspergillus nidulans* とネギ黒斑病菌 *Alternaria porri* の菌糸の成長を阻害することを報告した。今回、細菌（*Escherichia coli*、*Micrococcus luteus*）、酵母（*Schizosaccharomyces japonicus*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*）、糸状菌（*Fusarium oxysporum*）、線虫（*Caenorhabditis elegans*）及びショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）の増殖・成長に及ぼす影響を評価したので報告する。その結果、組換え PRI3 は、細菌と酵母の増殖を阻害しなかったが、乾腐病菌 *F. oxysporum* の菌糸の成長を阻害した。また、*A. nidulans* の胞子形成も阻害した。さらに、線虫とショウジョウバエの卵からの発生を阻害した。これらの結果から、PRI3 は胞子形成期の子実体を外敵から守る生体防御タンパク質であることが示唆された。

Pri3 gene was reported to be specifically expressed in the primordia of *Agrocybe aegerita* complex. The *Pri3* gene codes a 95 amino acid-long protein, harboring a putative N-terminal signal peptide of 20 amino acid-long and a remaining C-terminal Cys-rich sequence of 75 amino acid-long containing 8 Cys residues at the conserved positions. However, biological function of the PRI3 protein has remained unknown. We have cloned a *Pri3* cDNA from *A. cylindracea*, and observed that the gene is specifically expressed at the surface of the cap of young fruiting bodies. We have prepared a recombinant PRI3 protein using a *Pichia* yeast expression system, and observed that the recombinant PRI3 protein has antifungal activities against *A. nidulans* and *A. porri*. In this study, we examined biological function of the recombinant protein against bacteria, yeasts, *C. elegans*, and *D. melanogaster*. The results obtained suggest that the PRI3 protein play a role in the defense of fruiting bodies against predatory and parasitic organisms.

edible mashroom, host defense protein, recombinant protein

講演番号：3D7a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 D7 会場

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素のキノン補酵素生合成に果たすヘム含有サブユニットの役割
Role of a heme-bound subunit on quinone cofactor generation of quinohemoprotein amine dehydrogenase

○中島 代詠[1]、大関 俊範[1]、中井 忠志[2]、谷澤 克行[1]、岡島 俊英[1]([1]阪大産研、[2]広島工大生命)
○Norie NAKAJIMA[1], Toshinori OOZEKI[1], Tadashi NAKAI[2], Katsuyuki TANIZAWA[1], Toshihide OKAJIMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Hiroshima Inst. Tech.)

キノヘムタンパク質アミンデヒドロゲナーゼ（QHNDH）は、ビルトイン型キノン補酵素 cysteine tryptophylquinone (CTQ)をもち、様々なグラム陰性菌のペリプラズムにおいて一級アミンの酸化的脱アミノ反応を触媒する。CTQ は Trp および Cys 残基から多段階の翻訳後修飾によって形成されるが、その詳細は未解明の部分が多い。本研究において、我々は QHNDH のヘム結合サブユニット QhpA が翻訳後修飾によって CTQ 生合成に果たす役割を解明するため、大腸菌を宿主として *Pseudomonas putida* 由来 QhpA の分泌発現系を構築した。しかし、オリジナルのシグナル配列では、ペリプラズムからヘム結合型 QhpA は得られなかった。そこで、10 種類のシグナル配列を QhpA 遺伝子に融合させ、シトクロム c 生合成遺伝子クラスターがクローニングされた pEC86 プラスミドを導入して調べたところ、PelB シグナルによって QhpA のペリプラズムへの分泌とヘム取り込みが著しく改善されることを見出した。QhpA を生成したところ、ペルオキシダーゼ活性をもつことがわかった。QhpA はこのペルオキシダーゼ活性によってオルトキノール型の CTQ 形成中間体がキノン型に酸化される CTQ 生合成の最終段階に関わると予測している。

Quinohemoprotein amine dehydrogenase (QHNDH) has a built-in quinone cofactor cysteine tryptophylquinone (CTQ) and catalyzes the oxidative deamination of primary amines in periplasm of various Gram-negative bacteria. While CTQ is generated from Trp and Cys residues through multi-step posttranslational modification, details of the reactions remain unsolved. To elucidate a role of a heme-bound subunit of QHNDH on the CTQ biogenesis, secretion expression system of QhpA from *Pseudomonas putida* was constructed with *Escherichia coli* as a host. However, with the original signal sequence, the heme-bound QhpA was not obtained from the periplasm. Therefore, to optimize the secretion, 10 different signal sequences are fused to the QhpA gene and pEC86 plasmid, cloning an *E. coli* gene cluster for cytochrome *c* maturation, is also introduced into the expression system. As a result, PelB signal resulted in significant improvement for secretion and heme incorporation of QhpA. In addition, we found that purified QhpA has peroxidase activity. We predict that QhpA is involved in the last step of the CTQ biogenesis, in which the *o*-quinole intermediate of the CTQ formation is oxidized to the quinone form.

quinone cofactor, heme peroxidase, posttranslational modification

講演番号：3D7p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D7 会場

アコヤガイ貝殻真珠層におけるキチン分解酵素の役割の解明
Elucidation of the Role of Chitinolytic Enzymes in the Nacreous Layer of *Pinctada fucata*
○朱 凌霄、鈴木 道生（東大院農）
○Lingxiao Zhu, Michio Suzuki (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The Univ. of Tokyo)

アコヤガイの貝殻の有機マトリックスは、貝殻形成において規則的な微細構造の制御において重要な役割を果たすと考えられている。先行研究では、貝殻の外側にある稜柱層の炭酸カルシウム結晶の内部にキチン分解酵素が局在し、キチンのナノファイバー化に関与することが示された。このキチン分解酵素は有機基質に含まれるキチン繊維の太さを調整し、炭酸カルシウムの石灰化に影響を与えている。真珠層においても有機マトリックスはキチンとタンパク質で構成され、有機マトリックスの骨格が扁平状の炭酸カルシウム結晶の形成を制御することが知られている。そこで、本研究では真珠層において、キチン分解酵素が石灰化に対し何らかの役割を持つのかどうか明らかにすることを目的とした。

まず、真珠層酸可溶性画分にキチン分解活性があることが判明した。そこで、ファミリー18 キチナーゼの阻害剤であるアロサミジンをアコヤガイ生体に注射したところ、真珠層の有機マトリックスの骨格の形成が阻害されている様子が観察された。組織特異的な発現解析を行ったところ一部のキチナーゼのみが真珠層を形成する外套膜組織において発現することを確認した。これらのキチナーゼ遺伝子のノックダウン実験を行ったところ、真珠層の扁平状炭酸カルシウムの形成に影響を与えることが判明した。

The organic matrices in shells play an important role in controlling the regular microstructure during shell formation. Previous research had shown that chitin-degrading enzymes are localized inside calcite crystals in the prismatic layer. These chitinolytic enzymes regulate the thickness of chitin fibers in organic network thus influencing the calcification of calcium carbonate. The organic matrices in nacre are also composed of chitin and proteins, and it is known that the organic matrix skeleton controls the formation of flat calcium carbonate crystals. Therefore, this study aims to clarify whether chitinolytic enzymes play any role in formation of nacreous layer.
First, the nacreous acid-soluble fraction had confirmed to have chitinolytic activity. Therefore, allosamidine, an inhibitor of family 18 chitinases, was injected into living pearl oysters, and the formation of the organic matrix of nacre was observed to be inhibited. Subsequently, tissue-specific expression analysis revealed that only some chitinases were expressed in the mantle tissue that forms the nacreous layer. When double-stranded RNA of these chitinase genes was injected into living organisms, it was found that it affected the formation of squamous calcium carbonate in the nacreous layer.

chitinase, nacreous layer, *Pinctada fucata*

講演番号：3D7p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D7 会場

貝殻タンパク質 BMSP の T リッチ領域と炭酸カルシウム結晶の関係についての研究

Study on the interaction between the T-rich region of shell protein BMSP and calcium carbonate crystals

○志田 晶[1]、二川 慶[2]、大嶋 啓介[2]、加藤 由悟[2]、鈴木 道生[2] ([1]東大農、[2]東大院農)
○Akira SHIDA[1], Kei FUTAGAWA[2], Keisuke OSHIMA[2], Yugo KATO[2], Michio SUZUKI[2] ([1]Faculty of Agriculture, Univ Tokyo, [2]The Univ. of Tokyo)

BMSP は多種の貝類に保存され、貝殻に含まれているタンパク質である。類似するタンパク質の性質から、BMSP は炭酸カルシウムの結晶形成に関与していると考えられている。アコヤガイ (*Pinctada fucata*) の BMSP はタンパク質間相互作用に関わる VWA ドメイン 4 つ (N 末端から VWA1-VWA4) を持ち、それらのドメイン間には Thr 残基が多く含まれる特徴的な T リッチ領域が存在している。この T リッチ領域が炭酸カルシウムと BMSP の相互作用において重要な役割を持つと仮説を立て、以下の実験を行った。T リッチ領域と CaCO3 結晶の相互作用を調査するため、VWA1-VWA2 間に存在する T リッチ領域(TTSTTTTPV) のペプチドを調製し、溶液中で炭酸カルシウム結晶と混合したのち、NMR 測定によりペプチドの立体構造を解析した。ペプチド単体の測定と比較して、炭酸カルシウム結晶存在下では Thr1 の αH^1、βH^1 の化学シフト値が低磁場側に移動し、周辺の電子密度が上昇していると考えられた。Thr1 が C 末端側に近づくように構造が変化したと推測し、10 通りの推定ペプチド立体構造に関して Thr1 と Val9 間の距離を測定したが、結晶の有無による有意な差はなく、構造の変化は確認できなかった。

BMSP is a protein that is conserved in many species of shellfish and is found in shells. Based on similar protein properties, BMSP is thought to be involved in calcium carbonate crystal formation. The BMSP of the pearl oyster (Pinctada fucata) has four VWA domains (VWA1-VWA4 from the N-terminal end) involved in protein-protein interactions, and a characteristic T-rich region containing many Thr residues exists between these domains. We hypothesized that this T-rich region plays an important role in the interaction between calcium carbonate and BMSP and performed the following experiments.

To investigate the interaction between the T-rich region and CaCO3 crystals, peptides of the T-rich region between VWA1 and VWA2 (TTSTTTTPV) were prepared and mixed with calcium carbonate crystals in solution, and the steric structure of the peptides was analyzed by NMR measurement. The chemical shifts of Thr1 αH1 and βH1 were shifted to the low-field side and the electron density around Thr1 increased in the presence of calcium carbonate crystal compared to the peptide alone. and Val9 were measured for 10 putative peptide conformations, but there was no significant difference between the crystallized and non-crystallized conformations, and no conformational change could be confirmed.

calcium carbonate, BMSP, biomineralization

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D7p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D7 会場

アコヤガイ貝殻真珠層から発見された新規バイオミネラルタンパク質の機能解析
Functional analysis of a novel biomineral protein discovered in the nacreous layer of Japanese pearl oyster.
○大嶋 啓介、鈴木 道生（東大院農）
○Keisuke OSHIMA, Michio SUZUKI (The Univ. of Tokyo)

アコヤガイ (*Pinctada fucata*) の貝殻真珠層は主に $CaCO_3$ 結晶と有機物からなるバイオミネラルである．真珠層形成にかかわるタンパク質の全貌は解明されておらず，未知のタンパク質が多く存在している．

真珠層タンパク質抽出液の中で 2 番目に存在量の多い新規タンパク質 NAP1 (nacreous abundant protein 1) は uncharacterized タンパク質であり，ノックダウン実験により真珠層形成不全が起こることから，真珠層形成に不可欠なタンパク質であると判断された．大腸菌で発現させた組換え体 NAP1（rNAP1）を用いた実験により，rNAP1 はホモ二量体タンパク質であり，炭酸カルシウム結晶に対する結合能力を持つことが示された．さらに rNAP1 はレチノイン酸類似化合物 CD3254 との結合能力をもち，貝殻形成中にレチノイン酸を含む疎水性低分子化合物と相互作用することが示唆された．さらに，Alphafold2 により作成した NAP1 の立体構造はタンパク質複合体の安定化に関わると予想される構造，および芳香族アミノ酸に富んだ構造を持っており，前者で二量体構造の形成を，後者で CD3254 との相互作用をしていると予想された．

The nacreous layer of Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*) is a biomineral that is mainly composed of $CaCO_3$ crystals and organic matrices. The roles of proteins involved in the nacreous layer formation have not been fully elucidated, and there still are many unknown proteins.

NAP1 (nacreous abundant protein 1), the second most abundant protein in the nacreous layer, is an uncharacterized protein. Knockdown of NAP1 gene resulted in abnormal structure of nacreous layer formation, indicating that NAP1 is essential for nacreous layer formation. Synthesis of recombinant NAP1 (rNAP1) showed that rNAP1 is a homodimeric protein and has the ability to bind to calcium carbonate crystals. Additionally, rNAP1 exhibits the capability to bind CD3254, a retinoic acid analog. This suggested that, during shell formation, NAP1 interacts with hydrophobic low-molecular-weight compounds including retinoic acid. The 3D-structure of NAP1 predicted by Alphafold2 indicates that NAP1 has two domains, one is a protein complex stabilizing domain, and the other is an aromatic amino acid abundant domain. The former is expected to facilitate dimer formation, and the latter is expected to interact with CD3254.

biomineralization, *Pinctada fucata*, nacre formation

講演番号：3D7p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D7 会場

アコヤガイ靭帯の酸性ペプチド LICP の溶液 NMR 法を用いた構造・機能解析
Structural and functional analysis of the acidic peptide LICP from the *Pinctada fucata* hinge ligament using solution NMR
○二川 慶[1]、森岡 太一[1]、池谷 鉄兵[2]、伊藤 隆[2]、片山 秀和[3]、永田 宏次[1]、鈴木 道生[1]([1]東大院農、[2]都立大院理、[3]東海大工)
○Kei Futagawa[1], Taichi Morioka[1], Teppei Ikeya[2], Yutaka Ito[2], Hidekazu Katayama[3], Koji Nagata[1], Michio Suzuki[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Metropolitan Univ., [3]Tokai Univ.)

アコヤガイ（*Pinctada fucata*）貝殻は、炭酸カルシウム（$CaCO_3$）を主成分とするバイオミネラルで、稜柱層はカルサイト、真珠層と蝶番部分の靭帯はアラゴナイトと異なる炭酸カルシウム多形で構成されている。貝殻内の有機物が $CaCO_3$ 結晶の微細構造を形成すると考えられている。アコヤガイ靭帯は直径約 50 nm の繊維状のアラゴナイトナノファイバーで形成され、先行研究にて 10 個のアミノ酸から構成される酸性ペプチドである LICP（Ligament Intra-Crystalline Peptide）が同定されている。本研究では、LICP の構造・機能解析を行うことで、アラゴナイトナノファイバー形成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。溶液中で分散し、回転可能なアラゴナイトナノ粒子を溶液 NMR (Nuclear Magnetic Resonance) により解析することで、アラゴナイト結晶表面での LICP の立体構造解析を行った。その結果、LICP は酸性残基側鎖のカルボキシ基が直線上に存在し、酸性残基側鎖のカルボキシ基と Tyr の芳香環が同一平面に並び、アラゴナイト表面に付着しやすい構造をとることが明らかとなった。試験管にて LICP 存在下でアラゴナイト結晶形成実験を行った結果、LICP は c 軸方向に伸長した長針状の結晶を形成することが明らかとなった。以上の結果より、LICP の酸性アミノ酸側鎖カルボキシ基とチロシン側鎖の芳香環の π 電子がアラゴナイト結晶のカルシウムイオンとカチオン-π 相互作用することでアラゴナイトナノファイバー形成に寄与している可能性が示唆された。

The shell of *Pinctada fucata* is a biomineral composed mainly of calcium carbonate ($CaCO_3$). It is composed of different crystal polymorphs, the outer prismatic calcite layer, the inner nacreous aragonite layer and hinge ligament aragonite nanofiber. The organic matters within the shell form the microstructure of the $CaCO_3$ crystals in the shell. In a previous study, Ligament Intra-Crystalline Peptide (LICP), an acidic peptide composed of 10 amino acids, was identified from the *P. fucata* hinge ligament. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of aragonite nanofiber formation of LICP. The 3D-structure of LICP with aragonite solution was determined using solution NMR. As a result, carboxy groups in the acidic residue side chain of LICP and aromatic rings of Tyr are regularly aligned and easily attached to the aragonite surface, suggesting that LICP may contribute to the formation of aragonite nanofiber.

aragonite nanofiber, Pinctada fucata, calcium carbonate

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D7p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D7 会場

LC/MS による日本人の母乳中のペプチドの網羅的分析

Peptidome analysis with label-free LC/MS in Japanese human milk

○津田 智弘[1]、野尻 恵資[2]、鈴木 菜那[1]、日暮 聡志[2]、上西 寛司[1]([1]雪印メグミルク株式会社、[2]雪印ビーンスターク株式会社)
○ Tomohiro TSUDA[1], Keisuke NOJIRI[2], Nana SUZUKI[1], Satoshi HIGURASHI[2], Hiroshi UENISHI[1] ([1]MEGMILK SNOW BRAND Co.,Ltd., [2]Bean Stalk Snow Co., Ltd.)

母乳は新生児にとって主要な食物であり、優れた栄養バランスと優れた生物学的特性を備えている。母乳中に存在するペプチドの多くは、アミノ酸源としての単なる栄養供給を超えた生理機能性を持つことが判明している。母乳ペプチドの活性には、抗菌作用や降圧作用、抗酸化作用、免疫調節作用、細胞増殖作用、オピオイド様活性、抗菌作用、プロバイオティクス作用などが報告されており、これらのペプチドは、乳中の酵素によるタンパク質分解によって生じるとされている。ヒト母乳中のペプチドについて海外での研究報告例はあるが、日本人の母乳に含まれるペプチドの生理機能や種類については明らかされていない。そこで、生後 1, 2 か月の児を持つ 200 名の日本人の母乳を対象として、母乳に含まれるペプチドの LC/MS を用いた網羅的な分析手法を確立し、母乳から抽出したペプチドを分析した。その結果、計 6000 種類以上のペプチドを同定し、乳児の発育や健康に寄与する可能性のある種々のペプチドが発見された。

Breast milk is the primary food source for newborns, providing excellent nutritional balance and superior biological properties. Many of the peptides present in breast milk have been found to have physiological functionality beyond mere nutritional supply as a source of amino acids. Some of the reported activities of milk peptides include antibacterial, antihypertensive, antioxidant, immunomodulatory, cell proliferative, opioid-like, antimicrobial, and probiotic activities, and these peptides are believed to result from proteolysis by enzymes in milk. Although there are examples of overseas research reports on peptides in human breast milk, there are no reports clarifying the physiological functions and types of peptides in Japanese breast milk. Therefore, we established an exhaustive analytical method using LC/MS for peptides in breast milk and analyzed peptides extracted from breast milk of 200 Japanese mothers with 1- or 2-month-old infants. As a result, a total of more than 6,000 peptides were identified, and various peptides that may contribute to infant development and health were found.

Human Milk, Peptide, Peptidome

発表責任者：津田智弘（tomohiro-tsuda@meg-snow.com）

講演番号：3D7p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 D7 会場

AAA+ ATPase 複合体による化学合成独立栄養性細菌の Rubisco 再活性化の構造基盤
Structural basis of chemoautotrophic Rubisco reactivation by AAA+ ATPase complex
○廖 増威[1]、ゴパラシンガム チャイ[2]、ゲーレ クリストフ[2]、重松 秀樹[3]、亀谷 将史[1,4]、新井 博之[1,4]、伏信 進矢[1,4] ([1]東大院農、[2]理研、[3]高輝度光科学研究セ、[4]東大・CRIIM)
○ Zengwei Liao[1], Chai Gopalasingam[2], Christoph Gerle[2], Hideki Shigematsu[3], Masafumi Kameya[1,4], Hiroyuki Arai[1,4], Shinya Fushinobu[1,4] ([1]Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]RIKEN SPring-8 Center, [3]JASRI, [4]CRIIM, Univ. Tokyo)

Rubisco は二酸化炭素の固定を触媒する酵素であり、地球上の炭素循環に不可欠な役割を担っている。しかし、Rubisco が触媒する反応はターンオーバーが低い上に、誤反応などによる阻害性生成物によって失活しやすいことが知られている。Rubisco の再活性化の仕組みの一つとして Rubisco 遺伝子近傍の配列にコードされる AAA+ ATPase である Rubisco activase (Rca)が知られている。これまでに、シアノバクテリアの Rubisco-Rca 複合体の立体構造が報告されているが、ATP 加水分解にともなう Rubisco 再活性化の詳細なメカニズムはいまだに不明である。一方で、一部の細菌における Rubisco 再活性化には、AAA+ ATPase（CbbQ）と複合体を形成するアクセサリータンパク質（CbbO）が不可欠である。本研究では、化学合成独立栄養性水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 由来の CbbQO 複合体の組換えタンパク質を精製して、それらが Rubisco を再活性化している最中の反応中間体構造を cryo-EM 単粒子解析で捕捉することに成功した。これらの構造から、化学合成細菌における Rubisco 活性化の詳細なメカニズムを議論する。

Rubisco participates in the fixation of atmospheric carbon dioxide and therefore plays a vital role in the maintenance of carbon homeostasis in the ecological system. However, Rubisco is an inefficient enzyme with low catalytic turnover and tends to be inhibited by misfire products. The reactivation of inhibited Rubisco is dependent on Rubisco activase (Rca), a AAA+ ATPase encoded adjacent to Rubisco genes. Although the structure of a cyanobacterial Rubisco-Rca complex has been reported, the detailed mechanism of ATP hydrolysis coupled with Rubisco activation remains unclear. On the other hand, an accessory protein (CbbO) that forms a complex with a AAA+ ATPase (CbbQ) is essential for Rubisco reactivation in some bacteria. In this research, we purified recombinant CbbQO complex derived from *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 and succeeded in capturing the structures of a series of intermediate states of the Rubisco-CbbQO reactivation complex using cryo-EM single particle analysis. From these structures, we discuss the detailed mechanism of Rubisco reactivation in the chemoautotrophic organism.

AAA+ ATPase, Rubisco, Carbon fixation

発表責任者：伏信 進矢（asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D7p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 D7 会場

大腸菌翻訳アレストペプチドの探索とリボソームディスプレー法への適用

Exploration of Escherichia coli Translational Arrest Peptides and Application to Ribosome Display

○牧野 祥嗣、金井 保（富山県大工）
○Yoshihide MAKINO, Tamotsu Kanai (Toyama Pref. Univ.)

リボソームによる新生ポリペプチド合成において、その速度が翻訳されつつあるアミノ酸配列に左右されることが知られている。特に、アレストペプチドと呼ばれる一群の配列は、新生鎖の合成を一旦停止させるという特性を示す。リボソームディスプレー法は、リボソーム・mRNA・新生ポリペプチドの三者の複合体を形成させ、リガンド結合能を持つ新生ポリペプチドのバリアントを探索するという技術であるが、この三者複合体を安定的に維持するために、上記アレストペプチドがよく利用されている。我々はこれまでに、リボソームディスプレー法を用いて各種リガンドへの結合分子の開発を行ってきたが、より安定的に複合体を維持できる配列の利用により、その開発効率が改良される可能性がある。そこで我々は、強いアレスト活性を持つペプチドの開発とその利用を検討した。ヒト SUMO2 タンパク質の N 末端に FLAG ペプチドタグ、C 末端にランダムな 12 アミノ酸配列を融合させた遺伝子を合成し、mRNA を合成した。その後、*in vitro* 翻訳系を用いてリボソーム・mRNA・新生ポリペプチド複合体を調製し、抗 FLAG タグ抗体固定磁性粒子で親和性選択を行った。このようなサイクルをまず 2 回繰り返したところ、プロリンを多く含むペプチド配列等を確認した。親和性サイクルをさらに繰り返した場合の濃縮配列、従前のリボソームディスプレー法との比較等について報告する。

The rate of translation by ribosomes relies on the sequence of amino acids. Specific sequences known as arrest peptides can pause nascent chain synthesis. The ribosome display technique involves forming a complex of ribosomes, mRNA, and nascent polypeptide to explore the ligand binding ability of displayed protein variants. Arrest peptides are used to stabilize this complex. We have been developing binding molecules to various ligands by ribosomal display. Improved complex stability is expected to enhance the method's efficiency, hiring peptides with intense arrest activity. Human SUMO2 gene with a FLAG peptide tag at the N-terminus and a 12 random amino acid sequence at the C-terminus were synthesized, followed by mRNA synthesis. Ribosome-mRNA-nascent polypeptide complexes were formed using an *in vitro* translation system. Proline-rich sequences and others were found after two cycles of affinity selection. The enriched sequences from additional cycles and comparison with previous ribosome display procedures will be shown.

ribosome display, translational arrest peptide, library screening

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3D7p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 D7 会場

アデノシン三リン酸によるアミロイドβの分子運動速度の上昇と線維化の抑制

Increased dynamics and prevention of the fibril formation of amyloid ß by adenosine triphosphate

○中村 桃佳[1]、倉持 晶弘[2]、髙橋 大翔[2]、小森谷 友絵[1]、吉宗 一晃[1] ([1]日大院生産工、[2]茨城大工)
○Momoka NAKAMURA[1], Masahiro KURAMOCHI[2], Hiroto TAKAHASHI[2], Tomoe KOMORIYA[1], Kazuaki YOSHIMUNE[1] ([1]Nihon Univ., [2]Ibaraki Univ.)

アルツハイマー病(AD)に関係するアミロイドβ(Aβ)は線維状もしくは非晶質凝集体として脳内に存在する。これらのAβ凝集体の形態はその細胞毒性に影響を与えることから、凝集形態の制御はADの予防や治療方法の開発につながる。アデノシン三リン酸(ATP)は疎水性分子を可溶化させるハイドロトープとして働くこと及び、AD 患者の脳組織の ATP 含量が健常者よりも低いことが報告され、ATP と AD の関連が注目されている。本研究では金ナノ粒子で標識した Aβの分子運動を 10 mM ATP、ADP もしくは AMP 存在下及び非存在下で回折 X 線ブリンキング法(DXB)により観察した。この結果、ATP は有意にAβの分子運動を上昇させることが示唆された。また、原子間力顕微鏡による観察およびチオフラビン T 蛍光測定から、ATP 存在下では線維状凝集体の形成が抑制され、比較的小さな直径 100 nm 未満の非晶質凝集体が形成されることが示された。ATP によりAβの分子運動が促進されることで線維状凝集体を形成する on-pathway 経路での凝集が抑制され、非晶質凝集体の形成が促進されたと考えられた。DXB はAβの凝集抑制物質の定量的な評価に有用な方法である。

Amyloid ß (Aß) aggregates are main component of the amyloid plaques that are major hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Aß aggregates into two distinct fibril and amorphous forms which occur in the brains of AD patients with distinct toxicities. The control of Aß aggregation to attenuate the toxicity can be one of the effective therapies for AD. Adenosine triphosphate (ATP) is a hydrotrope that solubilizes hydrophobic molecules and suppress the fibril formation of Aß. Furthermore, a decrease in ATP concentrations in the neocortex of AD patients as the progresses suggests a molecular link between ATP and Aß. Diffracted X-ray blinking (DXB) monitors the motions of single Aß molecules and reveals the Aß dynamics. DXB revealed that ATP significantly increases the dynamics of Aß, though ADP and AMP had a little effect. The Thioflavin T assay showed that ß-sheet content was gradually increased in the presence of ATP, though the content was rapidly increased after 180 min incubation. The images of atomic force microscope showed that ATP induces the formation of amorphous aggregates with an average diameter of less than 100 nm. ATP may induce the amorphous aggregation of Aß by increasing the dynamics and prevent the fibril forming. DXB is one of the best experimental methods for quantitative evaluation of the inhibitory effect on the fibrillation.

Alzheimer's disease, amyloid ß, Diffracted X-ray blinking

発表責任者：吉宗一晃（yoshimune.kazuaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D7p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 D7 会場

超好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* 由来アルコール脱水素酵素の機能と溶液中での立体構造変化の解析

Function and conformational change analysis of alcohol dehydrogenase in solution from hyperthermophilic Archaea *Sulfolobus acidocaldarius*

○岩村 陽子、郷田 秀一郎（創価大院理工）
○Yoko IWAMURA, Shuichiro GODA (Soka Univ.)

超好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* と *Sulfurisphaera tokodaii* は、それぞれ 10 種、12 種のアルコール脱水素酵素をもつと推定されている。その中の一つの *S. tokodaii* 由来アルコール脱水素酵素(StoADH)は、大腸菌を宿主に生産されると低い活性を示し、加熱により酵素分子中の二価金属イオンが置換し、酵素活性が上昇することが報告されている。そこで、本研究では StoADH にアミノ酸配列相同性を示す *S. acidocaldarius* 由来アルコール脱水素酵素(SacADH)の機能解析及び熱活性化における構造の変化の解明を目的とした。

大腸菌を宿主に生産した SacADH の酵素活性を測定したところ、50 ℃で 15 分加熱によって 14 % 活性が上昇し、12.5 mM Zn^{2+}イオン存在下で活性が 34%上昇した。このような特徴は、アミノ酸配列相同性を示す StoADH とは大きく異なっていた。X 線小角散乱にて構造解析を行った結果、分子のサイズである *Rg* 値が、StoADH では、加熱型が 33.2 Å、非加熱型が 35.0 Åであった。SacADH では、加熱型が 33.2 Å、非加熱型が 34.5 Åであった。どちらも非加熱型が分子の大きさが大きいことが確認でき、加熱によって分子のサイズが小さくなることが明らかとなった。

Sulfolobus acidocaldarius and *Sulfurisphaera tokodaii* have 10 and 12 alcohol dehydrogenase annotations, respectively. One of the alcohol dehydrogenases from *S. tokodaii* (StoADH), which shows only low activity when produced in an *E. coli* as a host, has been reported to increase in enzyme activity due to the substitution of divalent metal ions in the enzyme molecule upon heating. In this study, we aimed to analyze the function of SacADH, which shows amino acid sequence homology to StoADH, and to elucidate the structural changes upon heat activation.

The enzyme activity of SacADH produced in *E. coli* increased by 14 % upon heating at 50 °C for 15 min and 34% increase in activity in the presence of 12.5 mM Zn^{2+} ion. These features were found to be very different from those of StoADH. Structural analysis by small-angle X-ray scattering revealed that the Rg values of the heated and unheated forms of StoADH were 33.2 Å and 35.0 Å, respectively, while those of SacADH were 33.2 Å for the heated form and 34.5 Å for the unheated type. In both cases, it was confirmed that the size of the molecule was larger in the unheated form, and it was clear that heating reduced the size of the molecule.

alcohol dehydrogenase, Sulfolobus acidocaldarius, archaea

発表責任者：郷田秀一郎（goda@soka.ac.jp）

講演番号：3D7p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 D7 会場

tRNA 硫黄修飾塩基の生合成機構に見出した酸素感受性の反応とその環境適応進化

Oxygen-sensitive reactions found in the biosynthetic mechanism of tRNA sulfur-modified nucleosides

○鳴 直樹（産総研・早大 OIL）
○NAOKI SHIGI (AIST-Waseda OIL)

tRNA は遺伝子のコドンをタンパク質のアミノ酸に対応させるタンパク質合成の中心的分子である。tRNA の修飾塩基は tRNA の機能に不可欠であり、修飾異常はがん・糖尿病などの重篤な疾病の原因となる。ほぼ全生物の tRNA-Lys, Glu, Gln のアンチコドンにある硫黄修飾塩基 2-チオウリジン（s2U）は正確なコドン認識に必須である。真正細菌と真核生物ミトコンドリアでは、MnmA/Mtu1 酵素 family が tRNA に硫黄を導入し、古細菌と真核生物細胞質では NcsA/Ncs6 酵素 family が酸素感受性鉄硫黄クラスターをもちいて硫黄化する。また好熱性細菌では、後者 family の酵素 TtuA が tRNA54 位に硫黄を導入し、tRNA を耐熱化する。

これらの硫黄化酵素について、無酸素下での生化学・構造生物学、分子生物学による多面的なアプローチにより、硫黄基質の活性化と運搬機構、RNA への硫黄転移反応機構をあきらかにした。さらに、tRNA 硫黄修飾塩基の複雑な生合成機構の生物学的意義や、タンパク質が酸素耐性を獲得する進化の過程や酸化的環境下でも鉄硫黄クラスターを維持するしくみ・理由についても議論したい。

tRNAs are central molecules in protein synthesis that converts mRNA codons to protein amino acids. Modified nucleosides are essential for tRNA function, and their abnormalities can cause serious diseases such as cancer and diabetes. 2-thiouridine (s2U) in the tRNA-Lys, Glu, and Gln anticodons of almost all organisms is essential for accurate codon recognition. By taking a multifaceted approach based on anoxic biochemistry, structural biology, and molecular biology, we clarified the activation and transport mechanisms of the sulfur donor and the mechanism of sulfur transfer to RNA by these sulfurtransferase. We will also discuss the biological significance of the complex biosynthesis mechanism of the tRNA sulfur-modified base, the evolutionary process by which these proteins acquire oxygen tolerance.

tRNA, sulfurtransferase, iron-sulfur cluster

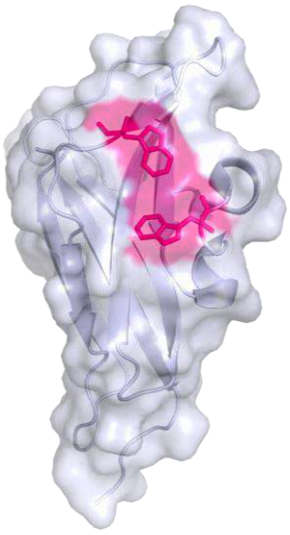
発表責任者：鳴　直樹（naoki-shigi@aist.go.jp）

講演番号：3D7p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 D7 会場

分子表面の芳香族アミノ酸クラスターがデンプン結合ドメインの構造安定性とフォールディングにおよぼす影響

Effects of the surface-exposed aromatic cluster of the starch-binding domain on structural stability and folding

○杉本 華幸、福富 瑚乃、赤澤 由布、長田 拓己、鈴木 一史（新潟大農）
○Hayuki SUGIMOTO, Kono FUKUDOMI, Yu AKAZAWA, Takumi OSADA, Kazushi SUZUKI (Niigata Univ.)



黒コウジカビグルコアミラーゼのデンプン結合ドメイン（SBD）は，芳香族アミノ酸クラスターが分子表面に存在するというユニークな構造を有する。このクラスターは 2 つのトリプトファン残基（W37，W84）を中心に形成され（左図のマゼンダ部分），デンプン結合に重要である。本研究では，この芳香族アミノ酸クラスターが SBD の構造安定性とフォールディングにおよぼす影響を明らかにすることを試みた。

野生型および 2 種の変異型，W37L と W84L の変性剤変性反応について平衡論的解析を行ったところ，変性はいずれも可逆であった。pH 7.0，25℃における変性のギブズエネルギー変化［$\Delta G^0_{(H_2O)}$］を比較すると，W84 に比べて W37 を置換した方が，不安定化効果が大きかった。アンフォールディング反応の速度論的解析を行ったところ，見かけの速度定数は，野生型，W84L，W37L の順に大きくなった。また，野生型と W84L では同程度のリフォールディング速度であったが，それより W37L のリフォールディングは速かった。これらの結果から，W37 の方が W84 よりも SBD の構造安定性やフォールディングにおよぼす影響が大きいことがわかった。これは，W84 よりも W37 の方が，周辺のアミノ酸残基と多くの相互作用を形成していることに起因すると考えられた。

The starch-binding domain (SBD) of *Aspergillus niger* glucoamylase has a surface-exposed aromatic cluster, which mainly consists of two tryptophan residues (W37 and W84). We attempted to examine effects of the aromatic cluster on the stability and folding reactions of SBD. Removal of W37 and W84 leaded to structural destabilization and to acceleration in the unfolding rates. The wild type and W84L had similar refolding rates, whereas that for W37L increased. The effects of the substitution at W37 were significantly larger than those at W84. This may result from the difference in number of interactions formed in the vicinity of each tryptophan residue.

surface-exposed aromatic cluster, stability, starch-binding domain

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3D7p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 D7 会場

クロガケジグモ（*Badumna insignis*）の毒液に含まれるペプチド成分の構造決定

Structural characterization of peptide components in the venom of spider *Badumna insignis*

○山本 怜[1]、Alhussin M.A. Megaly[2]、中川 好秋[1]、宮下 正弘[1] ([1]京大院農、[2]Al-Azhar Univ.)
○ REI YAMAMOTO[1], Alhussin M.A. Megaly[2], YOSHIAKI NAKAGAWA[1], MASAHIRO MIYASHITA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Al-Azhar Univ.)

【目的】クモ毒液の主な生理活性成分はペプチドである．世界には５万種を超えるクモが生息するが，その毒液成分に関する研究は殆ど進んでいない．日本にも多くのクモが生息するが，これらにも毒腺が存在することから，毒を持つと考えられている．しかしながら，そのほとんどにおいて毒成分の構造や生理活性は不明である．クロガケジグモ（*Badumna insignis*）はオーストラリア原産であるが，近年日本での分布が広がっている．しかし，このクモの毒成分の研究はほとんどおこなわれていない．そこで本研究では，次世代シーケンサーによる解析と質量分析によって得られる情報を組み合わせることで，このクモ毒に含まれるペプチド成分の構造決定をおこなった．

【方法・結果】京都大学構内で採集した *B. insignis* から毒腺を取り出し mRNA を抽出した．これを，次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析に供し，毒腺で発現するすべてのペプチド・タンパク質の配列を推定した．その結果，既知のクモ毒ペプチドと類似した配列が 83 種類見出された．次に，それぞれのペプチドの成熟構造を決定することを目的に，毒腺から抽出した粗毒を HPLC によって分画した後，酵素消化し，LC/MS/MS 分析をおこなった．得られた部分配列情報をもとに，少なくとも 9 種類の毒素ペプチドの成熟構造を決定することができた．これらのペプチドの生理活性については不明であるが，殺虫性を示すものが含まれている可能性がある．

The main bioactive components of spider venom are peptides. There are more than 50,000 species of spiders in the world, but little research has been conducted on the venom components. *Badumna insignis* is a spider originally inhabiting Australia, but its distribution in Japan has been expanding in recent years. However, no information is available on the venom peptides of this spider. In this study, we determined the structure of the peptide components of the venom by a combination of next-generation sequencing and mass spectrometry.

First, mRNA was extracted from the venom gland of *B. insignis* and sequences of all peptide and proteins expressed in the venom gland were deduced by RNA-seq analysis. As a result, we found 83 sequences similar to known spider venom peptides. Next, to determine the mature structure of each peptide, the crude venom extracted from the venom gland was fractionated by HPLC, enzymatically digested, and subjected to LC/MS/MS analysis. Based on the partial sequence information obtained, we were able to determine the mature structures of at least nine toxin peptides. Although their activity is unknown, it is possible that some of them have insecticidal properties.

Bioactive peptide, Transcriptome analysis, Mass spectrometry

講演番号：3D7p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 D7 会場

大腸菌で機能する *Physcomitrium patens* 由来ペルオキシダーゼ Prx34 のシグナルペプチド
The signal peptide of Prx34, *Physcomitrium patens* derived peroxidase, functioning in *Escherichia coli*

○松本 虎太郎[1]、伊藤 健司[2]、秋田 求[1] ([1]近畿大 生物工、[2]近畿大院 生物工学)
○Kotaro MATSUMOTO[1], Kenji ITO[2], Motomu AKITA[1] ([1]Dept. Biotech. Sci., Kindai Univ., [2]Major Biotech. Sci., Kindai Univ)

Prx34（XP_024372504）は、キトサン処理した際にヒメツリガネゴケ（*Physcomitrium patens*）から分泌されるペルオキシダーゼで、ヒメツリガネゴケのカビに対する抵抗性に重要な役割を果たしていることが報告されている（Lehtonen et al., 2009）。このタンパク質は N 末端に 32 アミノ酸からなる分泌シグナルをもつと予測されており、これがヒメツリガネゴケからの分泌に関与しているものと考えられている。このシグナル様配列を含む Prx34 の全長を大腸菌で発現させた場合に、培地中に顕著なペルオキシダーゼ活性が検出されたことから、この配列は大腸菌においても分泌シグナルとしてはたらく可能性が考えられる。N 末端に His タグを付けた場合、同様に培地中に活性は検出されるものの、His 精製による組換え Prx34 の回収ができなくなることから、Prx34 は菌体外に放出されるいずれかの段階で N 末端側から切断されていると考えられる。このシグナル様配列を 5 残基ごとに欠失させることによって、この放出に必須の領域を調べた。その結果、N 末端から 20 残基が培地への Prx34 の放出に必須であり、かつ、培地中での最大のペルオキシダーゼ活性には全長が必要であることがわかった。

Prx34(XP_024372504) is a peroxidase secreted by *Physcomitrium patens* when treated with chitosan. Prx34 plays an important role in resistance to fungi (Lehtonen et al., 2009). This protein has a predicted secretion signal sequence consisting of 32 amino acids on its N-terminus. Since significant peroxidase activity is detected in the medium of *Escherichia coli* expressing whole sequence of Prx34, we predict that the N-terminal sequence of Prx34 functions as the secretion signal in *E. coli*. When the N-terminus is His-tagged, peroxidase activity is still detected in the medium, but the recombinant Prx34 cannot be recovered using Ni or Co column, suggesting that Prx34 is cleaved from the N-terminal region during its release. By stepwise deletion assay, we tried to determine the core region of the predicted signal sequence. As a result, the N-terminal 20 amino acids were essential for the release of Prx34 to the medium, but the full length of the sequence was required for the maximum activity of Prx34 in the medium. We expect this sequence may be applicable to develop a secretion system for industrial production of recombinant protein using *E. coli*.

Signal peptide, Recombinant protein, Secretion

発表責任者：秋田求（akita@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3D7p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 D7 会場

酵母ツーハイブリッド法によるヒトフィラグリンと相互作用するヒトケラチン 10 のドメインの同定
Identification of domains of human keratin 10 interacting with human filaggrin by yeast two-hybrid assay

○河合 甚八、渡邊 哲也、佐藤 知樹、奥村 裕紀、氏田 稔（名城大院農）
○Jimpachi KAWAI, Tetsuya WATANABE, Tomoki SATO, Hiroki OKUMURA, Minoru Ujita (Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

ヒトの表皮はアレルゲンが体内に侵入することを防ぐバリア機能を有する。アトピー性皮膚炎のような皮膚疾患ではバリア機能の低下が確認され、その原因の 1 つとしてフィラグリン（FLG）遺伝子の変異が挙げられる。FLG は表皮細胞内のケラチンフィラメントを凝集し、ケラチンパターンを形成する。これが細胞に強度を与え、皮膚バリアを形成している。表皮で発現するケラチンフィラメントはケラチン 1（KRT1）とケラチン 10（KRT10）で構成されているが、FLG との相互作用の詳細な分子メカニズムは未解明である。そこで、本研究では酵母ツーハイブリッド法を用いて、ヒト FLG（hFLG）とヒト KRT1（hKRT1）あるいはヒト KRT10（hKRT10）の相互作用解析を行う。

hKRT1 あるいは hKRT10 の全長および head、rod、tail ドメインについて、酵母ツーハイブリッド法により hFLG との相互作用を解析した結果、hFLG と hKRT10 の rod ドメインが相互作用することが明らかとなった。したがって、ヒト皮膚のケラチンパターンの形成において、FLG と KRT10 の rod ドメインの相互作用が重要であることが示唆された。

Human skin functions as a physical barrier, preventing the entry of environmental allergens. Patients with atopic dermatitis exhibit decreased filaggrin (FLG) protein and perturbed epidermal barrier function. FLG associates with keratin filaments to aggregate into tight bundles in human skin. FLG colocalizes with keratin 1 (KRT1) and keratin 10 (KRT10) in human epidermis. KRT1 and KRT10 possess head domain, rod domain, and tail domain. However, the molecular basis of the FLG–KRT1/KRT10 interaction is not fully understood in humans. In this study, we report the interaction of human FLG with KRT10 using yeast two-hybrid (Y2H) assays.

Y2H assays showed that human FLG interacted with the rod domain of KRT10. Our results suggest that FLG may regulate the formation of a keratin network through interacting with the rod domain of KRT10 *in vivo* in human skin.

filaggrin, keratin, yeast two-hybrid assay

発表責任者：氏田　稔（ujita@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3E1a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E1 会場

麹菌および乳酸菌を用いた麦茶粕の発酵および風味の変化

Fermentation and flavor changes of barley tea lees using koji mold and lactic acid bacteria

○折居 千賀（（公財）東洋食品研究所）
○Chika ORII (TOYO INSTITUTE of FOOD TECHNOLOGY.)

麦茶粕は水分量が多く腐敗しやすいため、処分にコストがかかるという課題を持つ。そこで、本研究では麦茶粕の食品転用を目的とし、発酵法および発酵を用いた風味の向上について検討した。発酵菌は食品に利用される微生物から 4 種の麹菌と 2 種の乳酸菌を選択した。発酵は麦茶粕のみを原料とし、それぞれの菌に適した条件で 7 日間好気発酵を行った。発酵物抽出液について、味認識装置による風味解析および LCMS、キャピラリー電気泳動による成分分析を行った。いずれの菌も麦茶粕のみを原料とした生育が可能で、鰹節麹菌（*Aspergillus chevalieri*）のみ発酵中に臭気の発生が認められた。麹菌発酵物では酸味の増強と苦味雑味や旨味の減少傾向が見られ、乳酸菌発酵物では酸味の増強傾向が見られた。発酵生成物としてクエン酸や乳酸といった有機酸の生成がみられた。これらの有機酸は酸味の強化への寄与を示唆した。そのほか、麹菌発酵物では糖類の生成がみられ、これらの糖もまた発酵物の風味に影響を与える可能性が考えられた。これらの結果は発酵が麦茶粕の風味変化に有効であることを示し、麦茶粕の食品転用に繋がる可能性を示した。

Barley tea lees are costly to dispose of due to their high water content and tendency to spoil. In this study, we investigated different fermentation methods and flavor enhancement for the purpose of converting barley tea lees into food products. Four species of koji mold and two species of lactic acid bacteria were selected from different food fermenting microorganisms. Fermentation was performed for 7 days using only barley tea lees as the raw material under conditions suitable for each microorganism. The flavor of the ferment extract was evaluated by a taste sensor. Compound analysis was performed by LC/MS system and a capillary electrophoresis system. Our results suggested that all microorganisms were able to grow on barley tea lees. Only *Aspergillus chevalieri* produced an odor during fermentation. After fermentation using koji mold, the fermented product exhibited enhanced sourness and reduced bitterness and umami, while the fermented product in the lactic acid bacteria ferment exhibited enhanced sourness. The production of organic acids, such as citric and lactic acid, was observed in both fermentation products, suggesting that organic acids play a role in the enhancement of sourness. In addition, sugars were produced as a product of fermentation using koji mold, and may affect the flavor of the fermented products. Our results suggest that fermentation is effective in altering the flavor of barley tea lees and may be used successfully for the conversion of barley tea lees into food products.

Fermetation, Barley tea lees, Flavor enhancement

講演番号：3E1a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E1 会場

生酛における酒造年度ごとの乳酸菌叢の多様性

The lactic acid bacteria in *kimoto* seed mash are diverse every year

○竹内 赴登[1]、伊藤 一成[1]、三宅 祐治[2]、谷野 有佳[1]、渡邊 秀造[2]、渡邊 酵造[2]、三宅 剛史[1]([1]岡山県工技セ、[2]白菊酒造(株))
○Hayato TAKEUCHI[1], Kazunari ITO[1], Yuji MIYAKE[2], Yuka TANINO[1], Syuzo WATANABE[2], Kouzo WATANABE[2], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Ind. Technol. Center, Okayama Pref., [2]Shiragiku Shuzo Co., Ltd.)

【目的】清酒製造において生酛は、乳酸菌の乳酸生成により雑菌や野生酵母が淘汰され、清酒酵母の純粋培養を達成する。一般的な生酛では、硝酸還元菌に続いて *Leuconostoc mesenteroides*、その後 *Latilactobacillus sakei* が増殖すると報告されている。一方で、これらの乳酸菌種や遷移によらない生酛製造の報告もあり、酒造場ごとに一様ではないことも知られている。我々は、2023 年度大会において、生酛育成初期の乳酸菌叢が、同一の酒造場でも、酒造年度ごとに大きく異なっていたことを報告した。今回は、これら生酛の中期の乳酸菌叢を解析したので、その遷移について報告する。
【方法・結果】乳酸菌や酵母を添加しない同一の酒造場において、平成３０酒造年度から令和４酒造年度にかけて、湧付き以前の試料を採取し、$CaCO_3$ を含む抗黴培地に生育させ、クリアゾーンを形成した菌株について生酸菌として取得した。MALDI-TOF MS による同定を行い、各菌種の構成割合を算出した結果、主要菌叢が *Leuconostoc citreum* から *Leuconostoc suionicum* へ遷移した年や、*L. mesenteroides* から遷移しなかった年、主要菌叢への遷移がない年、*L. sakei* が主要菌叢となった年などが確認された。生酛育成初期だけでなく、生酛中期の乳酸菌叢やその遷移においても、酒造年度ごとに多様性が見られ、異なる味わいの生酛造りに寄与している可能性が示された。
【Objective】*Kimoto* seed mash, a traditional brewing method, contains sufficient lactic acid produced by lactic acid bacteria (LAB) to prevent microbial contamination. It has been reported that the LAB flora changes from *Leuconostoc mesenteroides* to *Latilactobacillus sakei*. However, *kimoto* seed mash in which LAB species does not change has also been reported. In the previous annual meeting of JSBBA, we showed that *kimoto* seed mash has different LAB flora during the early period in every brewing year, even if it was made in the one *sake* brewery. In this study, we report that the LAB flora during middle period and the transition of LAB species in each year.
【Method and Result】We analyzed *kimoto* seed mash made without the addition of LAB and yeast from 2019 to 2023 in the one *sake* brewery. We isolated LAB from *kimoto* seed mash until *waki-tsuki* (commencement phase of *sake* type yeast fermentation) and identified the species using MALDI-TOF MS. Various transitions of dominant LAB species were confirmed every year: changing from *Leuconostoc citreum* to *Leuconostoc suionisum*, not changing from *L. mesenteroides*, no dominant species, and almost only *L. sakei*. It was indicated that *kimoto* seed mash has various LAB flora and diversity of transition in the one *sake* brewery. This diversity may contribute to making *sake* more tasteful.

Kimoto seed mash, lactic acid bacteria, *Sake* brewing

発表責任者：竹内赴登（hayato_takeuchi@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：3E1a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E1 会場

奈良県ゆかりの植物からの清酒用酵母の分離とその特性

Isolation of sake yeast strains from plants related to Nara and analysis of their fermentation profiles

○都築 正男、栗原 智也、立本 行江（奈良県産振セ）
○Masao TSUDUKI, TOMOYA KUWAHARA, YUKIE TATSUMOTO (Nara Pref. Inst. Indust. Dev.)

近年，日本酒の嗜好は多様化しており，吟醸酒や甘口で濃淳な日本酒など，個性的で特徴のある日本酒も好まれるようになっており，清酒酵母についても特徴のある菌株が求められている。我々は，これまでに奈良八重桜酵母，山乃かみ酵母，オルニチン酵母などのオリジナル酵母を分離している。個性的で特徴のある日本酒を目指して，世界遺産である法隆寺境内の植物および，奈良県南部で主に栽培が盛んな薬用植物のひとつであるシャクヤクから酵母を分離し，これらの酵母の醸造特性等を調査した。酵母の分離はアルコールを添加した麹汁培地で行い，アルコール発酵能がある *Saccahromyces cerevisiae* の独自菌株を，それぞれ分離した。試験醸造を行い，醸造特性を調査し，個性的な日本酒製造に有望な菌株をそれぞれ 1 菌株獲得した。分離した酵母はいずれも，パントテン酸要求性はなく，キラー性も認められなかった。法隆寺境内からはアヤメから分離した酵母を選抜し，試験醸造では約 15%のアルコール，日本酒度が−23，酸度が 5.7 で，乳酸を多く含有する日本酒が生成した。またシャクヤク由来の酵母は，試験醸造では約 12%のアルコール，日本酒度が−58，酸度が 5.9 で，クエン酸とコハク酸を多く含有する日本酒が生成した。

Sake tastes have diversified in recent years, Sake with unique taste such as ginjo sake and sweet and rich sake are now also preferred, and unique strains is demanded about the sake yeast. We have already isolated original yeasts such as “Naranoyaezakura” strain “Yamanokami “strain, and ornithine-rich strain. In order to brew sake with unique taste, we isolated yeasts from plants in the precincts of Horyu-ji Temple, a World Heritage site, and from peony, a medicinal plant that is widely cultivated in southern Nara Prefecture, and investigated the brewing characteristics of these yeasts. Yeasts were isolated on koji extract medium supplemented with alcohol, and unique strains of *Saccharomyces cerevisiae* capable of alcoholic fermentation were isolated. We conducted test brewing, investigated the brewing characteristics, and obtained one strain of each plants that was promising for brewing unique sake. None of the isolated yeasts were pantothenic acid demanding and killer property. Yeast isolated from iris was selected from the precincts of Horyu-ji Temple, and the test brew produced a sake with about 15% alcohol, a nihonshudo of -23 and an acidity of 5.7, and a high lactic acid content. Yeast isolated from peony produced sake with about 12% alcohol, a nihonshudo of -58, and an acidity of 5.9, with high levels of citric and succinic acid in the test brew.

Saccharomyces cerevisiae, fermentation profile, sake yeast

発表責任者：都築　正男（tsuduki-masao@office.pref.nara.lg.jp）

講演番号：3E1a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 E1 会場

奈良漬の伝統的製法に固有の微生物叢を形成する乳酸菌

Lactic acid bacteria form a unique microbita in traditional narazuke making

○吉岡 求[1]、増田 幸彦[2]、渡辺 大輔[1] ([1]奈良先端大バイオ、[2]奈良屋本店)
○Motomu YOSHIOKA[1], Yukihiko MASUDA[2], Daisuke WATANABE[1] ([1]NAIST, [2]Naraya Honten)

奈良漬とは、塩漬野菜を熟成酒粕に複数回漬け替える製法により作られる伝統的な発酵食品である。微生物にとっては高塩分環境から高アルコール環境へと推移する過酷な環境変化のため、固有の生態系の存在が推測される。本研究では、奈良漬の製造工程における微生物叢の解明を目的とした。

原材料である熟成酒粕と塩漬野菜、漬替中の仕掛品および完成品の奈良漬を用いて、ITS1 領域と 16S rDNA V4 領域のアンプリコン解析に加え、微生物の単離を実施した。真菌に関しては、原材料と仕掛品に共通して *Zygosaccharomyces* 属および *Starmerella* 属酵母が認められた。細菌に関しては、塩漬野菜では耐塩性細菌が優占していたのに対し、仕掛品と完成品ではアルコール耐性の高い乳酸菌である *Fructilactobacillus fructivorans* が微生物叢のほとんどを占めた。塩分濃度の低下とアルコール度数の上昇に伴い *F. fructivorans* が適応しやすい環境が生じたと推察される。これに対し、非標準的製法で作られた奈良漬では *F. fructivorans* の頻度が低く、乳酸菌以外の多様な細菌由来の DNA が検出された。以上の結果から、奈良漬の伝統的製法は *F. fructivorans* のような乳酸菌による発酵を健全に進行させるために必須なプロセスである可能性が示された。

Narazuke is traditional fermented food made by repeatedly soaking salted vegetables in aged sake lees. Shifts from the high-salt to high-alcohol environments may contribute to formation of a unique microbial ecosystem. We aimed to elucidate the microbiota during narazuke making.

Amplicon analysis of the ITS1/16S rDNA V4 regions and isolation of microorganisms were conducted using ingredients and in-process or finished products. In the analysis of fungi, yeasts of the genera *Zygosaccaromyces* and *Starmerella* were commonly found in ingredients and in-process products. In the analysis of bacteria, while salted vegetables contained several species of salt-tolerant bacteria, in-process and finished products were dominated by *Fructilactobacillus fructivorans*, lactic acid bacteria with high alcohol tolerance. The decrease in salinity and the increase in alcohol content may generate an environment suitable for the growth of *F. fructivorans*. Narazuke made with an unorthodox method exhibited the low frequency of *F. fructivorans*; DNA from a wide variety of non-lactobacilli bacteria was detected instead. These results suggest that the traditional method of narazuke making may be an essential process for robust progression of fermentation by lactic acid bacteria such as *F. fructivorans*.

narazuke, lactic acid bacteria, microbiota

発表責任者：渡辺　大輔（watanabe.daisuke@bs.naist.jp）

講演番号：3E1a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E1 会場

ラム酒の発酵醪およびダンダー中の微生物群集構造の解析

Analysis of microbial community structure in rum mash and dunder

○黒木 葉菜[1]、堀越 美晴[1]、青木 大成[2]、天知 誠吾[3] ([1]千葉大園芸、[2]ペナシュール房総株式会社、[3]千葉大・院園芸)
○Hana KUROGI[1], Miharu HORIKOSHI[1], Taisei AOKI[2], Seigo AMACHI[3] ([1]Fac. of Hort., Univ. Chiba, [2]Rhum de la Peninsule de BOSO, [3]Grad. Sch. of Hort., Univ. Chiba)

ラム酒はサトウキビの絞り汁または廃糖蜜を発酵させて醸造する蒸留酒である。上質なラム酒製造の１つの手段として、ダンダーと呼ばれる蒸留廃液熟成物を醪に添加する場合がある。ダンダー内には種々の野生酵母や細菌が生息しているが、醪への明確な効果はわかっていない。そこで本研究では、ラム発酵醪およびダンダー中の微生物菌叢を解析し、安定的なラム酒製造を可能とする微生物群集構造や上質なラム酒製造の鍵となる微生物の探索を目的とした。

千葉県の房総大井倉蒸留所から廃糖蜜を原料とした醪およびダンダーをサンプリングし、ITS 及び 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行った。醪においては、酵母は *Saccharomyces cerevisiae* が 92％を占めていた。一方、ダンダーではその存在がほとんど確認できず、代わりに *Pichia membranifaciens* や *Kazachstania humilis* などの酵母が存在した。細菌群集構造においても醪とダンダーで異なる傾向が観察された。醪では *Lentilactobacillus buchneri* や *Lacticaseibacillus casei* などの乳酸桿菌が優占していた一方、ダンダーでは醪よりも多様な乳酸菌に加えて *Acetobacter* や *Gluconobacter* などの酢酸菌が優占していた。これらの菌叢の違いがエステル臭の強い上質なラム酒製造に影響を与える可能性が示唆された。

Rum is a distilled spirit made from sugarcane or molasses. In rum fermentation, dunder or stillage (nonalcoholic residues from the previous distillation) is sometimes added to the mash to achieve an authentic high-ester rum flavor. Dunder contains various wild yeasts and bacteria but their effects on the rum fermentation are not fully understood. To identify microbial community structures for stable rum fermentation and key microorganisms for its quality, we performed amplicon-based microbial community analysis in rum mash and dunder collected from a Japanese rum distillery located on Boso, Chiba. *Saccharomyces cerevisiae* was predominant in the mash, while other yeasts such as *Pichia membranifaciens* and *Kazachstania humilis* were present in the dunder. *Lentilactobacillus buchneri* and *Lacticaseibacillus casei* were predominant in the mash, while dunder exhibited a more diverse lactic acid bacteria as well as acetic acid bacteria such as *Acetobacter* and *Gluconobacter*. The differences in these microbial communities suggest a potential impact on the production of high-ester rum.

rum, dunder, microbial community

発表責任者：黒木葉菜（chibacada2720@gmail.com）

講演番号：3E1a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E1 会場

複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御：pH 制御による メタ連続発酵における 細菌叢と有機酸生産の動的変化の追跡

Control of bioprocess with Complex Microbial Engineering: Monitoring dynamic changes in bacterial community structure and organic acid production in continuous meta-fermentation by pH control

○古閑 友紀[1]、梶本 寛太[1]、宮本 浩邦[2,3,4]、酒井 謙二[1]、大城 麦人[1]、濱田 浩幸[1]、田代 幸寛[1]([1]九大院生資環、[2]千葉大園芸、[3]理研生命医科学、[4]サーマス)
○Tomonori KOGA[1], Kanta KAJIMOTO[1], Hirokuni MIYAMOTO[2,3,4], Kenji SAKAI[1], Mugihito OSHIRO[1], Hiroyuki HAMADA[1], Yukihiro TASHIRO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Chiba Univ., [3]Riken, [4]Thermas)

複合微生物プロセスを工業，農業，環境，医薬等への応用を目指す学問である『複合微生物工学』の創成を目指している[1]。特に、複合微生物を用いた有価物生産プロセスをメタ発酵と定義提唱しており[2]、これは複数の基質利用や雑菌汚染への耐性、滅菌不要などのメリットが存在する。一方、生産物のヘテロ化や制御理論と技術の未構築が課題である。連続発酵は高生産性・操作安定性に優れているが、細菌叢を含む統合的な知見は乏しい。本研究では、重要な因子であるにも関わらず報告が少ない pH に着目し、細菌叢と有機酸生産に与える影響を経時的に解明することを目的とした。複合種菌として堆肥を用い、pH を 5.5-7.5 まで 0.5 間隔と非制御に調整し、メタ発酵を行った。pH 7.5 では酪酸が 29.8 g/L 生産され、最優占種 *Xylanivirga thermophila* に加えて多種の細菌が増殖した。pH 7.0,6.5 では、*Caldibacillus hisashii* が優占種となり(41.8%,80.0%)、乳酸が主に生産された。特に、pH 6.5 では 64 h で 51.8 g/L の乳酸が生産されたが、164 h で 14.2 g/L まで減少した。pH 6.0 以下では *Weizmannia coagulans* が 44 h 以降優占種となり(>99%)、pH6.0 で乳酸濃度が 50.5 g/L まで達し、濃度を維持したまま乳酸選択性 99.4%、2.57 g/L/h の高い乳酸生産性を達成した。一方で。pH5.5、非制御では乳酸が低濃度で生産され、生育阻害が示唆された。以上の結果、pH の調整による優占菌種と種生産物の制御技術の可能性が示唆された。

The aim of our research is to develop "Complex microbial engineering", that applies complex microbial processes to engineering, agricultural, environmental, and pharmaceutical applications[1]. We have proposed the meta-fermentation defined as the production of valuable materials using mixed culture[2]. The main challenges are production of multiple products and the lack of control theory. This study was to investigate the effect of pH on the dynamics of bacterial community structure and organic acid production. Compost was used as a bacterial seed, and pH was adjusted to several values (5.5–7.5). At pH 7.5, 29.8 g/L butyric acid was produced with abundant *X. thermophila* and the numerously other species. At pH 7.0 and 6.5, *C. hisashii* was the predominant species (47.6%, 80.0%) with mainly lactic acid production. At pH 6.5, 51.8 g/L of lactic acid was produced at 64 h, while the concentration decreased to 14.2 g/L at 164 h. At pH 6.0 or less, *W. coagulans* became the predominant species (>99%) with high production of 50.5 g/L lactic acid concentration for long period. Consequently, this study suggested the feasibility of controlled process by an efficient pH adjustment strategy.
([1] 田代幸寛、酒井謙二,生物工学,99,627-630, 2021; [2] Koga et al., JBB, 136, p391-399, 2023)

continuous culture, mixed culture, bacterial community structure

発表責任者：田代幸寛（tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3E1a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E1 会場

鰹節カビに内在するマイコウイルスが宿主に与える影響

Effects of mycoviruses on katsuobushi mold

○武馬 聖二[1,2]、浦山 俊一[3,4]、周防 玲[1]、糸井 史郎[1]、岡田 茂[5]、二宮 章洋[5]([1]日大生物資源、[2]東大農、[3]筑波大生命環境、[4]筑波大 MiCS、[5]東大院農)
○Seiji BUMA[1,2], Syun-ichi URAYAMA[3,4], Rei SUO[1], Shiro ITOI[1], Shigeru OKADA[5], Akihiro NINOMIYA[5] ([1]College of Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Fac. of Agric., The Univ. of Tokyo, [3]Fac. of Life & Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [4]MiCS, Univ. of Tsukuba, [5]Grad. Sch. of Agric. & Life Sci., The Univ. of Tokyo)

鰹節のうち，カツオの切り身を煮熟後燻して乾燥させたものを荒節，荒節にカビをつけ発酵させたものを枯節や本枯節と呼ぶ。鰹節発酵に関わるカビは鰹節カビと呼ばれ，枯節特有の風味形成に関わると考えられている。枯節表面において優占する真菌は *Aspergillus* 属真菌である(1)。

マイコウイルスは真菌に内在するウイルスであり，宿主に様々な生理的影響を与える。過去に様々な *Aspergillus* 属真菌からマイコウイルスが報告されていることから，我々は，鰹節カビにもある程度の割合でマイコウイルスが内在しており，発酵に影響を与えるとの仮説を立てた。そこで，本研究では，鰹節カビに内在するマイコウイルスが宿主に与える影響を明らかにすることを目的とした。

まず，枯節から分離された *Aspergillus* 属真菌 5 種 9 株からウイルスを探索した結果，発酵における優占種である *Aspergillus chevalieri* から 6 種，*Aspergillus sulphureus* から 1 種の新規ウイルスを発見した。次に，ウイルスが宿主に与える影響を調べた。抗ウイルス薬を用いてウイルスの除去を試みたところ，一部のウイルスについては非感染株が得られた。感染株と非感染株の表現型を比較した結果，ポリマイコウイルスが培養初期の生育を抑制することが明らかになった。この結果は，マイコウイルスが鰹節発酵に何らかの影響を与えることを示唆するものである。

Filamentous fungi called “katsuobushi mold” are involved in production of fermented dried bonito (katsuobushi). It was reported that *Aspergillus* spp. are dominant on the surface of katsuobushi during the molding process (1).

Mycoviruses are viruses that infect fungi, and cause their hosts to undergo a characteristic change of phenotype. Because various mycoviruses have been found in *Aspergillus* spp., we hypothesized that katsuobushi mold is also infected with mycoviruses, and that the mycoviruses have some influence on katsuobushi fermentation. The purpose of this study is to reveal the influence of mycoviruses on katsuobushi mold.

In this study, we have identified seven new mycoviruses from two *Aspergillus* spp. Several mycoviruses were eliminated from their hosts using an antiviral drug. Comparison of the phenotypes of the isogenic strains with and without the mycovirus suggested that the polymycovirus inhibited the initial growth of *A. chevalieri*.

(1) Kadooka, C. et al. (2020) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **66**, 239-243.

katsuobushi, filamentous fungi, mycovirus

講演番号：3E1a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E1 会場

野生国酒酵母による醸造法
Method of brewing alcoholic beverages using wild Japanese *kokushu* yeast
薄井 周太、村上 義揮、雑賀 俊多、渡 彦大、森谷 千星、渡邉 康太、中山 俊一、○門倉 利守（東京農大 醸造）
Shuta Usui, Yoshiki Murakami, Shunta Saika, Genta Watari, Chise Moriya, Kouta Watanabe, Shunichi Nakayama, ○Toshimori Kadokura (Tokyo Univ. of Agri. Dept. of Fermentation Science)

かつての醸造界では野生酵母による醸造や野生酵母の混合仕込みなどは、揶揄される対象であったが、このところ野生酵母解禁かのように、野生酵母による各種酒類の醸造が活発に行われるようになってきている。演者らは 20 年以上前より野生清酒酵母を用いた清酒醸造を行い、現在でも商品として販売しているが、安全な醸造は酒蔵にとっては重要であり、腐造を起こせば酒蔵は傾きかねない。

自然界からの酵母の分離方法は様々ではあるが、演者らの研究室では麹を用いた集積培養を基本として純粋分離を行い、The YEASTS による同定と研究室独自の国酒酵母の判別法による同定を併用し、The YEASTS の key to species では *cerevisiae* に同定されない野生国酒酵母を選別している。各酒類の仕込に際しては、酒蔵の汚染を防ぐためにキラー性の有無の確認は必須としている。また、常法となっている仕込温度は現在使われている優良酵母の適温であり、明治期の清酒造りでは最高品温が 20℃を超えることもあったため、各野生国酒酵母の適正な仕込温度も検討している。さらに、実地仕込時に発酵が停止してしまうような緊急の場合には損害が大きいため、安全を考慮して優良酵母との混合仕込を躊躇なく行うべきと考えている。本講演ではこれまで行ってきたこれら野生国酒酵母の醸造法について改めて報告し、今後の商品開発についても紹介する。

Recently, the brewing of various alcoholic beverages using wild yeast has become popular, as if the ban on brewing with wild yeast has been lifted. We have been brewing sake using wild sake yeast for over 20 years and are still selling it as the sake. Safe brewing is important for the sake breweries. We will present a method of brewing alcoholic beverages using wild Japanese *kokushu* yeast and future development of alcoholic beverages.

There are various methods for isolating yeast from nature, we isolated wild yeast after enrichment culture using koji. Wild Japanese *kokushu* yeast was identified using “The Yeasts” and original identification method. When brewing alcoholic beverages, we checked for the presence of yeast killer factors to prevent contamination of sake breweries, and we are searching for the appropriate temperature for brewing using wild Japanese *kokushu* yeast. Furthermore, in case of an emergency, we consider mixing brewing by *kyokai* yeast to safety.

Japanese *kokushu* yeast, sake yeast, sake brewing

発表責任者：門倉利守（kadokura@nodai.ac.jp）

講演番号：3E1a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 E1 会場

レーズンと水からワインができる仕組み

A process of wine making from raisin water

○日尾 守[1]、村田 憲亮[1]、髙瀬 隆一[1]、渡辺 大輔[2]、小倉 康平[1]、橋本 渉[1]([1]京大院・農、[2]奈良先端大・バイオ)
○Mamoru Hio[1], Kensuke Murata[1], Ryuichi Takase[1], Daisuke Watanabe[2], Kohei Ogura[1], Wataru Hashimoto[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Div. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Technol.)

【背景と目的】ワイン発酵を担う主要な酵母は *Saccharomyces cerevisiae* である。しかし、本酵母はブドウ果皮にほとんど存在せず、自然発酵における起源には不明な点が多い。これまでに、水に浸漬した市販レーズンが内在酵母によりワイン様酒類となることを示した。本研究では、ブドウとレーズンの真菌叢の相違に着目し、レーズンの自然発酵がワインの原型の一つとなる可能性を検証した。
【方法と結果】ブドウ 6 品種とレーズン 6 製品の真菌叢を ITS 領域シーケンスから比較したところ、レーズンには *Saccharomyces* や *Zygosaccharomyces* を含む Saccharomycetaceae 科酵母が高い存在比率で含まれていた。また、レーズン単離酵母群（11 種）は、ブドウ単離酵母群（24 種）と比較してアルコール発酵能が高いことが明らかになった。次に、ブドウを天日干しした自作レーズンを滅菌水に浸漬したところ、エタノール濃度が 4%（v/v）程度まで上昇し、発酵後サンプルから Saccharomycetaceae 科酵母である *Lachancea fermentati* が単離された。さらに、ブドウに *S. cerevisiae* を接種して無菌環境で乾燥させたところ、乾燥過程で *S. cerevisiae* の存在比が増加した。以上より、ブドウを天日干しする過程で *S. cerevisiae* を含むアルコール発酵能の高い酵母が外部から定着し、そこに水を加えることでワインの原型となる可能性が示された。なお、本研究は果実酒製造免許を取得して行った。

[Background and objectives] Although wine is fermented from grape mainly by *Saccharomyces cerevisiae*, this yeast is rare on raw grape skins. The origin in spontaneous fermentation of wine is unclear. Previously, we showed that water containing commercially available raisins (dried grapes) turned into wine-like liquors by raisin-colonized yeasts. This study focused on difference of fungal community between raw grapes and raisins and examined the possibility of fermented raisin water as a wine prototype.
[Methods and results] ITS amplicon sequencing showed that Saccharomycetaceae yeasts, including *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* were colonized at higher abundance ratio in raisin group (six products) than raw grape group (six breeds). Raisin-isolated yeast group (11 species) possessed higher alcohol fermentation capability than grape-isolated yeast group (24 species). Immersing handmade sun-dried raisins into water led to ethanol fermentation up to about 4% (v/v), with Saccharomycetaceae yeast *Lachancea fermentati* isolated. When raw grapes were inoculated with *S. cerevisiae,* abundance ratio of the yeast increased during drying process. The results suggested the external colonization of yeasts with high alcohol fermentation capability including *S. cerevisiae* during the sun-drying and indicated the possibility of the spontaneous fermentation of prototype wines.

Wine, Fungal microbiome, Spontaneous fermentation

発表責任者：橋本 渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E1a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E1 会場

イソブタノール生産を評価する酵母バイオアッセイ系の確立と生産量向上に向けた代謝酵素改変への応用

Establishment of yeast-based bioassay system evaluating isobutanol production and its application to engineering of metabolic enzymes toward improvement of isobutanol production

○佐藤 源気[1]、黒田 浩一[2] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京都工繊大・分子化学)
○Genki Sato[1], Kouichi Kuroda[2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Institute of Technology)

優れたバイオ燃料となる分岐鎖高級アルコール（BCHAs）を高生産する酵母の開発において、生産量を簡便に評価するためのバイオアッセイ系が求められている。しかし、酵母における現行のバイオアッセイ系は生産経路中間体の検出に限られ、経路下流の改変には適用困難である。そこで我々はBCHAs による酵母の生育阻害を用い、最終産物を検出するバイオアッセイ系を考案してきた。

我々のイソブタノール（IbOH）超感受性酵母の知見[1]に基づき、0.2%以下の IbOH に感受性を示す酵母をセンサー株として構築した。IbOH 生産酵母株群の発酵上清を用いてセンサー株を生育させたところ、生育阻害に最も寄与する因子として IbOH を同定した。次に、IbOH 生産経路下流の α-ケト酸デカルボキシラーゼ（α-KDC）の発現強度を変化させ、IbOH 生産量が α-KDC 発現強度と相関する生産株を構築した。それらの上清に対してセンサー株を用いたバイオアッセイを行ったところ、センサー株の生育阻害によって生産量を評価することができた。本バイオアッセイ系を用いて、生産経路下流の酵素改変による IbOH 生産量への影響を網羅的に評価することが期待できる。

In the construction of yeasts producing highly branched-chain higher alcohols (BCHAs), the bioassay for direct evaluation of the production is desirable. However, an existing bioassay system for yeasts is limited to the intermediate detection in the production pathway. We conceived the bioassay system to detect the end products based on the growth inhibition of yeast by BCHAs.

We constructed the yeast sensitive to isobutanol (IbOH) below 0.2% as a sensor strain based on our previous studies[1]. IbOH was identified as the factor contributing most to growth inhibition of the sensors in the fermentation supernatant of IbOH-producing yeasts. The sensors were applied to the fermentation supernatants of yeasts with various expression levels of alpha-ketoacid decarboxylase (α-KDC) in the downstream production pathway. IbOH production could be evaluated by growth inhibition of the sensor strain. Our bioassay system allows comprehensive evaluation of the impact of enzyme engineering in downstream pathway on IbOH production.

[1] K. Kuroda, *et al.* (2019) *Cell Systems*, **9**, 534-547

Bioassay system, *Saccharomyces cerevisiae*, Isobutanol

発表責任者：佐藤源気（sgenki25bio@gmail.com）

講演番号：3E1p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E1 会場

Corynebacterium glutamicum の CS 集合化とグルタミン酸生産との機能的関連
A functional relationship between citrate synthase condensation and L-glutamate overproduction in Corynebacterium glutamicum
○長岡 誠[1]、古園 さおり[1,2,3]、西山 真[1,2] ([1]東大院農、[2]東大 CRIIM、[3]理研 CSRS)
○Makoto NAGAOKA[1], Saori KOSONO[1,2,3], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. fo Tokyo, [3]RIKEN CSRS)

C. glutamicum は細胞表層への刺激に応答して、L-グルタミン酸を細胞外に大量に排出する。この際、グルコースからグルタミン酸合成までの代謝流量が増加するが、関連酵素の遺伝子発現量は増加せず、翻訳後レベルでの代謝流量調節の存在が示唆される。我々はタンパク質集合化を介した代謝流量調節の可能性に着目しており、前大会でクエン酸合成酵素（CS）が細胞内で集合体を形成することを報告した。本大会では、CS 集合体とグルタミン酸生産との関連について解析した結果を報告する。

CS 触媒残基のアラニン置換（CS*）株は増殖阻害とグルタミン酸生産が消失した。CS の反応産物であるクエン酸添加により増殖は回復したがグルタミン酸生産は回復せず、CS 活性がグルタミン酸生産に必須であるとわかった。興味深いことに CS*の集合化は観察されなかった。一方、グルタミン酸生産に必須な 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼを阻害するタンパク質の遺伝子欠損株（Δ*odhI* 株）において、CS 集合化はグルタミン酸生産条件特異的に低下し、CS 活性もまた低下していた。以上の結果より、CS の活性と集合化、グルタミン酸生産が機能的に関連していることが示唆された。メタボローム解析の結果、CS*株とΔ*odhI* 株ではグルタミン酸生産条件特異的にピルビン酸由来の代謝産物が蓄積していた。両株で CS の集合化と活性が低下していることを踏まえると、CS 集合体とピルビン酸デヒドロゲナーゼが機能的に相互作用し、代謝流量調節に関わる可能性が示唆された。

In glutamate-overproducing conditions of *C. glutamicum*, an increase in the metabolic flux from glucose to glutamate synthesis is observed without increases in the production of responsible enzymes, suggesting the involvement of post-translational regulation of metabolic enzymes. We previously presented that citrate synthase (CS) formed condensates in *C. glutamicum*. A strain producing enzyme-dead CS variant (CS*) showed a growth defect and the loss of glutamate production. Feeding citrate rescued the growth but did not restore the glutamate production, indicating that the CS activity was essential for the glutamate production. Interestingly, CS* variant did not form a condensate. In the *odhI*-deleted strain that shows the loss of glutamate production, CS did not form a condensate and showed less activity. Thus, our data suggest the potential functional relationship between CS activity, CS condensation, and glutamate production. Our metabolome analysis further suggested that a potential functional interaction between CS condensate and pyruvate dehydrogenase might be involved in the increased metabolic flux.

Corynebacterium glutamicum, L-Glutamate production, Protein condensation

発表責任者：長岡 誠（nagaoka-makoto098@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E1 会場

大腸菌を用いた *N*-アセチルノイラミン酸発酵生産プロセスの構築
Efficient Production of *N*-Acetylneuraminic Acid in *Escherichia coli*
○氏原 哲朗、直江 大樹、吉岡 登希夫、社納 貴文、福本 一成（協和発酵バイオ）
○Tetsuro Ujihara, Taiki Naoe, Tokio Yoshioka, Takafumi Shanou, Kazunari Fukumoto (Kyowa Hakko Bio)

N-アセチルノイラミン酸は負の電荷を帯びたアミノ糖であり、シアル酸として通常糖タンパク質や糖脂質の非還元末端に局在していることが知られている。また、脳中のガングリオシドや糖脂質中に多く含まれていることが知られており、脳の発達や認知機能に関与することが示唆されている。そのため *N*-アセチルノイラミン酸は健康食品としての機能も期待されるが、その主な生産法はツバメの巣や卵黄からの抽出や病原性大腸菌の生産するシアル酸ポリマーの加水分解に限られていた。この N-アセチルノイラミン酸を工業的に生産するために我々は元来 *N*-アセチルノイラミン酸を生産しない非病原性の大腸菌を宿主に人工の合成経路を導入し,*N*-アセチルノイラミン酸の発酵生産を可能とした。工業生産のために精製検討を進めていた中で問題となる化合物の蓄積を確認し、構造を決定したところ Enterobacterial Common Antigen(ECA)の生合成中間体であることが明らかとなった。ECA 生合成に関わる遺伝子を破壊したところ、不純物の低減を確認し、かつ生産性も向上した。以上の結果から最終的に高い純度で *N*-アセチルノイラミン酸を生産することに成功した。

N-acetylneuraminic acid is a negatively charged amino sugar known as sialic acid, which is normally found at the non-reducing ends of glycoproteins and glycolipids. *N*-Acetylneuraminic acid is also known to be abundant in gangliosides and glycolipids in the brain, suggesting that it is involved in brain development and cognitive functions. However, the main production methods have been limited to extraction from swallow nests and egg yolks and hydrolysis of sialic acid polymers produced by pathogenic *E. coli*. In order to produce *N*-acetylneuraminic acid on an industrial scale, we introduced an artificial synthetic route using non-pathogenic *E. coli*, which do not naturally produce *N*-acetylneuraminic acid, as a host and enabled the production of *N*-acetylneuraminic acid by fermentation. Disruption of the genes involved in ECA biosynthesis led to a reduction in impurities and improved productivity. Finally, *N*-acetylneuraminic acid was successfully produced with high purity.

N-acetylneuraminic acid, Sialic acid, Industrial production

発表責任者：氏原哲朗（tetsuro.ujihara@kyowa-kirin.co.jp）

講演番号：3E1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E1 会場

アミノ酸源の添加は *Shewanella oneidensis* MR-1 株の嫌気条件での増殖を促進する
Supplementation with amino acid sources facilitates anaerobic growth of *Shewanella oneidensis* MR-1

○富田 啓介、池田 壮汰、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Keisuke TOMITA, Sota IKEDA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

異化的金属還元細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 株は細胞外の電極との電子の授受が可能であることから、酸化還元バランスが釣り合わない反応系を伴う物質生産のホストとして有望視されている。我々はこれまで、糖を発酵する能力を持たないと考えられていた本株が、培養時にアミノ酸を添加し同化代謝をサポートすることでグルコースを発酵して増殖出来ることを明らかにした。本研究ではアミノ酸添加というアプローチが他の嫌気代謝による増殖を促進できるかどうか検討した。加えて、添加するアミノ酸源の種類に関しても検討した。まず初めに、グルコースを含む最少培地に 20 種のアミノ酸の混合物、カザミノ酸、トリプトンをそれぞれ添加し、MR-1 株を嫌気条件で培養した。その結果、驚くべきことに MR-1 株の培養時に慣習的に添加されるカザミノ酸は増殖を促進しなかった。また、アミノ酸混合物よりもトリプトンの方が増殖促進効果が大きかった。次に、トリプトンの添加による増殖促進効果を様々な条件での嫌気培養により評価した。すると、トリプトン添加は *N*-アセチルグルコサミンやピルビン酸を基質にした発酵増殖、及び水素を電子供与体、フマル酸を電子受容体とした嫌気呼吸条件下での増殖を促進した。以上より、適切なアミノ酸源を添加することでこれまで実証されてこなかった MR-1 株の多様な代謝様式を明らかにすることが出来た。

Shewanella oneidensis MR-1 can transfer electrons to and from electrodes, making it a promising host for bioprocesses with redox-unbalanced reactions. We have demonstrated that MR-1 can grow fermentatively on glucose by adding amino acid sources to support anabolic metabolism. In this study, we examined whether the addition of amino acid sources would also enable anaerobic growth other than fermentative growth on glucose. Besides, the appropriate amino acid sources were explored. MR-1 was cultured in a glucose minimal medium supplemented with an amino acid mixture, casamino acids, or tryptone. Surprisingly, casamino acids, which are frequently used when culturing MR-1, did not enable fermentative growth on glucose, and the growth-promoting effect of tryptone was most significant. Furthermore, supplementation with tryptone facilitated fermentative growth on *N*-acetylglucosamine or pyruvate, which has remained to be demonstrated so far, and anaerobic growth under the condition where hydrogen and fumarate were used as an electron donor and acceptor, respectively. Our approach shed light on the hindered metabolic capacity of this strain due to the lack of amino acid supply.

electrochemically active bacteria, metabolism, fermentation

発表責任者：富田啓介（uktomita@toyaku.ac.jp）

講演番号：3E1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E1 会場

Gluconobacter 属酢酸菌 CHM43 株の変異株を用いた 2 - ケトグルコン酸生産
2-Ketogluconate production using an engineered derivative of *Gluconobacter* sp. CHM43 strain

○中島 さくら[1]、片岡 尚也[1,2]、松谷 峰之介[3]、ムサド・ティッパヤサク ウライワン[4]、ティーラーグール ガンジャナ[4]、松下 一信[1,2]、薬師 寿治[1,2] ([1]山口大・院創成科学、[2]山口大・中高温微研セ、[3]東京農業大・ゲノム、[4]カセサート大)
○Sakura NAKASHIMA[1], Naoya KATAOKA[1,2], Minenosuke MATUTANI[3], Uraiwan MASUD-TIPPAYASAK[4], Gunjana THEERAGOOL[4], Kazunobu MATUSHITA[1,2], Toshiharu YAKUSHI[1,2] ([1]Grad Sch Sci Tech Innov, Yamaguchi Univ, [2]RCTMR, Yamaguchi Univ, [3]Genome, Tokyo Univ of Agri, [4]Fac Sci, Kasetsart Univ)

Gluconobcter 属酢酸菌 CHM43 株はグルコースを，グルコン酸を経て，2-ケトグルコン酸（2KG）あるいは 5-ケトグルコン酸（5KG）へと酸化する。本菌株の特徴として，生産した 2KG を消費する。2KG 生産を考えるとこの消費が問題となるため，本菌における 2KG 代謝経路に関する知見を得ることを本研究の目的とした。2-ケトグルコン酸還元酵素（2KGR）遺伝子候補として *GLF_0478* と *GLF_1777* を見出し，*GLF_0478* と *GLF_1777* それぞれの単独遺伝子破壊株，ならびにこれらの二重遺伝子破壊株（ΔΔ 株）を構築した。Δ*GLF_0478* 株と Δ*GLF_1777* 株は親株と同様に 2KG を消費した。しかし，ΔΔ 株では親株と同様に 2KG を生成する一方，2KG の消費は全く見られなかった。結果的に本菌株は，2KG を蓄積し，親株の 1.3 倍 2KG を生産した。また，破壊株の 2KGR 活性は Δ*GLF_0478* 株と Δ*GLF_1777* 株は親株に比べて活性が低下し，ΔΔ 株は活性を示さなかった。これらの結果から，CHM43 株では 2KG の消費に *GLF_0478* と *GLF_1777* の両方が関与していると示唆された。さらにこれらの遺伝子発現が誘導的であるかどうかを調べた。*GLF_0478* は構成的に発現しているが，*GLF_1777* はグルコースまたはその誘導体存在下で誘導されることがわかった。

Gluconobacter sp. strain CHM43 oxidized glucose to gluconic acid, and then to 2-ketogluconic acid (2KG) or 5-ketogluconic acid (5KG) in its periplasmic space. A characteristic of this strain is that it consumes the produced 2KG. Because the 2KG metabolic pathway in *Gluconobacter* is largely unclear, we analyzed it for stable 2KG production. We found *GLF_0478* and *GLF_1777* as 2-ketogluconate reductase (2KGR) gene candidates, then we constructed a mutant strain lacking the *GLF_0478* and *GLF_1777* genes. The Δ*GLF_0478* and Δ*GLF_1777* stains consumed 2KG, like as the parent strain. However, the double deletion (ΔΔ) strain produced 2KG as well as the parent strain but not consume it. We examined 2KGR activities in the deletion mutant strains. The Δ*GLF_0478* and Δ*GLF_1777* strains showed reduced activities compared to the parent strain and the ΔΔ strain did not show activity. These results suggested that both *GLF_0478* and *GLF_1777* are involved in 2KG consumption in the CHM43 strain. We tested whether these genes are inducible. There results suggest that *GLF_0478* is constitutively expressed, while the *GLF_1777* is induced by glucose or its derivatives presence.

Oxidoreductase, 2-ketogluconic acid, Acetic acid bacteria

発表責任者：中島さくら（d001vju@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3E1p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E1 会場

オリーブ葉を基材とした固体培養における麹菌の生育とオリーブ葉麹の酵素活性

Growth of *Aspergillus oryzae* on olive leaves during solid-state fermentation and enzyme activity of olive leaf *koji*

○谷野 有佳[1]、伊藤 一成[1]、竹内 赴登[1]、三宅 剛史[1]、橋本 敦子[2]、奥川 日菜乃[2]、山下 秀行[3]、吉田 靖弘[4]、徐 恵美[4]、菊地 敬一[4]、深野 夏暉[2]、仁戸田 照彦[2]、神崎 浩[2]([1]岡山県工技セ、[2]岡山大院・環境生命、[3]樋口松之助商店、[4]日本オリーブ)

○ Yuka TANINO[1], Kazunari ITO[1], Hayato TAKEUCHI[1], Tsuyoshi MIYAKE[1], Atsuko HASHIMOTO[2], Hinano OKUKAWA[2], Hideyuki YAMASHITA[3], Yasuhiro YOSHIDA[4], Megumi JYO[4], Keiichi KIKUCHI[4], Natsuki FUKANO[2], Teruhiko NITODA[2], Hiroshi KANZAKI[2] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [3]Higuchi Matsunosuke Shoten, [4]Nippon Olive)

【目的】我々は、これまでにオリーブ葉を基材とした麹菌固体培養を行い、総ポリフェノール量や抗酸化活性を維持しながら、二次代謝産物の構造変換が起こることを報告している。一方で、オリーブ葉を基質とした麹菌の生育については、目視やデジタルマイクロスコープでの菌糸の観察や α-アミラーゼなどの酵素活性の測定によって確認するにとどまっていた。本研究では、走査電子顕微鏡 (SEM) を用いてオリーブ葉に麹菌が生育する様子を経時的に観察し、どのような酵素が生産されているのかを調べるため、いくつかの酵素の活性を測定した。

【方法・結果】蒸煮処理を行ったオリーブ葉と *Aspergillus oryzae* 6001 株を用いて、無通風箱培養法で 30ºC、72 時間の培養を行い、オリーブ葉麹を SEM (低真空モード、電圧 15 kV、圧力 10 Pa、クールステージ−10ºC) を用いて観察した。オリーブ葉麹では、培養 24 時間までに接種した分生子が発芽し、菌糸が伸長している様子がみられた。培養が進むと、太い菌糸が密集し、培養 48 時間以降に分生子の形成が観察された。さらに、オリーブ葉麹の断面を観察したところ、培養 48 時間には麹菌が葉の内部に侵入していることが確認された。また、オリーブ葉麹は培養 48 時間で菌体量が大きく増加しており、それに伴い、糖質分解酵素やタンパク質分解酵素の活性の増加もみられたことから、これらの酵素は麹菌の増殖により生産されたと考えている。

[Objective] We have reported that *koji* molds grew on olive leaves using *koji* mold solid-state cultivation technology, which resulted in changes in the structure of secondary metabolites. The growth of *koji* molds on olive leaves has been confirmed only by visual or microscopic observation of mycelia or measurement of enzyme activities such as α-amylase. In this study, we observed the growth of *koji* molds on olive leaves using scanning electron microscope (SEM) and evaluated the activities of some glycolytic and proteolytic enzymes.

[Methods and Results] Olive leaves were steamed, inoculated with *A. oryzae* 6001, and cultured at 30ºC for 72 hours using a non-airflow box. The observation of olive leaf *koji* using SEM showed that the germination of spores and the elongation of mycelia were occurred until 24 hours. The dense area of thick mycelia and the spore formation were observed from 48 hours. Further observation of cross section of olive leaf *koji* suggested that mycelia invaded inside of leaves. Supporting the observation using SEM, the mycelial contents of olive leaf *koji* increased at 48 hours. Additionally, glycolytic and proteolytic enzymes extracted from olive leaf *koji* also increased at 48 hours.

Aspergillus oryzae, solid-state fermentation, olive leaves

発表責任者：谷野　有佳（yuka_tanino@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：3E1p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E1 会場

小型通気式固体培養装置を用いた麹菌固体培養によるワインパミス成分の微生物変換
Bioconversion of wine pomace constituents by *Aspergillus* solid state fermentation using an air flow type rotary solid state fermenter for laboratory use

○岡 深雪[1]、藤田 彩楓[1]、奥川 日菜乃[2]、橋本 敦子[2]、三宅 剛史[3]、伊藤 一成[3]、谷野 有佳[3]、山下 秀行[4]、中川 拓郎[4]、平野 幸司[5]、深野 夏暉[2]、仁戸田 照彦[1,2]、神崎 浩[1,2] ([1]岡山大農、[2]岡山大院・環境生命、[3]岡山県工技セ、[4]樋口松之助商店、[5]果実工房)
○ Miyuki OKA[1], Ayaka FUJITA[1], Hinano OKUKAWA[2], Atsuko HASHIMOTO[2], Tsuyoshi MIYAKE[3], Kazunari ITO[3], Yuka TANINO[3], Hideyuki YAMASHITA[4], Takuro NAKAGAWA[4], Koji HIRANO[5], Natsuki HUKANO[2], Teruhiko NITODA[1,2], Hiroshi KANZAKI[1,2] ([1]Fac. Agr, Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [3]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [4]Higuchi Matsunosuke Shoten, [5]Kajitsu Kobo)

【目的】我々は麹菌がワインパミス（搾りかす）上で良好に生育し，ワインパミス麹の MeOH 抽出物中のワインパミス成分や抗酸化活性に変化が観察され，またその変化は果皮と種子ごとに特徴的であることを報告してきた[1-3]。これまでシャーレ培養，箱培養を用いた固体培養を実施してきたが，今回は生育環境の異なる小型通気式固体培養装置を用いた培養（機械培養）を行い，従来の方法との違いを検討した。【方法・結果】ワインパミスに *Aspergillus oryzae* 6001 を接種した麹菌固体培養により得られたワインパミス麹を果皮と種子に分け，分別していない麹と合わせてそれぞれを MeOH 抽出した。抽出物の分析の結果，総ポリフェノール量 (TPC) や DPPH 法による抗酸化活性，ポリフェノール成分が培養開始直後から変化しており，72 時間までの変化はシャーレ培養と異なっていた。さらに機械培養において 96 時間まで培養を行ったところ，72 時間時点から TPC と抗酸化活性が増加していた。このことから，機械培養によりワインパミス基材と異なる機能性を示すワインパミス麹素材の開発が期待される。農化 [1] ’21.3 仙台, 3C06-06, [2] ’22.3 京都, 2B02-04, [3] ’23.3 広島, 2B07-05

We have reported that *koji* mold grew well on wine pomace, leading to alterations in the contents of wine pomace and the antioxidant activity, in methanol extracts of wine pomace *koji*, and that these changes were distinct characteristics for skins and seeds, respectively[1-3]. While we have previously conducted solid-state cultivation of wine pomace using two *koji* mold solid-state cultivations: a petri-dish and a non-airflow box cultivations, in this study, we performed solid-state cultivation using an air flow type rotary solid-state fermenter for laboratory use (mechanical cultivation), which differs with respect to the growth environment from the two cultivation methods, to examine the differences from petri-dish cultivation. After wine pomace *koji* by *Aspergillus oryzae* 6001 was separated into skins and seeds, the separated skins and seeds, as well as whole *koji*s, were extracted with MeOH. The extract analysis showed that the total polyphenol content (TPC), the antioxidant activity, and polyphenolic constituents altered by *koji* mold. Those changes up to 72 hrs were different from the results of petri-dish cultivation. Furthermore, when the mechanical culture was continued up to 96 hrs, TPC and the antioxidant activity increased from the 72-hr time point. These results suggest that mechanical cultivation is expected to develop wine pomace *koji* materials with different functionality from the wine pomace.

Koji mold, High functionalization, Wine

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3E1p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E1 会場

Microbial Conversion of Unpolished Thai-Coloured Rice by *Aspergillus* Solid-State Cultivation: Effect on Amino Acid Composition

○Jirayu Jitpakdee[1], Kazunari Ito[2], Yuka Tanino[2], Hayato Takeuchi[2], Hideyuki Yamashita[3], Takuro Nakagawa[3], Teruhiko Nitoda[1], Hiroshi Kanzaki[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [3]Higuchi Matsunosuke Shoten)

We previously reported *koji* mold solid-state cultivation on wine pomace (a by-product from wineries)[1)] and olive leaves (an underutilised plant resource)[2)], leading to changes in polyphenols and antioxidant activity. When four industrial *koji* mold strains were cultivated for 43 h on four distinct rice varieties, namely Thai Riceberry black rice, Thai Sangyod red rice, Thai RD43 unpolished white rice, and Japanese Koshihikari polished white rice, the *koji* molds successfully grew on these materials. Methanol extracts from these rice *koji* samples exhibited increased polyphenol content and antioxidant activity. Furthermore, these changes varied depending on the *koji* mold strains[3)]. Additionally, it is well-known that *koji* molds express various proteases. Thus, it is conceivable that proteases are also expressed in these Thai-coloured rice *koji* samples cultivated with these four industrial *koji* mold strains to produce amino acids. Therefore, we analysed the changes in amino acid content and found a significant increase after cultivation, which varied depending on the *koji* mold strains. This suggests that microbial conversion through *Aspergillus* solid-state cultivation on unpolished Thai-coloured rice varieties possibly creates highly functionalised materials.

2023 JSBBA Annual Meeting (Hiroshima): 2B07-05[1)], 2B07-06[2)], 2B07-07[3)]

Koji mold, amino acids in rice, Thai-colored rice

発表責任者：Hiroshi Kanzaki（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3E1p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E1 会場

清酒製造現場での製麹を再現した培養における醸造関連酵素の遺伝子発現

Expression of brewing-associated enzyme genes on the culture reproduced *koji* making in the manufacturing setting of sake brewery

○伊藤 一成[1]、谷野 有佳[1]、竹内 赴登[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1]([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農、[3](株)フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Yuka TANINO[1], Hayato TAKEUCHI[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Ind. Technol. Center of Okayama Pref., [2]Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)

【目的】 清酒製造現場における麹造りでは、製麹中期～後期にかけて品温を上げ、麹を乾燥させることが重要とされている。これまでに製造現場の製麹を再現可能な無通風箱培養法において、製麹中に積極的な乾燥をせずとも、グルコアミラーゼ（GlaB）や酸性プロテアーゼ（PepA）の特に製麹初期の発現に分生子形成に関わる転写因子 FlbC が関与する可能性を示してきた。本研究では、製麹中期～後期の乾燥制御が、FlbC を含む転写因子や醸造関連酵素遺伝子の発現に与える影響について調べた。
【方法・結果】 蒸きょうした精米歩合 60%の雄町に *Aspergillus oryzae* RIB128 株の分生子を接種し、試験製麹を行った。製麹経過は、30℃, 95%RH で 24 時間、その後 12 時間かけて 40℃まで上昇させ、さらに 40℃で 12 時間維持する、計 48 時間とした。製麹中の乾燥は製麹開始 36 時間後から乾燥させる経過と、30 時間後から低下させる経過の 2 パターンを実施し、製麹時間ごとの酵素力価、菌体量及び各遺伝子の発現量を測定した。乾燥制御により *glaA* 以外の糖質分解酵素の遺伝子は発現量が増加し、一部のカルボキシペプチダーゼ遺伝子の発現もやや増加した。このとき、糖質分解酵素の発現に関わる *amyR* の発現に加え *flbC* の発現量も同じように増加していた。しかし、分生子形成経路で *flbC* の下流にある *brlA* の発現量は増加が無かったことから、FlbC は乾燥制御を実施する中期～後期の酵素遺伝子発現にも関与する可能性が示唆された。

【Objective】 It is important in the manufacturing setting of sake brewery to increase temperature in the late stage of the *koji* making and be dried *koji* for improved quality of *koji*. In previous report, we have shown the possibility that the transcription factor FlbC is involved in the expression of glucoamylase (GlaB) and acid protease (PepA) genes in the early stage of *koji* making. In this presentation, we describe comparison with the expression level of brewing-associated enzyme genes and the transcription factors on drying conditions at the late stage of *koji* making.
【Method and result】 The steamed rice inoculated with conidiospores of *A. oryzae* RIB128 strain was incubated for 48 h in a non-airflow box (NAB) culture method according to scheme of previous reports. *Koji* drying during *koji* making was performed by immediately decreasing the ambient RH of NAB after 36 h or 30 h. The gene expression of carbohydrate-degrative enzymes and some carboxypeptidases increased by *koji* drying. The expression level of *amyR* and *flbC* simultaneously increased, but not *brlA* gene. These results were suggested the possibility that FlbC is involved in expression of brewing-associated enzyme genes.

koji making, enzyme genes, transcription factor

発表責任者：伊藤一成（kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：3E1p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E1 会場

Comparative study of triacylglycerol lipase in *Aspergillus oryzae* associated with adjunct use for dairy application

○Napaporn CHINTAGAVONGSE[1], Yukina KAWAKAMI[1], Koichi TAMANO[2], Toru HAYAKAWA[1], Jun-ichi WAKAMATSU[1], Haruto KUMURA[1] ([1]Applied Food Science Laboratory, Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Bioproduction Research Institute, AIST Hokkaido)

Aspergillus oryzae has been used in traditional Japanese fermented foods. Taking advantage of its proteolytic potential, adjunct products of *A. oryzae* have been applied to enrich the ripened cheese flavor. However, some culture products contain high lipase activity, especially those from strain AHU 7139, which led to a high level of free fatty acids (FFA) in the resulting cheese products and caused rancidity due to the accumulation of volatile FFA. Our previous study revealed that a triacylglycerol (TG) lipase, tglA, was the most crucial lipase related to rancidity. In addition, diacylglycerol lipase (mdlB) was considered to promote rancidity through the subsequent reaction towards resulting milk fat diacylglycerols released by tglA. However, no rancidity has been noted in recently released koji-cheese using *A. oryzae* KC43. Thus, we compared the lipase activity profile of strain AHU 7139 and KC43 to elucidate the cause of limited rancidity with KC43.

Application of purified triolein as a substrate revealed that TG lipase produced by AHU 7139 showed the highest activity under acidic conditions, whereas that by KC43 showed higher activity around more alkaline pH circumstance. Nucleotide sequence analysis of *tglA* in KC43 showed single nucleotide insertion on the exon II region compared with that in AHU 7139 leading frameshift with reduced open reading frame that doesn't cover the lipase active site. Thus, KC43 was considered to produce other type of TG lipase than tglA. Furthermore, adjunct materials of AHU 7139 and KC43 were prepared to apply the *in vitro* curd experiment. FFA levels of 4-week ripened curds with KC43 adjuncts were comparable to those with adjunct-free products even though KC43 adjuncts contained TG lipase activity. In contrast, those with AHU 7139 adjuncts showed a significant increase in FFA levels. These results strongly support that tglA is the most relevant to rancidity and the suppression of tglA activity could open the application of the culture products of *A. oryzae* as an adjunct use for cheese ripening.

Aspergillus oryzae, lipase, rancid-off flavor

講演番号：3E1p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 E1 会場

β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine による *Vibrio* 属細菌のキチン代謝活性化システムの推測

Estimation of the system for enhancing chitin metabolism in *Vibrio* bacteria by β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine.

○平野 貴子[1,2]、津田 紘伸[2]、西尾 俊幸[1]、袴田 航[1,2]（[1]日大生資科、[2]日大院生資科）
○Takako HIRANO[1,2], Hironobu TUDA[2], Toshiyuki NISHIO[1], Wataru HAKAMATA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Graduate School of Nihon Univ.)

一般に *Vibrio* 属などの海洋細菌は、菌体外に分泌したキチナーゼによりキチンを *N,N'*-diacetylchitobiose［$(GlcNAc)_2$］などキチンオリゴ糖に分解した後に資化する。そのなかでも、*Vibrio parahaemolyticus* はキチナーゼに加えてキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD）も分泌し、$(GlcNAc)_2$ を脱アセチル化し β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine（GlcNAc-GlcN）を生産する。これまでに我々は、*V. parahaemolyticus* のキチン由来 2 糖代謝に関わるタンパク質の遺伝子発現が $(GlcNAc)_2$ に比べて GlcNAc-GlcN により強く誘導されることを報告した。以前の報告より、*Vibrio* 属細菌のキチン代謝関連タンパク質遺伝子の $(GlcNAc)_2$ または $(GlcN)_2$ による発現誘導が知られている。よって、GlcNAc-GlcN も同様に *Vibrio* 属細菌のキチン代謝活性化に関与すると示唆された。しかし、GlcNAc-GlcN の細胞内取り込み機構は不明である。そこで、*V. parahaemolyticus* と COD や一部のキチン由来 2 糖の輸送タンパク質の遺伝子を持たない *Vibrio furnissii* を用いて、$(GlcNAc)_2$・GlcNAc-GlcN・$(GlcN)_2$ によるキチナーゼやキチン由来 2 糖輸送タンパク質の遺伝子発現量の差をリアルタイム定量 PCR にて評価した。その結果、調査した遺伝子の多くは両菌ともに GlcNAc-GlcN による発現誘導傾向が見られたが、$(GlcNAc)_2$ や $(GlcN)_2$ ではその応答が異なっていた。さらに、両菌における GlcNAc-GlcN の資化能に違いが見られた。これらより、GlcNAc-GlcN によるキチン代謝活性化およびその菌体内輸送や遺伝子発現機構について考察する。

In marine environments, *Vibrio parahaemolyticus* secretes chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase (COD), and produces β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine (GlcNAc-GlcN) from chitin. In *V. parahaemolyticus*, gene expression of chitin-metabolism enzymes was strongly induced by GlcNAc-GlcN. It had been known that disaccharides, *N,N'*-diacetylchitobiose [$(GlcNAc)_2$] and chitobiose [$(GlcN)_2$], induce the gene expressions of proteins involved in chitin metabolism in *Vibrio* bacteria, and the transporters for these disaccharides had been speculated. However, there are no information about GlcNAc-GlcN transport system and the mechanism of gene expression by this saccharide. In this study, we compare *V. parahaemolyticus* with *Vibrio furnissii*, which does not encode COD genes on its genome, about the effect of chitin disaccharides on gene expression of some chitin-metabolism proteins. And, we also clarify the difference of proliferation by each saccharide between them. From the results of these expresiments, we speculated about GlcNAc-GlcN transporter and gene expression system by GlcNAc-GlcN of *Vibrio* bacteria.

Vibrio, chitin metabolism, oligosaccharide

発表責任者：平野　貴子（hirano.takako@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E1p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 E1 会場

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞膜ミクロドメイン形成におけるミクロリポファジーの役割

Role of Lipophagy in Formation of Microdomains on the Vacuolar Membrane in *Saccharomyces cerevisiae*

○中辻 拓実[1]、白石 晃將[1]、奥 公秀[2]、阪井 康能[1] ([1]京大院農、[2]京都先端科学大学)
○Takumi NAKATSUJI[1], Kosuke SHIRAISHI[1], Masahide OKU[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto University, [2]Kyoto University of Advanced Science)

脂質は細胞膜の構成成分であり膜を介した物質の輸送に関わるとともに優れたエネルギー源としての役割を持つ。当研究室により、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、脂肪滴は、グルコース枯渇時、ミクロリポファジーより液胞に取り込まれて分解され、その過程には ESCRT が必要なことが明らかとなった [1]。液胞膜上にはステロールに富んだミクロドメインが観察されるが、ミクロリポファジー欠損 *vps27*Δ 株ではミクロドメインが観察されなかったことから、液胞膜ミクロドメインの形成はミクロリポファジー依存的に起こることがわかった。今回、ミクロドメインを形成するステロールがミクロリポファジーにより液胞に取り込まれ、脂肪滴上のステロールエステル加水分解酵素が関与すると推察し、Tgl1 および Yeh1 が液胞内でのステロールエステル加水分解酵素の候補であると考え、両酵素を欠損させた *tgl1*Δ*yeh1*Δ 株を用いた顕微鏡観察を行ったところ、同株のミクロドメイン形成は野生株に比べて有意に減少していた。また液胞画分を精製し、ステロールエステル加水分解活性を調べたところ、野生株で見られるステロールエステルの分解活性が *tgl1*Δ*yeh1*Δ 株では検出されなかったことより、両酵素がミクロリポファジー誘導時に脂肪滴とともに液胞に取り込まれ、液胞内ステロールエステル加水分解酵素として働き、液胞内腔からのステロール供給がミクロドメイン形成に必要であることが示唆された。

Recent studies have shown that microlipophagy, selective degradation of lipid droplets, is induced during glucose depletion and ESCRT was involved in this process. we found that the microlipophagy-deficient *vps27*Δ strain did not form microdomains, indicating that microdomain formation occurs in a microlipophagy-dependent manner. Further analyses, including microscopy and measurement of sterol-ester hydrolysing activity, suggested that the lipid droplet-localized Tgl1 and Yeh1 are transported from the cytosol to the vacuole through microlipophagy where they act as sterol ester hydrolysing enzymes and that these functions are important for microdomain formation in the vacuolar membrane.

1Oku et al. Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J Cell Biol.* 2017

Autophagy, Lipid Dloplet, Microdomain

発表責任者：阪井　康能（sakai.yasuyoshi.8x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E1p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 E1 会場

Citrobacter braakii TB-96 株における グリセロール存在下での高発現かつ安定的なプロモーター選抜

High-expression and stable promoter selection in the presence of glycerol in *Citrobacter braakii* strain TB-96

○木村 武蔵[1]、鮫島 礼[1]、柳瀬 卓馬[1]、吉田 ナオト[1]、中島（神戸） 敏明[2]、清 啓自[1]（[1]宮大院農、[2]筑波大院生命環境系）

○Takezo KIMURA[1], Rei Sameshima[1], Takuma Yanase[1], Naoto Yoshida[1], Toshiaki Nakajima-Kambe[2], Keiji Kiyoshi[1] ([1]The Univ. of Miyazaki, [2]The Univ. of Tsukuba)

Citrobacter braakii TB-96 株（以下 TB-96 株）は、グリセロールを基質として 1,3-プロパンジオール（以下 1,3-PD）を発酵生産する。先行研究では、1,3-PD の生産量増大を目的として取得した破壊株でピルビン酸の蓄積が確認された。上記の蓄積を解消可能なバイパス経路の発現が必要とされている。本研究では、このバイパス経路の発現に適した高発現プロモーターを選抜した。

TB-96 株の 1,3-PD 発酵条件時の RNA-seq 解析により安定的に転写量の高いプロモーター候補 11 種類を選抜した。これらと一般的な遺伝子発現に用いられる *lac* プロモーター（以下 *lacP*）を、pSTV28 プラスミド上でそれぞれ GFP 遺伝子に連結し、TB-96 株へ導入後、2 種類の培養条件下で GFP の転写量と蛍光強度を測定した。その後、LB 平板培地で継代培養を 5 回繰り返した後、再度転写量と蛍光強度を測定することで継代培養におけるプロモーターの安定性を調査した。

その結果、IPTG により誘導した *lacP* に対し、2 種類のプロモーターで転写量と蛍光強度の有意な増加と安定性が確認された。以上より、グリセロール資化性細菌における誘導剤非依存型の安定的高発現プロモーターを取得した。今後は、バイパス経路過剰発現株の作製を進め、実際にピルビン酸の蓄積を解消し 1,3-PD の生産量向上に寄与するかを調査する予定である。

Citrobacter braakii strain TB-96 is a fermentative producer of 1,3-propanediol (1,3-PD) from glycerol. In a previous study, metabolic genes disrupted mutant in strain TB-96 was accumulated pyruvate and required to overexpress by-pass pathway to eliminate the accumulation. In this study, we selected a suitable promoter for overexpression in the strain TB-96.

The 11 candidate promoters derived from genome of the strain TB-96 and the commonly used lac promoter were each linked to the GFP gene on pSTV28 plasmid vector. The strain TB-96 was transformed with constructed plasmids and measured the transcription level and fluorescence intensity of GFP. Furthermore, transformants were subcultured five times on LB agar plates to validate the stability of the promoters, followed by analysis of transcription and fluorescence. As the result, two promoters were much higher than *lac* promoter induced by IPTG in transcription and fluorescence. Moreover, these promoters maintained the stability after subcultures. The by-pass pathway overexpression mutant is under constructing to test whether they can eliminate the pyruvate accumulation of pyruvate and enhance the 1,3-PD production.

promoter, glycerol, transcriptional stability

講演番号：3E1p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 E1 会場

Gluconobacter japonicus が持つ PQQ5 は D-乳酸を基質にする膜結合型キノプロテインである

PQQ5 of *Gluconobacter japonicus* is a membrane-bound quinoprotein that reacts with D-lactate

○竹内 秀[1]、片岡 尚也[1,2]、松下 一信[1,2]、薬師 寿治[1,2] ([1]山口大・院創成科、[2]山口大・中高温微セ)
○Shu TAKEUCHI[1], Naoya KATAOKA[1,2], Kazunobu MATSUSHITA[1,2], Toshiharu YAKUSHI[1,2]
([1]Yamaguchi Univ., [2]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】酢酸菌は, 細胞質膜のペリプラズム側に多種多様な膜結合型脱水素酵素を保有しており, その働きにより様々な糖質やアルコール類を不完全に酸化する代謝を営む。近年のゲノム解析により, 酢酸菌にも未だ機能未知の膜結合型脱水素酵素が多数存在することが明らかにされた。本研究では, この中でも, アミノ酸配列の情報からピロロキノリンキノンを補欠分子族とすると考えられる PQQ5 の機能を明らかにすることを目的に研究を行った。
【方法・結果】酢酸菌の中でも, PQQ5 を保有する *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 を材料に用いた。PQQ5 をコードする遺伝子 *pqq5* の高発現株を作製し, コントロール株を含めた 2 株から調製した膜画分を解析に用いた。糖類, 多価アルコール, ヒロドキシ有機酸を含む 31 種類の基質に対する脱水素酵素活性を測定し, コントロール株と比較したところ, ラセミ体の乳酸に対する活性が *pqq5* 高発現株で顕著に上昇した。これを受けて, D, L 体の各乳酸に対する活性を測定したところ, 特に D-乳酸に対して活性の上昇が確認された。また, *pqq5* 高発現株から調製した膜画分を EDTA で処理したところ, EDTA 濃度依存的に D-乳酸脱水素酵素活性が阻害された。以上のことから, PQQ5 は ① D-乳酸を基質とすること, ② ピロロキノリンキノンを補欠分子族とすること, が示唆された。

Acetic acid bacteria incompletely oxidize a variety of carbohydrates and alcohols in the periplasmic space. This oxidation is catalyzed by the membrane-bound dehydrogenases. Recently, genome analysis revealed that there are still several function unknown quinoproteins. Among those, we focused on PQQ5 in this study. The membrane fraction was prepared from the *Gluconobacter japonicus* mutant strain with or without overexpression of PQQ5 and the dehydrogenase activity was compared between them. The membrane fraction prepared from the PQQ5-overexpressed mutant showed higher dehydrogenase activity toward D-lactate than that of the strain without PQQ5 overexpression. Additionally, the D-lactate dehydrogenase activity was drastically inhibited by the EDTA treatment. Taking those into consideration, it can be concluded that D-lactate is one of the substrates of PQQ5 and pyrroloquinoline quinone is the prosthetic group of PQQ5.

Gluconobacter japonicus, quinoprotein, D-lactate

講演番号：3E2a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E2 会場

A gene cluster coding for multiple predicted glycosyl transferases is involved in the biogenesis of extracellular membrane vesicles of *Shewanella vesiculosa* HM13

○Mengshan Zhu, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

Shewanella vesiculosa HM13 is a psychrotrophic Gram-negative bacterium isolated from the intestinal contents of horse mackerel and produces a quantity of nano-sized extracellular membrane vesicles (EMVs) carrying a functionally unknown protein P49 as a single major cargo protein. The characteristics of cold-adapted bacterium are expected to facilitate the application of EMVs produced by *S. vesiculosa* HM13 in the extracellular production of thermolabile proteins. Elucidating the vesiculation mechanisms is one of the prerequisites for promoting its application. In our previous study, spontaneous mutations were found in two hypo-vesiculation mutants of this bacterium, which occurred in a common gene, *hm3339*. Being predicted to code for a glycosyltransferase (GT) superfamily protein, *hm3339* is potentially involved in the synthesis of bacterial extracellular polysaccharides. *hm3339* is included in a gene cluster consisting of *hm3337*, *hm3338*, *hm3339*, and *hm3340.* All the genes in this cluster were predicted to code for GT homologs. We succeeded in the disruption of *hm3337*, *hm3339,* and *hm3340* and found a dramatic decrease of EMV production for all these mutants. These mutants directly secreted P49 to extracellular space without being associated with EMVs. Focusing on Δ*hm3339*, a reduced capsular polysaccharide (CPS) production was observed by phenol-chloroform-petroleum extraction and the following SDS-PAGE, and a shortened cell length was found by microscopy observation. These characteristics of Δ*hm3339* were confirmed to be caused by the disruption of *hm3339* by complementation experiment. These results suggested a relationship between CPS and EMV production.

extracellular membrane vesicle, glycosyl transferase, capsular polysaccharide

発表責任者：Mengshan Zhu（mengshanzhu@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E2a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E2 会場

Shewanella vesiculosa HM13 の細胞外膜小胞生産におけるダイナミン様タンパク質遺伝子クラスターの役割

Role of the bacterial dynamin-like protein gene cluster in the production of extracellular membrane vesicles by *Shewanella vesiculosa* HM13

○井上 宙夢、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京大化研）
○Hiromu INOUE, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (The Univ. of Kyoto)

細菌の細胞外膜小胞（extracellular membrane vesicle, EMV）生産の分子機構には不明な点が多い。Michie らにより、大腸菌の EMV 生産にダイナミン様タンパク質 LeoA の関与が報告されている（Michie et al., 2014, PLoS One）。我々は、EMV 高生産性のグラム陰性細菌である *Shewanella vesiculosa* HM13 のゲノムから LeoA をコードすると予想される遺伝子（*hm2406*）を見出した。本遺伝子は配列から機能が推定されない遺伝子（*hm2405*）を含む遺伝子クラスターに存在した。本研究では、本株の EMV 生産における、*hm2405* と *hm2406* の機能を解明することを目的とした。EMV 画分をナノ粒子軌跡解析に供した結果、*hm2405* と *hm2406* の欠損はそれぞれ EMV 生産性を 52% と 22% 低下させ、これらの遺伝子の EMV 生産への関連が示された。HM2405 は配列から内膜への局在が推定され、AlphaFold2 によって作成した予想構造モデルから、I-BAR (Inverse-Bin/Amphiphysin/Rvs) ドメインタンパク質に類似した構造を有することが予想されたことから、*hm2405* と *hm2406* は outer-inner membrane vesicle などの細胞質成分を含有する EMV の生産に関連することが考えられた。そこで、EMV を SYTO9 をもちいた核酸染色に供し、EMV に内包される核酸含量を測定した。その結果、Δ*hm2405* と Δ*hm2406* は親株より低い蛍光強度を示し、これらの遺伝子が細胞質成分を含有する EMV の生産に関連することが示唆された。

Michie et al. reported the involvement of LeoA, a bacterial dynamin-like protein, in extracellular membrane vesicle (EMV) production by *E. coli* (Michie et al., 2014, PLoS One). We found a gene encoding a LeoA homolog, *hm2406*, in the genome of *Shewanella vesiculosa* HM13, a hyper-vesiculating Gram-negative bacterium. *hm2406* is in a gene cluster containing *hm2405*, which is predicted to encode a protein containing I-BAR (Inverse-Bin/Amphiphysin/Rvs) domain by AlphaFold2 prediction. The aim of this study was to elucidate the roles of *hm2405* and *hm2406* in the production of EMVs by HM13. Deletion of *hm2405* and *hm2406* decreased EMV productivity by 52% and 22%, respectively. To investigate whether these genes are involved in the production of cytoplasmic component-containing EMVs such as outer-inner membrane vesicles, EMV fractions were subjected to nucleic acid staining using SYTO9. As a result, EMVs from each gene-disrupted mutant showed lower fluorescence signal than those of the parental strain, suggesting that these genes are involved in the production of EMVs containing cytoplasmic components.

extracellular membrane vesicle, BAR domain, bacterial dynamin-like protein

発表責任者：井上　宙夢（inoue.hiromu.28r@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E2a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E2 会場

X-ray crystallographic analysis of a major cargo protein of extracellular membrane vesicles of a hypervesiculating bacterium, *Shewallena vesiculosa* HM13

○ Yuanzheng YANG[1], Jun KAWAMOTO[1], Takuya OGAWA[1], Kimihiko MIZUTANI[2], Bunzo MIKAMI[3,4], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [3]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, [4]Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

Shewanella vesiculosa HM13 is a cold-adapted Gram-negative bacterium isolated from the intestinal contents of horse mackerel. This bacterium produces a large amount of extracellular membrane vesicles (EMVs) carrying a protein of unknown function, P49. The presence of P49 as the sole major cargo protein of EMVs suggests the potential use of this strain to produce heterologous proteins as a major cargo protein of EMVs by using P49 as a carrier. In our previous research, we found that P49 is loaded onto the surface of EMVs and cells through interactions with capsular polysaccharides (CPS). To clarify the details of the interaction between P49 and CPS, it is necessary to obtain structural information on P49. Here, we conducted *in vitro* binding assays for P49 and CPS, as well as purification and crystallization of P49. P49 was prepared from the culture supernatant of the glycerophosphodiester phosphodiesterase (GdpD) gene-disrupted strain because this strain does not produce CPS and secretes P49 to the culture supernatant without being loaded onto EMVs (Kamasaka K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2020). After crystallization and obtaining crystals of high quality, we performed a soaking experiment with different kinds of sugar cryoprotectants and subjected the crystals to X-ray diffraction experiments at SPring-8 BL26B1. As a result, a protein crystal diffraction pattern with the resolution of 2.0 Å was obtained. Through molecular replacement using the AlphaFold2 simulation model, the protein structure of P49 has been refined at 2.0 Å resolution. The overall structure comprised three domains, including two highly ordered domains, namely domain A and B, and one disordered domain C, which indicates the flexibility of the P49 structure. Additionally, the structural data revealed the binding of domain A with glucose and maltose, possibly reflecting the interaction mode of CPS and P49. In conclusion, we succeeded in obtaining X-ray crystal structure of P49, which forms the basis for understanding the mechanism of binding between EMVs and P49.

extracellular membrane vesicle, crystallization, capsular polysaccharides

講演番号：3E2a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 E2 会場

好気条件における膜小胞高生産乳酸菌の探索
Exploration of lactic acid bacteria with high production of membrane vesicles under aerobic conditions
○稲垣 日奈子[1]、菅野 美月[2]、二又 裕之[2,3,4]、田代 陽介[2,4]([1]静大工、[2]静大院創造、[3]静大グリーン研、[4]静大院総合科技)
○Hinako INAGAKI[1], Mizuki KANNO[2], Hiroyuki FUTAMATA[2,3,4], Yosuke TASHIRO[2,4] ([1]The Univ. of Shizuoka Faculty of Engineering, [2]The Univ. of Shizuoka Graduate School of Science and Technilogy, [3]The Univ. of Shizuoka Green Science and Technology, [4]The Univ. of Shizuoka Graduate School of Integrated Science and Technology)

細菌は直径 20 - 400 nm のリポソーム様球状構造体である膜小胞（Membrane vesicles; MVs）を放出する。膜小胞はタンパク質、脂質、核酸など細菌由来の物質を保持し、それらを輸送することにより細菌―細菌間および細菌―宿主相互作用に深く関与している。また膜小胞は抗原提示細胞に取り込まれやすいサイズであり、免疫調節機能を有していることから、ワクチンや薬物送達への医療応用に向けた研究が加速化している。現在主な研究対象であるグラム陰性菌由来の膜小胞は、炎症の要因となりうるリポ多糖を保有している。そのため、より安全性が高く生体に有益な効果をもたらす乳酸菌の膜小胞をカスタマイズすることができれば、医療応用に有望なツールとなりうる。乳酸菌などのグラム陽性菌は一般的にグラム陰性菌に比べて膜小胞形成量が少ないことから、本研究では好気条件でも膜小胞を高生産する乳酸菌株の探索を試みた。
乳酸菌ライブラリ 86 株より好気条件下で 1 次スクリーニングを行い、培養上清中のリン脂質濃度が高い株を選抜した。透過電子顕微鏡観察ならびにナノ粒子トラッキング解析を行ったところ、放出された膜小胞は直径は約 20 - 400 nm に分布していた。また、特定のタンパク質が優先的に膜小胞に含有されており、標的抗原を膜小胞に付与できる可能性が示された。さらに ELISA 法により選定した 1 株の炎症性サイトカインの分泌量を測定したところ、好気条件で膜小胞高生産の RD055213 株は IL-6 の放出を誘発することが示された。以上により、本研究では医療応用に向け膜小胞デザインの候補となりうる乳酸菌株を特定した。現在選抜した乳酸菌の全ゲノム解読と膜小胞構成タンパク質の同定を試みている。

Membrane vesicles (MVs) released by bacteria into the extracellular environment have potential for medical applications, such as vaccines and drug delivery. The aim of this study was to characterize probiotic lactic acid bacterial strains with high MV production. A strain with high MV formation was selected from a lactic acid bacterial library. Specific proteins were selectively contained in MVs in some strains, indicating that target antigens can be displayed in the MVs. Furthermore, the secretion of inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α of one strain selected by the ELISA method showed that RD055213, a high-producing strain under aerobic conditions, induced the release of IL-6. In the future, the whole genome of selected lactic acid bacteria will be analyzed to assess the effect of MVs on the immune responses.

Membrane vesicles, Lactobacillus; probiotics

講演番号：3E2a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E2 会場

腸内細菌が産生する膜小胞の特性解析
Characterization of intestinal bacteria-produced membrane vesicles
○杜 昊聡、片倉 啓雄、山崎 思乃（関西大・生化工）
○Haocong Du, Yoshio Katakura, Shino Yamasaki-Yashiki (Kansai Univ.)

多くの細菌は直径 20–400 nm の膜小胞（MV）を菌体外に産生する。MV は細菌間のコミュニケーションのみならず、宿主への情報伝達にも関与する。一方、ヒトの腸内には多種多様な腸内細菌が高密度に生息しているが、腸内細菌の MV 産生の有無や、それらの MV が宿主に及ぼす影響ついては不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト由来腸内細菌の MV 産生能と、生理活性として MV の免疫賦活活性について調べた。腸内細菌 5 菌株を GAM 培地で 72 時間、嫌気的に培養し、培養上清を超遠心分離（150,000 × *g*, 4°C, 2 h）して MV を回収・定量したところ、グラム陽性菌の *Ruminococcus gnavus* は MV をほとんど産生しなかったが、グラム陰性菌の *Parabacteroides distasonis*、次いで *Megamonas funiformis* は顕著に MV を産生した。精製した MV をマクロファージ様 J774A.1 細胞に添加し、誘導される interleukin (IL) -6 産生量を指標に免疫賦活活性を調べたところ、*M. funiformis* の MV は他の MV より一桁低い濃度で IL-6 産生を誘導した。以上より、*M. funiformis* は免疫賦活活性が高い MV を高生産すると考えられ、現在、その免疫賦活活性をもたらす成分について検討している。

Generally, bacteria produce nanoscale membrane vesicles (MVs), which are involved not only in communication between bacteria, but also in signaling to host cells. Even though a large variety of intestinal bacteria inhabit in the human intestine, it remains unclear whether they produce MVs, and how the MVs, if produced, affect host cells. In this study, we investigated the MV-producing ability of human-derived intestinal bacteria as well as the immunostimulatory activity of the MVs. Five strains of intestinal bacteria were separately cultured anaerobically for 72 h, and MVs were collected from each culture supernatant via ultracentrifugation and quantified. Gram-negative *Parabacteroides distasonis* showed the highest MV producing ability followed by gram-negative *Megamonas funiformis*, while gram-positive *Ruminococcus gnavus* hardly produced MVs. Further, to evaluate the immunostimulatory activity of the MVs, purified MVs from each strain were added to macrophage-like J774A.1 cells and induced interleukin (IL)-6 production was examined. The MVs from *M. funiformis* induced IL-6 production even at concentrations one order of magnitude lower than those of the other MVs. Therefore, *M. funiformis* is considered to be a high-MV producing strain with high immunostimulatory activity.

membrane vesicle, intestinal bacteria, immunostimulatory activity

発表責任者：山崎　思乃（shino.ya@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3E2a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E2 会場

微生物間コミュニケーションを介した細胞外膜小胞の放出
Membrane vesicles formation is triggered by cell-cell communication in *Streptococcus mutans*
○伊藤 碧美[1]、山本 千佳[1]、永沢 亮[2]、原田 潤[1]、鵜木 海緒[1]、尾花 望[3,5]、野村 暢彦[4,5]、豊福 雅典[4,5] ([1]筑波大院・生物資源科学学位 P、[2]愛知医科大・医、[3]筑波大・医学医療系、[4]筑波大・生命環境系、[5]筑波大・MiCS)
○Tamami ITO[1], Chika Yamamoto[1], Ryo Nagasawa[2], Jun Harada[1], Mio Unoki[1], Nozomu Obana[3,5], Nobuhiko Nomura[4,5], Masanori Toyofuku[4,5] ([1]Degree Program in Agro-Bioresources Science and Technology, Univ. of Tsukuba, [2]Institute of Medicine, Aichi Medical Univ., [3]Institute of Medicine, Univ. of Tsukuba, [4]Institute of Life and Environmental Science, Univ. of Tsukuba, [5]MiCS, Univ. of Tsukuba)

多くの細菌は自身の細胞膜を由来とする膜小胞を放出することが知られている。膜小胞はタンパク質や DNA などの細胞由来成分を内包して周囲の細胞へと輸送する。輸送された膜小胞はその内包物によって細胞間のコミュニケーションなど様々な機能を発揮する。膜小胞の放出機構として、これまでに、グラム陰性・陽性菌の両方で、プロファージ由来の細胞壁分解酵素であるエンドリシンによる溶菌を介したものが報告されている。しかしながら、主要な口腔細菌の一種である *Streptococcus mutans* は膜小胞を放出することが報告されているものの、ゲノム中にエンドリシンの遺伝子を持たず、その放出機構は不明であった。一方、*S. mutans* はシグナル分子を用いた細菌のコミュニケーションであるクオラムセンシング（quorum sensing; QS）によって細胞壁分解酵素であるオートリシンの遺伝子を発現し、細胞の溶菌を制御することが報告されている。そこで、私たちは、*S. mutans* が QS によって膜小胞の放出を制御するかを調べることにした。その結果、QS によって集団中の一部の細胞が死に、膜小胞が放出されることが明らかとなった。今後は膜小胞内包物を解析し、QS により放出された膜小胞の機能解明に繋げたいと考えている。

Many bacteria are known to produce membrane vesicles (MVs). MVs consist of cellular membrane, and contains proteins, DNA, and are involved in bacterial communication. These cargos are often protected from degradation and transported to other cells. Previous studies showed that MVs can be produced via cell death by cell wall degradation. Those cell wall degradation were caused by endolysins. *Streptococcus mutans*, one of the major oral bacteria, is known to produce MVs, but don't possess endolysin, and the mechanisms of MV formation in S. mutans was unclear. On the other hand, *S. mutans* is known to regulate cell death via Quorum sensing (QS). Therefore, we investigated whether QS can trigger MV formation. Our results show that indeed QS induces MV formation in *S. mutans* by the expression of autolysin.

Since cell death is induced in the sub-population of cells by QS, the remaining cells may benefit from the MVs produced. In the future, we plan to analyze the contents of MVs and explore the functions of MVs induced by QS.

membrne vesicle, Quorum sensing, Streptooccus mutans

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E2a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E2 会場

Corynebacterium glutamicum における膜小胞を介した鉄獲得に関与する遺伝子の探索
Characterization of genes involved in membrane vesicle-mediated iron acquisition in Corynebacterium glutamicum

○藤田 真愛[1]、永久保 利紀[3,4]、川島 花雪[2]、山本 達也[3]、野村 暢彦[3,4,5]、豊福 雅典[3,4] ([1]筑波大・生物資源、[2]筑波大院・生物資源科学、[3]筑波大院・生命環境、[4]筑波大・MiCS、[5]筑波大・TARA)
○ Mao FUJITA[1], Toshiki NAGAKUBO[3,4], Kayuki KAWASHIMA[2], Tatsuya YAMAMOTO[3], Nobuhiko NOMURA[3,4,5], Masanori TOYOFUKU[3,4] ([1]Agro Biol. Res. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Univ. Tsukuba, [3]Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS, Univ. Tsukuba, [5]TARA center, Univ. Tsukuba)

細菌は、生体膜に由来する微小な膜小胞(membrane vesicle; MV)を形成することが知られている。MV は主に脂質二重膜とタンパク質で構成され、核酸やシグナル物質などの様々な物質が含まれている。細胞外に放出された MV はそれらの物質を他細胞に伝達し、その結果として多岐にわたり機能を発揮する。MV を介した物質伝達には微生物制御技術等への応用の可能性が秘められているものの、細菌が MV を受け取る分子機構については未解明である。そこで我々は、ミコール酸含有細菌のモデル生物の一種である *Corynebacterium glutamicum* を用いて、本菌群における MV の受け取り機構の解明を目指した。

先行研究において、我々は *C. glutamicum* の MV が鉄獲得に関与して、生育を促進させることを見出した(Kawashima *et al.*, *Microbiology spectrum* 2023)。また、MV 添加の有無の条件下で培養した *C. glutamicum* において転写れる mRNA のシーケンス解析を実施した結果、MV の添加により転写量が変動した遺伝子が同定された。加えて、*C. glutamicum* の野生株と上記遺伝子の破壊株における MV を介した鉄の受け取りを評価した結果、破壊株において MV に吸着された鉄の利用が制限されていることが示唆された。本研究で得られた結果は、*C. glutamicum* において MV に含まれる物質の受け取りに上記遺伝子が関与していることを示唆する。MV 受け取りの分子機構を明らかにするため、現在は上記遺伝子の機能解析を進めている。

Membrane vesicles (MVs), which are mainly composed of lipid bilayers and proteins, are released by bacteria and have diverse biological functions. Although MV-mediated molecule transfer has the potential in applications for treating bacteria, the molecular mechanisms by which bacterial cells receive MVs have remained elusive. In this study, we used *Corynebacterium glutamicum*, a model organism of mycolic acid-containing bacteria, to elucidate the mechanism of MV uptake in this bacterial group. In the previous study, we found that *C. glutamicum* releases MVs with iron adsorption activity, and that these MVs can transfer iron to the *C. glutamicum* cells, which promote their growth. In the present study, RNA sequence analysis identified genes whose transcription levels were altered upon the addition of MVs. Furthermore, in-frame deletion of the above genes led to limited utilization of MV-associated iron. In order to gain mechanistic insights into the MV-mediated iron transfer, we are currently analyzing the function of these gene products.

Membrane vesicle, Corynebacterium glutamicum, Iron acquisition

発表責任者：豊福 雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E2a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E2 会場

細菌における MV の受け取り因子の探索

Screening for genes involved in bacterial membrane vesicle uptake

○柏俣 青葉[1]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3] ([1]筑波大院　生物資源学位、[2]筑波大　生命環境系、[3]筑波大　微生物サスティナビリティ-研究センター)
○Aoba KASHIMATA[1], Nobuhiko NOMURA[2,3], Masanori TOYOFUKU[2,3] ([1]University of Tsukuba, [2]School of Life and Environmental Sciences University of Tsukuba, [3]The Microbiology Research Center for Sustainability)

細菌間のコミュニケーション機構の一つに quorum sensing（QS）がある。QS とは細菌が生産したシグナルを介して菌体濃度依存的に集団の挙動を変化させる機構である。細菌によっては QS シグナルを membrane vesicle (MV)と呼ばれる膜小胞に内包させることで、細胞選択的にシグナルを受け渡すと考えられているが、MV の受け取り機構は未だに分かっていない。本研究では MV の内包物や付着に関して興味深い知見のある *Paracoccus denitrificans* Pd1222 を用いることで、MV を介したシグナル伝達機構の解明を目指した。

この機構の解明の第一歩として、MV 受け取りに関する遺伝子を網羅的に探索した。自らはシグナルを生産せず、外部からのシグナルに応答して蛍光を発する *P. denitrificans* レポーター株を用いて、ランダムに変異を入れたトランスポゾンミュータントライブラリーを作製した。元々のレポーター株と比べて MV に対する応答(蛍光強度)が異なる変異株をスクリーニングし、それらの詳細な解析を行なった。今後は、得られた変異株を手がかりにして、MV の受け取り機構を明らかにしていく。

One of the known communication mechanisms in bacteria is quorum sensing (QS), which alter gene expression of the population in a density-dependent manner via signaling molecules. Some bacteria are reported to deliver QS signals through membrane vesicles (MVs), but the mechanism of MV uptake is still unknown. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of MV-mediated signal delivery by using *Paracoccus denitrificans* Pd1222, that is known to deliver MVs to specific type of cells.

As a first step toward elucidating this mechanism, we searched for genes related to MV uptake. Using a *P. denitrificans* reporter strain as a background, which does not produce signals on its own but emits fluorescence in response to external signals, a transposon mutant library was generated. Mutant strains with different responses (fluorescence intensity) to MVs compared to the original reporter strain were screened, and a secondary screening was performed on these strains to verify whether the change in fluorescence intensity was MV-dependent or not. We will further gain insight into the MV uptake mechanisms by characterizing the identified genes.

quorum sensing, membrane vesicle, signal transduction

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E2a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 E2 会場

大腸菌のセレンナノ粒子は細胞内で形成され膜に包まれて排出される
Intracellular formation, cell membrane encapsulation, and excretion of selenium nanoparticles in *E. coli*

○越智 杏奈[1]、芝本 佳永[1]、豊竹 洋佑[1]、藤岡 大毅[1]、岡西 広樹[2]、青野 陸[1]、井上 真男[1,3]、金井好克[2]、今井 友也[4]、三原 久明[1]([1]立命大 生命、[2]大阪大 院医、[3]立命大 R-GIRO、[4]京大 生存研)
○ Anna OCHI[1], Kano SHIBAMOTO[1], Yousuke TOYOTAKE[1], Daiki FUJIOKA[1], Hiroki OKANISHI[2], Riku AONO[1], Masao INOUE[1,3], Yoshikatsu KANAI[2], Tomoya IMAI[4], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Med., Osaka Univ., [3]Res. Inst. Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ., [4]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

大腸菌は有毒な亜セレン酸（SeO_3^{2-}）を還元し、毒性の低いセレンナノ粒子（SeNPs）を細胞外に蓄積する。大腸菌において、SeO_3^{2-}は細胞質内でチオレドキシンやグルタチオンによって還元されることが報告されているが、SeNPs が細胞内で形成された後に排出されるのか、細胞外で形成されるのか、形成過程の多くは不明である。そこで本研究では、大腸菌における細胞外 SeNPs 形成機構の解明を目的とし、細胞膜構造と細胞外 SeNPs 形成との関係を調べた。

当研究室では、エンベロープ構造の完全性が損なわれる大腸菌遺伝子欠損株において、SeNPs が細胞外に排出されず、細胞質内に蓄積することを明らかにしている。これらの欠損株において、細胞質内に蓄積された SeNPs の粒子径は約 100 nm に制御されていた。一方、野生株で観られる細胞外 SeNPs の粒子径もまた約 100 nm であり、培養時間によって粒子径が変わらないことから、SeNPs は細胞質で形成された後に細胞外へ放出されることが示唆された。さらに、細胞外 SeNPs を培養液から単離精製し、ジチオトレイトール（DTT）により還元して TEM で観察したところ、DTT 濃度に応じて SeNPs の消失と膜小胞（MV）様構造の増加が観察された。細胞外 SeNPs には、細胞膜に由来すると思われる脂質やタンパク質、細胞壁成分が結合していたことから、これらは細胞膜によって包まれていることが明らかとなった。以上の結果より、大腸菌において SeNPs は細胞質内で形成され、細胞膜に包まれて細胞外へ排出されることが示唆された。

E. coli converts toxic selenite to less toxic Se nanoparticles (SeNPs) that accumulate extracellularly, but the process is poorly understood. Previously, we found that the deletion of genes involved in envelope integrity led to the intracellular accumulation of SeNPs. A comparison of SeNPs sizes between WT and mutant strains indicated that SeNPs underwent intracellular maturation, reaching approximately 100 nm before being excreted outside the cell. Extracellular SeNPs were purified and analyzed by TEM. When SeNPs were incubated with dithiothreitol, we observed a concentration-dependent reduction in the quantity of SeNPs, accompanied by a simultaneous increase in the formation of membrane vesicle-like structures. SeNPs were bound to lipids, proteins, and cell wall components, indicating that SeNPs were enwrapped by cell membranes. These results suggest that SeNPs are formed in the cytoplasm, encapsulated by the cell membrane, and subsequently released into the extracellular space.

membrane vesicles, selenium, *Escherichia coli*

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3E2a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E2 会場

曲率認識ペプチドを用いた乳酸菌の膜小胞産生条件の検討
Investigation of conditions conducive to membrane vesicle production by lactic acid bacteria using a curvature-sensing peptide

○中村 めい[1]、前川 沙喜子[2]、河野 健一[3]、片倉 啓雄[2]、山崎 思乃[2]([1]関西大院・理工、[2]関西大・化生工、[3]京大院・薬学)
○Mei Nakamura[1], Sakiko Maekawa[2], Kenichi Kawano[3], Yoshio Katakura[2], Shino Yamasaki-Yashiki[2] ([1]Graduate School of Science and Engineering, Kansai Univ., [2]Kansai Univ., [3]Kyoto Univ.)

細菌はメンブランベシクル（MV）と呼ばれる微小な膜小胞を産生する。乳酸菌の MV は免疫調節作用をもち、これらの性質やその産生量に影響する因子の研究には定量が必須である。しかし、脂質を定量する従来法は特異性が低く、超遠心分離による精製が必要で、多数の試料の扱いは難しい。そこで本研究では、膜小胞に特有な脂質パッキング欠損に結合する曲率認識ペプチド[1)]を用いる定量法を検討した。乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* NBRC 15891 をモデル菌株とし、培地成分の操作が容易な合成培地を用いて、曲率認識ペプチド（二量体型 di-NBD-nFAAV5）の有用性を検証した。本ペプチドは菌体に非特異的に結合するが、培養上清の MV は定量可能だった。本ペプチドは pH 依存性が小さく、有機酸の生成により pH が低下した培養上清でも、pH 調整することなく MV を定量できた。合成培地中のアミノ酸、ビタミン、核酸、および微量金属濃度について検討した結果、鉄イオン濃度を増やすと MV 産生が抑制されることがわかった。

Bacteria produce nanoscale membrane vesicles (MVs). MVs derived from lactic acid bacteria exhibit immunomodulatory effects, and their quantification is essential for the study of these properties and factors that influence their production. Conventional methods for lipid quantification exhibit low specificity and require MV purification using ultracentrifugation, rendering the process tedious and low throughput. We here evaluated a quantitation method using a curvature-sensing peptide[1)] that binds to lipid packing defects unique to MVs. Using *Lactiplantibacillus plantarum* NBRC 15891 as a model strain, we investigated the availability of a curvature-sensing peptide (dimeric form di-NBD-nFAAV5) in a synthetic medium with easily manipulated medium components. MVs in culture supernatant were quantifiable although this peptide also bound indiscriminately to the bacterial cells. Quantification with this peptide is relatively pH independent and can be performed without pH adjustment in culture supernatants with low pH due to organic acid formation. The effects of amino acid, vitamin, nucleic acid, and trace metal concentrations on MV production were examined. We found that increasing iron ion concentrations suppressed MV production.

1) Kawano K. et al., Chem. Pharm. Bull., 69, 1075-1082 (2021).

extracellular membrane vesicle, lactic acid bacteria, curvature-sensing peptide

発表責任者：山崎思乃（shino.ya@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3E2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E2 会場

グラム陽性細菌によるグラム陰性細菌の QS 誘導
Quorum Sensing Induction in a Gram-negative bacterium by a Gram-positive bacterium.
○杉本 翠[1]、佐野 千佳歩[2]、永久保 利紀[3,4]、野村 暢彦[3,4]、豊福 雅典[3,4] ([1]筑波大・生命環境学群生物資源学類、[2]筑波大院・生命地球科学研究群、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター)
○Sui SUGIMOTO[1], Chikaho SANO[2], Toshiki NAGAKUBO[3,4], Nobuhiko NOMURA[3,4], Masanori TOYOFUKU[3,4] ([1]Agro Biol. Res. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Fac. Life and Environ Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS (Microbiology research Center for Sustainability), Univ. Tsukuba)

クオラムセンシング (Quorum sensing; QS)は、シグナル物質を介した細菌間コミュニケーション機構の 1 つであり、細菌の病原性やバイオフィルム形成などに関わるさまざまな遺伝子の発現が制御されている。この QS に用いられるシグナル物質は細菌の分類群によって異なっており、グラム陰性細菌ではアシルホモセリンラクトン (*N*-acyl-homoserine lactone; AHL)、グラム陽性細菌ではペプチドシグナルなどが例として挙げられる。当研究室の先行研究において、筑波大学の圃場から単離されたグラム陽性細菌の一種が、グラム陰性細菌である *C. violaceum* の QS を誘導することが示された。本株のゲノム解析より *lux* システムとは異なる推定 AHL 合成遺伝子の他に推定 AHL 分解遺伝子をもつことが示唆されている。本研究において、AHL 分解機能をもつと予測されるラクトナーゼ遺伝子を過剰発現させた株を作製したところ、野生株と比べて *C. violaceum* の QS 誘導を減少させることが確認された。これまでにグラム陽性細菌が、グラム陰性細菌への QS 誘導分子を産生・利用できることを報告した知見はわずかであり、本研究で得られた結果は細菌間コミュニケーションにおける新たな知見を提供する。現在、本株におけるシグナル分子の同定と関連遺伝子の探索を進めている。

Quorum sensing (QS) is one of the mechanisms of bacterial cell-to-cell communication that is driven by signaling molecules. QS regulates the expression of various genes, some of which are known to be related to bacterial pathogenicity and biofilm formation. The signaling molecules used in QS differ between bacterial group. Gram-negative bacteria use small molecules such as acyl-homoserine lactone (AHL) while Gram-positive bacteria manly use peptide signals. We have isolated a Gram-positive bacteria from a field in University of Tsukuba, that is able to induce QS of *C. violaceum*, a Gram-negative bacteria. Genome analysis indicate that this strain possesses a putative AHL synthesis gene that is distinct from the *lux* family and also possess a putative AHL degradation gene. We further constructed an lactonase overexpressing strain and decrease in the QS induction of *C. violaceum* was observed compared to the wild strain. To date, there are only few reports showing Gram-positive bacteria can produce inductive signals. Our results will provide new insights in inter-species bacterial communications. Future works will aim in identifying genes involved in the signaling of this strain.

Quorum sensing, cell-to-cell communication, acylhomoserine lactone

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E2 会場

細菌間コミュニケーションによって制御される緑膿菌プロファージの解析
Quorum sensing regulated prophage in *Pseudomonas aeruginosa*
○上原 礼佳[1]、吉澤 晋[2]、木暮 一啓[2]、野村 暢彦[3,4]、豊福 雅典[3,4] ([1]筑波大院・理工情報生命学術院、[2]東京大・大気海洋研、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・MiCS)
○ Ayaka UEHARA[1], Susumu YOSHIZAWA[2], Kazuhiro KOGURE[2], Nobuhiko NOMURA[3,4], Masanori TOYOFUKU[3,4] ([1]Grad. Sch. Sci Tech., Univ. Tsukuba, [2]AORI, Univ. Tokyo, [3]Fac. Life Environ Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS., Univ. Tsukuba)

プロファージは細菌の染色体に組み込まれたウイルスゲノムであり、一般的に DNA 損傷によって増殖が誘導され、宿主外へと拡散する。これに対し本研究では、高菌体密度で活発化する細菌間コミュニケーション(QS)を介して、ファージ粒子の放出が誘導される現象を報告する。

我々はこれまでに、海洋から単離された緑膿菌 1187 株の QS 機構に着目した研究を進めてきた。その過程で、1187 株の QS 遺伝子を欠損すると、培養液中のファージ粒子が減少することを見出した。1187 株の全ゲノム解析を行った結果、本株は複数のプロファージ領域を持つことが確認された。QS を介して誘導されるプロファージを特定するために、QS 欠損株を用いた TEM 観察及び qPCR を行ったところ、特定のファージが QS 依存的に増殖していることが明らかとなった。以上より、緑膿菌において特定のプロファージの誘導が、細菌間のコミュニケーション機構に組み込まれていることが示唆された。また、本ファージの放出は DNA 損傷を介したファージ誘導への関与が知られる *recA* 遺伝子の機能とは独立していた。

ファージと宿主の相互作用は、基礎および応用の両面で重要である。本研究では、緑膿菌におけるプロファージ誘導の新たな機構を見出し、今後詳細な解析を進める。

Prophage is a bacteriophage genome that is integrated into the bacterial chromosome, and they are often induced by DNA damage. In this study, we report that phage particle release is induced by quorum sensing (QS).

By characterizing the QS system of *Pseudomonas aeruginosa* 1187 which was isolated from the ocean, we realized that phage particles were released in 1187 cultures. The number of particles was reduced in a 1187 QS mutant. Whole genome sequence analysis revealed that 1187 carries several prophages in its genome. To identify the prophage that is induced by QS, we performed TEM observation and qPCR analysis. The results revealed that a specific phage proliferated and was released in a QS-dependent manner. RecA protein is often required for prophage induction, so we performed plaque assay with *recA* mutant and found that QS induces this prophage independently to RecA. These results suggest that induction of specific prophages in *Pseudomonas aeruginosa* is integrated into the bacterial cell-to-cell communication system, that may provide novel insights into phage-bacteria interplay.

Quorum sensing, Prophage, *Pseudomonas aeruginosa*

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E2 会場

細菌集団の一部で出現する新規生存形態の解明
Characterization of a novel form of cell emerging in a bacterial subpopulation
○原田 潤[1]、兼松 周作[1]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3] ([1]筑波大院・生物資源科学学位プログラム、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大・微生物サステイナビリティー研究センター)
○Jun HARADA[1], Shusaku Kanematsu[1], Nobuhiko Nomura[2,3], masanori toyofuku[2,3] ([1]University of Tsukuba, Master’s Program in Agro-Bioresources Science and Technology, [2]University of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences, [3]University of Tsukuba, MiCS (Microbiology research Center for Sustainability))

細菌に感染するウイルスであるファージが内部に共生している緑膿菌では、集団全体の 1%程度の割合で、細胞壁が分解された球状細胞（以下 round cell; R-cell)が出現することがわかってきた。細菌は細胞壁が分解されると、細胞分裂や細胞融合能、物質の排出や取り込み機構、抗生物質耐性などにおいて、通常の細菌では発揮しえない性質と能力を有することが考えられるが、これまでに R-cell はほとんど研究されていない。そこで、本研究では、その普遍性が示唆されながらも実態が明らかになっていない R-cell の性質や機能を明らかにすることで、その生物学的役割の解明を目指した。R-cell は通常の培養条件下では集団全体の 1%程度しか得られないため、解析が極めて困難であることから、培養条件を最適化したところ、緑膿菌の大多数を R-cell にさせ、安定的に解析できる系を構築した。R-cell の膜構造を通常細胞と透過型電子顕微鏡にて比較したところ、外膜構造が異なることがわかった。興味深いことに、細胞壁を人工的に分解したプロトプラストと比較した場合においても外膜構造が異なることが示され、既存の細胞形態のいずれとも異なる可能性が示唆された。さらに、流体デバイスを用いた抗生物質耐性試験においては、R-cell は通常細胞より細胞壁を標的とする抗生物質に耐性を有することがわかった。また、遺伝子発現解析から、解糖系や分泌系に関わる遺伝子群が通常細胞よりも発現上昇していた。本研究は、これまでに見過ごされてきた細菌の新たな生存形態の解明に繋がると考えられる。
We found that a subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* changes their shape into to cell wall-deficient round cells (R-cells). These R-cells have scarcely been studied and we aimed to elucidate the biological role of R-cells by characterizing their properties. Since the proportion of R-cells in a population is only about 1% under normal culture conditions, it is hard to characterize these cells. We first optimized the conditions to induce R-cell formation with high efficiency. Ultrastructure inspection of R-cells by transmission electron microscopy showed that R-cells have defects in the outer membrane which differed from artificially produced protoplasts. Live-cell imaging captured that R-cells are less sensitive to cell wall targeting antibiotics using a fluidic device. Transcriptome analysis showed that upregulated genes in R-cells related to carbon metabolism and protein secretion systems. This study provides new insights into the biological role of a overlooked form of bacteria that is induced by a phage gene.

bacterial cell wall, phage, membrane vesicle

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E2 会場

大腸菌細胞の配向秩序による細胞外マトリクス生産の不均一性

Heterogeneity in Extracellular Matrix Production by Orientation Order of *Escherichia coli* Cells

○横山 文秋、竹内 一将（東大・理・物理）
○Fumiaki YOKOYAMA, Kazumasa TAKEUCHI (Physics, Science, U Tokyo)

遺伝的に同種の細胞も表現型の不均一性を示す。これは確率的な事象と細胞集団を取り巻く微小スケールの環境変動から生じるが、微小環境由来の不均一性についての理解はまだ十分ではない。そこで本研究では、大腸菌の多細胞形態における細胞の配向秩序という視点で微小環境に焦点を当て、細胞外マトリクス生産の不均一性を調べている。我々は、寒天パッド下やマイクロ流体チャンバー内に閉じ込められた細胞集団の増殖と、マトリクスに関連する蛍光タンパク質遺伝子の発現を顕微鏡で観察した。棒状の細胞は増殖するにつれ、細胞配向の時空間的な秩序と欠陥を伴いながら長軸方向に互いに配列した。画像解析により、このマトリクス生産が欠陥近傍で起こっていることが示唆された。内因性と外因性圧力の両方が、それぞれ細胞増殖と流体弁によって加えられ、マトリクス生産を開始させた。我々は、配向欠陥で周囲の細胞に圧迫された細菌細胞が力学的応力を感知し、マトリクス生産の時空間的不均一性をもたらしていると考えている。マトリクスは構造を強固にすることから、この不均一なマトリクス産生が三次元バイオフィルム構造の形成に寄与していると推測している。

Even in isogenic cells show phenotypic heterogeneity, which arises from stochastic events and variations in the microenvironment where the cell population resides. Our understanding of microenvironment-driven heterogeneity is still in its infancy. In this study, we are looking into the heterogeneity in extracellular matrix production focusing on microenvironment through the lens of cell orientation order in an *Escherichia coli* multicellular form. We observed the growth of a cell population confined under an agar pad or in a microfluidic chamber with the expression of a fluorescence protein gene associated with a matrix by microscopy. As the rod-shaped cells proliferated, they aligned each other along their long axis with spatiotemporal order and defects in the cell orientation. Through image analysis, our observations suggest that this matrix production occurs near the defects. Both endogenous and exogenous pressure, respectively applied by cell growth and by fluidic valve, initiated the matrix production. We propose that bacterial cells pushed by surrounding cells around the orientation defects sense mechanical stress, leading to spatiotemporal heterogeneity in matrix production. As the matrix renders the structure rigid, it is speculated that this heterogeneous matrix production contributes to the formation of three-dimensional biofilm structures.

phenotypic heterogeneity, extracellular matrix, biofilm

発表責任者：横山 文秋（fumi.yokoyama@noneq.phys.s.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E2 会場

トリプトフォールによる酵母のスフィンゴ脂質合成阻害とクオラムセンシング
Inhibition of yeast sphingolipid synthesis by tryptophol and quorum sensing
○崎濱 由梨[1]、三岡 哲生[1]、望月 貴博[1]、加藤 拓[2]、只見 秀代[2]、三好 美穂[2]、永富 康司[2]、阿部 文快[1] ([1]青山学院大学、[2]サヒクオリティーアンドイノベーションズ)
○Yuri SAKIHAMA[1], Tetsuo MIOKA[1], Takahiro MOCHIZUK[1], Taku KATO[2], Hideyo TADAM[2], Miho MIYOSHI[2], Yasushi NAGATOMI[2], Fumiyoshi ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin University, [2]Asahi Quality and Innovations,Ltd.)

微生物が液性因子を介して細胞密度を検知し、自らの増殖や物質生産を調節する仕組みをクオラムセンシング（QS）と呼ぶ。*Saccharomyces cerevisiae* では、トリプトフォールなどの芳香族アルコールが QS 分子として作用する。我々は、芳香族アルコールによる酵母の増殖制御や受容体の同定を目的とした研究を行っている。昨年度は、様々な *S. cerevisiae* 株の増殖に及ぼす芳香族アルコールの効果の解析と、遺伝子破壊ライブラリーを用いたトリプトフォール耐性株の単離について報告した。今年度は、トリプトフォール耐性の原因遺伝子の特定と耐性機構に関する報告を行う。QS が誘起される低窒素源培地を用い、5~10 mM（0.08~0.16%）のトリプトフォールに耐性を示す遺伝子破壊株を調べたところ、欠失している遺伝子とは別に *ELO2* というスフィンゴ脂質合成系で脂肪酸を伸長する酵素の遺伝子に変異（アミノ酸置換としては I284F）が見出された。そこで、他のスフィンゴ脂質合成系遺伝子の破壊株についてトリプトフォール耐性を調べたところ、*ELO2* や *SUR2* の破壊が耐性をもたらす一方、*SCS7* の破壊株はむしろ超感受性を示した。このことは、トリプトフォールがスフィンゴ脂質、あるいは前駆体であるセラミドの蓄積を引き起こし、増殖を負に制御する可能性を示唆している。現在、薄層クロマトグラフィーによるスフィンゴ脂質とセラミドのプロファイリングを行っている。

Quorum sensing (QS) is a mechanism through which microorganisms regulate their growth and metabolism by sensing cell density through secreted molecules. In *Saccharomyces cerevisiae*, aromatic alcohols act as the QS molecules. We have been investigating the impact of aromatic alcohols on yeast cell growth to identify regulatory mechanisms and receptors. In the previous year's meeting, we reported the isolation of tryptophol-resistant strains using a yeast gene deletion library. In this study, we identified genes associated with tryptophol resistance. The *elo2* mutant (Elo2-I284F) was found to be resistant to tryptophol, with *ELO2* being involved in the sphingolipid synthesis pathway. Furthermore, disruption of sphingolipid synthesis pathway genes *ELO2*, *ELO3*, and *SUR2* demonstrated resistance to tryptophol, while the *SCS7* disruptant exhibited high sensitivity. These findings suggest that cell growth is inhibited by sphingolipids or that ceramide precursors accumulated in the cell in the presence of tryptophol. We are currently performing sphingolipid and ceramide profiling for each mutant using thin-layer chromatography.

budding yeast, quorum sensing, sphingolipid

講演番号：3E2p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E2 会場

濃度応答性メタノール誘導において転写因子 KpMxr1 のリン酸化制御に関わるシグナル伝達因子の探索

Search for signal transduction factors that regulate phosphorylation of the transcription factor KpMxr1 in *Komagataella phaffii*

○北山 岳人、井上 紘一、由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○Gakuto KITAYAMA, Koichi INOUE, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

異種タンパク質生産に広く利用されているメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) では、メタノール誘導性遺伝子の発現レベルがメタノール濃度に応答して厳密に制御される（concentration-regulated methanol induction; CRMI）。我々はこれまでに、メタノール誘導性遺伝子発現に必須の転写活性化因子 KpMxr1 のメタノール濃度に応じたリン酸化レベルの変化が CRMI に重要であり、そのリン酸化状態が、KpPkc1 から MAP キナーゼカスケードに依存しない未知のシグナル伝達経路（CRMI 経路）によって制御されることを報告した [1)]。

本研究では、CRMI 経路において KpMxr1 のリン酸化状態を調節するシグナル伝達因子の探索を目的として、KpMxr1 の *Saccharomyces cerevisiae* におけるホモログである ScAdr1 との物理的相互作用が示唆されるキナーゼ/ホスファターゼについて、*K. phaffii* でのホモログ遺伝子の破壊株を作成した。現在、メタノール培地での生育や CRMI への影響を調査しており、得られたキナーゼ/ホスファターゼの結果について本講演では報告する。

1) Inoue *et al.*, Mol. Microbiol., 118:683-697 (2022).

Methylotrophic yeasts have been used as hosts for heterologous protein production, which is achieved with their strongly and tightly regulated methanol-induced promoters. When methylotrophic yeasts grow on methanol, methanol-induced genes in *K. phaffii* (*P. pastoris*) are expressed depending on the methanol concentration in the medium (concentration-regulated methanol induction; CRMI). We recently reported that phosphorylation state of transcription factor KpMxr1 is changed corresponding to the methanol concentration and that the methanol signal is transmitted through CRMI pathway independent of the MAP kinase cascade that branches out from KpPkc1 to KpMxr1 [1)]. In this study, to search for factors that regulate phosphorylation of KpMxr1, we constructed the strains lacking the kinase/phosphatase which are suggested to have physical interaction with *Saccharomyces cerevisiae* Adr1, the homolog of KpMxr1. We are now analyzing growth on methanol and transcript level of methanol-induced genes with these strains disrupted with candidate genes.

Methylotrophic yeast, Transcription factor, Signal transduction

発表責任者：由里本博也（yurimoto.hiroya.5m@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E2p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E2 会場

酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA 顆粒の時空間制御と特性評価

Spatiotemporal regulation and characteristics of methanol-inducible mRNA granules in yeast *Candida boidinii*

○関岡 風花、白石 晃將、赤木 美穂、幅田 亜香莉、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Fuka SEKIOKA, Kosuke SHIRAISHI, Miho AKAGI, Akari HABATA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ. Agriculture)

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* をメタノール培地で培養すると、ペルオキシソームに局在するアルコールオキシダーゼ（AOD）やジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）、細胞質に局在するホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FLD）など、メタノール代謝に関わる酵素群が顕著に発現誘導される。これらメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態を解析するために、mRNA の可視化システムを構築し、メタノール培養時にメタノール誘導性 mRNA が細胞質で顆粒構造を形成することを確認した[1]。そこで本研究では、メタノール誘導性 mRNA が形成する顆粒（methanol-inducible mRNA granules: mimRNAg）の特性とその生理機能を解析することを目的とした。

DAS1 mRNA をモデルに、mimRNAg 形成数を調べたところ、メタノール誘導時の経時変化が *DAS1* 遺伝子の発現量の推移と連動していた。続いて、細胞質において mRNA の動態制御に関わる RNP 顆粒 Processing body（P-body）との局在を調べたところ、両者の共局在率は 10%未満であった。また、P-body 形成阻害株においても mimRNAg を形成した。さらに、液-液相分離による凝集体を解く効果のある 1, 6-ヘキサンジオールに対し、P-body が感受性を示した一方で、mimRNAg の大部分が抵抗性を示した。これらより、mimRNAg が細胞質で形成される新たな構造体であると想定し、現在は、その特性や局在について解析している。

1）赤木ら、日本農芸化学会 2021 年度大会講演要旨集, 3A03-17.

When cultured on methanol, *C. boidinii* highly expresses the enzymes responsible for methanol metabolism, such as alcohol oxidase (AOD), dihydroxyacetone synthase (DAS) and formaldehyde dehydrogenase (FLD). Previously, we established the mRNA visualization system to study the intracellular dynamics of methanol-inducible mRNAs. Microscopic observation revealed that methanol-inducible mRNAs localized to fluorescent puncta under methanol culture conditions.

We tried to characterize methanol-inducible mRNA granules (mimRNAg). Microscopic analyses showed that mimRNAg colocalized with P-bodies only partially. While P-bodies were sensitive to 1, 6-hexanediol, which dissolves condensates formed by liquid-liquid phase separation, the majority of mimRNAg were resistant to this chemical, suggesting that mimRNAg are novel RNP structures.

methylotrophic yeast, mRNA, RNP granules

講演番号：3E2p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E2 会場

Saccharomyces cerevisiae HKR1 遺伝子のエキソン内在プロモーターによる発現制御機構

Regulatory mechanism of *Saccharomyces cerevisiae HKR1* with the exonic promoter

○今藤 俊宏、小澤 良太郎、細川 佑奈、笠原 紳（宮城大・食産業）
○Toshihiro KONDO, Ryotaro OZAWA, Yuna HOSOKAWA, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のムチン様 I 型膜タンパク質 Hkr1p は 1,802 アミノ酸から成る巨大な糖タンパク質で、過剰発現させることにより *Lindnera mrakii*（旧名 *Hansenula mrakii*）が産生する HM-1 キラートキシンへの耐性を付与することが知られている。また、Hkr1p は HOG MAP キナーゼ経路における最上流の浸透圧センサーとして機能し、CWI MAP キナーゼ経路にも関与するなど、多方面で細胞機能の制御に関わっていると考えられる。その遺伝子である *HKR1* は全長約 5.4 kb のイントロンをもたない遺伝子であり、本研究ではこれまでに、当該遺伝子のコード領域後半にある *Hin*dIII 部位からターミネーター領域に至る約 2.6 kb の断片のみを酵母細胞へ導入した場合でも強い HM-1 耐性を付与することを確認している。そのことから、*HKR1* は 5′末端上流域にあるプロモーター領域とは別に、エキソンの内部にもプロモーターとして機能する領域が存在することが示された。また、その転写活性は通常、エキソン内部の上流配列により抑制的に制御されているが、NaCl 等の高塩濃度ストレスによりその抑制が解除されることも確認している。現在、エキソン内在プロモーターの転写開始点やそこからの発現産物の酵母細胞内での局在解析を行っている。

Hkr1p is a large, highly glycosylated mucin-like type I transmembrane protein consisting of 1,802 amino acids that confers resistance by its overexpression to HM-1 killer toxin produced by the killer yeast *Lindnera mrakii* (synonym *Hansenula mrakii*). It also functions as the most upstream osmotic sensor in the HOG MAP kinase pathway and is also involved in CWI MAP kinase pathway, suggesting that Hkr1p has multiple functions in signal transduction pathways. In this study, we have shown that a partial fragment of *HKR1* from the *Hin*dIII site in the coding region to its terminator induced adequate resistance to HM-1 in *S. cerevisiae* cells. Furthermore, we found that transcription of *HKR1* was initiated not only from the promoter upstream of the 5′ terminus, but also from the region in the exon, and its transcriptional activity was normally repressed by the upstream sequence. The repressed expression was in part recovered by salt stress, such as high concentration of NaCl. We are currently determining the transcription start site of the exonic promoter. Also, the localization of the partial Hkr1p in the cells is being observed.

yeast, transcriptional regulation, stress response

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：3E2p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E2 会場

Saccharomyces cerevisiae HKR1 のエキソンに内在するプロモーターと発現産物の蛍光タンパク質による解析

Analyses of the exonic promoter of *Saccharomyces cerevisiae HKR1* and the expressed product by using a fluorescent protein

○細川 佑奈、今藤 俊宏、小澤 良太郎、笠原 紳（宮城大・食産業）
○Yuna HOSOKAWA, Toshihiro KONDO, Ryotaro OZAWA, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *HKR1* は全長約 5.4 kb のイントロンをもたない遺伝子で、膜貫通型ムチン様タンパク質の Hkr1p をコードしている。通常、遺伝子の転写は 5′末端上流域にあるプロモーターから始まるが、*HKR1* では翻訳開始点から 3249 塩基目（以下、#3249 と表記）から #3408 のエキソン内部の領域からも転写が始まり、平常時はその転写活性が同遺伝子内の当該領域上流配列により抑制的に制御されている。本研究では、このエキソン内在プロモーターの転写抑制が解除される条件を見出すこと、またエキソン内在プロモーターから発現してくる C 末端側の部分的な Hkr1p の細胞内局在と挙動を、蛍光タンパク質を用いて解明することを目的としている。
エキソン内在プロモーターと推定される領域について、その領域長を変えて蛍光タンパク質遺伝子を連結したプラスミドを構築し、形質転換体の蛍光強度を測定することによりそれぞれのプロモーター活性を評価した。これらの形質転換体を様々なストレス要因の下で培養したところ、*HKR1* のエキソン内在プロモーター支配下にある配列は、NaCl などの塩による高浸透圧ストレスに順応する際に誘導発現され、機能する可能性が示された。現在、Hkr1p の C 末端に蛍光タンパク質を連結した融合タンパク質を発現させて、その局在と挙動の観察を進めている。

HKR1 is an intronless, 5.4 kb gene identified in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* and encodes a mucin-like type I transmembrane protein, Hkr1p. Our resent study showed that *HKR1* has a cryptic transcription initiation site in the middle and is alternatively transcribed from there. In addition, the transcriptional activity of the exonic promoter is repressed by its upstream sequence within the exon of *HKR1*. In this study, we report the conditions under which the repressed transcription of the exonic promoter is reactivated. Also, subcellular localization of the partial Hkr1p expressed from the exonic prompter was observed by using a fluorescence protein reporter assay system.
Plasmids containing various lengths of the exonic promoter were constructed and a fluorescence protein gene was ligated to each promoter sequence, then introduced into *S. cerevisiae* cells. A significantly higher level of fluorescence was detected when the transformants were cultured under a high osmotic pressure condition with NaCl. Currently, observation of subcellular localization and behavior of the partial Hkr1p by using the fluorescent protein is in progress.

yeast, transcriptional regulation, stress response

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：3E2p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E2 会場

Saccharomyces cerevisiae HKR1 遺伝子のエキソン内在プロモーター領域の解析
Analysis of the exonic promoter of *Saccharomyces cerevisiae HKR1*
○小澤 良太郎、今藤 俊宏、細川 佑奈、笠原 紳（宮城大・食産業）
○Ryotaro Ozawa, Toshihiro Kondo, Yuna Hosokawa, Shin Kasahara (Miyagi Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *HKR1* は、その過剰発現により HM-1 キラートキシンへの耐性をもたらすイントロンをもたない遺伝子であるが、3′末端側の部分配列をプロモーターレスの状態で多コピープラスミドを用いて *S. cerevisiae* に導入しても HM-1 耐性を付与することから、エキソンの内部に転写開始が可能な配列が存在すると推察されている。またそれは、5′末端の翻訳開始点である ATG から 3249 塩基目にあたる *Hin*dⅢ部位以降の 160 bp の領域内に存在すると考えられている。当該領域を *Hin*dⅢ部位側から段階的に欠失させ、プラスミド上でそれぞれの下流に大腸菌の *lacZ* を連結して *S. cerevisiae* に導入し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定することで転写活性を定量的に評価したところ、*Hin*dⅢ部位の下流 108 bp までの欠損で活性が大きく低下し、133 bp まで欠損させると活性が認められなくなった。この結果から、*Hin*dⅢ部位から 109 塩基目以降に転写開始点が存在する可能性が考えられたため、現在は 5′-RACE 法による転写開始点の同定を進めている。さらに、当該領域にその上流の配列を含ませて同様に評価すると、*Hin*dⅢ部位より上流には転写活性を高める配列と低める配列が存在する可能性が示された。

HKR1 of *Saccharomyces cerevisiae* is an intronless gene that confers resistance to HM-1 killer toxin to itself even when the promoterless 3′ partial sequence is introduced by using a multicopy vector, suggesting that there is a sequence in the exon that may initiate transcription. In addition, the transcription initiation site is considered to reside within the 160 bp-region around the *Hin*d Ⅲ site located 3249 nucleotides downstream the ATG, the translation initiation site at the 5′ terminus. The 160 bp-region was deleted in steps from the *Hin*dⅢ site and the *lacZ* gene of *Escherichia coli* was ligated to each deletion on a yeast centromeric plasmid, introduced into *S. cerevisiae* cells, then transcriptional activity of each clone was quantitatively evaluated by measuring beta-galactosidase activity. Deletion of 108 base pairs from the *Hin*dⅢ site resulted in a significant decrease and deletion down to the 133rd nucleotide resulted in complete loss of activity. From these results, we suppose that there is a transcription start site (TSS) after the 108th nucleotide from the *Hin*dⅢ site. We are currently using the 5′-RACE method to determine the TSS. Furthermore, the transcriptional regulation of the sequence upstream the *Hin*dⅢ is being tested as well.

Saccharomyces cerevisiae, promoter, transcription start site

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：3E2p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 E2 会場

光によって誘導できる放線菌高生産系 iLiEX システムによる有用酵素の生産
Light-inducible robust production of industrial enzymes using the iLiEX system in *Streptomyces griseus*

○渡部 あいり[1]、野谷 龍太[1]、木船 智尋[2]、佐久間 祥吾[2]、山田 理緒[2]、髙野 英晃[1,2]([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○Airi WATANABE[1], Ryuta NOYA[1], Chihiro KIBUNE[2], Shogo SAKUMA[2], Rio YAMADA[2], Hideaki TAKANO[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

我々は、前大会において放線菌 *Streptomyces griseus* に転写増幅を担う T7 RNA ポリメラーゼ(T7 RNAP)を含む iLiEX 系の導入によって、組換えタンパク質が光依存的に生産されることを報告した。本研究では、産業的に利用されている放線菌由来分泌酵素群を中心にその生産性を評価したところ、新たに 9 種類の分泌酵素の生産が確認され、ロイシンアミノペプチダーゼの生産は、暗条件下と比べて最大約 58 倍の光誘導生産が確認されたと同時に、その大量生産が認められた。また、可視性マーカーとしての蛍光タンパク(sfGEP と mScarlet)を検討したところ、寒天固体培地上における光依存的な発現が確認された。さらに、1 細胞内における環境刺激や低分子化合物によるマルチな制御を可能にするため、T7 RNAP とはプロモーター認識が異なる 20 種類のファージ由来 RNA ポリメラーゼ(vRNAP)とそれに対応するプロモーター63 種類の機能を評価したところ、新たに 7 種類の vRNAP が *S. griseus* において機能することを見出した。本研究で同定したレポーター酵素群と vRNAP をツールとして用いることによって 1 細胞内におけるマルチ制御が可能となることが見込まれる。

We previously reported a genome-integrative Light-inducible Expression (iLiEX) system that allowed *Streptomyces griseus* NBRC 13350 to produce large amounts of recombinant proteins in repose to light stimulus. In this study, we evaluated the production of nine secreted industrial. Among these, high extracellular production of leucine aminopeptidase was observed under light conditions, with 58 fold higher activity than that produced under dark conditions. Additionally, we expressed Superfolder GFP and mScarlet-I as a visible marker and confirmed the fluorescence emitted by the *S. griseus* transformant grown on a solid agar media. To enable multiplex regulation by environmental stimuli and chemical compounds in a single cell, we examined the transcriptional amplification activity of twenty phage RNA polymerases. As a result, we found that seven RNA polymerases boost transcription in *S. griseus*.

Streptomyces, LitR, recombinant protein

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E2p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 E2 会場

放線菌 *Streptomyces griseus* をホストとする光誘導型酵素生産システムの開発

Light-inducible robust protein production using a plasmid-based LiEX system in *Streptomyces griseus*

村越 恭平、野谷 龍太、○高野 英晃（日大院生資科）
Kyohei MURAKOSHI, Ryuta NOYA, ○Hideaki TAKANO (Grad. Sch. of Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

LitR はビタミン B_{12} をクロモフォアに用いる光センサー型転写調節タンパク質であり、放線菌群で広く観察される光誘導性カロテノイド生産の制御を担っている。その応用研究の過程において、LitR、シグマ因子 LitS、光誘導性プロモーターの 3 要素を高コピープラスミドに導入することによって、光誘導性遺伝子発現プラスミドの構築に成功し、pLiEX (plasmid-type Light inducible Expression) システムと命名した。本系を導入した放線菌 *Streptomyces griseus* NBRC 13350 株において、組換えタンパク質生産は細胞ストレスにならない弱い青色光から緑色光によって誘導でき、また、二次代謝やプロテアーゼ生産を一括制御する A-ファクター欠損株においても同様の高生産性が確認された。そこで、放線菌由来の産業有用酵素群 25 種を対象とした生産解析を行った結果、ラッカーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシロースイソメラーゼ、アルカリフォスファターゼ D などの高分泌生産が確認された。また、青色抗生物質アクチノロージンの生合成遺伝子クラスターをゲノムに挿入したセファマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. NBRC 13304 株において、pLiEX によってポジティブレギュレーター*actII-ORF4* を発現させることによって、アクチノロージンの光依存的な生産も確認された。

Light-inducible regulator (LitR) is a coenzyme B_{12}-based transcriptional regulator with photosensory function that controls a light-dependent carotenoid production in *Streptomyces* spp. We constructed a light-inducible high-level gene expression plasmid that consisted of *litR* , an ECF-type sigma factor *litS*, and light-inducible promoter, designated as pLiEX (plasmid-type Light inducible Expression) system. *S. griseus* transformants retaining the pLiEX system expressed high levels of recombinant proteins in response to blue to green weak light irradiation, which does not result in oxidative stress for this stain. This light-inducible high-level production was also observed in an A-factor deficient strain, which lacks the ability to produce secondary metabolites and proteases. We examined the the practical applicability of the pLiEX system by producing twenty-five industrial enzymes, confirming high-level production of laccase, transglutaminase, xylose isomerase, and alkali phosphatase.

Streptomyces, LitR, industrial enzymes

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E2p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 E2 会場

枯草菌宿主での T7 発現系を利用したタンパク質分泌生産の検討

Secretory protein production using the T7 expression systems in *Bacillus subtilis*

福原 大空、吉永 悠太、田中 智教、高橋 誉親、○広岡 和丈（福山大生命工・生物工）
Sora FUKUHARA, Yuta YOSHINAGA, Tomonori TANAKA, Takachika TAKAHASHI, ○Kazutake HIROOKA (Fukuyama Univ.)

【目的】我々が開発した枯草菌宿主でのフラボノイドやキシロースで誘導可能な T7 発現系では、各誘導型プロモーター下流に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を連結して染色体に組み込み、T7 プロモーター制御下にある目的遺伝子を保持するプラスミドを細胞内に導入している [1)]。本研究ではこれらの発現系が目的タンパク質を分泌生産させるのに有効であるかを検証した。【方法と結果】細菌のタンパク質分泌系には Sec 系と Tat 系があり、Sec 系では標的タンパク質が未フォールディング状態で分泌されるのに対し、Tat 系では分泌前にフォールディングが行われる。Sec 系で分泌される枯草菌 EglS エンドグルカナーゼの遺伝子を T7 プロモーター制御下に配してプラスミドに組み込み、各誘導型 T7 発現構築をもつ枯草菌株に導入した。キシロース誘導型では、予想に反してキシロース未添加条件の方が EglS 生産量が多くなった。フラボノイド誘導型では最大生産量は前者よりも少なかったが、非誘導条件で発現が検出されず厳密な制御が示された。Sec 系で分泌される AprE のシグナル配列を N 末端に付加して EGFP 発現を試みたが検出されなかったので、Tat 系で分泌される YwbN のシグナル配列を N 末端に付加して発現させたところ、蛍光を発する EGFP が明確に検出された。

In our T7 expression systems inducible by compounds such as flavonoids and xylose in *Bacillus subtilis*, the T7 RNA polymerase gene, controlled by each inducible promoter, is integrated into the chromosome, and a plasmid carrying the target gene under the T7 promoter control is introduced into the cell[1)]. We tested whether these expression systems are adequate for the secretory production of target proteins mediated by Sec and Tat systems. The plasmid carrying the T7 promoter-controlled gene of *B. subtilis* EglS endoglucanase, secreted by the Sec system, was introduced into the *B. subtilis* strains with respective inducible T7 expression constructs. Unexpectedly, the xylose-inducible strain produced the most EglS under the xylose-free condition. In the flavonoid-inducible strain, the maximum EglS production was less than the former; however, it showed strict regulation. Although the EGFP with the N-terminal signal sequence of AprE, secreted by the Sec system, was not expressed, the addition of the signal sequence of YwbN secreted by the Tat system to EGFP and its expression resulted in clear detection of active EGFP.

1) Koreeda A, et al. *Biosci Biotechnol Biochem* 2023;87(9):1017-1028.

Bacillus subtilis, T7 expression system, protein secretion

発表責任者：広岡和丈（hirooka@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3E2p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 E2 会場

枯草菌におけるヘリオバクテリア光合成遺伝子クラスターの導入と異種発現

Introduction and heterologous expression of heliobacterial photosynthetic gene cluster in *Bacillus subtilis*

○天野 克海[1]、浅井 智広[2]、荷村 かおり[1]、高橋 裕貴[1]、板谷 光泰[3]、朝井 計[1]、渡辺 智[1]([1]東農大生命、[2]中央大理工、[3]信州大工)
○Katsumi AMANO[1], Chihiro AZAI[2], Kaori NIMURA[1], Yuki TAKAHASHI[1], Mitsuhiro ITAYA[3], Kei ASAI[1], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Chuo Univ., [3]Shinshu Univ.)

自然形質転換能に優れた枯草菌は、長鎖 DNA の導入ホストとして利用できる。これまでに藍藻 *Synechocysits* sp. PCC 6803 のゲノムを導入した枯草菌が構築されたが（Itaya, et al., 2005）、枯草菌細胞内において光合成遺伝子をはじめとした異種遺伝子の大規模な発現は未だ達成されていない。我々は、枯草菌における異種遺伝子の大規模発現のターゲットとして、酸素非発生型光合成を行う光合成細菌ヘリオバクテリアの光合成遺伝子群（Photosynthetic Gene Cluster, 以下 PGC）に注目した。本菌は枯草菌同様にファーミキューテス門に属しており、PGC のプロモーターや SD 配列は枯草菌のコンセンサス配列によく似ていることから枯草菌における発現を期待した。段階的な形質転換により、*Heliobacterium modesticaldum* Ice1 の PGC (38 遺伝子、約 56kbp)を枯草菌 *proB* サイトに導入した。RNAseq により、PGC の発現を転写レベルで調べたところ、全遺伝子の 74%（28 遺伝子）の転写産物を検出した。一方、クロロフィル *g* 代謝酵素をコードする残りの 26%（10 遺伝子）の転写レベルは極めて低く、これらの遺伝子は枯草菌の遺伝子発現ルールに従って発現しないことが示された。本発表では、枯草菌における PGC 発現に関する我々の研究と展望について述べたい。

Bacillus subtilis has excellent natural transformation ability and can be used as a host to introduce and maintain long DNA. The longest record of this was the construction of *B. subtilis* with a genome of the cyanobacterium *Synechocysits* sp. PCC 6803 (Itaya, et al., 2005). However, functional expression of introduced foreign genes, including photosynthesis-related genes, has not yet been achieved in this organism. We focused on the photosynthetic gene cluster (PGC) of *Heliobacteria*, a photosynthetic bacterium that performs anoxygenic photosynthesis, as a target for the large-scale expression of exogenous genes in *B. subtilis*. *Heliobacteria* belongs to the phylum Firmicutes as does *B. subtilis*, and examination of the PGC sequence revealed that the promoter and SD sequences were similar to the consensus sequence of *B. subtilis*.

To express PGC functionally in *B. subtilis*, we introduced the PGC of *Heliobacterium modesticaldum* Ice1 (38 genes, about 56 kbp) into the *B. subtilis proB* site. The expression of PGC was examined at the transcriptional level by RNAseq, and it was found that 74% (28 genes) of the total genes were transcribed in these cells. On the other hand, the transcription levels of the remaining 26% (10 genes) encoding the chlorophyll *g* metabolic enzymes were extremely low, indicating that these genes were not expressed according to *B. subtilis* rules. In this presentation, we would like to discuss our research and prospects for PGC expression in *B. subtilis*.

Bacillus subtilis, Photosynthesis, Synthetic biology

発表責任者：渡辺 智（s3watana@nodai.ac.jp）

講演番号：3E3a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E3 会場

データーベースからの ATP 依存型ジアゾ化酵素の探索及び基質特異性評価
Exploration of ATP-dependent diazotases from the database and evaluation of their substrate specificities

○寧 嘉宇[1]、川合 誠司[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○Jiayu Ning[1], Seiji Kawai[1], Yohei Katsuyama[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】有用な生物活性を示すものが多い、窒素–窒素（N–N）結合含有化合物の有機合成は、一般的に難易度が高い。放線菌由来のジアゾ基含有天然物の生合成研究から、複数の亜硝酸利用型ジアゾ化酵素が同定されているが、ゲノムデータベース上には約 800 のジアゾ化酵素ホモログが存在しており、その中には既知のジアゾ化酵素よりも応用性の高いものがあると期待される。本研究では、データベースよりジアゾ化酵素を多数取得し、基質特異性や反応効率などを調べることで応用性の高い酵素を見出すことを目的とした。その酵素を用いて様々なジアゾ基含有化合物を合成し、それらの誘導体を化学合成することで N–N 結合含有化合物ライブラリーを構築することが次の目標である。
【結果・考察】データベースからジアゾ化酵素ホモログを収集し、アミノ酸配列の類似度に基づいて分類した。各グループから代表を選抜し、組換えタンパク質を調製して、様々な構造を有するアミノ基含有芳香族化合物の *in vitro* ジアゾ化反応に供し、反応液を LC-MS を用いて分析した。その結果、基質特異性が緩く、活性が高いジアゾ化酵素 Mco01_40450 を放線菌 *Microbispora corallina* のゲノムから発見した。現在、この酵素の性質の更なる解析を行うとともに、この酵素を用いて様々なジアゾ基含有芳香族化合物を合成することに取り組んでいる。

Organic synthesis of nitrogen-nitrogen (N-N) bond-containing compounds is generally difficult. Previous studies on the biosynthesis of diazo group-containing natural products in actinomycetes have led to the identification of several nitrite-utilizing diazotases. However, there are approximately 800 diazotases homologs in the genome database, and we expected some of them to be more applicable than known ones. In this study, diazotases homologs were collected from the database and classified according to their amino acid sequence similarities. Representative diazotases were selected from each class, and their recombinant proteins were prepared for the *in vitro* diazotization reactions of amino group-containing aromatic compounds with various structures, and the reaction mixtures were analyzed using LC-MS. As a result, the diazotase Mco01_40450 from the actinomycete *Microbispora corallina* was shown to have a broad substrate specificity and high activity. We are currently performing experiments to further analyze the properties of this enzyme and enzymatically synthesize various diazo group-containing compounds.

diazo, ligase, genome mining

発表責任者：勝山　陽平（aykatsuhko@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E3a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E3 会場

放線菌二時代謝における亜硝酸を用いた芳香環アミノ化酵素の機能解析

Functional analysis of enzymes that catalyze aromatic ring amination using nitrous acid in secondary metabolism of actinomycetes

○桑原 康[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○Ko KUWABARA[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

芳香環に窒素官能基を直接導入する酵素は、一酸化窒素を用いてチロシンまたはトリプトファンにニトロ基を導入するシトクロム P450 酵素（RufO, TxtE）のみが知られており、亜硝酸を用いて同様の反応を行う酵素の報告はない。Nybomycin の生合成では、3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) の 4 位にアミノ基を導入する反応が予想されているが、その機構は明らかになっていない。我々はこのアミノ基の導入に亜硝酸が用いられていると予想し、この反応を担う酵素群の解明を目指してきたが、*Streptomyces albus* を用いた異種発現実験により、nybomycin 生合成遺伝子クラスター中の 3 遺伝子（*nybN, nybO*, *nybC*）が 3-HAA と亜硝酸を用いた 2,4-diamino-3-hydroxybenzoic acid (2,4,3-DAHBA) の合成に必須であることをすでに明らかにしている。

今回、我々は NybO, NybC の組換え酵素を用いた *in vitro* 酵素反応実験を行った。その結果、(i) NybO が亜硝酸を用いて 3-HAA のジアゾ化を触媒すること、(ii) NybC がそのジアゾ基を NAD(P)H 依存的にヒドラジニル基へと還元することが明らかになった。また、2-diazo-3-hydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) を添加した培地で、*nybN*, *nybC* を導入した *S. albus* の異種発現株を培養したところ、2,4,3-DAHBA の合成が確認された。さらに、同実験で[^{15}N]ラベル化された 2,3-DHBA を用いたところ、[^{15}N]ラベル化した 2,4,3-DAHBA の合成が確認された。これらの結果から、NybN, NybC が 2,3-DHBA のジアゾ基の遠位の窒素を 4 位炭素に転移する反応を触媒することが強く示唆された。この機構を理解するために、現在 NybN の機能解析を進めている。

No enzymatic systems have been reported for the amination of aromatic rings with nitrous acid. Biosynthesis of nybomycin, streptonigrin, and diazaquinomycin has been predicted to have a common reaction: the introduction of an amino group into 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) at C-4. Comparative analysis of their biosynthetic gene clusters showed that *creE* and *creD* homologs, which are involved in the production of nitrous acid from aspartic acid, and three uncharacterized genes (*nybN*, *nybO*, and *nybC*) were conserved. Our previous heterologous expression study showed that *nybN*, *nybO*, and *nybC* from the nybomycin biosynthetic gene cluster were involved in the amination of 3-HAA using nitrous acid. In this study, we carried out an *in vitro* study of NybO and NybC and revealed that NybO and NybC catalyzed the diazotization of 3-HAA using nitrite and the reduction of the diazo group to the hydrazine moiety, respectively.

amination, biosynthesis, actinomycetes

発表責任者：桑原康（kuwabara-ko31415@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E3a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E3 会場

Alazopeptin 生合成由来 *N*-acetyl-6-diazo-5-oxo-L-norleucine 認識アデニル化酵素 AzpC の基質特異性の改変
Alteration of the substrate specificity of AzpC, an *N*-acetyl-6-diazo-5-oxo-L-norleucine- recognizing AMPylation enzyme from alazopeptin biosynthesis

○丸山 崇史[1]、三宅 恒輝[1]、川合 誠司[1]、森脇 由隆[1,2]、寺田 透[1,2]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○ Takashi MARUYAMA[1], Kouki MIYAKE[1], Seiji KAWAI[1], Yoshitaka MORIWAKI[1,2], Tohru TERADA[1,2], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Dept. of Biotech., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) は、末端ジアゾカルボニル部分が化学修飾により様々な官能基へ容易に変換できるため、化学・合成生物学の魅力的なツールである。本研究では DON を認識するアデニル化（A）ドメインを開発し、非リボソームペプチド合成酵素に組み込むことで、新規ジアゾ基含有ペプチドを合成することを目指す。その第一歩として、アラゾペプチン生合成において *N*-アセチル DON (Ac-DON) をキャリアータンパク質 (AzpF) にロードするアデニル化酵素 AzpC を DON を認識する酵素へと改変することを試みた。まず、AzpC と Ac-DON のドッキングと MD シミュレーションにより基質の結合位置を予想し、Ac-DON のアミノ基と近い位置の 4 残基を Asp または Glu に置換した AzpC 変異体を作製した。その結果、I342E が弱いながらも DON を認識することが示された。次に、I342E のランダム変異導入による活性向上を目指し、スクリーニング系の構築を試みた。このために、AzpC により AzpF に結合した DON（または Ac-DON）のジアゾ基をクリック反応により蛍光プローブでラベルし、ゲル濾過により粗精製した AzpF の蛍光強度を評価する活性評価系を考案した。まず、dibenzocyclooctyne-amine と 5-carboxyfluorescein *N*-succinimidyl ester を用いて蛍光プローブを作製した。次に、この蛍光プローブを用いることで、AzpC を異種発現させた大腸菌細胞破砕液の可溶性画分を用いた *in vitro* 反応により、AzpC の活性を評価できることを示した。現在、このアッセイ系を用いたスクリーニングにより、より活性の高い AzpC の探索を試みている。

6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) is an attractive tool in synthetic biology because its terminal diazocarbonyl moiety can be easily modified into various functional groups. In this study, we aim to develop an NRPS A domain that recognizes DON to incorporate DON into arbitrary peptides. First, we attempted to create an enzyme that recognizes DON by modifying the AMPylation enzyme AzpC. The Ac-DON binding site of AzpC was predicted by docking and MD simulations. AzpC mutants were produced by replacing one of the four residues close to the amino group of Ac-DON. As a result, I342E recognized DON. We attempted to construct a screening system to improve the activity of I342E by introducing random mutations to the I342E variant. In this system, the diazo group of DON bound to AzpF by AzpC was labelled with a fluorescent probe (dibenzocyclooctyne-5-carboxyfluorescein) by a click reaction and purified by gel filtration. Activity was evaluated based on the fluorescence intensity of AzpF. Mutagenesis and screening are ongoing.

diazo group, AMPylation, Kitasatospora

発表責任者：大西康夫（ayasuo@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E3a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 E3 会場

Streptomyces 由来 cyclopenta[*b*]pyridine 含有ポリケタイド streptazone 類生合成の *in vitro* 解析
In vitro analysis of the biosynthesis of streptazones, polyketides with a cyclopenta[*b*]pyridine ring from *Streptomyces*

○平松 太地[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Taichi HIRAMATSU[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

Streptazone 類は天然には珍しいシクロペンタ[*b*]ピリジン環を有するポリケタイドである。我々は streptazone E 生産菌 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 に着目し、その生合成遺伝子クラスター (*stz*) を同定したが、遺伝子破壊実験の結果から、新規環化酵素 StzE と StzF のヘテロダイマー (StzEF) により、6 員環にエポキシ環を持つ nigrifactin 誘導体がエポキシの開裂を伴って環化されることでシクロペンタ[*b*]ピリジン環が形成されると予想された[1]。この珍しい環構造の生合成機構をより詳細に明らかにすることを本研究の目的とした。まず、*Streptomyces abikoensis* NBRC 13860 が *stz* ホモログクラスターを有し、streptazone C を生産することを明らかにした。次に、*stz* ホモログクラスター由来ポリケタイド合成酵素 (PKS) を調製し、PKS 産物の *in vitro* 合成に成功した。現在、この PKS 産物合成系にポスト PKS 反応系を組み合わせることで streptazone 生合成の全容解明を目指している。一方、StzEF の *in vitro* 解析により、上記の nigrifactin 誘導体から 6-5 縮環構造を持つ streptazone E の誘導体と考えられる化合物が生成されることが示された。さらに、StzEF の部位特異的変異導入実験によって StzF の Cys112 と Asp114 が活性に不可欠であることが明らかになった。現在、この生成物の構造解析を進めている。

Streptazones are polyketides with a cyclopenta[*b*]pyridine ring, which is an unusual structure in nature. Previously, we focused on streptazone E-producing *Streptomyces* sp. MSC090213JE08, identified its biosynthetic gene cluster (*stz*), and reported a putative biosynthetic pathway based on gene disruption experiments [1]. It has been suggested that a nigrifactin derivative with an epoxy ring is cyclized to form a cyclopenta[*b*]pyridine ring by a novel cyclase composed of a heterodimer of StzE and StzF (StzEF). We found that *S. abikoensis* NBRC 13860 has an *stz* homolog cluster and produces streptazone C. Using recombinant polyketide synthases (PKSs) derived from the *stz* homologue cluster, we successfully synthesized a PKS reaction product *in vitro*. This analysis is ongoing to elucidate the biosynthetic mechanisms of streptazones. Furthermore, recombinant StzEF produced a streptazone E derivative with a 6-5 bicyclic ring from the nigrifactin derivative *in vitro*. Mutagenesis of StzEF revealed that Cys112 and Asp114 of StzF were essential for its activity.

[1] Ohno et al. ChemBioChem, 16, 2385–2391 (2015)

biosynthesis, polyketide, *Streptomyces*

講演番号：3E3a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E3 会場

ジアゾ基含有アミノ酸 azaserine の生合成経路の *in vitro* 解析
In vitro analysis of the biosynthetic pathway of azaserine, a diazo group-containing amino acid.
○四海 佑亮[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Yusuke SHIKAI[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

azaserine は *Streptomyces flagilis* 及び *Glycomyces harbinensis* から単離されたジアゾ基を有する天然物であり、glutamine との構造類似性から抗腫瘍活性を有する。我々は生合成機構が未知であった azaserine の生合成経路の特定・解明を目指し現在まで研究を遂行しており、2022 年度大会では異種発現による azaserine 生合成遺伝子クラスターの同定を報告した。また、*in vitro* 実験の結果から、azaserine がヒドラジノ酢酸 (HAA) を前駆体とし、AzsS、AzsP、AzsT、AzsF の働きによってキャリアータンパク質 (CP) AzsQ 上で 2-hydrazineylideneacetyl-AzsQ (HDA-AzsQ) が合成されることを合わせて報告した。その後の *in vitro* 解析により、以下のような反応経路が明らかになった [1]。3-oxoacyl 合成酵素 AzsD によって、反応経路の上流で HAA の生合成に関与する AzsN の C 末端に存在する CP ドメインに HDA-AzsQ の HDA 残基が転移する。次いで非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) AzsO の Cy ドメインによって HDA のチオエステル部分と L-Ser の水酸基との間でエステル結合が形成され、その後チオエステラーゼ AzsB によって NRPS から切り出されることで、azaserine の前駆体である HDA-Ser が合成される。NRPS の Cy ドメインによるエステル結合は報告例がなく、その反応機構を明らかにするため変異導入実験などを行い、その活性に重要な残基をいくつか同定した。現在、ジアゾ基の生合成機構を解明すべく、さらなる実験を行っている。

Azaserine is a natural product with a diazo group, isolated from *Streptomyces flagilis* and *Glycomyces harbinensis*. It has antitumor activity owing to its structural similarity to glutamine. The azaserine biosynthetic gene cluster in *S. fragilis* and the azaserine biosynthetic pathway from hydrazinoacetic acid (HAA) to 2-hydrazineylideneacetyl-AzsQ (HDA-AzsQ) synthesis were reported at the JSBBA meeting in 2022. Through further *in vitro* analysis, the main part of azaserine biosynthetic pathway was elucidated as follows. The 3-oxoacyl synthase AzsD transfers the HDA moiety of HDA-AzsQ to the C-terminal CP domain of AzsN, which is involved in HAA biosynthesis of HAA. An ester bond is then formed between HDA and the hydroxyl group of L-Ser by the Cy domain of the nonribosomal peptide synthethase (NRPS) AzsO. The thioesterase AzsB catalyzes hydrolysis to form the direct precursor of azaserine, HDA-Ser.The ester bond formation by the Cy domain of NRPS has not been reported. To elucidate the reaction mechanism, we performed mutagenesis experiments and identified several residues important for its activity. Further experiments are currently underway.

1. Shikai *et al*., ***Chem. Sci.***, 2023,**14**, 8766-8776

biosynthesis, N-N bond, nonribosomal peptide synthethase

講演番号：3E3a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E3 会場

細菌の中鎖 *Z*型イソプレニル二リン酸合成酵素の鎖長制御機構の解析
Analysis of the product chain length determination mechanism of bacterial medium-chain *Z*-isoprenyl diphosphate synthases
○阿部 透、山之内 菜央、山崎 智也、上田 大次郎、佐藤 努（新潟大院自然）
○ Tohru ABE, Nao YAMANOUCHI, TOMOYA YAMAZAKI, Daijiro UEDA, Tsutomu SATO (Niigata Univ.)

生物は普遍的に、糖の運搬に寄与する *Z,E*混合型イソプレノイド（真核生物ではドリコールと呼称）を生合成し、その炭素鎖長には生物種によって違いが見られる。*Z*型イソプレニル二リン酸合成酵素（*Z*-IDS；別名 *cis*-プレニルトランスフェラーゼ）は *Z,E* 混合型イソプレノイドの炭素鎖を生合成する酵素であり、生成物鎖長に応じて短鎖型（C_{20} 以下）・中鎖型（$C_{35\text{-}60}$ 程度）・長鎖型（C_{70} 以上）に大別される。C_{55} 鎖を合成する細菌の中鎖 *Z*-IDS において、活性部位クレフト底部のアミノ酸残基が生成物の鎖長決定に重要な役割を担うことが報告されているものの [1,2]、異なる鎖長を合成する細菌由来の中鎖 *Z*-IDS においてもほぼ同一のアミノ酸残基が保存されており、現在知られている鎖長決定機構ではそれらの間における鎖長の違いを決定する要因を説明できない。本研究では、C_{50} 鎖を生合成する結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の *Z*-IDS (Mtu*Z*-IDS)[3]と C_{35} をメインに生合成する *M. vanbaalenii* の *Z*-IDS (Mva*Z*-IDS) [4]の生成物鎖長決定機構の解明を目指した。C_{55} 鎖を生合成する大腸菌由来の *Z*-IDS (Eco*Z*-IDS)と、Mtu*Z*-IDS, Mva*Z*-IDS の間で異なるアミノ酸残基に着目した変異実験から、鎖伸長の途中段階に位置するチロシン残基が伸長方向を制御していることが示唆され、これが細菌の中鎖 *Z*-IDS 間での生成物鎖長の違いを生む一因となっていると考えられた。

Z-isoprenyl diphosphate synthases (*Z*-IDSs) produce *Z,E*-mixed isoprenoid carbon chains, responsible for the sugar transport in living organisms. *Z*-IDSs are classified into types of short (≤ C_{20}), medium ($C_{35\text{-}60}$), and long (≥C_{70}) chains based on the product chain length. In bacterial medium chain *Z*-IDS that synthesizes C_{55} chains, the amino acid residue at the bottom of the active site cleft plays an important role in determining the product chain length. However, that chain length determination mechanism cannot explain the differences in the product chain length observed among bacterial medium-chain *Z*-IDSs. In this study, we performed the mutation analysis focusing on different amino acid residues between three bacterial medium-chain *Z*-IDSs, which are produces C_{55}, C_{50}, and C_{35}, respectively. The results suggest that amino acid residues located at intermediate steps of chain elongation control the direction of chain elongation, which may contribute to the differences in product chain length among bacterial medium-chain *Z*-IDS.

1) Y. Kharel *et al.*, *FEBS J.*, 273, 647-657, 2006. 2) T. P. Ko *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 47474-47482, 2001.
3) W. Wang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 381, 129–140, 2008. 3) T. Abe *et al.*, *ChemBioChem*, 21, 2931-2938, 2020.

isoprenoid, biosynthesis, enzyme

発表責任者：佐藤　努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3E3a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E3 会場

非末端環化型トリ/セスクアテルペン環化酵素の同定

Identification of non-terminal cyclizing tri/sesquarterpene cyclase

○上田 大次郎[1]、鈴木 和佳奈[1]、寒河江 侑加[1]、井上 真央[1]、品田 哲郎[2]、佐藤 努[1] ([1]新潟大農、[2]阪公大理)

○DAIJIRO UEDA[1], WAKANA SUZUKI[1], YUKA SAGAE[1], MAO INOUE[1], TETSURO SHINADA[2], TSUTOMU SATO[1] ([1]The Univ. of Niigata, [2]The Univ. of Osaka Metropolitan)

我々は、*Bacillus megaterium* 由来二機能性テルペン環化酵素（BmeTC）を発見し、この酵素を用いて希少有用化合物である ambrein の酵素合成に成功した[1)]。Ambrein の収率向上を目的に部位特異的変異実験が行われ、D373C 変異体が 1 つの酵素でスクアレンから ambrein を 1 段階で合成することに成功した[2)]。そこで、1 酵素でのアンブレイン合成の収率を上げるため、配列同一性 40～50 %の他菌種の TC ホモログ酵素の DXDD モチーフの 3 番目の Asp 残基を Cys 残基に置換し、スクアレンとの反応性を解析した。その中で、テルペン環化酵素（TC1）の野生型と D381C 変異体において、BmeTC^{D373C} 反応物とは構造が異なる 2 種類の生成物が得られた。また、BmeTC の本来の基質であるセスクアテルペン（C_{35}）、テトラプレニル-β-クルクメン（TBC）を基質としてとりこみ、1 種の生成物が得られた。これらの化合物は基質の中間部分に環状骨格をもつ新規のテルペノイドであることが明らかになった。本研究において、非末端から環化を開始するトリ/セスクアテルペン環化酵素を初めて同定した 。TC1 は非末端から環化を行うため、既知の環化酵素とは異なるユニークな立体構造を持っていることが考えられる。すでに我々が明らかにした BmeTC の基質アナログ結合型の結晶構造と TC1 の基質結合型の予測構造を比較した。TC1 では反応開始部位近傍に特有の空間が存在し、BmeTC とは異なる基質結合様式を示した。BmeTC ではサイズの大きなアミノ酸残基になっている領域が TC1 ではサイズの小さなアミノ酸残基で置換されており、この部分配列が TC1 に特有の空間を形成し、非末端環化物の生成に関与していることを予想している。 TC1 の触媒機構が明らかになることで、新規テルペノイドの探索や創出に繋がることが期待される。

文献１）Ueda D. *et al, J. Am. Chem. Soc.* 135, 18335, 2013.　２）Yamabe Y. *et al., Sci. Rep.*, 10, 19643, 2020.

We have discovered a bifunctional terpene cyclase (BmeTC) from *Bacillus megaterium*, which was also successfully used for the enzymatic synthesis of ambrein[1)]. A BmeTC D373C mutant synthesized ambrein from squalene in a single step[2)]. In order to increase the yield of ambrein synthesis in one enzyme, the third Asp residue of the DXDD motif of the TC homologs of other bacterial species with 40-50 % sequence identity was replaced with a Cys residue, and its reactivity with squalene was analyzed. Among them, two products were obtained in the wild type and the D381C mutant of terpene cyclase (TC1), which were structurally different from the BmeTC^{D373C} products. In addition, a product was formed from C_{35} tetraprenyl-β-curcumene substrate, by TC1. These compounds were novel terpenoids. In this study, we identified for the first time a tri/sesquaterpene cyclase that initiates cyclization from the non-terminal end. TC1 cyclizes from the non-terminal end and may have a unique conformation different from known cyclases. The crystal structure of BmeTC with the substrate analog and the predicted structure of the substrate-binding form of TC1 were compared. It was found that the substrate-binding mode of TC1 is different from that of BmeTC due to the presence of a unique space near the reaction initiation site. The clarification of the catalytic mechanism of TC1 is expected to lead to the discovery and creation of new terpenoids.

terpenoids, terpene cyclase, isoprenoids

発表責任者：佐藤　努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3E3a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E3 会場

昆虫由来新規テルペン合成酵素の生成物の構造と諸性質の解析

Characterizaion of a novel terpene synthase from insects

○柴 逸、上田 大次郎、冨士川 成美、佐藤 努（新大院農）
○ITU SAI, DAIJIRO UEDA, NARUMI FUJIKAWA, TSUTOMU SATO (The Univ. of Niigata)

植物や微生物のテルペン生合成では、イソプレニル二リン酸合成酵素(IDS)が伸長反応、テルペン合成酵素(TPS)が環化反応等の炭素骨格形成を担っており、お互いの酵素に配列類似性はない。一方、昆虫では両反応ともに IDS ホモログが触媒し、環化反応を行う酵素は IDS-type TPS と呼ばれている。我々は、昆虫の IDS ホモログにおける伸長反応と環化反応の触媒機能の違いを解明するため、研究を開始した。また、昆虫は様々なテルペンをフェロモンとして利用していることから、IDS-type TPS 特異的なモチーフを同定できれば効率的なゲノムマイニングによる新規テルペンの発見につながると考えられる。将来的にはフェロモン農薬の生物生産への応用を見据えている。

ハムシ *Phyllotreta striolata* 由来 5 種類の IDS-type TPS（*Ps*TPS1-5）の機能解析が報告されている[1)]。その中で *Ps*TPS2 の主生成物は同定されていなかったが、今回、それを単離し、構造を決定した。また、*Ps*TPS2 の諸性質（温度、pH、金属イオン、速度論定数など）など最適な反応条件を解析し、既報[1)] の条件よりも活性を 4.1 倍に向上させることに成功した。IDS-type TPS の詳細な諸性質の報告例はなく、今回はじめて明らかにできた。

１）F. Beran, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2016**, 113(11), 2922–2927.

In terpene biosynthesis in plants and microorganisms, isoprenyl diphosphate synthase (IDS) and terpene synthase (TPS) are responsible for elongation reactions and carbon skeleton formation including cyclization reactions, respectively. And there is no sequence similarity between them. In contrast, in insects, both reactions are catalyzed by only IDS homologs, and the enzyme catalyzing the cyclization reaction is called IDS-type TPS. We began research to elucidate differences in the catalytic functions of elongation and cyclization reactions in insect IDS homologs. Since insects use various terpenes as pheromones, the identification of IDS-type TPS specific motifs would lead to the discovery of novel terpenes through efficient genome mining. In the future, we plan to develop biological production of pheromone pesticides. Functional analysis of five IDS-type TPSs (PsTPS1-5) from the crucifer flea beetle *Phyllotreta striolata* has been reported[1)]. The main product of PsTPS2 had not been identified among them, but this study has isolated it and determined its structure. The optimal reaction conditions, including various characters of PsTPS2 (temperature, pH, metal ions, kinetic constants, etc.), were analyzed, and the activity was successfully increased by 4.1-fold compared to previously reported conditions[1)]. The detailed characterizations of IDS-type TPS have never been reported.

terpene, insects, isoprenoids

発表責任者：佐藤　努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3E3a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 E3 会場

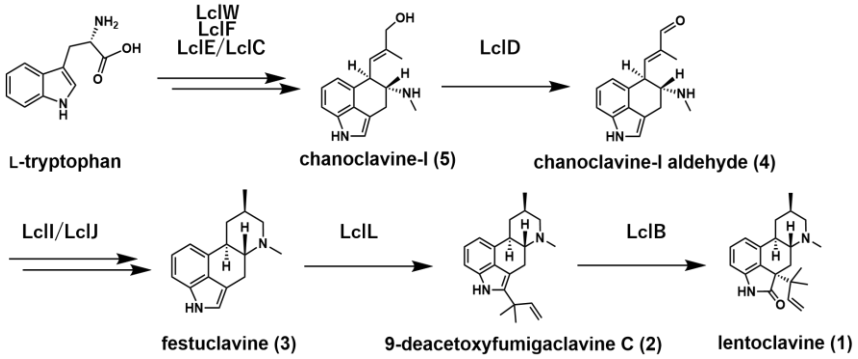
糸状菌 *Aspergillus lentulus* 由来の新規天然物 lentoclavine の生合成研究

Biosynthesis of lentoclavine, a novel ergot alkaloid produced by *Aspergillus lentulus*

○鈴木 亮大、永井 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○ Ryota SUZUKI, Takumi NAGAI, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (The Univ. of Shizuoka)

2005 年にヒト検体から分離された *Aspergillus lentulus* は多数の新規生合成遺伝子クラスター(BGC)を有していることが見出されている。本真菌が持つ新規 BGC の内、*lcl* クラスターは麦角アルカロイド生合成における共通中間体の生合成遺伝子を含んでいるものの、それ以外の構成遺伝子が他の麦角アルカロイド生合成の BGC と異なっていた。そこで、新規骨格を有する麦角アルカロイドの探索を目的として研究に着手した。

lcl クラスターにおいて生合成初期段階を担うと予想された遺伝子 *lclW* をノックアウトし、LC-MS 分析により分子式 $C_{21}H_{28}N_2O$ を示す化合物 **1** の生産消失が確認された。NMR スペクトル解析によって、**1** は既知化合物とは異なる位置にプレニル基が転移した新規天然物であることが明らかとなり、NOESY 相関およびカップリング定数の値から相対立体配置を解析し、**1** を lentoclavine と命名した。**1** の興味深い生合成経路の一端の解明を目的とし、さらなる研究に取り組んだ。



Aspergillus lentulus isolated from clinical speciments in 2005, was found to possess a number of novel biosynthetic gene clusters (BGCs). Among them, a BGC named *lcl* cluster contains biosynthetic genes for chanoclavine-l-aldehtde, a common intermediate in the biosynthesis of ergot alkaloids, whereas tailoring genes are different from those of other ergot alkaloids. To identify the product of *lcl* cluster, metabolites of *lclW*-deleticn mutant were compared with those of wild-type, indicating compound **1** with molecular formula of $C_{21}H_{28}N_2O$ is related to *lcl* cluster.

NMR spectroscopic analysis revealed that **1** is a novel natural product with a prenyl group transferred to a different position from that of the known compound. The relative stereochemistry was determinedbased on NOESY correlations and coupling constant values, and **1** was named lentoclavine. Furthermore, we revealed some parts of the interesting biosynthetic pathway of **1**.

biosynthesis, ergot alkaloid, filamentous fungus

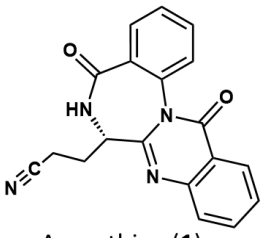
講演番号：3E3a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E3 会場

真菌由来ニトリル基含有化合物 auranthine の生合成研究

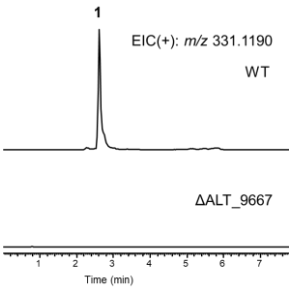
Biosynthetic studies on auranthine, a nitrile-based compound from fungi

○田村 翼、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○TSUBASA TAMURA, Shinji Kishimoto, Kenji Watanabe (The Univ. of Shizuoka)

Auranthine (**1**)は 1986 年に *Penicillium aurantiogriseum* から単離された真菌二次代謝物である [1]が、2018 年に構造訂正がなされてプロパンニトリル基を有していることが分かった [2]。今までニトリル基は植物やバクテリアでの生合成されている例が報告されているが、真菌での報告例はない。そこで真菌におけるニトリル基の生合成を明らかにするべく **1** の生合成機構の解明を行うことにした。**1** は *P. aurantiogriseum* 以外に *Aspergillus lentulus* と *Aspergillus fumigatiaffinis* から報告されている [3]ことから、これらの 3 つの種において保存されている NRPS を探索したところ、いずれも NRPS に隣接して arginosuccinate synthase に類似した遺伝子が存在するクラスターを発見した。ラベル化実験から **1** にはグルタミンが取り込まれることが報告されている [4]ことを合わせて考えると、argininosuccinate synthase によるカルボニルの活性化でアミドが脱水してニトリルが生じることが予想された。そこでこの arginosuccinate synthase に相当する *A. lentulus* の遺伝子 ALT_9667 を *A. lentulus* の相同組み換えによりノックアウトし、**1** の生産確認をしたところ **1** の生産が消失していることが分かった。



Auranthine (**1**)



Auranthine (**1**) is a fungal secondary metabolite isolated from *Penicillium aurantiogriseum* in 1986, and was found to possess a propanenitrile group in 2018. Although biosynthesis of nitrile groups in plants and bacteria have been reported, there have been no reports on fungal biosynthesis of nitrile group. Therefore, we decided to elucidate the biosynthetic mechanism of nitrile groups in **1**. *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatiaffinis* were also reported to produce **1** [3], since we searched for conserved NRPSs in these three species and found a cluster containing NRPS and arginosuccinate synthase genes. Considering that glutamine was reported to be incorporated into **1** based on labeling experiments[4], the activation of the carbonyl by argininosuccinate synthase was expected to dehydrate the amide to produce nitrile. To prove this idea, arginosuccinate synthase gene ALT_9667 was knocked out in *A. lentulus*, resulting in loss of production of **1**.

Auranthine, Propanenitrile, argininosuccinate synthase

講演番号：3E3a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 E3 会場

コリバクチン生産菌の検出除菌による大腸がん予防法の確立

Establishment of a colorectal cancer prevention method by detection and eradication of colibactin-producing bacteria

○小林 裕輝[1]、新貝 龍旦[1]、吉岡 泰淳[2]、三好 規之[2]、永翁 一代[1]、佐藤 道大[1]、渡辺 賢二[1]([1]静岡県大薬、[2]静岡県大食)
○Yuki KOBAYASHI[1], Tatsuaki SHINGAI[1], Yasukiyo YOSHIOKA[2], Noriyuki MIYOSHI[2], Kazuyo NAGAOSA[1], Michio SATO[1], Kenji WATANABE[1] ([1]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [2]Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka)

腸内細菌叢を構成する一部の細菌が生産するコリバクチンは、哺乳類細胞の DNA 二重鎖切断を引き起こす遺伝毒性物質であり、大腸がん原因物質と考えられている。コリバクチンは、最近その化学構造が明らかにされ、また、コリバクチンが大腸がん原因物質である実験事実が多数得られている。我々は、コリバクチンによる発がんの予防という観点から、コリバクチンおよびその生産菌の簡便かつ迅速な検出方法の開発に取り組んできた。そこで今回、コリバクチン産生菌の高速・高感度・高精度検出を可能とするモノクローナル抗体の作製を目指した。抗体の作製には、当研究室で見出したコリバクチン高生産大腸菌（*E. coli*-50）とコリバクチン非生産菌を用いた。その結果、コリバクチン生産菌特異的なモノクロ―ナル抗体の作製に成功した。得られた抗体を用いて、*E. coli*-50 の細胞ライセートに対してウエスタンブロッティングを行ったところ、ラダー状のバンドパターンが得られた。このバンドパターンから抗体のエピトープは大腸菌の O 抗原であることが示唆された。O 抗原はリポ多糖であり、脂質ユニットおよび糖鎖ユニットから構成される。競合的 ELISA 実験により、得られた抗体は、糖鎖ユニットを認識していることが明らかとなった。現在、O 抗原の糖鎖ユニットの精製を行い、その化学構造の解明を進めている。本講演では、抗体の作製およびエピトープの糖鎖ユニットの化学構造について報告する。

Colibactin, produced by some bacteria in the intestinal flora, is a genotoxic metabolite that causes DNA double-strand breaks in mammalian cells and is considered a causative agent of colorectal cancer. We have been working on developing a simple and rapid detection method for colibactin and its producing bacteria, to prevent carcinogenesis caused by colibactin. Therefore, we aimed to create a monoclonal antibody that would enable rapid, sensitive, and highly accurate detection of colibactin-producing bacteria. We used a high colibactin-producing *Escherichia coli* (*E. coli*-50) and a non-colibactin-producing strain discovered in our laboratory. As a result, we succeeded in producing a monoclonal antibody specific to colibactin-producing bacteria. Western blotting of *E. coli*-50 cell lysate with the obtained antibody showed a ladder-like band pattern. This band pattern suggested that the epitope of the antibody was the O antigen of *E. coli*. Competitive ELISA experiments revealed that the antibody recognized the sugar chain unit. Currently, we are purifying the sugar chain unit of O antigen and elucidating its chemical structure.

Colibactin, E. coli-50, O antigen

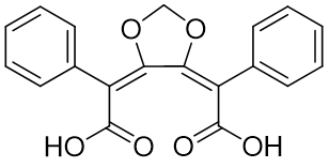
講演番号：3E3a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 E3 会場

カキシメジの有毒成分ウスタル酸の生合成研究

Biosynthetic of ustalic acid, a toxin produced by *Tricholoma kakishimeji*

○増山 侑哉、青木 聡樹、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○ Yuya Masuyama, Satoki Aoki, Shinji Kishimoto, Kenji Watanabe (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

カキシメジ（*Tricholoma kakishimeji*）は，キシメジ科キシメジ属の菌根性の毒キノコであり，本種の下痢誘発物質として子実体からウスタル酸（**1**）が報告されているが，本化合物について生合成経路は明らかになっていない。一般にキノコの二次代謝産物生合成遺伝子の多くは菌糸体において休眠状態であるものの，菌株によっては菌糸体で生産が認められるケースもある。そこで，**1** の生合成経路を培養菌糸において解明するべく研究を開始した。



ウスタル酸（**1**）

NITE バイオテクノロジーセンター（NBRC）より購入したカキシメジ類 5 株の菌糸について， PDB 培地に植菌して培養し， **1** 標品との比較による LCMS 分析を行ったところ，5 株全ての培養株において標品との保持時間の一致するプロダクトイオン *m*/*z* 219.0814（$C_{18}H_{13}O_4^-$, RT:4.99min）および分子イオン *m*/*z* 337.0712（$C_{18}H_{15}O_6^-$, RT:4.99min）を見出し，培養菌糸おける微量の **1** の産生を確認した。続いて， **1** の生産量の多い株について，ゲノム解析を行い， **1** の生合成遺伝子候補を見出した。現在，候補遺伝子の機能解析を進めている。

Tricholoma kakishimeji is a mycorrhizal poisonous mushroom causing food poisoning in Japan. Although ustalic acid (**1**) was isolated from the fruiting bodies of this species as a diarrehea-including substance, the biosynthetic pathway of **1** has not been clarified. In general, most of the secondary metabolites of mushrooms are produced in the fruiting body and not in the mycelium. However, some strains of mushrooms are found to produce secondary metabolites in the mycelium form. Therefore, we started research to elucidate the biosynthetic pathway of **1** using mycelia of *T. kakishimeji*.

Five strains of *T. kakishimeji* from NBRC were inoculated in PDB medium and cultured. LCMS analysis of both mycelia and medium of five strains showed both the product ion *m*/*z* 219.0814 ($C_{18}H_{13}O_4^-$, RT:4.99min) and the molecular ion *m*/*z* 337.0712 ($C_{18}H_{15}O_6^-$, RT:4.99min), indicating the production of a small amount of **1** in the cultured mycelium. Then, genome analisis of the strain with the highest production of **1** unveiled candidate genes for the biosynthesis of **1**.

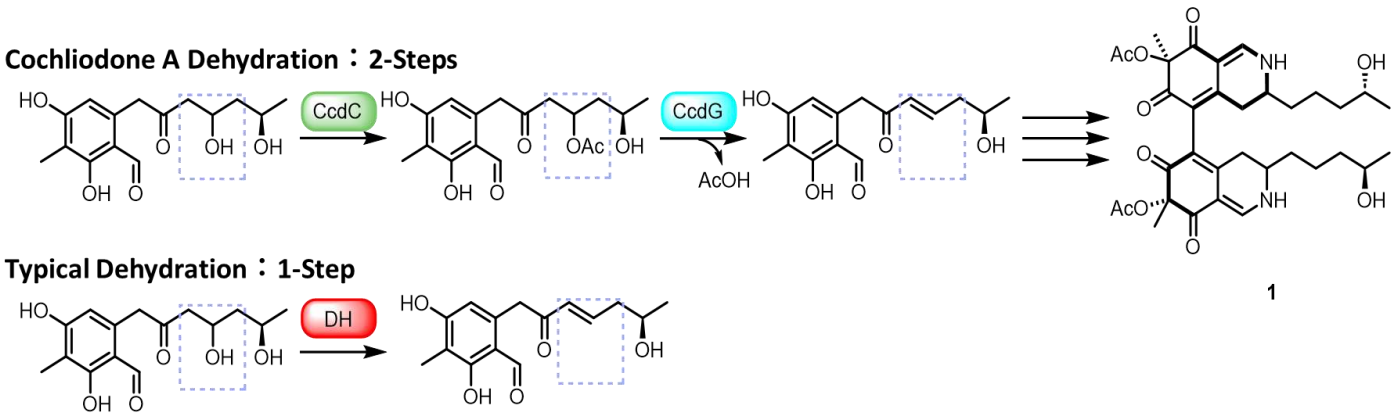
biosynthesis, mushrooms, ustalic acid

発表責任者：増山侑哉（m21040@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3E3a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 E3 会場

Uncovering the reaction mechanism of unique dehydration in cochliodone biosynthesis
○Christopher Sarmales-Murga, Motoki Kosaka, Michio Sato, Kenji Watanabe (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

In the realm of polyketide biosynthetic pathways, a typical dehydration mechanism, which is the oxidation of an alcohol group, is conducted by a single dehydratase domain (DH). In terms of the biosynthetic pathway of cochliodone A (**1**), it has been proposed that the dehydration mechanism is conducted by two proteins, CcdC and CcdG, instead of a single DH. This mechanism is unique as this approach to dehydration is rarely, if at all, seen in nature as it would be much simpler for an organism to employ a single protein instead of two. Here we show the unique mechanism where the alcohol functional group is replaced by an acetate functional group *via* CcdC and acetyl-CoA, which is then eliminated to generate a double bond in its place by CcdG. These findings are important as both proteins CcdC and CcdG with their unique properties, could be engineered to be more promiscuous, reacting with many more substrates to create novel therapeutics & compounds.



Cochliodone A, Biosynthesis, Unique dehydration mechanism

講演番号：3E3a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 E3 会場

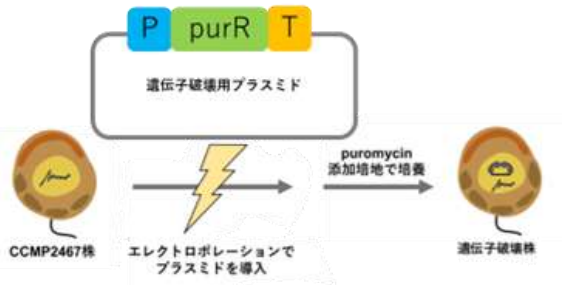
遺伝子破壊法による渦鞭毛藻由来 SCCM 生合成遺伝子の解明

Determination of the SCCM biosynthetic genes in dinoflagellate by genetic engineering

○本田 雅人[1]、安藤 知佳[2]、北 将樹[2]、恒松 雄太[2] ([1]名大農、[2]名大院生命農)
○Masato HONDA[1], Chika ANDO[2], Masaki KITA[2], Yuta TSUNEMATSU[2] ([1]School of Agr. Sci. of Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ.)

近年、ゲノム解析や酵素機能解明の研究方法論が確立されたことで、バクテリアや真菌、植物などに由来する生合成遺伝子の発見、生合成酵素機能解明が報告されてきた。その一方で、渦鞭毛藻に由来するポリケチド様化合物 SCCM (Super-Carbon-Chain Molecules) 生合成遺伝子については未だに実験的証明がされていない。本研究では、ポリケチド合成酵素が SCCM 生合成に関与すると予想し、渦鞭毛藻ゲノム中のモジュラー型 PKS (Polyketide Synthase) 様遺伝子を破壊し、遺伝子破壊株の SCCM 生産能を評価することで、SCCM 生合成遺伝子を証明することを目的とした。

まず、*Symbiodinium microadriaticum* CCMP2467 株のゲノム中の高発現プロモーターおよびターミネーター配列をもとに薬剤選択カセットを発現するプラスミドを作製し、それをエレクトロポレーション法により導入し、CCMP2467 株の形質転換を行った。また、標的遺伝子に相同的な配列を用いてノックアウト用プラスミドを作製し、同様の手順で遺伝子破壊株を作製した。今後、SCCM 合成遺伝子破壊株の SCCM 生産能の消失をメタボロミクス解析により確認し、SCCM 生合成遺伝子を同定する。



Advancement of genomic sequencing technology has enabled the discovery of natural products biosynthetic genes derived from bacteria, fungi, and plants. On the other hand, the biosynthesis genes of polyketide-like compounds, SCCMs (Super-Carbon-Chain Molecules) produced by dinoflagellates are not yet clear. This study aimed to elucidate SCCM biosynthesis genes in dinoflagellate using genetic engineering.

First, a plasmid expressing a drug selection cassette (puromycin resistant) was constructed using the highly expressing promoter and terminator sequences presented in the genome of *Symbiodinium microadriaticum* CCMP2467. The dinoflagellate cells were transformed with the plasmid by electroporation and selected in a puromycin-containing medium. Using this procedure, we successfully obtained puromycin-resistant strains. This presentation will discuss our challenge to knockout a target gene in dinoflagellate.

dinoflagellate, polyketide synthase, transformation

講演番号：3E3p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E3 会場

抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成解析

Biosynthetic Study of Antitumor Antibiotic Mitomycins

○高橋 佑大[1]、角田 毅[2]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Yudai TAKAHASHI[1], Takeshi TSUNODA[2], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

マイトマイシンは、放線菌 *Streptomyces ardus* が生産する抗腫瘍抗生物質であり、ベンゾキノンにピロリジジン縮環したミトサン骨格を持つ。その生合成について、標識実験から 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) と glucosamine を前駆体とすることが示されていたが、ミトサン骨格の形成機構は不明である。我々は最近、組換え酵素を用いた in vitro 実験で AHBA が MitE (アシル CoA リガーゼ) によって MmcB (アシルキャリアタンパク質) にロードされた後、糖転移酵素 MitB による *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) の付加で GlcNAc-AHBA-MmcB が生合成されることを見出した[1]。しかし、遺伝子クラスター中には機能未知遺伝子が多数存在するため、続く生合成反応を組換え酵素を用いた in vitro 実験で解析するのは現実的ではない。そこで本研究では、大腸菌を宿主にミトサン骨格形成反応を逐次 in vivo で再構築することを目指した。His-tag 融合 *mmcB* 遺伝子を *mitB*、*mitE* 遺伝子と共発現させた大腸菌に AHBA を添加して培養したところ、GlcNAc-AHBA-MmcB の生産が確認された。また、*mitB* 遺伝子の下流に存在する *mitC* (脱アセチル化) の追加発現で GlcN-AHBA-MmcB が生成したことから MitB に続く反応は MitC が担うことが明らかとなった。現在、次の反応に関与すると予想される遺伝子を追加導入し生成物の解析を行っている。

Mitomycins are antitumor antibiotics that have unique structure containing benzoquinone, pyrorizidine, and aziridine rings. Despite long clinical history of mitomycin C, the biosynthesis of mitomycins remains unknown. Previously, we elucidated the early stage mitomycin biosynthesis with in vitro experiments and showed that 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) was first loaded onto MmcB (acyl carrier protein) by MitE (acyl CoA ligase) to yield AHBA-MmcB. MitB then catalyzed the glycosylation of AHBA-MmcB with UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc).[1)] In the present study, we reconstituted the biosynthesis of mitomycins in *Escherichia coli* and analyzed the biosynthetic intermediate by LC-MS. When the cells, in which His-tagged *mmcB* was coexpressed with *mitE* and *mitB*, was cultivated in the presence of AHBA, the production of GlcNAc-AHBA-MmcB was observed. Additional coexpression of *mitC* yielded GlcN-AHBA-MmcB, suggesting that MitC catalyzed deacetylation of the MitB product. We are currently investigating the following reaction step by coexpression of additional genes.

[Reference]

1) Y. Ogasawara, Y. Nakagawa, C. Maruyama, Y. Hamano, T. Dairi. *Bioorg*. *Med*. *Chem*. *Lett*. **2019**, *29*, 2076.

biosynthesis, antitumor antibiotics, in vivo reconstitution

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E3 会場

イソキサゾリン構造を有するアシビシンの生合成解析

Biosynthesis of Isoxazoline Containing Natural Product

○布田 大志[1]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Taishi FUDA[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

放線菌 *Streptomyces sviceus* から単離されたアシビシンと 4-ヒドロキシアシビシンは、天然物としては珍しいイソオキサゾリン構造を有する抗生物質であり、γ-グルタミルトランスペプチダーゼを強力に阻害する[1)]。その生合成について、標識実験からオルニチンを前駆体とすることが示されているが、イソオキサゾリン骨格の構築に関与する遺伝子や酵素の報告はない。

本研究ではアシビシンの生合成遺伝子クラスターの同定と生合成経路の解明を目的とした。初めに、*S. sviceus* を 11 種類の培地で培養し LC-MS で分析した結果、4-ヒドロキシアシビシンの生産が確認された。そこで、4-ヒドロキシアシビシンの生産を指標に遺伝子破壊実験によるクラスターの同定を試みた。アシビシン類は構造に塩素原子を含んでいることから、ハロゲン化酵素の相同遺伝子を生産菌のドラフトゲノムに探索した結果、候補の遺伝子クラスターが 4 つ見出された。また、相同組換えによりそれぞれのハロゲン化酵素遺伝子を破壊した結果、1 つで 4-ヒドロキシアシビシンの生産が消失したことから、本遺伝子を含むクラスターがアシビシンの生合成に関与することが示唆された。現在、クラスター中のハロゲン化酵素以外の遺伝子の破壊実験による解析を行っている。

Acivicin and 4-hydroxyacivicin, isoxazoline containing natural products isolated from the *Streptomyces sviceus*, are potent inhibitor of γ-glutamyltranspeptidase.[1)] Although feeding experiments demonstrated that ornithine was the biosynthetic precursor, genes and enzymes responsible for their biosynthesis, especially how isoxazoline ring was formed, remains unclear. Here, we report identification of the biosynthetic gene cluster.

Because acivicins contained a chlorine atom in the structures, we searched for halogenase genes from a draft genome of the producer and identified four candidates. We then carried out gene knock out experiments by homologous recombination of each candidate and showed that one of mutants diminished the production of acivicins.

[Reference]
1) D.G. Martin et al. *J. Antibiot*. **1981**, *34*, 459.

biosynthesis, amino acid, isoxazoline

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E3 会場

ヒドラジド含有型天然物の生合成に関する研究

Studies on biosynthesis of hydrazide-containing natural product

○西田 壮吾[1]、成冨 駿[1]、小倉 勇輝[1]、山崎 陽香[1]、角田 毅[2]、勝山 陽平[3,4]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工、[3]東大院農生科応生工、[4]東大・微生物イノベ連携機構)
○Sogo NISHIDA[1], Shun NARUTOMI[1], Yuki OGURA[1], Haruka YAMAZAKI[1], Takeshi TSUNODA[2], Yohei KATSUYAMA[3,4], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [4]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

ヒドラジド構造 (-N-N-(C=O)-) を有する天然物は有用な生物活性を持つものが多く、それら天然物の生合成の理解は学術上、産業上有用である。N-N 結合形成反応については、s56-p1 生合成に見出され Spb38/39/40 によりヒドラジノ酢酸が形成される機構と、cremeomycin 生合成に見出された CreE/D 酵素により生じた亜硝酸とアミノ基を中間体とし、ATP 依存的にジアゾ基を形成する機構の２種類が知られている[1)]。しかし、ヒドラジド構造の形成機構についてはほとんど知見がない。そこで本研究では、放線菌由来のヒドラジド天然物 (**1**) に着目した。生産菌のドラフトゲノムには *cre*E/D のホモログに加えて *spb*38/39/40 のホモログも存在していたため、それぞれのホモログ遺伝子を in frame で破壊した。その結果 *creE/D* 破壊株でのみ **1** の生産が停止したことから *creE/D* ホモログが **1** の生産に関与していることが示唆された。また、*cre*E/D ホモログ周辺には、機能未知の遺伝子が多数存在したことから、**1** のヒドラジドは新たな機構で生合成されると推定された。

Hydrazide (-N-N-(C=O)-) structure is rare in natural products and most of hydrazide-containing natural products exhibited potent and interesting bioactivities. Thus, insight into the biosynthesis of hydrazine-containing natural products is highly important in both scientific and industrial aspects. Two mechanisms to biosynthesize N-N bond have been identified to date.[1)] One involves the formation of hydrazinoacetic acid by Spb38/39/40 identified in s56-p1 biosynthesis, and the other involves ATP-dependent N-N bond formation from amino acid and nitrite generated by CreD/CreE in cremeomycin biosynthesis. However, biosynthesis of hydrazide moiety is largely unknown.

In this study, we investigated the biosynthesis of a hydrazine-containing natural product (**1**) produced by a *Streptomyces* strain. Since the draft genome analysis indicated that **1** producer possesses both *cre*E/D and *spb*38/39/40 homologs in the chromosome, we individually knocked out these genes and found out that the mutant of the *cre*E/D homologs abolished the productivity of **1**.

[Reference]
1) Y. Katsuyama and K. Matsuda *Curr. Opin. Chem. Biol*. **2020**, *59*, 62.

biosynthesis, hydrazide, natural products

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E3 会場

ゲノムマイニングによる新規 GTP シクロヒドロラーゼの同定
Identification of Novel GTP Cyclohydrolase with Genome Mining

○梅澤 朱理[1]、角田 毅[2]、新宅 一平[1]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Akari UMEZAWA[1], Takeshi TSUNODA[2], Ippei SHINTAKU[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

GTP シクロヒドロラーゼ (GCH) はプテリン類補酵素を生合成する経路の初発反応を担う酵素であり、相同酵素が植物毒素トキソフラビンなどの二次代謝産物の生合成にも関与することが知られている[1)]。GCH は、いずれも GTP を基質とするが、生成物の違いから I～IV 型の 4 つのタイプに分けられている。我々は、GCH が新規二次代謝産物探索のための良いクエリになると考え、公共のゲノム配列データベースに GCH のオーソログを検索し、これらを対象に近隣結合法による系統解析を行ったところ、7,8-dihydroneopterin triphosphate を生合成する I 型 GCH と配列相同性を示すが既知酵素の存在しないクレードがあることを見出した。このクレードに属する推定新規 GCH について、組換え酵素を用いた in vitro で機能解析を行った結果、GTP を基質として分子量 141 の生成物を与えた。これは既知の GCH 反応生成物のいずれとも一致せず、既知の GCH とは全く異なる新たな反応を触媒することが示唆された。今後、本 GCH の反応生成物の解析を行うとともに、遺伝子破壊実験による関連天然物の同定を行う予定である。

GTP cyclohydrolase (GCH) is a first committed step to biosynthesize pterin cofactors, and GCHs also participates in the biosynthesis of some secondary metabolites. Although all the GCH are known to use GTP as the substrate, four types of GCHs (types I–IV) depending on the product structure have been identified. Since there are few examples of GCHs involved in secondary metabolite biosynthesis,[1)] we explored the GCH-related secondary metabolites using genome mining. We searched for GCH orthologs from the genome database of actinomycetes and generated a phylogenetic tree with Neighbor-Joining method. We found a clade containing no characterized enzymes and recombinant enzyme of one of the genes was prepared and used for in vitro analysis. LC-MS analysis revealed the formation of a product with a molecular weight of 141 using GTP as the substrate. This molecular weight was different from any of the known GCH products, indicating that the gene encoded novel type of GCHs. Currently, we are analyzing the reaction products and will identify the corresponding natural products by gene disruption experiments.

[Reference]
1) B. Philmus, *et al. ChemBioChem*, **2015**, *16*, 1782.

genome mining, GTP cyclohydrolase, biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E3 会場

プロテアソーム阻害剤の生合成研究

Biosynthetic Study of Proteasome Inhibitor

○角田 毅[1]、古村 淳吉[2]、山崎 陽香[2]、小笠原 泰志[1]、大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]北大院総化)
○Takeshi TSUNODA[1], Shunkichi FURUMURA[2], Haruka YAMAZAKI[2], Yasushi OGASAWARA[1], Tohru DAIRI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ.)

ラクタシスチン (LA) は大村らによって 1991 年に *Streptomyces lactacystinicus* の培養液から単離されたプロテアソーム阻害剤であり [1)]、現在では生化学用試薬として広く使用されている。LA の化学構造に着目すると、自然界には珍しい高度に置換された γ-ラクタム環であるα,α-二置換アミノ酸を有している。その生成機構を明らかにするために、これまでに安定同位体を用いた生産菌への取り込み実験が行われており、ロイシンの 2 位、イソブチル酸の 1 位炭素が γ-ラクタム環部位に取り込まれることがわかっている [2)]。しかし、生合成酵素や遺伝子に関する情報はない。そこで本研究では LA 生合成を遺伝子、酵素レベルで明らかにすることを目的とした。

LA の化学構造から、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) とポリケタイド合成酵素 (PKS) の関与が推定されたことから、*S. lactacystinicus* のドラフトゲノム配列を決定し、両酵素をコードする遺伝子を共に含む領域を探索した。その結果、PKS-NRPS hybrid と NRPS をコードする遺伝子を含む 6 遺伝子 (11.9 kbp) からなる領域を見いだした。当該領域が LA 生合成に関与するかを調査するため、水酸化酵素をコードする遺伝子を破壊した。破壊株の LC-MS 解析では、LA の生産が消失し、LA から水酸基が欠失した類縁体の *m/z* と一致するピークが観測された。また、当該領域を異種宿主で発現させたところ、LA の生産が確認できた。さらに、組換え酵素を用いた解析を行った結果、そのほとんどについて機能が解明できたことから報告する。

Lactacystin (LA) was isolated from *Streptomyces lactacystinicus* by Ōmura *et al*. in 1991.[1)] This compound works as a proteasome inhibitor, and it is now widely used as a biochemical reagent. LA possesses a highly substituted γ-lactam ring, α,α-disubstituted amino acid, and *N*-acetylcysteine. A series of feeding experiments using stable isotopes indicated that the carbon at the 2-position of leucine and the carbon at the 1-position of isobutyrate are incorporated into the α,α-disubstituted amino acid moiety.[2)] However, there is no information on the enzymes and genes involved in its biosynthesis.

In this study, we firstly identified the biosynthetic gene cluster of LA in the draft genome of its producer by the gene inactivation experiment and heterologous expression experiments. Then, we conducted the in vitro experiments to elucidate the biosynthetic pathway of LA.

[References]

1) S. Ōmura et al. *J. Antibiot*. **1991**, *44*, 113.
2) S. Takahashi et al. *J. Antibiot*. **1995**, *48*, 1015.

biosynthesis, natural products, proteasome inhibitor

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E3 会場

微細藻類由来 DHA 合成酵素の ketosynthase ドメインの機能解析
Dissecting Ketosynthase Domains in Microalgal Polyunsaturated Fatty Acid Synthase
○尾形 海斗[1]、仲間 陸[1]、小林 飛悠[1]、角田 毅[2]、丸山 千登勢[3]、濱野 吉十[3]、氏原 哲朗[4]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工、[3]福井県大院生物資源、[4]協和発酵バイオ)
○ Kaito OGATA[1], Riku NAKAMA[1], Hiyu KOBAYASHI[1], Takeshi TSUNODA[2], Chitose MARUYAMA[3], Yoshimitsu HAMANO[3], Tetsuro UJIHARA[4], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ., [4]Kyowa Hakko Bio Co. Ltd.)

ある種の微細藻類や海洋性細菌はポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体 (PUFA 合成酵素) によりドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6 ω3) やエイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5 ω3) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を生合成することが知られている。これら酵素は類似のドメイン構造を持つにも関わらず異なる PUFA を特異的に合成する。これまで当研究室では、海洋性細菌由来の PUFA 合成酵素の in vitro 解析で、２つのケトシンターゼ (KS_A、KS_C) ドメインの使い分けで最終産物の炭素鎖長を制御することを明らかにしている [1,2]。しかし、微細藻類由来の酵素の KS_A、KS_B ドメインは海洋性細菌由来のものと相同性が低く、生産物制御機構は不明である。これまでに、*Schizochytrium* sp. 由来の DHA 合成酵素の KS_A、KS_B ドメインの組換え酵素とアシル ACP 基質を用いた in vitro 解析で炭素鎖長 2 から 6 までの伸長反応を明らかにしている [3]。本研究では、炭素鎖長が長い基質について in vitro 解析し、DHA 生合成のほぼ全ての伸長反応における KS_A、KS_B ドメインの使い分けを明らかにした。

Some marine bacteria and microalgae produce polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) by PUFA synthases, which are huge enzyme complexes with multiple catalytic domains similar to fatty acid synthases. Interestingly, individual PUFA synthase creates a specific PUFA, even though domain organization of PUFA synthases are similar to each other. Previously, we investigated the control mechainisms for carbon chain length and cis double bond position of bacterial PUFA synthases.[1, 2] However, the control mechanisms of microalagal DHA synthase remain unclear because of low sequence similarity between bacteria and microalgae enzymes. We previously investigated early-stage chain-elongation reactions (from C2 to C6) by in vitro experiments using recombinant two ketosynthase domains (KS_A and KS_B).[3] Here, we report in vitro analysis of chain-elongation reactions using acyl ACP substrates with longer acyl chain.

[References]
1) S. Hayashi *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*., **58**, 2326 (2019).
2) S. Hayashi *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*., **58**, 6605 (2019).
3) 尾形ら 日本農芸化学会 2023 年度大会 1F02-10.

ketosynthase, biosynthesis, polyunsaturated fatty acids

発表責任者：大利 徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E3 会場

微細藻類由来 DHA 合成酵素の dehydratase ドメインの機能解析

Dissecting Dehydratase Domains in Microalgal Polyunsaturated Fatty Acid Synthase

○川田 智哉[1]、小林 飛悠[1]、大塚 慎[1]、角田 毅[2]、丸山 千登勢[3]、濱野 吉十[3]、氏原 哲朗[4]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工、[3]福井県大院生物資源、[4]協和発酵バイオ)
○ Tomoya KAWATA[1], Hiyu KOBAYASHI[1], Makoto OTSUKA[1], Takeshi TSUNODA[2], Chitose MARUYAMA[3], Yoshimitsu HAMANO[3], Tetsuro UJIHARA[4], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Biosci. Biotec., Fukui Pref. Univ., [4]Kyowa Hakko Bio Co. Ltd.)

ある種の微細藻類や海洋性細菌はドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6 ω3) やエイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5 ω3)、アラキドン酸 (ARA; C20:4 ω6) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を PUFA 合成酵素と呼ばれるポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体により生合成することが知られている。PUFA 合成酵素は類似のドメイン構造を持つにも関わらず炭素鎖長や二重結合の位置が異なる PUFA を正確に作り分ける。これまで当研究室では、海洋性細菌由来の PUFA 合成酵素の in vitro 解析により、異なるタイプの dehydratase (DH_{FabA}、DH_{PKS}) ドメインの基質特異性の差が ω3 と ω6 PUFA を作り分けることを明らかにしている [1)]。また、微細藻類 *Schizochytrium* sp. 由来の DHA 合成酵素にも DH_{PKS} と 2 つの DH_{FabA} ($DH1_{FabA}$ と $DH2_{FabA}$) ドメインが存在し、全ての DH ドメインが DHA 生合成に必要であることも明らかにしている [2)]。しかし、これらの DH_{FabA}、DH_{PKS} ドメインは海洋性細菌由来のものと相同性が低く、生産物制御機構は不明である。そこで本研究ではその解明を目的に各ドメインの組換え酵素と各種アシル ACP を調製し in vitro 解析を行った。その結果、基質により 3 つの DH ドメインを使い分けることが強く示唆された。

Some marine bacteria and microalgae produce polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), and arachidonic acid (ARA) by PUFA synthases, which are huge enzyme complexes with multiple catalytic domains similar to fatty acid synthases. Interestingly, individual PUFA synthase creates a specific PUFA, even though domain organization of PUFA synthases are similar to each other. Previously, we investigated the control mechainisms for *cis* double bond position of the product with bacterial PUFA synthases.[1)] We also showed that DH_{PKS} and two DH_{FabA} ($DH1_{FabA}$ and $DH2_{FabA}$) domains in DHA synthase from the microalgae *Schizochytrium* sp. were essential for DHA biosynthesis.[2)] However, the control mechanisms of microalagal DHA synthase remain unclear due to low sequence similarity between bacteria and microalgae enzymes. Here, we report in vitro analysis to examine the mechanism of *cis* double bond formation using recombinants of three domains and acyl-ACP substrates with various chain lengths. Our analysis suggested that DHA synthases used the three DH domains depending on the acyl-ACP substates.

[References]

1) S. Hayashi *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*., **58**, 2326 (2019).
2) 小林ら 2021 年度 日本農芸化学会北海道支部第 2 回学術講演会 B7

dehydratase, biosynthesis, polyunsaturated fatty acid

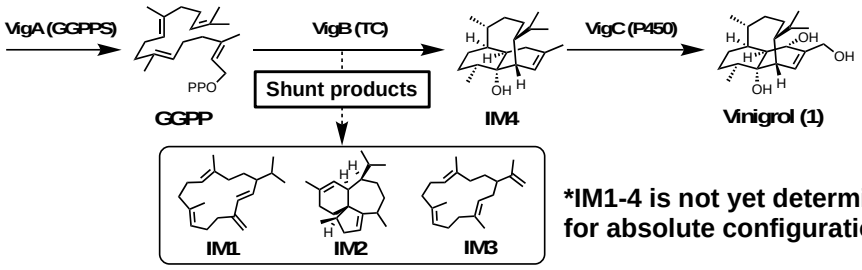
発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E3p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E3 会場

Vinigrol の生合成に関与する新規テルペン環化酵素の発見と機能解析

Discovery and Functional Analysis of a Novel Terpene Cyclase Involved in the Biosynthesis of Vinigrol

○佐藤 史都、塚田 健人、古村 翔、森下 陽平、菅原 章公、尾﨑 太郎、浅井 禎吾（東北大院薬）
○Fumito SATO, Kento TSUKADA, Sho FURUMURA, Yohei MORISHITA, Akihiro SUGAWARA, Taro OZAKI, Teigo ASAI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)



Vinigrol (**1**) は血小板凝集抑制作用を示すジテルペンであり、8 連続不斉中心を備えた特異な 3 環性骨格を有している[1,2]。これまでに、vinigrol の生合成に関する研究例はない。そこで本研究では、vinigrol のユニークな骨格形成機構の解明を目的として、生合成遺伝子クラスター (BGC) の探索と異種発現、環化酵素の機能解析を実施した。

はじめに、vinigrol 生産菌のゲノム配列を解析し、ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素 (GGPPS) をクエリとして BGC を探索した。その結果、GGPPS (*vigA*), hypothetical protein (*vigB*), cytochrome P450 (*vigC*) を含む一つの候補遺伝子群 (*vig* cluster) を同定した。続いて、*vigABC* を *Aspergillus oryzae* を宿主として異種発現し、形質転換体が **1** を生産することを示した。また、*vigA* と *vigB* を麹菌内で共発現すると、**1** の前駆体 **IM4** 以外に複数の環化産物が生産された。VigB には既知の活性モチーフが保存されておらず、新しいタイプの テルペン環化酵素だと考えられた。興味深いことに、VigB のホモログを同様の方法で異種発現すると、異なるプロファイルで生成物を与えることが判明した。本研究では、VigB とホモログの生成物を網羅的に解析し、環化の過程で生じる中間体に由来すると考えられる複数の構造を決定した。発表では、決定した化学構造に基づいて環化機構についても議論する。

Vinigrol (**1**) is a fungal diterpene that inhibits platelet aggregation and has a unique tricyclic skeleton.[1,2] To date, there have been no studies on the biosynthesis of **1**. In this study, we identified the biosynthetic gene cluster (BGC) of **1** and analyzed the function of terpene cyclase (TC) to elucidate the biosynthetic mechanism of **1**. First, we conducted genome sequencing of the producing strain. Using GGPP synthase as a probe, one candidate BGC containing GGPPS (*vigA*), hypothetical protein (*vigB*) and cytochrome P450 (*vigC*) was identified. Heterologous expression in *Aspergillus oryzae* revealed that these genes are involved in the biosynthesis of **1**. VigB and its homolog were found to be a novel type of TCs, giving IM4 and multiple products. Based on the structures of isolated compounds, cyclization pathway of these unique TCs will be discussed in the presentation.

(1. Uchida, I. *et al., J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5292-5293; 2. Ando, T. *et al., J. Antibiot.* **1987**, 31-35.)。

Vinigrol, Terpene Cyclase, Biosynthesis

発表責任者：浅井禎吾（teigo.asai.c8@tohoku.ac.jp）

講演番号：3E3p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E3 会場

ゲノムマイニングの効率化を実現する長鎖遺伝子の麹菌内迅速再構築法の検討

Rapid reconstitution of fungal biosynthetic gene clusters in *Aspergillus oryzae*

○青木 翔吾、尾崎 太郎、菅原 章公、森下 陽平、浅井 禎吾（東北大院薬）
○Shogo AOKI, Taro OZAKI, Akihiro SUGAWARA, Yohei MORISHITA, Teigo ASAI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】糸状菌由来の非リボソームペプチド（NRP）は免疫抑制剤 cyclosporine に代表されるように顕著な生物活性を持ち、医薬資源として重要な化合物群である。真菌ゲノム上には一万個以上の非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）遺伝子が存在するため生物活性天然物の探索標的として有望であるが、ゲノムマイニングと異種発現を用いた糸状菌 NRP の探索例は少なく未開拓である。これは通常 10 kb を超える NRPS 遺伝子のクローニングや宿主への導入が煩雑であることが一因であると考えられる。本研究では、NRPS をはじめとする長鎖遺伝子の簡便かつ迅速な解析方法の確立を目的として、ゲノム編集を利用して遺伝子断片を麹菌へ直接導入する手法を検討した。
【方法・結果】標的遺伝子を相同組み換え（HR）で再構築可能な複数の断片に分割して PCR で増幅し、それらを直接麹菌に導入する手法を検討した。機能既知のテルペン生合成遺伝子を研究材料として、単一遺伝子断片で形質転換を行ったところ、プラスミド DNA を用いる従来の手法と遜色ない効率で遺伝子導入が可能であった。続いて、HR を誘導するための遺伝子断片間のオーバーラップの長さと断片数が導入効率に与える影響を種々検討し、80 bp のオーバーラップを持つ遺伝子を最大 10 断片、25 kb まで導入することができた。本手法を用いて、研究室が保有する糸状菌株から見出した 12 種の NRPS 遺伝子を麹菌へ導入したところ、3 種で代謝物と考えられる特異的なピークを確認することができ、本手法が機能未知 NRPS のスクリーニングに有効であることを示した。

Non-ribosomal peptides (NRP) from filamentous fungi are an important group of compounds as a pharmaceutical resource because of their potent biological activities. Non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) are abundant in fungal genomes, but there are few examples of NRP exploration using heterologous expression possibly due to size of the genes encoding large modular NRPSs. Herein, we examined the rapid construction of long NRPS genes in *Aspergillus oryzae* using CRISPR/Cas9-mediated genome editing method. The target NRPS was split into the multiple fragments containing 80-bp overlap sequence and amplified by PCR. The amplified fragments were then purified and introduced into *A. oryzae* with the genome editing plasmid. The target NRPS was reconstructed by homologous recombination and integrated into the targeted genetic loci. Employing this method, we examined the expression of 12 NRPSs found in the genome of our culture collection. As a result, the product derived from 3 NRPSs were identified by LC-MS, demonstrating that this method is useful for the screening of fungal NRPSs of unknown function.

Genome mining, Non-ribosomal peptide, Biosynthesis

講演番号：3E3p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E3 会場

ustYa 遺伝子のゲノムマイニングにより見出した cyclochlorotine 類縁生合成遺伝子クラスターの機能解析

Genome mining of UstYa family proteins invloved in the biosyntheis of cyclochlorotine derivatives

○岡本 春太、尾﨑 太郎、森下 陽平、菅原 章公、浅井 禎吾（東北大院薬）
○Shunta OKAMOTO, Taro OZAKI, Yohei MORISHITA, Akihiro SUGAWARA, Teigo ASAI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

Cyclochlorotine (CCT) は *Talaromyces islandicus* が生産するマイコトキシンの一種である。その生合成では、UstYa ファミリーに分類される 3 種の蛋白質が塩素化、アシル基転移、ヒドロキシ化に関わることが示されている。UstYa は様々な変換反応に関わることが報告されているが、詳細な機能解析例はない。また、いずれの既知酵素ともアミノ酸配列の相同性を示さないため、新しいタイプの生合成酵素であると考えられる。さらに、データベース上には膨大な数の UstYa が存在するが、ほとんどが機能未知であり、UstYa が関わる未知の生合成経路や新規天然物が数多く潜在していると考えられる。本研究では、UstYa の機能開拓と新規天然物の取得を目的として、UstYa を指標としたゲノムマイニングを行った。

当研究室保有のゲノムデータベースを対象にして、UstYa を含む生合成遺伝子クラスター (BGC) を探索したところ、CCT 生合成に関わる 7 つの遺伝子のホモログに加えて、CCT 生合成に関わる 3 種の UstYa とは系統的に異なる 2 種の UstYa ホモログを含む BGC を見出した。そこで、CCT およびそのヒドロキシ体を生産する麹菌形質転換株にこの 2 種の UstYa を導入した。得られた形質転換体の代謝物を LC-MS で分析した結果、形質転換体に特異的な代謝物を観測した。現在、本化合物の単離・構造解析を進めている。

Cyclochlorotine (CCT) is a mycotoxin produced by *Talaromyces islandicus*. In its biosynthesis, three UstYa family proteins are involved in chlorination, transacylation and hydroxylation. UstYa proteins show no sequence similarity to known enzymes, suggesting that they are new type of biosynthetic enzymes. In this study, we conducted the genome mining of UstYa proteins to explore the functional space of UstYa proteins and to identify the new fungal natural products.

We searched for biosynthetic gene cluster (BGC) containing UstYa gene in our genome database and found two BGCs similar to that of CCT. These BGCs contain two UstYa genes in addition to the three UstYa proteins responsible for CCT biosynthesis. These two additional UstYa genes were co-expressed in the *Aspergillus oryzae* transformant producing CCT and hydroxy CCT. As a result, a new metabolite specific to the resultant transformant was observed. The isolation and structural analysis of this metabolite is in progress.

Genome mining, Biosynthesis, Non-ribosomal peptides

講演番号：3E3p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 E3 会場

テトラエーテル脂質合成酵素ホモログの機能および生成物特異性の解明
Elucidation of the function and product specificity of tetraether lipid synthase homologs
○石原 和華[1]、井深 達哉[2]、伊藤 智和[1]、浅川 晋[1]、横川 隆志[2]、邊見 久[1]([1]名大院生命農、[2]岐阜大工)
○ Nodoka ISHIHARA[1], Tatsuya IBUKA[2], Tomokazu ITO[1], Susumu ASAKAWA[1], Takashi YOKOGAWA[2], Hisashi HEMMI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Gifu Univ.)

アーキア膜脂質はイソプレノイド鎖とグリセロール骨格からなるコア構造と極性頭部基から構成されている。コア構造には基本的な構造であるアーキオールの他、多様な構造が存在する（図）。近年、カルドアーキオールとマクロサイクリックアーキオールをコア構造とする膜脂質はテトラエーテル脂質合成酵素（Tes）という同一の酵素により生合成されることが報告され、同酵素の触媒機構も提唱されている。しかし、Tes を保有するアーキア間で膜脂質の存在比は異なっており、同酵素の機能には依然として不明な点も多い。よって、本研究ではカルドアーキオールとマクロサイクリックアーキオールの生成比を支配する要因の解明を目的とした。既知の Tes、もしくは膜脂質の存在比が異なるアーキアに由来する Tes ホモログの遺伝子を挿入した構築したプラスミドを用いて *Methanosarcina acetivorans* を形質転換した後、それらの菌体から脂質を抽出し、UHPLC-Orbitrap 質量分析システムによる分析を行った。その結果、本来 *M. acetivorans* には存在しない膜脂質が合成され、その生成比は酵素により異なっていた。

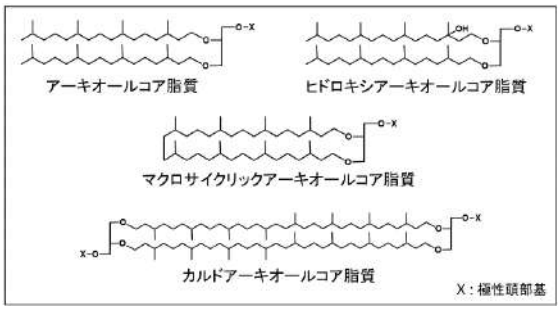


図　様々なアーキア膜脂質

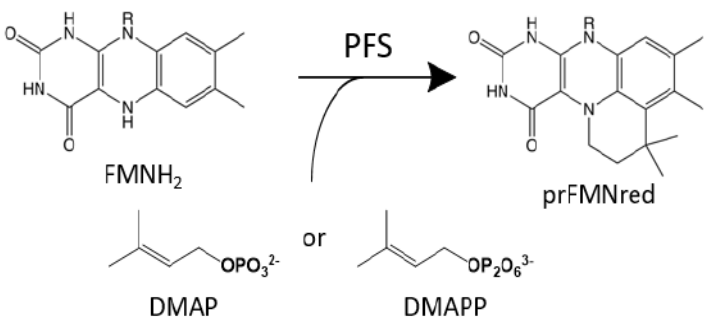
Archaeal membrane lipids are composed of polar head group(s) and a lipid core containing isoprene and glycerol moieties. In addition to a fundamental core structure called archaeol, archaea synthesize variety of membrane lipid cores. Recently, it was revealed that tetraether lipid synthase (Tes) synthesizes both macrocyclic archaeol core lipids and caldarchaeol core lipids, and the catalytic mechanism of Tes has been proposed. However, lipid compositions of archaea that have Tes or its homolog are variable, and the function of Tes still remains vague. Thus, we tried to elucidate what decides the ratio of macrocyclic archaeol and caldarchaeol cores. We cloned the genes of known Tes and its homologs and analyzed lipid compositions of *Methanosarcina acetivorans* expressing each gene. As the result, membrane lipids that are not naturally synthesized in *M. acetivorans* were observed, and the production ratio of the newly synthesized membrane lipids were different among the *M. acetivorans* strains expressing different genes.

archaea, membrane lipid, isoprenoid

発表責任者：邊見久（hhemmi@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E3p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 E3 会場

古細菌祖先型プレニル化フラビンモノヌクレオチド合成酵素の基質特異性
Substrate specificity of archaeal ancestral prenylated flavin mononucleotide synthase
○伊志嶺 壮真[1]、星野 洋輔[2]、伊藤 智和[1]、邊見 久[1]([1]名大農、[2]GFZ ドイツ地球科学研究センター)
○Soma Ishimine[1], Yosuke Hoshino[2], Tomokazu Ito[1], Hisashi Hemmi[1] ([1]Nagoya Univ., [2]GFZ German Research Centre for Geosciences)



酵素反応において補酵素は重要な役割を担う。近年、新たなフラビン補酵素としてプレニル化フラビンモノヌクレオチド（prFMN）が発見された。prFMN は、古細菌型メバロン酸経路において、脱炭酸酵素の補酵素として用いられており、そのため多くの古細菌にとって必須である。prFMN は、prFMN 合成酵素（PFS）によって還元型フラビンモノヌクレオチド（$FMNH_2$）と、ジメチルアリルリン酸（DMAP）またはジメチルアリル二リン酸（DMAPP）から合成される。メタン生成古細菌の一つである *Methanosarcina mazei* の持つ PFS はプレニルドナー基質として DMAPP よりも DMAP を好んで用いることが分かった。これは、プレニル二リン酸を基質として用いる既知のプレニル基転移酵素とは異なる性質である。この性質は古細菌の持つ PFS 全般に共通なのかという疑問が生じた。そこで、本研究では、PFS の分子系統解析の結果を元に古細菌祖先型の PFS のアミノ酸配列を推定し、同酵素の基質特異性について調べた。その結果、祖先型 PFS も基質として DMAP を好むことが分かった。

Coenzymes play important roles in enzymatic reactions. Recently, prenylated flavin mononucleotide (prFMN) was discovered as a new member of flavin coenzymes. prFMN is required as the coenzyme for a decarboxylase in the archaeal mevalonate pathway. prFMN is synthesized by prFMN synthase (PFS) from reduced flavin mononucleotide ($FMNH_2$) and dimethylallyl phosphate (DMAP) or dimethylallyl diphosphate (DMAPP). We found that PFS from *Methanosarcina mazei* prefers DMAP to DMAPP as the prenyl-donor substrate. This property is different from those of known prenyltransferases that use prenyl diphosphates. We wonder whether the property is common for archaeal PFSs or not. Therefore, we estimated the amino acid sequence of the archaeal ancestral PFS based on the molecular phylogenetic analysis of PFSs and investigated its substrate specificity. We found that the ancestral PFS also prefers DMAP.

Prenyltransferase, Flavin, Isoprenoid

講演番号：3E3p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 E3 会場

ササラダニ類におけるシアン化水素生成のメカニズムに関する研究

Mechanism of hydrogen cyanide formation by oribatid mites

○森山 太介[1]、高原 千尋[1]、島野 智之[2]、清水 伸泰[1] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]法政大学自然科学センター)
○ Daisuke MORIYAMA[1], Chihiro TAKAHARA[1], Satoshi SHIMANO[2], Nobuhiro SHIMIZU[1] ([1]Kyoto Univ. of Adv. Sci., [2]Hosei Univ.)

【背景と目的】近年、ササラダニからヤスデのようにシアン化合物を生産する種が発見された。ヤスデはシアン化合物であるマンデロニトリルを分泌腺の貯蔵嚢に貯めて、体外に放出する際に反応室のリアーゼと混合することでシアン化水素が生成する。一方、ササラダニからシアン化合物は検出されたものの、実際にシアン化水素が生成するかは不明である。そこで我々はササラダニ亜目コイタダニ科に属するセンダンササラダニ *Phauloppia adjectra* 由来のシアン化合物を用いて、シアン化水素への分解機構の検証を行った。また、センダンササラダニ成虫および若虫におけるシアン化合物の生成量の定量も行ったので、併せて報告する。
【方法と結果】センダンササラダニ成虫および若虫はケヤキの樹皮裏から採集した。ダニの油腺分泌物は成虫および若虫をヘキサンに浸漬することで抽出し、その抽出液を GC-MS で分析した。その結果、成虫から mandelonitrile octanoate が検出された一方で、本化合物は若虫からは検出されず成虫特異的な成分であることが明らかとなった。さらに成虫をすり潰すことによってシアン化水素が生成することをピクリン酸試験紙法で確認したことから、シアン化水素の生成には酵素の関与が示唆された。現在、シアン化水素の生成量の定量および生成機構の解析とともに、成虫由来の mandelonitrile octanoate の定量を行っている。

A species that produces cyanide, such as millipedes, was discovered in oribatid mites. Millipedes store cyanide, mandelonitrile in the reservoir of their secretory glands, and when released from the body, hydrogen cyanide (HCN) is produced by mixing with lyase in the vestibule. Although cyanide have been detected in oribatid mites, it is not known whether HCN is actually produced in oribatid mites. In this study, we examined the mechanism of HCN decomposition from cyanide of *Phauloppia adjectra* (Oribatida, Oribatulidae). We also quantified the amount of cyanide produced in the adults and nymphs of *P. adjectra*. Oil gland secretions extracted with hexane were analyzed using GC-MS. The results showed that mandelonitrile octanoate was detected from the adults. This compound was not detected in the nymph, indicating that it is an adult-specific component. HCN was produced by homogenized adults, which was confirmed by the picric acid test. The production of HCN is suggested the involvement of enzymes. We are currently quantifying the amount of HCN produced and analyzing the formation mechanism, as well as quantifying mandelonitrile octanoate in adults.

chemical defense, oribatid mite, cyanogenesis

発表責任者：森山　太介（moriyama.daisuke@kuas.ac.jp）

講演番号：3E4a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E4 会場

コロナウイルス感染患者における腸内細菌叢の変化

Alterations of the gut microbiota in Patients with Coronavirus Disease

○中村 仁俊、池松 真也（沖縄高専）
○Hitoshi NAKAMURA, Shinya IKEMATSU (NIT Okinawa collage)

近年,腸内細菌叢と疾患との関係に関して多くの研究がされている.
今回 COVID-19 罹患者 1 名の糞便サンプル(COVID-19 罹患期間中 7 日間と回復後期間を 51 日間)から次世代シーケンサーを用いた,16SrRNA の V3-V4 領域のシーケンスを行い,得られたシーケンスデータをもとに菌叢解析パイプライン Qiime2 を用いて腸内細菌叢解析を実施した.COVID-19 罹患期間中のサンプルと回復後のサンプルとで群間比較を PERMANOVA 検定で確認したところ 2 群において統計的有意差が確認された.その後 ANCOM モデルを用いて 2 群間で占有率に統計的有意差のある菌種を解析したところ 4 種の菌が該当した.そのうちの 1 種である *Ruminococcus* 属の菌は COVID-19 罹患期間中サンプルにて約 10~20%の占有率で他の 3 種に比べ大きいものであった.今後は COVID-19 罹患者の腸内細菌叢のオープンデータを探し,そのデータも加え再解析を行っていく予定である.

In recent years, many studies have been conducted on the relationship between the gut microbiota and diseases.
In this study, we sequenced the V3-V4 region of 16SrRNA from fecal samples (9 samples during COVID-19 and 51 samples after recovery) with the cooperation of one COVID-19 patient using a NGS , and analyzed the gut microbiota using Qiime2, a bacterial flora analysis pipeline, based on the sequencing data obtained.The PERMANOVA test was used to compare the samples during the COVID-19 disease period with those after recovery, and a statistically significant difference was confirmed between the two groups. The ANCOM model was then used to analyze the bacteria with statistically significant differences in occupancy between the two groups, and four species were finding. One of these species, *Ruminococcus*, had a greater occupancy rate of approximately 10~20% in the COVID-19 samples. This was higher than the other three species.

COVID-19, Bioinformatics, gut microbiota

講演番号：3E4a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E4 会場

表面増強ラマン散乱におけるノロウイルス検出応答の安定性に関する研究
Stability of Norovirus detection response in surface-enhanced Raman scattering
○前畑 秀叡[1]、Boonyakida Jirayu[2]、Memdi Indra[2]、朴 龍洙[1,2]([1]静大院総合科技、[2]静大グリーン研)
○Shuei MAEHATA[1], Jirayu Boonyakida[2], Indra Memdi[2], Enoch Park[1,2] ([1]GIST of Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. of Green Sci. Tech. of Shizuoka Univ.)

ノロウイルス（NoV)は食中毒の原因で食品の安全性に大きく関わっており、高感度な簡易検出診断が必要とされている中、ナノ材料を用いたウイルス検出が非常に注目を集めている。特に表面増強ラマン散乱（SERS）は高感度で優れた特異性からウイルス検出への応用が期待されるが、安定性や簡易化には課題が多い。そこで、本研究では金銀ベースのナノタグによる安定した高感度検出と小型ラマン分光器による簡易化に成功したことを報告する。

3 次元構造を有した Au@Ag-MBA-Au NPs (ナノタグ)を作製し、強い SERS を引き起こすことに成功した。このナノタグと磁気ナノ粒子（MNP)に NoV 抗体を修飾することで、NoV 存在下においてナノタグ-NoV-MNP のサンドイッチ構造が形成され、標的ウイルスを磁気分離、濃縮を行うことができる。また常に同じ場所にサンプルを集められ、安定性を向上させた。金基板にノロウイルス様粒子を滴下し検出した結果、検出限界は 0.68 pg/mL と優れた感度を示した。また 10 %のヒト血清中でも変動係数 7.7 %を示し、高い安定性を示した。今回の結果は Point Of Care 診断の可能性を示唆し、マルチターゲット検出への展開も期待される。

Norovirus (NoV) is a cause of food poisoning and a major factor in food safety. Recently, nanomaterials have attracted considerable attention to the demand for simple diagnosis. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) can be applied to virus detection due to its high sensitivity and excellent specificity but there are many challenges in stability and simplicity. This study achieved high-sensitivity detection using gold and silver-based nanotags and simplified detection using portable Raman spectrometer.

We fabricated Au@Ag-MBA-Au NPs (nanotag) with a three-dimensional structure and enhanced Raman signal. Combining the nanotags and magnetic NPs (MNPs) with NoV antibodies forms a nanotag-NoV-MNP complex in the presence of NoV. Then, it can be magnetically separated and always be collected at the same position on the substrate, improving stability. The sample was dropped on the gold substrate for detection and measured with portable Raman spectrometer. This detection platform exhibited excellent sensitivity with a detection limit of 0.68 pg /mL. It showed high stability even in the 10 % human serum of CV 7.7 %. These results suggest the possibility of point-of-care diagnosis and is applicable for multi-target detection.

surface-enhanced Raman scattering, gold nanocomposite, simple detection

講演番号：3E4a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E4 会場

DNA 結合タンパク質 gp32 に対する抗体を用いた迅速簡便な遺伝子検査法の開発

Development for simple and rapid genetic tests for infectious diseases using DNA-binding protein gp32 and its antibodies

パム ニアンテイキム[1]、平川 由紀[2]、滝田 禎亮[3]、門間 敬子[2]、保川 清[2]、○吉宗 一晃[1] ([1]日大生産工、[2]京女大家政、[3]京大農)

Ngan Thi Kim PHAM[1], Yuki HIRAKAWA[2], Teisuke TAKITA[3], Keiko MOMMA[2], Kiyoshi YASUKAWA[2], ○Kazuaki YOSHIMUNE[1] ([1]Nihon Univ., [2]Kyoto Women's Univ., [3]Kyoto Univ.)

顧みられない熱帯病はウイルス、細菌、原虫及びゼン虫による感染症で、低中所得国に蔓延している。これらの病気を早期に発見することは重症化や感染拡大を防ぐ上で重要である。本研究では特別な機器を使わずに感染生物のゲノムを等温 DNA 増幅法の一つである Recombinase polymerase amplification (RPA 法)により増幅し、増幅した DNA をペーパーイムノクロマトグラフィーで特別な装置を使わずに迅速簡便に検出する方法の開発を目的とする。RPA 法では PCR の様に加熱による二本鎖 DNA の変性は行わず、gp32 により二本鎖 DNA を一本鎖にほどくことにより等温で DNA を増幅できる。この gp32 に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を作製し、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)で評価したところ、gp32 が DNA と結合することによってこれらの抗 gp32 抗体との反応性を大幅に変化させることを発見した。この gp32 と抗 gp32 抗体を用いた ELISA において、1.2 μg/ml のλDNA を検出できた。この gp32 の性質を用いて特別な装置を必要としないペーパーイムノクロマトグラフィーによる DNA の検出を試みたので報告する。

Neglected tropical diseases (NTDs) are caused by bacteria, protozoa, and helminths and increase mortality and morbidity, especially in underdeveloped countries. Early detection of these diseases with lower costs should restrict the spread. The gp32 protein from T4 bacteriophage unwinds double-strand DNA and is necessary for recombinase polymerase amplification (RPA) which is an isothermal DNA amplification technique. Here, the anti-gp32 antibodies were prepared and their reactivities were assayed with enzyme-linked immunosorbent assay. Their reactivities against gp32 were altered in the presence of λ DNA (1.2 μg/ml) due to conformational change of gp32. A paper-based immunochromatography using the anti-gp32 antibody was prepared aiming for quick detection of DNA from NTDs without any equipment.

genetic test, anti-gp32 antibody, enzyme-linked immunosorbent assay

発表責任者：吉宗一晃（yoshimune.kazuaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E4a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 E4 会場

微生物染色体 DNA 中のポリプリン/ポリピリミジン配列の解析と遺伝子型別へ の応用

Analysis of polypurine/polypyrimidine sequences in microbial chromosomal DNA and their application to genotyping

○安川 和志（富山県衛生研究所）
○Kazuyuki YASUKAWA (Toyama Institute of Health)

微生物の遺伝子型別は、公衆衛生の分野で特に重要である。例えば、食中毒が発生した場合、原因菌の同定を行うと共に遺伝子の型別を実施する。その手法として、パルスフィールドゲル電気泳動法や複数の塩基配列を解読し比較する手法 (MLST 法)が用いられているが煩雑な操作と多くの時間を要する。

本研究は、微生物の染色体 DNA に存在するポリプリン/ポリピリミジン(PolyR)配列に着目した迅速かつ簡便な遺伝子型別法の開発である。真核生物における遺伝子上の PolyR 配列の役割について多くの研究報告がある一方で、微生物の遺伝子配列中にどの程度 PolyR 配列が存在しどの様な役割があるかは知られていない。本発表では、様々な微生物種における染色体上の PolyR 配列の抽出と比較を行った。この結果より、染色体 DNA 上に存在する PolyR 配列を利用した遺伝子型別法が可能であると考え検討した結果について報告する。

Genotyping of microorganisms is particularly important in the field of public health. For example, when food poisoning cause by pathogenic microorganisms occurred, the causative organisms are identified and genotyped. Pulsed-field gel electrophoresis and the multilocus sequence typing (MLST) method are used for genotyping, but they are complicated and time-consuming.

In this study, we developed a rapid and simple genotyping method focusing on polypurine/polypyrimidine (PolyR) sequences in the chromosomal DNA of microorganisms. While there are many reports on the role of PolyR sequences on eukaryotic DNA, it is not known to “how many PolyR sequences are present in chromosomal DNA from microorganisms” and “what their roles are”. In this presentation, we compared PolyR sequences on chromosomal DNA of various microorganisms by *in silico* analysis. Based on these results, we developed a genotyping method based on the PolyR sequences in chromosomal DNA, and we report the results of our investigation.

Bacteria, Genotyping, Polypurine sequence

発表責任者：安川和志（kazuyuki.yasukawa@pref.toyama.lg.jp）

講演番号：3E4a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E4 会場

終末糖化産物受容体を活用した評価技術の開発と応用

Development of detection method for AGEs affecting cellular functions through RAGE

○小堀 俊郎[1,2]、ガネーシュ ディーパック[1,2]、熊野 みゆき[1]、町田 幸子[1]([1]農研機構食品研、[2]筑波大生命環境)
○Toshiro Kobori[1,2], Deepak Ganesh[1,2], Miyuki Kumano[1], Sachiko Machida[1] ([1]NFRI, [2]Tsukuba Univ)

終末糖化産物（Advanced Glycation End products: AGEs）は、食品の味、香り、焼き色などに関係する。一方、体内でも AGEs は生成し、終末糖化産物受容体（RAGE）との結合を介して加齢性疾患を誘発する。AGEs は機器分析、ELISA などで検出できるが、いずれも生体への影響を評価することはできなかった。そこで、人工的に RAGE を生産してセンサとすれば、生体影響を指標とした AGEs の評価が可能となると着想した。本研究では、宿主として用いたカイコで RAGE の細胞外領域である sRAGE 及びビオチンリガーゼを共発現させることによりビオチン化 sRAGE を生産した。このビオチン化 sRAGE を用いて開発したプレートアッセイにより、異なる種類の前駆体（還元糖、カルボニル化合物）と BSA から生成したモデル AGEs の sRAGE 結合性が異なること、この結合性が細胞内の酸化ストレスと相関すること、糖尿病性腎症及び認知症の患者血清の sRAGE 結合性は健常者血清よりも大きいことを明らかにし、AGEs の生体影響を試験管内で評価できる可能性が示唆された。また、ビオチン化 sRAGE のその他の活用可能性についても紹介する。

Advanced Glycation End products (AGEs) are a heterogenous group of glycation adducts on amino acids. AGEs contribute to creation of colors, tastes and flavors in food, whereas AGEs are also endogenously produced. Intracellular inflammation triggered by binding of AGEs to receptor for AGEs (RAGE) is linked to some chronic diseases. Therefore, growing attention has been paid to a relationship between dietary AGEs and health. In this study, we developed a detection method for AGEs which would give a cellular impact through RAGE. For this, biotinylated extracellular domain of RAGE (sRAGE) was firstly obtained after co-expression with biotin ligase, BirA, in transgenic silkworm. Second, purified biotinylated sRAGE was applied to a competitive assay format to quantify AGEs binding to RAGE. RAGE-binding activities of sugar- and dicarbonyl-derived AGEs were comparable to oxidative stress which the same set of AGEs generated in cultured cells, suggesting that this would be a promising method for evaluating AGEs which could affect cellular functions.

Advanced glycation end products, Receptor for advanced glycation end products

発表責任者：小堀俊郎（tkobo@affrc.go.jp）

講演番号：3E4a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E4 会場

粉体工学的アプローチと機械学習を用いたカブトムシ三齢幼虫の雌雄分類

Sex classification of Rhinoceros beetle larvae using powder technology approach and machine learning

○高井 千加[1,2]、山下 誠司[3] ([1]岐阜大工、[2]東北大多元研、[3]名大工)
○Chika TAKAI[1,2], Seiji YAMASHITA[3] ([1]Gifu University, [2]Tohoku University, [3]Nagoya University)

カブトムシ幼虫の糞の形が決まる後腸が生殖器近傍にあることから、糞の形には雌雄差があると考えた。品質工学で頻用されるマハラノビス - タグチ(MT)法は，複数の特徴量データ間の相関関係を基準にしてパターンの違いを認識し分類する。任意のグループを基準（単位空間と呼ぶ）とし，評価データとのパターンの違いをマハラノビス距離(MD^2)として算出する。各サンプルの MD^2 が単位空間のそれと離れているほど，そのサンプルは単位空間とは異なる特徴を持つといえる。MD^2 の値は分布があるため閾値を設定し，閾値以上の MD^2 を持つデータを異常値とみなす。データ全数で除した異常値率を算出すれば，異常値率の範囲によって分類が可能となる。また，MT 法では品質工学のパラメータ設計の手法を応用した原因分析が可能であり，分類精度に寄与する特徴量の相関性のみを抽出することが可能である。つまり、カブトムシ幼虫糞の雌雄差を生み出す特徴量を具体的に知ることができる。本研究では国産カブトムシの三齢幼虫糞形状に関わる特徴量データから雌雄分類精度向上に寄与する特徴量が糞の表面粗さであることを明らかにし、糞形状のみで雌雄分類できることを示した。

The positioning of the reproductive organs near the posterior intestine, responsible for shaping the dropping of Rhinoceros beetle larvae, prompted the hypothesis of sex-related variations in dropping morphology. The Mahalanobis-Taguchi (MT) method, a widely used tool in quality engineering, identifies and classifies pattern differences by leveraging correlations among multiple feature datasets. Establishing a reference group (referred to as the unit space), we calculate the Mahalanobis distance (MD^2) to discern pattern variances with evaluation data. Samples exhibiting MD^2 values distant from the unit space suggest distinct characteristics. By setting a threshold for MD^2 values, data surpassing the threshold are identified as anomalies. Computing the anomaly rate, excluding all data, facilitates classification based on the anomaly rate range. The MT method, borrowing techniques from quality engineering parameter design, enables cause analysis and extraction of correlated feature data contributing to classification accuracy. In this study, we elucidate that dropping surface roughness is a crucial feature enhancing the accuracy of sex classification in third-stage larvae of domestic Rhinoceros beetles. Our results affirm the capability of sex classification based solely on dropping morphology.

Powder technology, Sex claddification, Machine learning

発表責任者：高井千加（takai.chika.h3@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3E4a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E4 会場

ポリシアル酸とドーパミン誘導体の相互作用解析
Analysis of Interaction between Polysialic Acid and Dopamine-lead Compounds
○早川 開都[1,2]、羽根 正弥[1,2,3]、田中 浩士[4]、呉 迪[1,2,3]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大院・生命農学、[2]名大・生物機能セ、[3]名大・iGCORE、[4]東工大・物理工学院)
○Kaito HAYAKAWA[1,2], Masaya HANE[1,2,3], Hiroshi TANAKA[4], Di WU[1,2,3], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci, Nagoya Univ., [2]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [3]iGCORE, Nagoya Univ., [4]Depart. of Chem Sci. and Eng., Tokyo Inst. of Tech.)

シアル酸が 8-400 残基縮重合したポリシアル酸は分子保持機能を持つ。特に正常な神経回路の形成や神経発生の調節などに深く関わる生理活性因子の受容体提示を制御しており、これら一群の分子を介して脳機能を制御していると考えられている（Sato and Kitajima, 2013; Sato and Kitajima, 2020）。また、ポリシアル酸はがんや精神疾患と共に変化することから、その検出法の開発が重要である。我々は癌や精神疾患のマーカーとして利用できるプローブの開発を目指しており、ポリシアル酸とその結合分子、神経伝達物質ドーパミン(DA)との相互作用（Isomura *et al.*, 2011）に着目し、その構造基盤を明らかにすることを目指した。そこで、ポリシアル酸と DA との相互作用の構造的基盤を明らかにするために、in silico 解析を行った。ポリシアル酸に対する 1 本鎖抗体である scFv と、オクタシアル酸構造との X 線結晶構造より、トリシアル酸構造を抽出した。低分子 DA の構造は、Molecular Operating Environment（MOE）上で構造を構築し最適化した。そして、MOE のドッキングプログラムにより *in silico* 解析を行った。その結果、今回抽出したトリシアル酸構造はポリシアル酸構造を模倣し、DA とトリシアル酸の結合部位の予測を行う事ができた。次に、DA および 13 種類の DA リード化合物を用い、ポリシアル酸カラムを用いた Frontal Affinity Chromatography（FAC）を行った。その結果、DA よりも親和性の高い化合物を得た(Hayakawa *et al.* 2023)。

PolySia is an important glycan in vertebrate brains during development and adult neural functions. Recently, we demonstrated that polySia directly binds neurologically active molecules. The molecules that have been shown to bind to polySia are BDNF, FGF2 and dopamine (DA). PolySia is related to psychiatric disorders and cancer, and the development of specific probes is important for the diagnosis of these diseases. Our final goal is to develop polySia-specific probes that can be used as markers for cancer and psychiatric diseases. In this study, based on the interaction between polySia and DA, we focused on small molecules that bind to polySia as recognition molecules. We performed *in silico* analysis using the Molecular Operating Environment (MOE) docking program to clarify the structural basis of the interaction between polySia and DA-lead compounds. In addition, the in vitro interaction analysis of polySia with small molecules was evaluated by the frontal affinity chromatography (FAC) using a polySia-immobilized column.

Polysialic acid, Frontal Affinity Chromatography, Molecular Operating Environment

講演番号：3E4a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E4 会場

ポリシアル酸と低分子化合物の新規相互作用解析法の開発

Development of novel analysis method for the interaction between polysialic acid and small molecule compounds

○羽根 正弥[1,2,3]、早川 開都[2,3]、田中 浩士[4]、呉 迪[1,2,3]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大・iGCORE、[2]名大院・生命農学、[3]名大・生物機能セ、[4]東工大・物理工学院)
○Masaya HANE[1,2,3], Kaito HAYAKAWA[2,3], Hiroshi TANAKA[4], Di WU[1,2,3], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3] ([1]iGCORE, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci, Nagoya Univ., [3]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [4]Depart. of Chem Sci. and Eng., Tokyo Inst. of Tech.)

シアル酸が 8-400 残基縮重合したポリシアル酸は神経回路の形成や神経発生の調節などに深く関わる生理活性因子の一群の分子に対して分子保持機能を持ち、脳機能を制御していると考えられている（Sato and Kitajima, 2013; Sato and Kitajima, 2020）。また、ポリシアル酸は ST8SIA2 および ST8SIA4 の 2 つの酵素が単独もしくは協調して生合成されることが知られているが、それらが作るポリシアル酸構造には機能的な差があることを明らかにしてきた（Mori *et al.*, 2017）。しかし、それらの構造的な差は既存のプローブでは区別できない。そして、ポリシアル酸はがんや精神疾患と共に変化することから、その検出法の開発が重要である。そこで、我々はポリシアル酸とその結合分子、神経伝達物質ドーパミン(DA)との相互作用（Isomura *et al.*, 2011）に着目し、癌や精神疾患のマーカーとして利用できる低分子化合物を用いたポリシアル酸の新奇プローブの開発を目指している。今回、DA および 13 種類の DA リード化合物を用い、ポリシアル酸と低分子化合物の相互作用を ELISA を基盤としたハイスループットな解析法を開発した(Hayakawa *et al.*, 2023)。また、低分子化合物ライブラリーに対してスクリーニングを行い、ポリシアル酸に対して親和性の高い化合物を見出した。さらに、解析法を改変し、その中から ST8SIA2 および ST8SIA4 それぞれの作るポリシアル酸構造特異的に親和性の高い化合物を見出した。

Polysialic acid (PolySia) is an important glycan in vertebrate brains during development and adult neural functions. Recently, we demonstrated that polySia directly binds neurologically active molecules. The molecules that have been shown to bind to polySia are BDNF, FGF2 and dopamine (DA). In addition, polySia is biosynthesized by two enzymes, ST8SIA2 and ST8SIA4, alone or in concert, and that there are functional differences in the polysialic acid (Mori *et al.*, 2017). PolySia is related to psychiatric disorders and cancer, and the development of specific probes is important for the diagnosis of these diseases. Our final goal is to develop polySia-specific probes that can be used as markers for cancer and psychiatric diseases. In this study, we developed high throughput analysis method for the interaction between polysialic acid and small molecule compounds. We screened a library of small molecule compounds and found compounds with high affinity to polysialic acid. Furthermore, we modified the analytical method and found compounds with high affinity for the polysialic acid structures synthesized by ST8SIA2 and ST8SIA4, respectively.

polysialic acid, ELISA, screening

講演番号：3E4a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 E4 会場

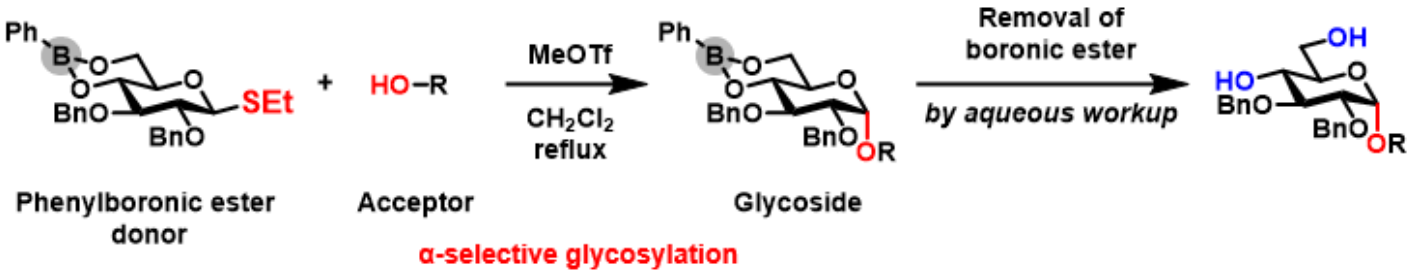
糖供与体 4,6-*O*-フェニルボロン酸エステル保護基がグリコシル化反応の立体選択性に与える影響の検証

Investigation on influence of 4,6-*O*-phenylboronic ester protecting group of glucosyl donor on stereoselectivity in glycosylation.

○梅村 悠太[1]、河村 奈緒子[2]、今村 彰宏[1,2,3]、石田 秀治[1,2,3]、安藤 弘宗[1,2]、田中 秀則[1,2]([1]岐阜大院連合農学、[2]岐阜大 iGCORE、[3]岐阜大応用生命)
○Yuta UMEMURA[1], Naoko KOMURA[2], Akihiro IMAMURA[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hiromune ANDO[1,2], Hide-Nori TANAKA[1,2] ([1]United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ., [3]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ.)

糖鎖合成において、グリコシル化反応の立体制御は重要な課題の一つである。2-*O*-アシル保護基の隣接基関与で立体選択的な 1,2-*trans* グリコシド結合形成が可能であるが、1,2-*cis* グリコシド結合形成の立体制御は未だ困難である。我々は、Crich らの報告（Crich, D. *et al. J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8142–8148.）を参考にし、4,6-*O*-フェニルボロン酸エステル保護グルコース供与体とイノシトール受容体とのグリコシル化反応において高い 1,2-*cis* 選択性が発現することを昨年度大会で報告した。本発表では、4,6-*O*-ジベンジルおよびベンジリデン保護糖供与体、嵩高さや電子的性質が異なる糖受容体を用いて反応を行い、ボロン酸エステルが 1,2-*cis* 選択性を決定する因子であるかを検証した。

Stereocontrol of glycosylation is one of important tasks in glycan synthesis. Stereoselective 1,2-*trans* glycosidic bond formation involves neighboring group participation of 2-*O*-acyl protecting groups. On the other hand, stereocontrol of 1,2-*cis*-glycosidic bond formation still remains challenging. Based on a previous report by Crich et al. (Crich, D. *et al. J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8142–8148.), we have reported that high 1,2-*cis* selectivity was observed in glycosylation reaction of an inositol acceptor with a 4,6-*O*-phenylboronic ester-protected glucose donor at last annual meeting. In this presentation, we investigated whether the boronic ester protecting group is a determinant of 1,2-*cis* selectivity by performing glycosylation reactions using 4,6-*O*-dibenzyl- and benzylidene-protected glycosyl donors as well as glycosyl acceptors with different steric hindrance and electronic property.



glycosylation, Phenylboronic ester protecting group, stereocontrol

講演番号：3E4a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E4 会場

1,5-ラクタム化シアル酸橋頭位ラジカルを利用した *C*-シアロシド合成法の開発

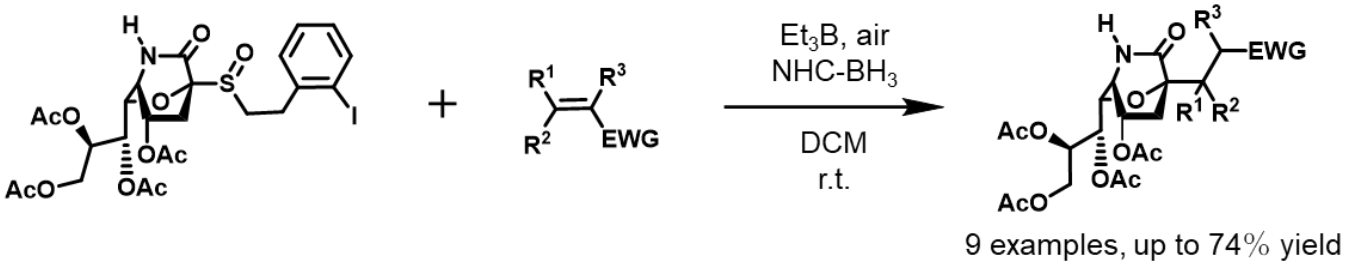
Development of a method for *C*-sialoside synthesis using bridgehead radical of 1,5-lactamized sialic acid

○小林 萌々香[1]、河村 奈緒子[2]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]、田中 秀則[2]([1]岐阜大応用生命、[2]岐阜大学 iGCORE)

○ Momoka KOBAYASHI[1], Naoko KOMURA[2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2], Hide-Nori TANAKA[2] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ.)

グリコシド結合の酸素原子を炭素原子に置換した*C*-グリコシドは代謝安定アナログであり、糖鎖の機能解明だけでなく高機能化研究で役立つと期待されている。近年*C*-グリコシド合成は目覚ましい発展を遂げているが、シアル酸の*C*-グリコシド（*C*-シアロシド）合成は未だ限られている。当研究室では、1,5-ラクタム化を利用した戦略で立体選択的な*O*-シアロシド合成を達成してきた［*ACIE* **2005**, *44*, 6759–6763］。本研究では、1,5-ラクタム戦略コンセプトを基に、新たな*C*-シアロシドの立体選択的合成法の開発に取り組んだ。1,5-ラクタム化したシアル酸橋頭位でラジカルを発生させ、ラジカル受容体とのカップリング反応に供したところ、シアル酸アノマー位で炭素–炭素結合が形成された。α,β-不飽和カルボニル・ニトリル化合物、ビニルスルホン、ビニルホスホン酸エステルをラジカル受容体として用い、様々な*C*-シアロシドの合成に成功した。

C-Glycosides, in which the oxygen atom of the glycosidic bond is replaced by a carbon atom, are metabolically stable analogs. They are expected to be useful for elucidating and improving glycan functions. Although syntheses of *C*-glycosides have made remarkable progress recently, synthesis of *C*-glycosides of sialic acid (*C*-sialosides) is still limited. Our laboratory has achieved stereoselective synthesis of *O*-sialosides by a strategy using 1,5-lactamization [*ACIE* **2005**, *44*, 6759–6763]. In this study, we addressed development of a novel method for stereoselective synthesis of *C*-sialoside based on the 1,5-lactam strategy concept. Generation of a radical at the bridgehead of 1,5-lactamized sialic acid and subsequent coupling with a radical acceptor allowed for C–C bond formation at the anomeric position of sialic acid. Using α,β-unsaturated carbonyl and cyano compounds, vinyl sulfone, and vinyl phosphonate as radical acceptors, we successfully synthesized various *C*-sialosides.



sialic acid, *C*-sialosides, bridgehead radical

発表責任者：田中秀則（tanaka.hidenori.v1@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3E4a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 E4 会場

立体選択的 N 結合型 ADP-リボシル化分子の合成法の開発

Development of a method for stereoselective synthesis of *N*-ADP-ribosylated molecules

○田中 秀則[1,2]、萩野 瑠衣[2]、河村 奈緒子[1]、今村 彰宏[1,2,3]、石田 秀治[1,2,3]、安藤 弘宗[1,2]（[1]岐阜大 iGCORE、[2]岐阜大院連合農学、[3]岐阜大応用生命）
○Hide-Nori TANAKA[1,2], Rui HAGINO[2], Naoko KOMURA[1], Akihiro IMAMURA[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hiromune ANDO[1,2] ([1]iGCORE, Gifu Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ., [3]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ.)

ADP-リボシル化は、NAD^+から ADP-リボース部がアミノ酸残基に転移される翻訳後修飾であり、DNA 損傷修復、転写制御、細胞死などの幅広い生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たす。しかしながら、研究サンプルの入手が困難であるため、ADP-リボシル化の分子レベル機能は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、N 結合型 ADP-リボシル化分子の立体選択的合成法の開発に取り組んだ。本合成法では、無保護 β-アジド ADP リボース基質を用いた Traceless Staudinger Ligation を活用することを計画した。すなわち、Bernardi らの報告（Nisic, F. *et al. Eur. Chem. J.* **2012**, *18*, 6895–6906）と同様に、アノマー位アジド基の還元に続き、ホスホイミン形成によるリボフラノシル環の開環と閉環でアノマー位の立体化学を反転させ、α 選択的に ADP-リボースの *N*-グリコシド結合を形成できると考えた。Traceless Staudinger Ligation を実施したところ、アミノ酸、ペプチド、蛍光色素など、様々なアグリコンを有する N 結合型 ADP-リボシル化分子を α 選択的に合成できた。

ADP-ribosylation, in which the ADP-ribose moiety of NAD^+ is transferred to amino acid residues, is a post-translational modification that plays an important role in a wide range of biological processes including DNA damage repair, transcriptional regulation, and apoptosis. However, molecular-level functions of ADP-ribosylation remain unclear due to lack of availability of homogenous samples. In this study, we addressed the development of a method for stereroselective synthesis of *N*-ADP-ribosylated molecules. In this method, we planned utilizing traceless Staudinger ligation with unprotected β-azide ADP-ribose substrate. Based on a previous report by Bernardi group (Nisic, F. *et al. Eur. Chem. J.* **2012**, *18*, 6895–6906), we hypothesized that reduction of the anomeric azide and subsequent inversion of the anomeric stereochemistry by ring-opening and ring-closing lead to α-selective *N*-glycosidic bond formation of ADP-ribose. By performing traceless Staudinger ligation, we successfully achieved α-selective synthesis of various *N*-linked ADP-ribosylated molecules having amino acid, peptide, fluorescent dye as an aglycon.

N-ADP-ribosylated molecules, stereoselective synthesis, traceless Staudinger ligation

発表責任者：田中秀則（tanaka.hidenori.v1@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3E4a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 E4 会場

完全なα選択的シアリル化を用いた *N. meningitidis* W135 由来多糖の合成研究

Synthetic studies of polysaccharides derived from *N. meningitidis* W135 using a fully stereoselective α-sialylation

山本 洋[1]、○河村 奈緒子[2]、加藤 雅大[1]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・iGCORE)

Hiro YAMAMOTO[1], ○ Naoko KOMURA[2], Masahiro KATO[1], Hide-Nori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ.)

シアル酸含有糖鎖は様々な生命現象に深く関与し、その機能研究や医薬研究への応用のために化学合成による試料供給が必要とされてきた。我々は、近年開発したシアル酸の完全なα選択的グリコシド化法[1]の応用によりシアル酸含有多糖の合成に取り組んでいる。*Neisseria meningitidis* は髄膜炎原因菌のひとつであり、その莢膜多糖が細菌性髄膜炎に対するワクチン開発研究や感染機構の解明研究の標的として注目されてきた。本研究では、新たなアプローチによる *N. meningitidis* W135 由来多糖の効率的な合成を目的とした。

N. meningitidis 由来多糖は二糖[-6)-Galα(1-4)Neu5Acα(2-]の繰り返し構造から成り、二種類のαグリコシド結合の立体選択的構築が合成上の課題である。本研究では、高反応性である Gal 6 位水酸基に対してαシアリル化を繰り返すことで糖鎖を 2^n ずつ伸長する倍加伸長法を立案した。すなわち、DTBS 効果[2]によりまず二環性シアル酸受容体の 4 位水酸基をαガラクトシル化した後、完全なα選択的シアリル化で伸長する合成法を考案した。加えて、糖鎖伸長に伴う難溶化の対策として、*p*-*tert*-Butylbenzoyl (TBBz)基[3]を水酸基の保護基として用いることとした。この戦略により、昨年度の本大会にて、8 糖骨格までの合成を報告した[4]。本年度は更なる糖鎖伸長と脱保護について報告する。8+8 による 16 糖骨格、16+8 による 24 糖合成を達成し、倍加伸長法の有効性を確認した。

Neisseria meningitidis W135 has capsular polysaccharides consist of a disaccharide repeating unit [-6)-Galα(1-4)Neu5Acα(2-]. In this study, we attempted the chemical synthesis of the repeating structures based on a fully stereoselective α-sialylation method [1]. First, Galα(1-4)Neu linkage was constructed using DTBS-directed α-galactosylation method [2]. Next, elongations of glycans by fully stereoselective α-sialylation were conducted, which finally provided a 24 mer framework.

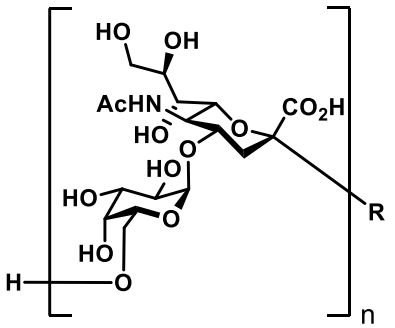


Fig. The structure of capsular polysaccharides derived from *N. meningitidis* W135

[1] N. Komura *et al. Science* **2019**, *364*, 677.
[2] A. Imamura *et al. Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725.
[3] S. Asano *et al. Org. Lett.* **2019**, *21*, 4197.
[4] 山本洋, 日本農芸化学会 2023 年度大会 1D07-02.

Sialic acid, Glycosylation, Polysaccharide

講演番号：3E4a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 E4 会場

レジオナミン酸の完全なα選択的グリコシド化法の開発研究
Study for the development of completely α-selective glycosidation of legionaminic acid
○椛澤 颯馬[1]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]、河村 奈緒子[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・iGCORE)
○ Fuma KABASAWA[1], Hide-Nori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISIDAIDA[1,2], Hiromune ANDO[2], Naoko KOMURA[2] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]iGCORE, Gifu Univ.)

【背景・目的】シアル酸の類縁体であるレジオナミン酸を含有する糖鎖は *Legionella* 属などの細菌が有する糖鎖であり、感染機構の解明研究やワクチン研究の重要な標的であることから、化学合成での試料供給が望まれている。しかしながら、レジオナミン酸含有糖鎖の化学合成において、レジオナミン酸のαグリコシド化反応の立体制御が課題であった。本研究では、レジオナミン酸とシアル酸の構造類似性に着目し、近年当研究室で開発したシアル酸の完全なα選択的グリコシル化法[1]のレジオナミン酸への応用を発想した。すなわち、レジオナミン酸のβ面に架橋構造を構築することにより、グリコシド化反応においてβ面を遮蔽し、α結合のみの形成が可能と考えた。
【方法・結果】レジオナミン酸の 1 位カルボキシル基と 5 位アミノ基をアルキル鎖で架橋した二環性レジオナミン酸を設計した。そこで、シアル酸を原料とした二環性レジオナミン酸供与体の合成を立案した。初めに 5 位がアセトアミド基のシアル酸からレジオナミン酸への変換を試みたが、7 位のアジド化反応が極めて低収率となった。これは、5 位アミド基との水素結合形成により 7 位水酸基への脱離基導入が進行しにくいためと考えた。そこで、架橋構造により 5 位アミド基を固定すれば水素結合が緩和されて 7 位水酸基の反応性が向上すると考えた。まず初めに、シアル酸の 1 位と 5 位を架橋した後、7 位水酸基が遊離の構造へと導いた。続いて、7 位水酸基の Tf 化を行った結果、予想通り反応は速やかに進行し、続く亜硝酸エステル化を経由して 7 位の立体反転を達成した。続いて、7 位のアジド化、9 位のデオキシ化を行った後、種々の変換を経て二環性レジオナミン酸供与体へと誘導した。さらに、合成した二環性レジオナミン酸供与体を用いてグリコシド化反応を試みた。

Legionaminic acids are found in glycans of bacteria such as *Legionella*. Because legionaminic acid-containing glycans are important targets for mechanism study of viral infections and vaccine developments, their chemical synthesis has been required. However, stereocontrol of glycosidation of legionaminic acid has been a challenging issue. In this study, we have developed a macrobicyclic legionaminic acid donor, which was designed based on a fully stereoselective α-sialylation method [1]. Furthermore, we have attempted glycosidation of the macrobicyclic glycosyl donor.

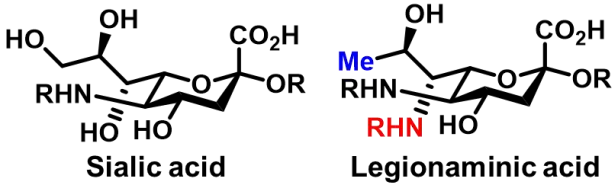


Fig. The structure of sialic acid and legionaminic acid

[1] N. Komura *et al. Science* **2019**, 364, 677–680.

Legionaminic acid, Sialic acid, Glycosylation

発表責任者：河村奈緒子（komura.naoko.a1@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3E4a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 E4 会場

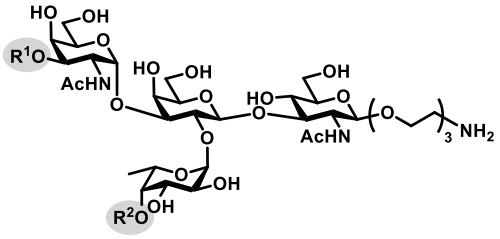
カキ中に見いだされたメチル化 A 型糖鎖抗原の合成

Synthesis of methylated A-type carbohydrate antigens found in oysters

山口 江利子[1]、ビフーテ プラティクシャ[1]、河村 奈緒子[1]、田中 秀則[1]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2]、ゲラルデル ヤン[1,3]、○安藤 弘宗[1]([1]岐阜大・iGCORE、[2]岐阜大・応用生物、[3]リール大 CNRS・UGSF)

Eriko YAMGUCHI[1], Pratiksha A. Vibhute[1], Naoko KOMURA[1], Hide-nori TANAKA[1], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2], Yann Guerardel[1,3], ○Hiromune ANDO[1] ([1]iGCORE, Gifu Univ., [2]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ, [3]UGSF, Univ. of Lille, CNRS)

【目的】細胞膜に存在するヒトの血液型糖鎖抗原は、ウィルス感染の受容体として利用されることが知られている。近年、海洋生物において水酸基がメチル化された多様な血液型糖鎖抗原の存在が明らかとなり、これらもウィルス受容体として働くことが示されている。しかし、その分子認識の仕組みは不明な点が多い。本研究では、カキに含まれるメチル化 A 抗原のウィルス結合性を調べるため、リガンドの候補分子として 3-Me-GalN 型、4-Me-Fuc 型、3-Me-GalN・4-Me-Fuc 型のメチル化 A 抗原四糖エピトープ類縁体の化学合成を目的とした。



R^1 = Me, R^2 = H (Me-3*O*-GalN form)
R^1 = H, R^2 = Me (Me-4*O*-Fuc form)
R^1 = Me, R^2 = Me (Me-3*O*-GalN・Me-4*O*-Fuc form)

【方法・結果】本合成では、単糖による逐次グリコシル化を採用し、四糖骨格を立体選択的に構築することとした。まず、還元末端残基となる GlcN に対して、アレー化のために末端にアミノ基を持つアグリコンを導入し、GlcN 受容体へ誘導した。続いて、Gal＋GlcN のグリコシル化の後、Gal 2 位水酸基を選択的に遊離にし、共通ユニットとなる二糖受容体を得た。次に Fuc 供与体（4-*O*-Me 体または 4-*O*-Ac 体）との縮合反応により各三糖骨格を得た後、Gal 3 位遊離の受容体へと変換した。続いて、4,6-DTBS 化した GalN 供与体（3-*O*-Me 体または 3-*O*-Ac 体）により、Gal 3 位に GalN を α グリコシドとして導入し四糖骨格を構築した。最後に段階的な保護基の除去により目的のメチル化 A 抗原四糖を合成した。

Histo-blood-group-antigens (HBGAs) are used as receptors in virus entry into human cells. Recently, partially methylated HBGAs were shown to serve as receptors in virus entry into marine organism cells. In the present study, we aim to synthesize methylated A antigens found in oysters to detail their binding affinity to oyster-infectious virus. We set up monomethylated (at 4-OH of Fuc or 3-OH of GalNAc) and dimethylated (4-OH of Fuc and 3-OH of GalNAc) A angtigen carrying tetrasaccharides as the synthesis targets. The tetrasaccharide frameworks of A antigen was synthesized by step-by-step glycosylations. The synthesis commenced with Gal + GlcN coupling, followed by fucosylations at the 2-OH of Gal in the disaccharide. Next, trisaccharides were α-glycosylated with 4,6-DTBS-protected GalN donors, and stepwise global deprotection successfully produced methylated A antigens.

Histo-blood-group-antigen, A antigen, virus infection

発表責任者：安藤弘宗（ando.hiromune.i0@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3E4p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E4 会場

条鰭類アクアポリン 10 パラログの輸送基質選択における機能分岐
Functional divergence in solute selectivity between ray-finned fish-specific paralogs of *aqp10*

○永嶌 鮎美[1]、潮 和敬[1]、今泉 元岐[1]、西原 秀典[1,5]、古田 忠臣[1]、インゴ ブラーシュ[2]、松崎 浩二[3]、マイケル・F ロメロ[4]、加藤 明[1] ([1]東工大・生命理工、[2]ミシガン州立大学、[3]ふくしま海洋科学館（アクアマリンふくしま）、[4]メイヨー医科大学、[5]近大・農・生物機能)
○ Ayumi NAGASHIMA[1], Kazutaka USHIO[1], Genki IMAIZUMI[1], Hidenori NISHIHARA[1,5], Tadaomi FURUTA[1], Ingo Braasch[2], Koji MATSUZAKI[3], Michael F. Romero[4], Akira KATO[1] ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo institute of Technology, [2]Michigan State University, [3]Marine Science Museum, Fukushima Prefecture (Aquamarine Fukushima), [4]Mayo Clinic College of Medicine & Science, [5]Department of Advanced Bioscience, Faculty of Agriculture, Kindai University)

アクアグリセロポリンは、水および電荷を持たない低分子化合物を通す輸送体である。四肢動物を含む肉鰭類には *aqp10* 遺伝子が 1 つ存在し、条鰭類にはタンデム重複、全ゲノム重複および遺伝子の欠失により、*aqp10* のパラログが 2 つ以上存在する。当研究室の先行研究により、ヒト Aqp10 は水、グリセロール、尿素およびホウ酸を輸送するが、Aqp10 パラログの 1 つであるトラフグ Aqp10.2b は水とグリセロールのみを輸送することが示された。しかし、どちらの活性が祖先型であるか、また進化の過程でいつ基質特異性が変化したのかは不明であった。そこで、四肢動物、肉鰭類、条鰭類の古代魚、真骨魚類の Aqp10 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、輸送活性を解析した。その結果、水、グリセロール、尿素およびホウ酸を輸送する活性が共通した祖先型の性質であることが示された。また、条鰭類に広く存在するパラログである Aqp10.2 の尿素とホウ酸に対する透過性は、他の Aqp10 よりも著しく弱かった。これらの結果は、条鰭類の共通祖先において Aqp10.2 が尿素とホウ酸の輸送に必須な構造を失った、あるいは Aqp10.2 が尿素とホウ酸をグリセロールと区別するフィルターを獲得したことを示唆している。

Aquaglyceroporins transport water and uncharged low-molecular weight compounds. Tetrapod animals have a single *aqp10* gene whereas bony fishes have two or more *aqp10* paralogs which have been generated by tandem gene duplication, whole genome duplication, and gene deletion. Our previous study revealed that human Aqp10 is permeable to solutes such as glycerol, urea, and boric acid but a pufferfish paralog, Aqp10.2b, only transports water and glycerol. However, it was unclear which activity of Aqp10 was plesiomorphic and when and how the solute selectivity changed during evolution. To examine these questions, we cloned and expressed Aqp10s of tetrapod, ancient fishes, and teleost fishes in *Xenopus* oocytes and analyzed the transport activity. As a result, water, glycerol, urea, and boric acid transport activity was commonly observed in Aqp10s of various species, showing that this activity is the plesiomorphic characteristics of Aqp10 in vertebrates. The permeabilities of the Aqp10.2, a widely conserved paralog in ray-finned fishes, to urea and boric acid were much lower than those of the other Aqp10s. These results suggest that in the common ancestor of ray-finned fishes, Aqp10.2 lost the structure necessary for urea and boric acid transport.

Aquaporin, Aquaglyceroporin, Molecular evolution

発表責任者：永嶌鮎美（anagashima@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3E4p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E4 会場

高速原子間力顕微鏡を用いたビンキュリン活性化機構の解明
Elucidation of Vinculin Activation Mechanism Using High-Speed Atomic Force Microscopy
○黒田 美都[1]、松山 大輝[1]、古寺 哲幸[2]、木岡 紀幸[1] ([1]京大院農、[2]金沢大 NanoLSI)
○Mito Kuroda[1], Daiki Matsuyama[1], Noriyuki Kodera[2], Noriyuki Kioka[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kanazawa Univ.)

ビンキュリンは細胞外マトリックスの硬さ感知とそれに伴う細胞応答の制御に重要な役割を果たす接着装置構成タンパク質である。ビンキュリンは、N 末端側の頭部ドメインと C 末端側の尾部ドメイン、それらをつなぐリンカー領域から構成され、頭部と尾部が分子内相互作用した Closed 構造から頭部と尾部が解離した Open 構造への変化が硬さの感知に寄与している 。これまでに、ビンキュリン頭部とテーリン VBS ペプチドとの結合や尾部とアクチン繊維との結合により Closed 構造から Open 構造へと構造変化すると考えられているが、ビンキュリンがどのように活性化するか詳しいメカニズムは明らかにされていない。本研究では、ビンキュリンがリアルタイムでどのような構造変化を示すかを高速原子間力顕微鏡で評価した。その結果、ビンキュリンの構造変化を引き起こすテーリン VBS ペプチドの添加により、Open 構造の滞留時間が増加した。また、各構造の滞留時間の回帰分析から、Closed 構造から Open 構造への変化、すなわち活性化には二つの経路が存在することが示唆された。今後、頭部構造の詳細な解析により、活性化メカニズムについて新たな知見を得ることができると考えている。

Cell adhesion structure plays an important role in sensing extracellular matrix stiffness and regulating cellular responses. Focal adhesion protein vinculin is composed of an N-terminal head domain, a C-terminal tail domain, and a linker region that connects the two domains. The conformational changes from a closed structure, in which the head and tail interact intramolecularly, to an open structure, in which the head and tail are dissociated, contributes to stiffness sensing. However, the detailed mechanism of how vinculin is activated has not been elucidated. In the present study, we investigated the conformational change of vinculin by high-speed atomic force microscopy. We found that the talin VBS peptide, which induces the conformational change of vinculin, increased the dwell time of the open conformation. Furthermore, regression analysis of the dwell time suggested two pathways for the change from closed to open conformation, i.e. activation. As a future perspective, a detailed analysis of the head structure is expected to provide new insights into the activation mechanism.

AFM, focal adhesion, vinculin

発表責任者：黒田美都（kuroda.mito.8s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E4p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E4 会場

高浸透圧ストレス下で形成される p62 body の解明

Characterization of p62-body induced under hyperosmotic stress in mammalian cells

○田村 直輝、和栗 聡 (福島医大)
○Naoki TAMURA, Satoshi WAGURI (Fukushima Med. Univ.)

脂質膜のない非膜性オルガネラ（membraneless organelle：MLO）の多くは、液－液相分離という物理的な性質によって形成される。MLO は一般的に可逆性を示すが、凝集体などの不可逆性の構造体になると様々な神経変性疾患を引き起こす。しかし、MLO の性状に関する知見はいまだ少ない。そこで本研究では MLO の理解を深めるために、高浸透圧ストレス下において形成される二つの MLOs、p62 顆粒とストレス顆粒の比較解析を行った。

ヒト膀胱癌由来 T24 細胞などを高浸透圧ストレスに曝したところ、p62 顆粒とストレス顆粒がストレス強度依存的に別々の構造体として形成されることが分かった。このとき、p62 顆粒の方がよりストレスに対して反応性が高かった。以前、我々は高浸透圧ストレス下でオートファジー経路が誘導されることを報告したが（Tamura et al. (2019) MCB)、このオートファジーは p62 顆粒を分解する一方で、ストレス顆粒は分解しなかった。また、光－電子相関顕微鏡（CLEM）法を用いた微細構造解析では明らかに両顆粒の形態が異なっており、p62 顆粒のみオートファジー隔離膜によって包まれていた。

以上から、高浸透圧ストレス下で形成される p62 顆粒とストレス顆粒は形成・分解様式、構成因子、および形態の点から全く異なる性状を持つ MLO であることが明らかになった。

Most membraneless organelles (MLOs) are formed by the physical property of liquid-liquid phase separation. MLOs are generally reversible, but when they become irreversible structures such as aggregates, they cause various neurodegenerative diseases. However, the properties of MLOs are still unknown. Here, in this study, to better understand MLOs, we performed a comparative analysis of two MLOs, p62 bodies and stress granules, that form under hyperosmotic stress.

When human bladder cancer-derived T24 cells were exposed to hyperosmotic stress, p62 bodies and stress granules were formed as separate structures. Previously, we reported that the autophagy pathway is induced under hyperosmotic stress. This autophagy degraded p62 bodies, but not stress granules. In addition, CLEM analysis clearly showed that the morphology of both granules was different and only the p62 bodies were sequestered by an autophagic membranes.

autophagy, LLPS, osmotic stress

発表責任者：田村直輝（tamura-n@fmu.ac.jp）

講演番号：3E4p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E4 会場

ヒト ABC タンパク質の脂質、脂溶性ビタミン輸送能評価系の開発

Development of the efficient method to analyze the transport activity of lipids and lipophilic vitamins by human ABC transporter

○木村 泰久、藤村 大河、木岡 紀幸（京大・院農・応用生命）
○Yasuhisa KIMURA, Taiga FUJIMURA, Noriyuki KIOKA (Div. Appl, Lif. Sci., Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

<背景>ABC(ATP Binding Cassette)タンパク質は ATP 依存的な膜輸送体で、物質輸送を介して生体の恒常性維持や有害化合物からの保護を担う。ABC タンパク質はヒトでは 48 種類が単離されているが、その中には輸送基質が同定されておらず、機能が推測できないタンパク質が複数存在する。また、コレステロールの輸送を行うと考えられてきた輸送体が、脂溶性ビタミンの輸送能を持つことが報告されるなど、ABC タンパク質の多機能性にも大きな感心が寄せられている。本研究では主要な脂質や脂溶性ビタミンを同時に計測し、ABC タンパク質の輸送能を効率的に評価する手法の開発を試みた。

<方法・結果>脂質と脂溶性ビタミンの混合物を順相 HPLC によって分離し、蒸発光散乱検出器(ELSD)によって脂質成分を、フォトダイオードアレイ検出器(PDA)によって脂溶性ビタミンを検出した。その結果、ELSD ではコレステロールやホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン等、主要な膜成分を分離定量することができた。また、PDA の検出波長の最適化によってビタミン D、E 等の脂溶性ビタミンの分離、定量にも成功した。コレステロールとホスファチジルコリン、ビタミン E の輸送能が報告されているヒト ABCA1 の輸送活性を評価したところ、ABCA1 を発現した細胞の培地中にこれらの脂質及び脂溶性ビタミンが排出されることを確認した。

ABC transporters transport various substrates across the cell membrane. Several ABC transporters have been reported to transport lipids and lipophilic vitamins, however, no reliable methods to separate and quantify these compounds by single chromatography have been developed. In this study, we optimized normal phase chromatography equipped with an evaporative light scattering detector (ELSD) and a photodiode array detector (PDA). In this method, it is possible to separate and quantify lipids and lipophilic vitamins at the same time. Using this method, we were able to detect the lipid and vitamin transport activity of human ABCA1.

ABC transporter, lipid, vitamin

発表責任者：木村泰久（kimura.yasuhisa.2u@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E4p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E4 会場

近接依存性ビオチン標識法を用いて同定された初期分泌経路局在タンパク質 PRRC1 の機能解析

Functional analysis of PRRC1, an early secretion pathway-localized protein identified using proximity-dependent biotin-labelling method

中山 菜月、尾関 希美、山田 彩和、牧 正敏、高原 照直、○柴田 秀樹（名大院）
Natsuki Nakayama, Nozomi Ozeki, Sawa Yamada, Masatoshi Maki, Terunao Takahara, ○Hideki Shibata (Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

動物細胞の分泌経路において、COPII は細胞質から小胞体の特別な輸送領域に動員され、小胞体膜を被覆し、輸送小胞の出芽と積荷タンパク質の選別を担う。小胞体からゴルジ体への輸送経路は初期分泌経路と呼ばれ、輸送小胞によって輸送されていると考えられてきたが、近年、小胞体から細長く伸びる輸送管や小胞体からゴルジ体へ輸送トンネルが形成されるなどの新たな説が提唱されている。本研究では、初期分泌経路の新規制御タンパク質候補として APEX2 を用いた近接依存性ビオチン標識法によって同定された PRRC1 の機能解析を行った。まず、COPII 被覆との結合を解析し、PRRC1 が COPII 内被覆を構成する Sec23A と結合することを明らかにし、その結合領域を同定した。次に、COPII 外被覆を構成する Sec31A と Sec23A の結合を、PRRC1 が阻害することを見出した。また、Sec31A-GFP を恒常発現する細胞を用いて、光褪色後蛍光回復法（FRAP 法）により Sec31A-GFP の小胞体の輸送小胞出芽部位への局在が、PRRC1 の発現抑制により安定化することを明らかにした。現在、小胞体からゴルジ体への輸送に PRRC1 の発現抑制が影響を与えるタンパク質の同定をすすめており、あわせて報告したい。

In the secretory pathway of animal cells, COPII machinery is recruited from the cytoplasm to a specialized region in the endoplasmic reticulum (ER), where it coats the ER membrane and is responsible for budding of transport vesicles and sorting of cargo proteins. The transport pathway from the ER to the Golgi apparatus is termed the early secretory pathway. In this study, we analyzed the function of PRRC1, which was identified by proximity-dependent biotin-labelling using APEX2 as a candidate for a novel regulatory protein of the early secretory pathway. First, the binding analysis of PRRC1 to the COPII components revealed that PRRC1 binds to Sec23A, which constitutes the COPII inner coat, and the binding region was identified. Next, we found that PRRC1 inhibited the binding of Sec23A to Sec31A, an outer component of COPII. Using cells that constitutively express Sec31A-GFP, we also found that the localization of Sec31A-GFP to the site of budding of transport vesicles in the ER was stabilized by the knockdown of PRRC1 by the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). We are currently studying on the identification of proteins that are affected by the knockdown of PRRC1 in the transport in the early secretory pathway.

COPII, secretory pathway, protein transport

発表責任者：柴田秀樹（shibabou@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E4p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E4 会場

マウス由来の抗がん剤等のトランスポーターAbcg2 の糖鎖付加部位変異体の機能解析
Functional analysis of glycosylation site mutants of anti-cancer drug transporter Abcg2 derived from mice.
○田口 善智、田中 友恵、廣森 竣、河合 朋優、何 依潔、和田 佳奈美、永見 宏樹（近畿大 生物理工 遺伝子工）
○Yoshitomo TAGUCHI, Tomoe TANAKA, Shun HIROMORI, Tomohiro KAWAI, Yijie HE, Kanami WADA, Hiroki NAGAMI (Kindai Univ.)

ABCG2（BCRP1）は細胞膜に局在して、抗がん剤、尿酸などの様々な物質を細胞内から外へ能動輸送するトランスポーターである。ABCG2 は、がんの抗がん剤耐性の獲得、痛風の発症に関与すると同時に、広い範囲の正常組織にも発現して生体防御機能を担い、体内における薬物動態に関与する。実験動物における薬物動態をヒトに外挿する際に、ヒトとマウス等の ABCG2 の機能の差異を明らかにしておくことが重要である。申請者らは、ヒト ABCG2 の糖鎖付加部位が 1 カ所なのに対して、マウス Abcg2 はそれを 2 カ所（N596, N600）もつことを明らかにした。そこで本研究では、マウス Abcg2 の糖鎖付加部位の変異体を用いて、それぞれの糖鎖の機能の違いを明らかにすることを試みた。
2 カ所の糖鎖を両方除去した二重変異体（N596Q, N600Q）は、細胞膜における発現量が野生型と比較して大きく低下したのに対して、N596Q および N600Q の 1 カ所のみ変異体は、どちらもタンパク質としての発現量は野生型とほとんど同じであった。一方、N596Q 変異体の発現細胞の抗がん剤耐性度は野生型とほとんど変わらないのに対して、N600Q 変異体のそれは野生型と比較して大きく低下しており、Abcg2 のもつ 2 つの糖鎖はそれぞれ役割が異なることが示唆された。

ABCG2 (BCRP1) actively transports various substances such as anticancer drugs and uric acid from inside the cell to the outside. ABCG2 is not only involved in acquiring resistance to anticancer drugs in cancer and the onset of gout, but also expresses in a wide range of normal tissues, influencing the pharmacokinetics within the body. It's important to clarify the differences in the functions of ABCG2 between humans and mice, for extrapolating drug kinetics from experimental animals to humans. We revealed that while the human ABCG2 has one site for glycosylation, mouse Abcg2 has two sites (N596, N600). Functional analysis using mutants of mouse Abcg2 with alterations in glycosylation sites suggested that the two glycosylation sites of Abcg2 have distinct roles.

ABC transporter, glycosylation, ABCG2

発表責任者：田口 善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3E4p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E4 会場

がん細胞における接着斑の脂質組成改変を目指した酵素局在化システムの構築

Development of the enzyme-localization system to modify the lipid composition of Focal adhesion in cancer cells

○山﨑 頌子、増元 亮裕、木村 泰久、黒田 美都、木岡 紀幸（京大院農）
○ Shoko YAMASAKI, Akihiro MASUMOTO, Yasuhisa KIMURA, Mito KURODA, Noriyuki KIOKA (Kyoto Univ.)

接着斑(FA)は、細胞と細胞外マトリックス(ECM)の間に形成されるタンパク質複合体である。FA を介して細胞は ECM の性質を感知し、遊走や増殖、分化を調節する。近年、FA 周辺の細胞膜が他の細胞膜とは異なる脂質組成であることが示唆され、私達は FA 周辺の膜脂質が FA の機能に関与していると考えている。FA 周辺の膜脂質の働きを明らかにするには、膜脂質を合成または分解する酵素を FA 周辺に一過的に局在させ、FA 周辺の膜脂質の組成を局所的に変化させることが有用である。これまでに、ジベレリン代謝物 GA_3 の添加により 2 つのタンパク質 GID1 と GAI の結合を誘導する化学誘導性二量体化(CID)を利用し、正常線維芽細胞において脂質修飾酵素の FA 局在化を報告した。がんの浸潤や転移への膜脂質の関与が報告されていることから、本研究ではこのシステムのがん細胞での利用可能性について検討した。

膜脂質の中でも細胞の機能を調節するプロセスの中核を担うホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸(PI(4,5)P_2)に焦点を当て、PI(4,5)P_2 合成酵素 PIP5K-YFP-GID1 と Cerulean-GAI-FA 局在タンパク質を共発現させた。共焦点顕微鏡で観察したところ、GA_3 の添加数分から 30 分後にかけて PIP5K が細胞質から FA へ局在した。一方で、PI(4,5)P_2 脱リン酸化酵素 OCRL では GA_3 を添加しても有意な局在変化は見られなかった。このことから、がん細胞において CID を用いることで一部の脂質修飾酵素の FA 局在化が可能であることが明らかになった。現在、このシステムをがん細胞で利用して FA 周辺の PI(4,5)P_2 が担う役割の解明を目指している。

Focal adhesion (FA) is a protein complex at cell-extracellular matrix (ECM) adhesion sites, which senses ECM properties and regulates cell migration and proliferation. Recent studies have shown that FA membrane has a specific lipid composition. We hypothesized that the lipid composition of the FA membrane plays a role in regulating FA function. To test our hypothesis, it is necessary to manipulate the lipid composition of FA membrane. We have established a method to localize lipid-modifying enzymes to FA in normal cells using Chemically Induced Dimerization (CID). Here we examine if this system also works in cancer cells. We focus on PI(4,5)P_2, which plays a critical role in cellular function. We showed that enzyme that synthesizes PI(4,5)P_2 was recruited to FA in cancer cells upon CID stimulation. We are further examining whether FA localization of this enzyme affects cellular function.

Focal adhesion, Chemically induced dimerization, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

講演番号：3E4p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E4 会場

酸化ストレス依存的な HT22 細胞内 MLV-Gag の動態変化と生理的意義

Regulation of MLV-Gag by oxidative stress in HT22

○葛西 柚月[1]、田辺 岳海[1]、水木 徹[2]、根建 拓[1] ([1]東洋大院生命、[2]東洋大バイオナノセンター)
○Yuzuki KASAI[1], Takemi TANABE[1], Toru MIZUKI[2], Taku NEDACHI[1] ([1]Graduate School of Life sciences, Toyo University, [2]Bio-Nano Electronics Research Center, Toyo University)

神経変性疾患では、ミスフォールドされた細胞内タンパク質の凝集および拡散が生じるが、最近になって内在性レトロウイルスの一種である MLV-Gag がこの細胞内タンパク質凝集を制御することが示された。一方、内在性レトロウイルスの遺伝子発現制御や産生されるタンパク質の生理的機能については不明な点が多く残っている。本研究では、神経変性疾患を引き起こす原因のひとつである酸化ストレスに着目し、マウス海馬由来 HT22 細胞内の MLV-Gag の動態変化と生理的意義の解明を試みた。まず、HT22 細胞に酸化ストレスを負荷したところ、MLV-Gag の発現量が有意に減少することが明らかとなった。この MLV-Gag 減少機構を解析したところ、酸化ストレス依存的に発現増加するプログラニュリン (PGRN)が重要であることが明らかとなった。さらに、MLV-Gag の機能として、タンパク質凝集促進以外に神経細胞の生存率もコントロールしていることが分かった。以上、酸化ストレス依存的な MLV-Gag 発現減少によってタンパク質凝集抑制とともに細胞数の減少が生じるが、この MLV-Gag 発現減少には PGRN が関与している可能性が考えられる。

Neurodegenerative diseases are characterized by the aggregation of misfolded proteins. Recently, it has been shown that MLV-Gag, an endogenous retrovirus, regulates the intracellular protein aggregation. However, the expressional regulations and the physiological functions of MLV-Gag remain largely unknown. In this study, we attempted to elucidate the expressional control of MLV-Gag by oxidative stress and analyzed its physiological significances in mouse hippocampal cell line, HT22 cells. We initially found that oxidative stress significantly reduced intracellular and extracellular MLV-Gag levels in HT22 cells. Intriguingly, progranulin (PGRN) induction in response to oxidative stress was necessary for MLV-Gag reduction. Furthermore, we found that MLV-Gag regulates neuronal survival in addition to promoting protein aggregation. Thus, it is possible that PGRN, which is related to neurodegenerative diseases, is involved in the oxidative stress-dependent decrease in MLV-Gag expression, which may lead the suppression of protein aggregation.

HT22 sells, endogenous retrovirus, oxidative stress

発表責任者：葛西柚月（s39102300053@toyo.jp）

講演番号：3E4p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E4 会場

肝線維化が誘導される肝臓特異的 67-kDa laminin receptor ノックアウトマウスのメタボローム解析
Metabolomic analysis of liver-specific 67-kDa laminin receptor knockout mice with induced liver fibrosis

○一瀬 智美、米山 拓良、竹下 菜津子、錦戸 里紗、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Tomomi ICHINOSE, Takuro YONEYAMA, Natsuko TAKESHITA, Risa NISHIKIDO, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

67-kDa laminin receptor（67LR）は、緑茶カテキンの一種である Epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）の受容体として機能することが知られているが、67LR 自身の生物学的役割については不明な点が多い。そこで、67LR の機能を明らかにすべく肝臓特異的 67LR ノックアウト（67LR-KO）マウスを作製したところ、肝臓における線維化が誘導された。そこで本研究では、67LR-KO マウスの肝臓における線維化と代謝との関係性を明らかにするためにメタボローム解析を行った。

肝線維化が認められる 67LR-KO およびコントロールマウスの肝臓から抽出した親水性代謝物をターゲット型 LC-MS 分析に供し、アミノ酸や有機酸を含めたメタボロームデータを取得した。本データを主成分分析（PCA）に供したところ、Score plot 上で 2 群間の異なる分散が認められ、さらに、判別分析（OPLS-DA）においても遺伝子型による相違が観察された。次に、これらの代謝物プロファイルを群間で比較した結果、一般的な肝線維化モデルマウスで減少することが報告されているチロシンやスレオニンなどの代謝物ならびに酸化ストレス除去による肝線維化抑制作用と関連する複数の代謝物が 67LR-KO により減少する傾向を示した。

以上の結果より、67LR-KO マウスの肝臓では線維化状態に応じた複数の代謝物の存在が確認され、これらの制御機構の解明が 67LR による肝線維化誘導機構の解明につながる可能性がある。

The 67-kDa laminin receptor (67LR) functions as a receptor for epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG), a type of green tea catechin. However, the biological roles of 67LR are unclear. Liver-specific 67LR knockout (67LR-KO) mice showed liver fibrosis. In this study, we investigated the relationship between metabolic states and the progression of liver fibrosis in 67LR-KO mice by metabolomic analysis. Hydrophilic metabolites extracted from livers were analyzed using LC-MS-based targeted metabolomics. The LC-MS datasets were subjected to multivariate statistical analyses. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) showed two different clusters formed according to genotypic differences. Metabolites reported to be decreased in mouse models of liver fibrosis tended to be decreased in 67LR-KO mice. The levels of some metabolites from various pathways were altered by 67LR-KO.

The presence of multiple metabolites in the liver of 67LR-KO mice, depending on their fibrotic status, may help to elucidate the mechanisms by which 67LR induces liver fibrosis.

67LR, Liver fibrosis, Metabolomics

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3E4p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E4 会場

細胞内におけるマンガンと亜鉛代謝の相関性に関する解析
Interaction of manganese and zinc homeostasis in mammalian cells
○西藤 有希奈[1]、安井 裕之[2]、神戸 大朋[1] ([1]京大院生命、[2]京都薬科大)
○YUKINA NISITHO[1], HIROYUKI YASUI[2], TAIHO KAMBE[1] ([1]The Univ. of Kyoto, [2]Kyoto Pharmaceutical University)

亜鉛、銅、マンガンなどの微量金属元素は、生体内で一定に保たれる必要があり、この維持においては、各種金属輸送体や関連タンパク質が重要な役割を担う。近年、幾つかの亜鉛輸送体がマンガンの代謝維持にも関与することが報告されており、マンガンと亜鉛の代謝は密接に関連する可能性が示唆されている。一方で、その相関性について詳細は明らかでない。本研究では、亜鉛代謝制御関連因子に着目し、マンガンが亜鉛の代謝に与える影響について詳細な解析を行った。高濃度のマンガン存在下で培養した細胞において、亜鉛応答因子である ZNT1 やメタロチオネイン（MT）の発現の減少、および、亜鉛要求性酵素の活性の低下が認められた。このことから、マンガンが亜鉛代謝に影響を与える可能性が示唆された。更に、マンガンを細胞外へ排出する SPCA1 の欠損により細胞内のマンガン量を増加させることによっても、亜鉛代謝制御関連因子の発現や活性が同様に低下することが明らかとなった。微量金属元素の相互作用として、亜鉛と銅の拮抗がよく知られるが、本研究において、銅過剰による亜鉛代謝制御関連因子の発現や活性の低下は認められなかった。本研究は、マンガンと亜鉛代謝が密接に関連することを示した重要な知見であると考えている。

Cells are equipped with an elaborate system to regulate systemic and cellular homeostasis of essential metals, including Zn, Cu, Mn, which is operated by the coordinated functions of transporters, binding proteins, chaperones, sensor proteins. Recent studies suggest that the cellular Mn metabolism is related to Zn metabolism in the multifarious cellular processes. However, it remains unclear how Mn interacts with Zn in the cells. In this study, we investigated the effects of Mn on Zn homeostasis in a series of experiments. High Mn treatment decreased expression of Zn homeostatic proteins ZNT1 and MT, and reduced Zn enzyme activities. Loss of Mn-efflux transport protein decreased ZNT1 and MT expression and Zn enzyme activity without Mn supplementation. Such reduction was not found in excess Cu treatment and in cells lacking Cu-efflux proteins. Our results provide novel molecular insights into the intricate interactions between Mn and Zn homeostasis in mammalian cells.

zinc, manganese, homeostasis

発表責任者：西藤 有希奈（nishito.yukina.2r@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E4p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 E4 会場

MMP2 制御は酸化ストレスによる老化様皮膚病態を改善する
Suppression of MMP2 improves aging-like skin pathologies induced by oxidative stress
○澁谷 修一、上條 真弘、渡辺 憲史、清水 孝彦（国立長寿研　ジェロサイエンス）
○Shuichi Shibuya, Masahiro Kamijo, Kenji Watanabe, Takahiko Shimizu (Natl. Ctr. of Geriatr. & Gerontol.)

コラーゲンを含む細胞外マトリックス(ECM)の恒常性維持は皮膚機能を保つ上で重要である。これまでに、我々は抗酸化酵素 SOD1 欠損(*Sod1*$^{-/-}$)マウス皮膚の先行解析で、酸化ストレスによる ECM 分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ 2（MMP2）の発現増加が皮膚萎縮に大きく寄与するデータを得た。本研究は、*Sod1*$^{-/-}$マウス皮膚の過剰な MMP2 を制御し、酸化ストレスに起因する老化様皮膚病態の改善作用を調べることを目的とした。まず、*Sod1*, *Mmp2* 二重欠損マウスを作出し皮膚病態を解析した。作出した *Sod1*$^{-/-}$, *Mmp2*$^{-/-}$マウスは体が小さく成長異常が見られたため、*Sod1*$^{-/-}$, *Mmp2*$^{+/-}$マウスを解析した。*Sod1*$^{-/-}$, *Mmp2*$^{+/-}$マウスは *Sod1*$^{-/-}$, *Mmp2*$^{+/+}$マウスと比較して皮膚厚が増加し皮膚萎縮の改善作用を示した。遺伝子発現解析では、*Sod1*$^{-/-}$, *Mmp2*$^{+/-}$マウス皮膚で *Tnf-α* が有意に減少し、皮膚炎症が軽減した。次に *Sod1*$^{-/-}$マウス皮膚および創傷処理皮膚に MMP インヒビターbatimastat を経皮投与し、薬剤による MMP2 抑制の作用を調べた。その結果、Batimastat は *Sod1*$^{-/-}$マウスの皮膚厚を有意に増加し、創傷治癒速度も有意に改善した。MMP2 制御による皮膚の ECM 恒常性維持は酸化ストレスによる加齢様皮膚病態改善戦略として応用が期待できる。

Homeostasis of the extracellular matrix (ECM), including collagen, is important for maintaining skin function. Previously, we obtained the data from the analysis of the skin of mice lacking the antioxidant enzyme SOD1 (*Sod1*$^{-/-}$) that increased expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), a member of the ECM degrading enzyme family, significantly contributes to skin atrophy. In this study, we investigated the effect of excessive MMP2 regulation on aging-like skin pathologies caused by oxidative stress in *Sod1*$^{-/-}$ mice. First, we generated *Sod1*, *Mmp2* double-deficient mice and analyzed their skin pathologies. *Mmp2* deletion in *Sod1*$^{-/-}$ mice improved skin atrophy with decreased expression of inflammatory cytokine genes. Next, pharmacological MMP2 inhibition by transdermal administration of batimastat, the MMP inhibitor, to the skin of *Sod1*$^{-/-}$ mice improved skin atrophy and wound healing in *Sod1*$^{-/-}$ mice. Retain of ECM homeostasis in the skin through MMP2 regulation is expected to be applied as a strategy to improve aging-related skin pathologies.

matrix metalloproteinase, skin aging, oxidative stress

講演番号：3E4p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 E4 会場

Comparative study of the enzymatic properties of CMP-sialic acid synthetases in deuterostome
○Di Wu[1,2,3], Misato Bessho[1,2], Masaya Hane[1,2,3], Chihiro Sato[1,2,3], ken kitajima[1,2,3] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]iGCORE, Nagoya Univ.)

The CMP-sialic acid synthase (CSS) is an essential enzyme in the biosynthetic pathway of sialic acid (Sia)-containing glycoconjugates, because it synthesizes CMP-Sia, which is an only donor substrate for sialylation of glycan chains. It has been shown that which Sia species (Neu5Ac, Neu5Gc, or Kdn) the CSS prefers as a substrate depends on the organism species. In addition, vertebrate CSS is known to be localized primarily in the nucleus, which is different from other enzymes that are involved in the nucleotide-sugar synthesis. However, the substrate specificity and localization of CSS of *Deuterostomia* other than vertebrates, *i.e.*, protochordata and echinodermate, has not been clarified. In this study, we conducted a comparative analysis of the substrate specificity and intracellular localization of CSSs from various duterostome animals, including sea urchin (echinoderm), acorn worm (hemichordate), amphioxus (cephalochordate), ascidian (urochordate), and loach (vertebrate). The acorn worm, amphioxus, and loach contained three, four, and two kinds of *CSS* genes, respectively.
(1) The recombinant histidine-tagged CSS was expressed using the *Escherichia coli* expression system and purified by the Ni-agarose chromatography. The CSS activity was measured toward Neu5Ac, Neu5Gc, and Kdn. The activities of all the purified CSSs were detected; however, substrate specificity was shown to vary from species to species. Interestingly, in organisms with multiple kinds of CSS, such as loach and acorn worm, each CSS has different substrate specificity toward to Neu5Ac, Neu5Gc, or Kdn, suggesting that CSS is differently used depending on the Sia species.
(2) Intracellular localization was analyzed by expressing each recombinant CSS in mammalian CHO cells and insect S2 cells, followed by performing immunocytochemistry. In all the species examined, the immunostaining was more or less observed in the nucleus or cytosol. However, the ratio of nucleus and cytosol localization were different depending on the species.
Our results showed that the substrate specificity and intracellular localization of CSSs differed among deuterostome. We could for the first time demonstrate that CSSs in the *Deuterostomia* had diverse properties.

CMP-sialic acid synthetases, enzymatic property, deuterostome

講演番号：3E5a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E5 会場

Aspergillus sydowii が生産するタンパク質分解酵素群の異種発現と特性解析
Heterologous expression and characterization of proteases from *Aspergillus sydowii*
○織部 恭宏[1]、西村 龍星[1]、木村 行宏[1]、田中 伸一[2]、土居 幹治[2]、竹中 慎治[1]([1]神戸大院農、[2]マルトモ株)
○Yasuhiro Oribe[1], Ryusei Nishimura[1], Yukihiro Kimura[1], Shin-ichi Tanaka[2], Mikiharu Doi[2], Shinji Takenaka[1] ([1]The Univ. of Kobe, [2]Marutomo co.)

【目的】ユネスコ無形文化遺産への登録や国際博覧会での紹介を通して、我が国の伝統的な食文化が世界的にも認知され、これを支える“だし”への関心も高まりつつある。だしの素である鰹節は荒節と枯節に大別され、枯節の製造には *Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ったかび付け工程が加わる。当研究室で保有する鰹節カビ *A. sydowii* MA0196 株は、タンパク質分解活性が高く、本菌を用いて鰹節やだしがらを処理すると、エキスのうま味や呈味性が増大する[1,2]。そこで、鰹節タンパク質の分解に特化した酵素を特定し、鰹節の品質向上や酵素群の活用を見出すべく、その触媒化学的諸性質や低水分活性下での働きを明らかにすることを目的とする。この報告では、鰹節カビ *A. sydowii* MA0196 株が分泌するタンパク質分解酵素の異種発現と特性について述べる。
【方法】既報の方法を基に、MA0196 株を固体培養し、培養物に含まれるタンパク質分解酵素を各種クロマトグラフィーにより精製した。エンド型ペプチダーゼ異種発現は、*Pichia* 酵母によった。
【結果】MA0196 株について、アミノペプチダーゼ（5 種）、ジペプチジルペプチダーゼ（2 種）、カルボキシペプチダーゼ（3 種）、アスパルティックプロテアーゼや鰹肉タンパク質に対して分解活性を示す 2 種のセリンプロテアーゼ（Oryzin および Tryp）を見出した。この 2 種のセリンプロテアーゼについて、それぞれ *P. pastoris* による異種発現系の構築を検討してきた。現在、これらのプロテアーゼの調製条件を最適化するとともに、特性解析を行っている。
【Abstract】In Japanese fermented foods, lipolysis and proteolysis during the fermentation generate a variety of flavor compounds and taste-active amino acids. Our aim is to elucidate the key peptidases involved in katsuobushi ripening and fermentation by xerophilic molds. Understanding the characteristics and roles of fungal enzymes lead to choose beneficial molds and to optimize the katsuobushi production. *A. sydowii* MA0196 was found to secreted various endo- and exo- peptidases during katsuobushi powder solid-state fermentation. Among identified peptidases, elastinolytic and trypsin-like serine proteases (Oryzin and Tryp) hydrolyzed katsuobushi protein. These serine proteases were heterologous expressed by *Pichia pastoris*. Here, purification and characterization of recombinant proteases will be described. 1) Takenaka et al. Int. J. Food Microbiol. 353:109299 (2021); 2) Takenaka et al. Proc. Biochem. 130: 534-544 (2023).

Aspergillus, katsuobushi, peptidase

発表責任者：織部恭宏（231a417a@stu.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3E5a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E5 会場

鰹節カビが生産する脂質分解酵素群の異種発現と特性解析
Heterologous expression and characterization of lipolytic enzymes from katsuobushi molds
○竹中 慎治[1]、梅木 智哉[1]、豊嶋 瞭太[1]、木村 行宏[1]、田中 伸一[2]、土居 幹治[2]([1]神戸大院農、[2]マルトモ株)
○shinji Takenaka[1], Tomoya Umeki[1], Ryota Toyoshima[1], Yukihiro Kimura[1], Shinichi Tanaka[2], Mikiharu Doi[2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Marutomo co.)

【背景と目的】鰹節は荒節と枯節の 2 種類に大別され、枯節の製造には *Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ったかび付け工程が加わる。同工程において鰹肉中の脂質の分解が進むことから、脂質分解に関わる菌体外酵素群の同定と特性解析を行い、*A. chevalieri* および *A. pseudoglaucus* からそれぞれ 5 種類（cLip_1~cLip_5）および 3 種類（pLip_1~pLip_3）の脂質分解酵素をすでに見出している[1)]。本研究では、これら 8 種の脂質分解酵素の触媒化学的諸性質の解析を行った。
【方法】酵素の調製：各種クロマトグラフィーにより親株酵素または麹菌、*Pichia* 酵母および大腸菌による組換え酵素を精製した。酵素活性測定：基質として *p*-nitrophenyl ester (pNP_C2～C16)または cod liver oil を用いた。また，低水分活性環境を疑似的に再現するためにグリセロールまたは D-ソルビトールを反応液に添加した。
【結果および考察】cLip_1～cLip_4 および pLip_1 は短鎖のエステル（C2~C6）に対して高活性であり、cLip_5、pLip_2 および pLip_3 は C6～C12 に対して幅広い活性を示した。cod liver oil に対する酵素活性を調べたところ、cLip_5、pLip_2 および pLip_3 が高活性を示した。酵素活性に与える水分活性の影響を調べると、cLip_1、cLip_4 や pLip_3 などは低水分活性下でも活性を維持していた。現在，親株における Lip 遺伝子群の発現量を比較しており，どのようなタイプの脂質分解酵素が鰹節の発酵熟成に特に関わるのか議論したい。
【Abstract】In Japanese fermented foods, lipolysis and proteolysis during the fermentation generate a variety of flavor compounds and taste-active amino acids. Our aim is to elucidate the key lipolytic enzymes involved in katsuobushi ripening and fermentation by xerophilic *Aspergillus* spp. *A. chevalieri* and *A. pseudoglaucus* secreted various lipolytic enzymes (cLip_1 to cLip_5 and pLip_1 to pLip_3). In this study, we characterized recombinant enzymes derived from these molds, which were heterologously expressed in *E. coli*, *Pichia pastoris*, and/or *A. oryzae*. The lipolytic enzymes were assessed in terms of their hydrolytic properties for both artificial substrates (p-nitrophenyl acyl esters) and a natural substrate (cod liver oil). Additionally, their hydrolytic activity under low water activity conditions was examined. Gene expression levels will also be compared to provide further insights. 1) Takenaka et al. Int. J. Food Microbiol. 353:109299 (2021).

Aspergillus, katsuobushi, lipolytic enzymes

発表責任者：竹中慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3E5a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E5 会場

種々の *Paenibacillus* 属由来 *nif* クラスターを導入した大腸菌でのニトロゲナーゼ活性

Nitrogenase activity in recombinant *Escherichia coli* possessing *nif* cluster derived from *Paenibacillus* spp.

○竹内 琴音[1]、早川 紗和子[1]、本田 裕樹[1]、駒 大輔[2]、藤井 浩[1]（[1]奈良女大理、[2]大阪技術研）
○Kotone TAKEUCHI[1], Sawako HAYAKAWA[1], Yuki HONDA[1], Daisuke KOMA[2], Hiroshi FUJII[1]
([1]Fac. Sci., Nara Women's Univ., [2]ORIST)

【背景・目的】アンモニアは優れた可搬性から水素に次ぐエネルギーキャリアとして注目される。一方、その工業的生産はハーバー・ボッシュ法に依り、高温高圧下で化石燃料由来の水素を大量に使用する。ニトロゲナーゼは常温常圧下で窒素からのアンモニア生成を触媒する酵素で、ニトロゲナーゼを活用した省エネルギーなアンモニア合成に期待が寄せられる。これに向けて演者らは、大腸菌へのニトロゲナーゼ活性付与を試みており、これまでに得られた知見を報告する。
【方法】アセチレン還元活性が確認された *Paenibacillus* 属から *nif* クラスター（*nifBHDKENXhesAnifV*）とその上流領域 150～200 bp を取得し pUC19 に挿入した。構築したプラスミドを保持した大腸菌を嫌気培養し、アセチレン還元を指標にニトロゲナーゼ活性を測定した。*nif* の上流領域を蛍光タンパク質をコードする配列に連結し、蛍光強度を指標に大腸菌内でのプロモーターとしての機能を確認した。
【結果】菌株保存機関より取得した *Paenibacillus* 属のうち相対的にアセチレン還元活性の高い 3 株（活性の高い順に A, B, C とする）の *Paenibacillus* 属から *nif* クラスターをクローニングした。大腸菌に導入すると、アセチレン還元活性は C 株由来 *nif* クラスター導入株から検出できた。また蛍光タンパク質を用いた解析で、C 株の上流領域のみが大腸菌内でプロモーターとして機能すると確認できた。C 株の上流領域を、AやB株の *nif* クラスターに連結して大腸菌に導入すると、C 株由来 *nif* クラスター導入大腸菌よりも高いアセチレン還元活性を示した。

Nitrogenase is an enzyme catalyzing the ammonia formation from nitrogen under mild conditions, and energy-sabing ammonia production using the enzyme is expected. We have been attempting to confer nitrogenase activity to *Escherichia coli* to obtain high level production of the nitrogenase enzyme. The *nif* clusters were cloned from three stains of *Paenibacillus* sp. with relatively high acetylene reduction activity among tested (designated A, B, and C in order of activity). When the three nif clusters with their upstream region were introduced into *E. coli*, the acetylene reduction activity was detected in the one *E. coli* strain possessing the nif cluster from *Paenibacillus* strain C. Promoter analysis with the fluorescent protein revealed that only the upstream region from strain C functioned as a promoter in *E. coli*. When the plasmids, that possess the upstream region of strain C ligated with the *nif* cluster from strains A and C, introduced into *E. coli*, both *E. coli* strains showed higher acetylene reduction activities than the *E. coli* possessing the strain C-derived *nif* cluster.

ammonia, nitrogenase, *Paenibacillus* sp.

発表責任者：本田　裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：3E5a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 E5 会場

大腸菌における Azotobacter vinelandii 由来ニトロゲナーゼの活性改善

Improvement of the nitrogenase activity in *Escherichia coli* expressesing the *nif* related genes from *Azotobacter vinelandii*

○伊藤 有亮[1,2]、吉留 大輔[1]、日髙 真誠[1]、荒木 康子[2]、伊藤 伊藤 考太郎[2]、古園 さおり[1,3]、西山 真[1,3] ([1]東大院・農生科、[2]キッコーマン株式会社、[3]東大・微生物連携機構)
○YUSUKE ITO[1,2], DAISUKE YOSHIDOME[1], MAKOTO HIDAKA[1], YASUKO ARAKI[2], KOTARO ITO[2], SAORI KOSONO[1,3], MAKOTO NISHIYAMA[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]Kikkoman Corp., [3]CRIIM, UTokyo)

生物窒素固定の応用利用の基盤整備の一つとして、大腸菌に窒素固定能を発揮させる研究が行われている。我々は、大腸菌に *A. vinelandii* の 18 の窒素固定関連遺伝子（*nifHDKBUSVQENXYWZMF*、*iscA*^{nif}、*nafU*）を導入したうえで、NifH の鉄硫黄クラスター形成関連遺伝子（*nifUS*、*iscA*^{nif}）、ならびに NifH への電子伝達に関与する大腸菌の遺伝子（*ydbK*、*fldA*）を発現強化すると（KI4-ABC2 株）、窒素固定能を安定して発揮することを昨年度大会で報告した。本発表では、ニトロゲナーゼ複合体（$[NifH]_2$ ならびに $[NifD]_2[NifK]_2$）の形成状態を解析し、それを改善する因子を探索した結果を報告する。

A. vinelandii DJ および大腸菌 KI4-ABC2 株の細胞破砕液をゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析により[NifD]および[NifK]の分布を調べた。その結果、DJ 株では[NifD]および[NifK]はすべて$[NifD]_2[NifK]_2$として存在していたが、KI4-ABC2 株では NifD と NifK がモノマー状態で存在しているものもかなり多く観察され、$[NifD]_2[NifK]_2$の形成効率が低いことが分かった。そこで、apo-$[NifD]_2[NifK]_2$ の成熟への関与が示唆されている *nafH* または *nafY* の発現を強化した結果、窒素固定能が向上した。さらに$[NifH]_2$の成熟に関わる *nifM* の発現を強化したところ、同様に窒素固定能の向上が認められ、それらを組み合わせることで窒素固定能のさらなる向上が達成された。

We previously demonstrated that additional expression of genes involved in the biosynthesis of [4Fe-4S] cluster (*nifUS* and *iscA*^{nif}) and also the electron transfer (*ydbK* and *fldA*) improved the nitrogenase activity（KI4-ABC2 strain） in the *E. coli* KT strain expressing the 18 nitrogen fixation-related genes (*nifHDKBUSVQENXYWZMF*, ^{nif}*iscA and nafU*) from *A. vinelandii* ATCC 9046. We in this study investigated the effects of genes involved in the assembly of the nitrogenase complex($[NifH]_2$ and $[NifD]_2[NifK]_2$) to further improve the nitrogenase activity.

Gel filtration and western blot analysis revealed that NifD and NifK fully formed a heterotetramer $[NifD]_2[NifK]_2$ in *A. vinelandii*, but only partially in KI4-ABC2 strain. Overexpression of *nifM*, which is involved in the maturation of $[NifH]_2$, and/or *nafH* or *nafY*, which is thought to be involved in the maturation of apo-$[NifD]_2[NifK]_2$, improved the nitrogenase activity.

nitrogen fixation, heterologous expression, nitrogenase complex formation

講演番号：3E5a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E5 会場

界面胞子変換システムの位置選択的微生物酸化への応用

Application of interfacial sporular transformation system to regioselective microbial oxidation

○小田 忍、杉本 恭子（金沢工大・ゲノム研）
○Shinobu ODA, Kyouko SUGIMOTO (Kanazawa Inst. Technol.)

【目 的】休眠細胞と見なされているカビ胞子は、実は栄養細胞が持つ数多くの酵素をフル装備した活性型細胞である上に、優れたストレス耐性を有した生体触媒である。本研究では、濾過板に固定化したカビ胞子層の上に重層した疎水性有機溶媒中の基質を微生物変換する、界面胞子変換システム（IFST; Interfacial sporular transformation system）の構築を図った。
【方 法】1% Methylcyclohexanol（Met-CHol）/dimethylsilicone oil（KF-96A-1CS）と窒素源量半減サブロー培地との界面培養において、*Penicillium* sp. KIT-J0337 を Met-CHol 酸化株に選定した。本株の胞子について酸化酵素の位置選択性、菌糸との活性比較、基質濃度と胞子量の影響を調べた。さらには、胞子層を固定化した濾過板（NA-100, Advantec）を素寒天ゲル上に設置したリアクターユニットを三段に重ね、有機層（1.5% 4-Met-CHol/KF-96A-1CS）循環ラインを連結して実動試験を実施した。
【結果】 96 株の *Penicillium* spp.より選抜した KIT-J0337 株は 2-Met-CHol を酸化できず、4-Met-CHol を最もよく酸化した。4-Met-CHol は非常に強い微生物毒性を有しており、菌糸では 2%濃度の基質の酸化が不可能であったのに対して胞子は 3%の濃度でもこれを酸化でき、1.5% Met-CHol の場合に最も多くの 4-methylcyclohexanone（4-Met-CHone）を胞子濃度依存的に生産した。濾過板を固定化担体とする三段高層式システムが、1.5%の 4-Met-CHol を安定的に酸化し得ることも確認できた。

Objectives: The aim of this study was to construct a prototype of practical interfacial sporular transformation (IFST) system targeting at the oxidation of 4-methylcyclohexanol (4-Met-CHol) to 4-methylcyclohexanone (4-Met-CHone).
Methods: About *Penicillium* sp. J0337 selected as the best strain, regioselectivity of its oxidative enzyme, comparison of sporular and mycelial enzyme activities, effects of substrate concentration and spore amount were estimated in an interface between an agar plate and an dimethylsilicone oil layer. The prototype of IFST system was constructed with three-stacked reactor units packed a filter pad (NA-10, ADVANTEC) set on a plain agar gel and an organic layer-circulation line.
Results: The spores of this strain could regioselectively oxidize 4-Met-CHol to 4-Met-CHone depending on a substrate concentration and a spore amount. It was observed that the three units-stacked IFST system stably produced much 3-Met-CHone.

fungal spore, microbial transformation, interfacial sporular transformation system

発表責任者：小田忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3E5a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E5 会場

Lysobacter sp. MK9-1 由来キチナーゼ Chi19MK の構造解析
Structural analysis of the thermostable GH19 chitinase from *Lysobacter* sp.MK9-1.
○横道 萌、菅野 春樹、真壁 幸樹、今野 博行、矢野 成和（山形大学理工）
○Moe YOKOMICHI, Haruki KANNO, Koki MAKABE, Hiroyuki KONNO, Shigekazu YANO (Yamagata Univ.)

【目的】
グラム陰性細菌 *lysobacter* sp. MK9-1 由来の糖質加水分解酵素 19 型キチナーゼ Chi19MK は、優れた熱安定性を有している。本研究では、Chi19MK の耐熱性機構の解明を目指し、触媒ドメインの結晶構造解析をもとに変異酵素を作製した。変異酵素の熱安定性を解析することにより、耐熱性に関わるアミノ酸や構造領域の特定を試みた。
【方法と結果】
熱安定性を有しない *Bacillus circulans* KA-304 由来の糖質加水分解酵素 19 型キチナーゼ ChiI と Chi19MK のアミノ酸配列と立体構造を比較し、構造が類似しないアミノ酸や領域を調べた。その結果を基にして、Chi19MK の 147 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異酵素(D147A)、ChiI の部分領域を置換した変異酵素（mutant1,mutant2）の 3 種類を作製した。それぞれの変異酵素において円二色性分散計を用いた二次構造の解析を行った結果、D147A、mutant2 は熱処理によって変性したが、mutant1 は熱変性しなかった。現在、立体構造の比較結果をもとに、複数の変異酵素を作製している。

Glycoside hydrolase (GH) family 19 type chitinase, Chi19MK, from gram-negative bacterium *Lysobacter* sp. MK9-1 is a thermostable enzyme. To clarify the structural features related to thermostability, we constructed various mutant enzymes based on the crystal structure of the catalytic domain. By analyzing the circular dichroism (CD) spectrum of the mutant enzyme, we attempted to identify the amino acids and structural regions involved in thermostability.

GH19 chitinase Chi I from *Bacillus circulans* KA-304 is not a thermostable enzyme. The amino acid sequences and crystal structures of Chi I and Chi19MK were compared to identify amino acids and regions without structural similarity. Based on these results, three types of mutant enzymes were produced: a mutant enzyme in which the 147th aspartic acid of Chi19MK was replaced with alanine (D147A), and two mutant enzymes in which a partial region of Chi I was replaced (mutant1 and mutant2). The secondary structure analysis of each mutant enzyme using CD spectra analysis revealed that D147A and mutant2 were denatured by heat treatment, and mutant1 was not.

chitinase, Lysobacter, thermostability

発表責任者：矢野成和（shige-y@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3E5a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E5 会場

糸状菌 *Trichoderma asperellum* 由来キチナーゼに関する研究
Studies on chitinase from filamentous fungus *Trichoderma asperellum*
○新谷 昌紘、豊田 陵介、金政 真（中部大院・応生）
○Masahiro SHINTANI, Ryosuke TOYODA, Shin KANAMASA (Grad. Sch Biosci. Biotech., Chubu Univ.,)

バイオマスは地球上に豊富に存在する再生可能な資源であり、その利用過程で生じる二酸化炭素は植物に吸収されて炭素循環を形成することから、持続可能社会の実現に向けたひとつの解決策になると期待されている。バイオマスの利用には糖質加水分解酵素による分解（糖化）が必要である。キチンはエビ、カニなどの甲殻類の殻に含まれる豊富なバイオマスである。当研究室で同定した糸状菌 *Trichoderma asperellum* IC-1 株は、高いキチナーゼ活性を有する。本研究では、本菌株の培養条件がキチナーゼ生産に与える影響を調べ、さらに本酵素について知見を得るために麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主として異種発現を試みた。

本菌を 14 種類の炭素源で培養を行いキチナーゼの活性を測定して酵素生産性を調べた。また、QRT-PCR により転写解析を行い、特に転写量が高かったキチナーゼ遺伝子について高発現ベクターを構築し、*A. oryzae* に導入した。遺伝子導入した *A. oryzae* においてキチナーゼ活性を確認したことについて報告する。

Biomass is the most abundant renewable resource on earth, and the carbon dioxide produced in the process of its use is absorbed by plants to form a carbon cycle, which is expected to be one solution for the realization of a sustainable society. Chitin is found in the shells of shrimp, crabs, and other crustaceans, and is abundant biomass on earth. The filamentous fungus *Trichoderma asperellum* strain IC-1 identified in our laboratory has high chitinase activity. In this study, we investigated the effect of culture conditions on chitinase production of this strain, and we expressed recombinant chitinases in *Aspergillus oryzae*.

Trichoderma asperellum, chitinase, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3E5a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E5 会場

計算科学を用いた真菌由来テルペン環化酵素の反応機構解析

Analysis of the reaction mechanism of fungal terpene cyclase using a computational chemistry approach

○烏野 祐作[1]、佐藤 玄[2]、白石 太郎[1]、葛山 智久[1] ([1]東大院農、[2]山梨大院総合)
○Yusaku KARASUNO[1], Hajime SATO[2], Taro SHIRAISHI[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Interdiscip. Grad. Sch. Med. Eng. Univ. Yamanashi)

テルペン環化酵素(TC)は、テルペン類の主骨格を構成する反応を触媒する鍵酵素である。中でもクラスⅠに分類される TC は、ジリン酸の解離を初発反応としてさまざまな遷移状態を経て多様なテルペノイド骨格を与える興味深い酵素群である。本研究では、TC の活性中心におけるアミノ酸残基の役割を正確に把握するため、構築した一連の反応中間体の全原子モデルの検証を目的とした。

TaTC6 は真菌である *Trichoderma atroviride* FKI-3849 から見出されたクラスⅠテルペン環化酵素であり、基質である farnesyl diphosphate から trichobrasilenol を生産する反応を触媒する[1)]。本研究では、まず DFT 計算によって推定された中間体[2)]を用いて、Rosetta によるドッキング計算[3)]を行い、すべての中間体の全原子モデルを構築した。その結果、TaTC6 の触媒活性に関わるアミノ酸残基と、それらアミノ酸残基の役割をより詳細に予想することが可能になった。そこで次に、各触媒残基の変異酵素を作製し、得られた反応産物を同定することで、それぞれのアミノ酸残基の予想された役割を検証した。本発表では、これらの結果の詳細について紹介する。

Terpene cyclases (TC) are key enzymes that catalyze construction of the main skeleton of terpenes. Among TCs, class I TCs are interesting enzymes that undergo various transition states through the dissociation of diphosphate as the initial reaction to give diverse terpenoid skeletons. The purpose of this study was to validate the all-atom model of a series of reaction intermediates constructed to accurately determine the role of amino acid residues in the active center of TC.

TaTC6 is a class I TC found in the fungus *Trichoderma atroviride* FKI-3849, which catalyzes the synthesis of trichobrasilenol from farnesyl diphosphate[1)]. We first conducted Rosetta docking calculations[3)] using the intermediates estimated by DFT calculations[2)] and constructed an all-atom model for all intermediates. The model enabled to predict in more detail the amino acid residues involved in the catalytic activity of TaTC6 and their roles. Next, we produced mutant enzymes for each catalytic residue and verified the predicted role of the amino acid residues. In this presentation, we will present the details of these results.

(1) Murai K., *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 15046-15050
(2) Sato H., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 19830-19834
(3) O'Brien TE. *et al.*, *Chem. Sci.*, 2016, 7, 4009-4015

DFT calculation, docking simulation, active center

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E5a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 E5 会場

ゲノム編集因子 ST8 を用いた産業用酵母におけるゲノム編集技術の開発
Development of genome editing technology in industrial Yeast using genome editing factor ST8
○沢津橋 俊[1]、中島 俊雄[2]、藤田-竹下 結衣[2]、穂積 俊矢[2]([1]徳島大先端酵素研、[2]（株）セツロテック)
○Shun SAWATSUBASHI[1], Toshio NAKAJIMA[2], Yui FUJITA-TAKESHITA[2], Shunya HOZUMI[2]
([1]Tokushima Univ. IAMS, [2]Setsuro Tech Inc.)

醸造や製パンに用いられる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は産業上有用な微生物として古くから育種改良されてきた。しかしながら、突然変異誘導による従来育種では、狙った形質を得るまでに膨大な時間を要することが課題である。本研究では、ゲノム編集因子 ST8 を駆使した産業酵母の育種技術の構築を目的とした。ST8 は、ヒト培養細胞・ニワトリ・マウスなどの高等真核生物において、ゲノム編集実績のあるクラス II-V 型の CRISPR-Cas ヌクレアーゼの 1 種である。そこで、まずは ST8 タンパク質および CRISPR RNA を共発現するプラスミドベクターを構築し、さらにリペアフラグメントを鋳型とした相同組換えによる遺伝子破壊を実施した。その結果、二倍体産業用酵母において、最大で 99.9%の高効率での遺伝子破壊に成功した。また、リペアフラグメントを利用しない非相同末端結合においては、数回の継代を実施した場合に 10%程度の効率でゲノム編集に成功した。この結果から、産業用酵母において遺伝子組換え生物に該当しないゲノム編集技術を確立でき、本技術がアルコール発酵能や香気生成能に優れた酵母の育種開発の強力なツールとなる可能性を示している。

Saccharomyces cerevisiae, a budding yeast used in brewing and baking, has long been bred and improved as an industrially useful microbe. However, conventional breeding by mutation induction requires a large amount of time to obtain the desired phenotypic traits. In this study, our goal is to devise a method for breeding industrial yeast utilizing the genome editing factor ST8, a class II type V CRISPR-Cas nuclease that has been used for genome editing in higher eukaryotes such as human cultured cells, chickens, and mice. Consequently, we initially engineered a plasmid vector coexpressing the ST8 protein and CRISPR RNA. Subsequently, we executed gene disruption through homologous recombination, utilizing the synthetic recombination sequence as a template. As a result, we succeeded in highly efficient gene disruption of up to 99.9% in diploid industrial yeast. In non-homologous end joining without using synthetic fragments, genome editing was successful with an efficiency of about 10%. These findings suggest the feasibility of establishing a genome editing technology in industrial yeast. Therefore, this technology emerges as a potent instrument for the selective breeding and advancement of yeasts endowed with exceptional attributes.

genome editing, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：沢津橋俊（shun-sawa2@umin.ac.jp）

講演番号：3E5a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E5 会場

セルロース結合ドメインを多連結に付加した *Candida antarctica* lipase B の構築とセルロースへの固定化

Addition of a cellulose-binding domain multimer to *Candida antarctica* lipase B and immobilization of the fusion enzyme on cellulose.

○久恒 光輝、真壁 幸樹、矢野 成和（山形大院理工）
○Koki HISATSUNE, Koki MAKABE, Shigekazu YANO (Yamagata Univ.)

【目的】

工業的に酵素を使用する場合、酵素は固定化される場合がある。リパーゼは工業的に利用されており、その中でも広く用いられているのは *Candida antarctica* lipase B (CALB)である。本研究では、CALB をモデルとし、セルロース結合ドメイン (CBD)を 4 連結した融合酵素（CALB-CBDx4）を作製した。本融合酵素を作製する際に、自発的に共有結合を形成する SpyCatcher/SpyTag システムを利用した。融合酵素 CALB-CBDx4 のセルロースに対する結合能を評価した。

【方法と結果】

CALB の C 末端に His-tag、SpyTag を付加するために発現ベクター（pET-pelB-CALB-His、pET-pelB-CALB-SpyTag）を作製し、*Escherichia coli* Rosetta2 (DE3)で発現させた。各種クロマトグラフィーを用いて精製した pelB-CALB-His、pelB-CALB-SpyTag の比活性は、それぞれ 66.7、68.3 μmol ml^{-1} mg^{-1} であった。この結果から、SpyTag を付加しても活性に大きな影響を与えないことが示された。次に、4 連結した CBD に SpyCatcher を付加した CBDx4-SpyCatcher を作製した。CBDx4-SpyCatcher と pelB-CALB-SpyTag を混合することで、目的の融合酵素 CALB-CBDx4 が得られた。CALB-CBDx4 とセルロースを混合することで、セルロースに結合することを確認した。今後、この酵素の固定化量、再利用性などについての評価を行う。

Enzymes are widely used in various industries and are sometimes immobilized on carriers or matrices. *Candida antarctica* lipase B (CALB) is widely used enzyme. In this study, four cellulose-binding domains were fused to the C-terminus of the CALB. Because SpyTag and SpyCatcher spontaneously form a covalent complex, the SpyCatcher/SpyTag system was used to construct the fusion enzyme (CALB-CBDx4). The ability of CALB-CBDx4 to bind cellulose was evaluated.

His-tag and SpyTag were fused to the C-terminus of CALB, and the fusion enzymes (pelB-CALB-His and pelB-CALB-SpyTag) were expressed in *Escherichia coli*. The specific activity of pelB-CALB-His and pelB-CALB-SpyTag were 66.7 and 68.3 μmol ml^{-1} mg^{-1}, respectively, suggesting that the addition of SpyTag hardly affected the lipase activity. SpyCatcher was fused to four cellulose-binding domains, and the fusion enzyme, CBDx4-SpyCatcher, was ligated to CALB-SpyTag, indicating the formation of CALB-CBDx4. The cellulose-binding assay showed that CALB-CBDx4 bound strongly to cellulose.

cellulose-binding domain, *Candida antarctica* lipase B, enzyme immobilization

発表責任者：矢野成和（shige-y@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3E5a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 E5 会場

Methane oxidation in non-methanotrophs
○Oktay Gafarov, Kohei Kida, Koji Iwasaki, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

In recent years, there are active researches in the area of conversion of methane to methanol (gas to liquid) which is a valuable raw material for various chemical substances and potential substitute for petroleum-derived fuels. However, this conversion is done under hazardous and energy-consuming reaction conditions in chemical plants. On the other hand, methanotrophic bacteria have a methane monooxygenase (MMO) that catalyzes methane oxidation at ambient temperature and pressure. However, most methanotrophic bacteria, obligate methanotroph, cannot grow on any carbon sources except methane and instantly consume all of methanol for their growth, so they cannot be used for methanol production from methane. This problem can be solved by using microorganisms that can oxidize methane but do not metabolize methanol.

Gordonia sp. TY-5 and *Mycolicibacterium* sp. TY-6 are facultative and aerobic propane-utilizing bacteria previously known for oxidation of propane and alkanes with longer carbon backbone.[1,2] In this study, we confirmed methane oxidation to methanol as well in both strains. In strain TY-5, methane and propane oxidation activities were induced in propane-growing conditions. The *prmB* (propane monooxygenase B subunit) gene disruptant lost methane oxidation activity reinforcing our suggestion that PRM can catalyze methane oxidation.

In strain TY-6, methane oxidation activity was detected not only in propane-grown cells but also in cell grown on conventional growth media such as LB medium. Genomic analysis revealed that strain TY-6 does not have any methanol-assimilation pathway as we have previously reported for strain TY-5.[3] However, strain TY-6 besides PRM has several genes which are similar to MMO. To further understanding of methane oxidation in strain TY-6, conditions for the best growth and methanol production from methane were elucidated.

1) Kotani, et al., J. Bacteriol., 185:7120-7128, 2003.
2) Kotani et al., J. Biosci. Bioeng., 102:184-192, 2006.
3) Kida et al., 2C03-05, Annual Meeting of JSBBA 2022.

methane oxidation, methanol production, methane monooxygenase

講演番号：3E5a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 E5 会場

二段階発酵を用いたウイスキー廃液からのバイオ水素生産
Biophydrogen production from whiskey waste liquid by two stage feermentation
○日比野 政裕[1]、宮本 工聖[2]、清水 裟捺[2] ([1]室蘭工大院環境創生、[2]室蘭工大システム理化)
○Masahiro HIBINO[1], Kousei MIYAMOTO[2], Sana SHIMIZU[2] ([1]Div. Sust. Enviro. Eng., Muroran Inst. Tech., [2]Dept. Sci. Inf., Muroran Inst. Tech.)

バイオマスから微生物が生産するエネルギー物質の一つに水素がある。水素は燃焼しても水を生成するだけで二酸化炭素を排出しないので、クリーンなエネルギー源として期待されている。道内から排出される様々な食品廃液はバイオマス資源となりうるが、バイオ水素生産の実用化には、まだ十分な基礎研究が必要である。本研究では、ウイスキー廃液の活用に着目し、ウイスキー廃液を炭素源として、紅色非硫黄細菌を利用した 2 段階発酵による光水素生成について検討した。本研究で用いた紅色非硫黄細菌（*Rhodopseudomonas palustris*）は、北海道来馬川から採取した。水素生成用培地に炭素源としてウイスキー廃液を加え、紅色非硫黄細菌の濃度を OD_{600}0.25 とし、初期 pH6.8 及び培養温度を 32℃に設定して回分培養による水素発酵を実施した。第一段階の水素発酵は、暗条件または明条件で行った。さらに、第一段階後に懸濁液の pH を 6.8 に再調整し、第二段階として明条件による水素発酵を行った。第一段階での水素生成は紅色非硫黄細菌の植菌の有無に関係なく起こった。このことは、大麦に水素生成細菌群が含まれていることを示す。水素発生後の懸濁液の pH の変化は、第一段階では 5 付近に下がり、第二段階では 8 付近まで上昇した。このことは、第一段階では糖が分解されて有機酸と H_2 が生成し、第二段階で有機酸からの H_2 が生成されたことを示唆する。第一、第二段階を通して累積した水素発生量は~2 L H_2/L、水素収率は~60%と見積もることができた。
Biomass and organic solid waste are considered very potential to be converted to hydrogen by biological production processes. Hydrogen is renewable energy carrier and considered to be a clean and CO_2-free fuel for future. Among the methods for biological hydrogen production, two-stage processes of dark and photo fermentation have the potential to use the renewable resources and wastes as substrate for hydrogen production and achieve high hydrogen production and high conversion efficiency of hydrogen. In this study, hydrogen production from whiskey waste liquid by two-stage processes of dark fermentation without seed sludge and photo fermentation using *Rhodopseudomonas palustris* was investigated in batch experiments. The total hydrogen yield was estimated to be ~2 L H_2/L which was more than 60 % of the theoretical yield.

photosynthetic bacteria, photofermentation, hydrogen

発表責任者：日比野政裕（hibino@mmm.muroran-it.ac.jp）

講演番号：3E5a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 E5 会場

炭素源が海洋細菌 *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) の生育およびポリ(3-ヒドロキシブタン酸)合成に及ぼす影響
Effect of sole carbon source on the growth and poly(3-hydroxybutyrate) production of *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) isolated from marine enviroments
○小森 美花[1]、梅林 勇気[2]、河合 盛進[2]、鈴木 宏昭[2]、山田 美和[1] ([1]岩手大・農、[2]トヨタ紡織・新領域開拓部)
○Mika KOMORI[1], Yuki UMEBAYASHI[2], Sung-Jin KAWAI[2], Hiroaki SUZUKI[2], Miwa YAMADA[1] ([1]Iwate Univ., [2]Toyota Boshoku Corp.)

【背景・目的】我々は、廃棄海藻を原料としたバイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA) 合成を目指し、褐藻類に多く含まれるアルギン酸を単一炭素源としてポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] を合成可能な *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) を単離した。さらに、本菌は乾燥、破砕処理を行った海藻を添加した培地においても P(3HB) を合成可能であり、褐藻類に含まれるアルギン酸やマンニトールを利用して P(3HB) を合成することが示唆された。本研究では、これらの海藻成分が本菌の生育および P(3HB) 合成に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】アルギン酸 Na、マンニトール、もしくは両者を炭素源とした培地 (1.5 L) において、ジャーファーメンターを用いて本菌を培養した。この際、12 時間ごとにサンプリングを行って、菌の生育、P(3HB) 合成、および培地中の各炭素源濃度について経時的なモニタリングを行った。その結果、P(3HB) 合成量、蓄積率は、アルギン酸 Na を単一炭素源とした場合に最も高くなり、本菌においてアルギン酸の P(3HB) 合成への利用性が高いことが示唆された。一方で、培養中のマンニトール消費速度は速く、本菌の生育や P(3HB) 合成に対するマンニトールの利用速度が速いことが示唆された。また、アルギン酸 Na とマンニトールを炭素源として培養した場合には、マンニトールは経時的に消費されたが、アルギン酸 Na の減少は確認されず、マンニトールの存在によってアルギン酸代謝が抑制されている可能性が示唆された。さらに、各炭素源の代謝の初発反応を触媒すると推測されるアルギン酸リアーゼとマンニトールデヒドロゲナーゼについても活性測定を行った。その結果、アルギン酸 Na を炭素源として培養した際にはアルギン酸リアーゼ活性、マンニトールを炭素源として培養した際にはマンニトールデヒドロゲナーゼ活性が顕著に確認された。また、両者を炭素源として培養した場合には、マンニトールデヒドロゲナーゼ活性のみが確認された。これらの結果より、炭素源によって酵素の発現レベルで生育や P(3HB) 合成に関する代謝制御が生じていると推察された。
The 5-11-6-3 strain was cultured in the medium containing alginate or/and mannitol as a sole carbon source, and we monitored growth, P(3HB) production, and alginate or/and mannitol concentrations in media. Alginate was the best substrate for P(3HB) production, and mannitol was used rapidly for growth and P(3HB) synthesis. In addition, activities of alginate lyase and mannitol dehydrogenase when alginate or/and mannitol was used as a sole carbon source indicated that growth and P(3HB) production of the 5-11-6-3 strain would be regulated by carbon sources.

polyhydroxyalkanoates, alginate, mannitol

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3E5a14
講演日時：3 月 26 日 12:09～ 1 号館 E5 会場

洗濯後衣類から単離したバクテリアによる不快臭発生調査と殺菌処理による影響

Investigation of malodors of bacteria isolated from washed fabrics and the effect of sterilization

○奥田 裕暁[1,2]、松村 吉信[1,3]、池水 麦平[2]([1]関西大 生命・生物工、[2]パナソニック株式会社、[3]関西大 ORDIST)
○Hiroaki OKUDA[1,2], Yoshinobu MATSUMURA[1,3], Mugihei IKEMIZU[2] ([1]Kansai Univ. Life Sci. and Biotech., [2]Panasonic Corp., [3]Kansai Univ. ORDIST)

【背景】洗濯後の衣類の不快臭発生が多くの家庭で確認され、皮脂や汗などを微生物が代謝して発生すると報告されている。これまでに、一般家庭で洗濯された綿布に付着する生・死細胞数調査を行った結果、顕微鏡観察法で綿布 1 g あたり 10^{8-10} 個の細胞の付着が観察され、一部試料では死細胞率が 50-80%と比較的高い傾向であった。このことから、生細胞だけではなく死細胞も不快臭発生の原因であると予想され、洗濯後衣類から単離したバクテリア細胞を、殺菌処理の有無による臭気発生を比較した。
【方法】不快臭発生試験は、単離菌の培養細胞またはそれを殺菌処理後の死細胞を、スクワレン、カザミノ酸、グルコースを炭素源とした BSM 培地に懸濁し滅菌綿布に植菌し、密閉条件下で 30℃、1 日間静置後に 6 段階臭気強度表示法で官能評価した。殺菌処理は超音波(10 kHz, 30 s x 2 回)または加熱（60℃10 分間または 80℃5 分間)処理した。
【結果】今回の研究に用いた単離菌による不快臭発生試験では、殺菌処理なしと超音波処理（死細胞率 99%)の試料から臭気強度 3 前後の中程度の不快臭が検出され、加熱処理（死細胞率 65/99%)では臭気強度 1 と低いものであった。超音波処理では細胞から漏出した酵素も脂質やアミノ酸に作用して不快臭を発生させたと考えられ、低温での殺菌処理では細胞を死滅させても不快臭の原因となることが示唆された。今後、臭気成分ついて GC/MS 分析を行い、その成分についても報告する予定である。

Fabric malodor after washing their clothes at home is a common problem. In our previous study, microscopic investigation showed that many microorganisms adhered to fabrics at 10^{8}-10^{10} cells per gram of fabric with dead cell percentages of 50-80%. These results suggest that malodor is caused by both dead and viable cells. We therefore compared odors of bacterial cells, isolated in previous study, with and without sterilization by a 6-grade odor intensity measurement method.

The unsterilized and ultrasonic cell samples emitted malodors of odor intensity 3 level, while the heat-treated cell samples had odor intensity 1 level. It is suggested that ultrasonication cannot inactivate many enzymes in dead cells and lipids and amino acids are easily metabolized. We are intending to analyze malodor compounds in bacterial cells by GC/MS.

bacteria, malodor, home laundry

発表責任者：松村　吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3E5p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E5 会場

Screening of Microbial Serine Palmitoyltransferase (SPT) with Coupled ATP Regeneration

○Amelia Atmowidjojo[1], Michiki Takeuchi[2], Jun Ogawa[1] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan, [2]Industrial Microbiology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

The goal of this research is to find a novel microbial serine palmitoyltransferase (SPT) catalyzing the synthesis of an intermediate compound named 3-ketodihydrosphingosine (3KDS) for sphingolipid production. SPT catalyzes a Claisen-like conjugation of palmitoyl-CoA (P-CoA) and L-serine to produce 3KDS (**Fig. 1**). This research also aims to couple the 3KDS production with ATP regeneration system to substitute ATP with a lower cost energy source. The discovery of a novel bacterial SPT will facilitate the study of sphingolipid-related physiologic and pathophysiologic processes. Moreover, the enzyme holds the potential to become a biocatalyst of conjugation reaction between fatty acid and amino acid thus enabling the synthesis of an array of new compounds.

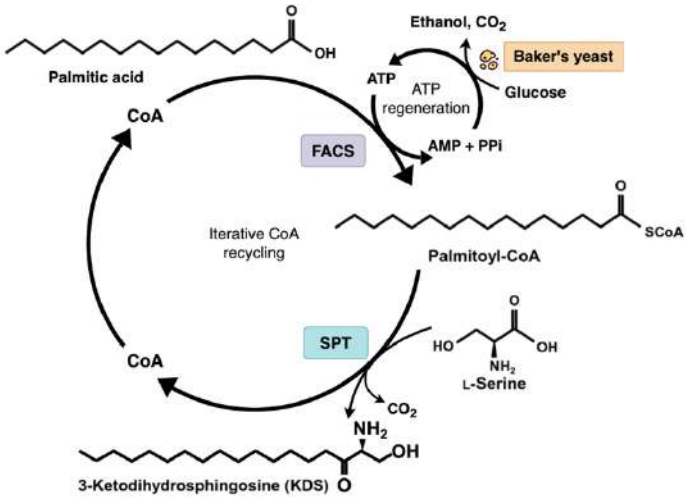


Figure 1. 3KDS production coupled with ATP regeneration.

Microbial enzyme screening was conducted to find novel strains as biocatalysts of the three reactions in **Fig. 1**. The first step was to screen for a strain which possesses the fatty acyl-CoA synthetase (FACS) to supply palmitoyl-CoA as substrate needed for the second step of SPT screening for 3KDS production. Candidate microorganisms were put in each enzymatic assay reaction mixture and the produced palmitoyl-CoA and 3KDS were measured using HPLC and LCMS, respectively. Additionally, several yeast strains were also screened for its ability to convert AMP to ATP through the glycolytic pathway.

As a result, some yeast strains with FACS activity were obtained through an advanced screening of 23 P-CoA producing microorganisms. Moreover, 3KDS production screening was conducted with various microorganisms in which some strains were found to produce 3KDS. Then, secondary SPT screening was conducted using cell-free extracts of the selected strains. The secondary SPT screening candidates include the strains with higher activity from the first screening and the additional strains that belongs to the same species as the highest 3KDS-producing strain. Potential 3KDS-producing strains were obtained from the secondary screening. Subsequently, to seek the strain with ATP regeneration ability, various yeast strains were subjected to screening and a strain with the highest regeneration ability was chosen. The strain was then used for ATP regeneration study. The author successfully obtained the strains as potential candidates for each step of the 3KDS production.

sphingolipid, serine palmitoyltransferase, microbial enzyme screening

発表責任者：Jun Ogawa（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E5 会場

Gordonibacter urolithinfaciens DSM 27213^T におけるウロリチン 4 位脱水酸化を触媒する新規誘導酵素系の解析

Analysis of a novel inducible enzyme system catalyzing urolithin 4-dehydroxylation in *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213^T

○片所 杏野[1]、渡邊 寛子[1]、中島 賢則[2]、山本 浩明[2]、小川 順[1]、岸野 重信[1]([1]京大院農、[2]ダイセル・事業創出センター)

○Anno KATASHO[1], Hiroko WATANABE[1], Takanori NAKAJIMA[2], Hiroaki YAMAMOTO[2], Jun OGAWA[1], Shigenobu KISHINO[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto University, [2]Business Development Center, Daicel Corp.)

【目的】 ウロリチンは、ザクロなどに含まれるエラジタンニンから腸内細菌代謝により生成されるポリフェノールである。中でもウロリチン A、B は抗酸化作用を示し、健康増進への寄与が期待されている。腸内細菌 *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213^T はエラグ酸（EA）をウロリチン M5、M6、C へと変換する。我々は微生物による EA からのウロリチン類生産を目指し、本菌のウロリチン 4 位脱水酸化反応（ウロリチン M5 から M6 への変換反応）に関与する酵素系の解析に取り組んだ。

【方法・結果】 本菌を、EA 添加・非添加培地にて培養し、得られた菌体の EA 変換活性を比較した結果、EA 添加培地で培養した菌体のみに EA 変換活性が誘導されていることを見いだした。次に、プロテオーム解析により誘導、非誘導菌体での発現タンパク質を比較したところ、誘導菌体で高発現している molybdopterin 含有酵素および 4Fe-4S 含有酵素からなるタンパク質群（UroA1、UroA2）を見いだした。続いて、放線菌を宿主とする *uroA1,uroA2* 共発現形質転換株を作成し活性評価を行った結果、本形質転換株がウロリチン M5 を M6 へ変換したことから、UroA1、UroA2 がウロリチン 4 位脱水酸化反応に関与することが示された。

【introduction】 Urolithin is a polyphenol generated through the metabolism of ellagitannins found in fruits like pomegranates by intestinal bacteria. Urolithin A and B, in particular, exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects, and are expected to promote human health. *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213^T is capable of transforming ellagic acid (EA) into urolithin M5, M6 and C. We aimed to produce urolithins from EA using microorganisms, and tried to identify the enzyme involved in the urolithin 4-dehydroxylation in this bacterium.

【methods and results】We harvested cells grown in the medium with or without EA and found that only the cells cultured in the presence of EA inducibly expressed the activity to convert EA to urolithins. Next, we performed comparative proteomic analysis of induced and non-induced cells. We identified highly expressed proteins, UroA1 and UroA2, which are consisting of molybdopterin-containing enzyme and 4Fe-4S containing enzyme, respectively. We created a transformant expressing *uroA1* and *uroA2* using *Rhodococcus erythropolis* L88 as a host and confirmed its urolithin M5 conversion to urolithin M6, indicating that UroA1 and UroA2 are involved in the urolithin 4-dehydroxylation.

urolithin, gut bacteria, dehydroxylation

発表責任者：岸野重信（kishino.shigenobu.3e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E5 会場

新規耐熱性酵素の導入による、水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus*TH-1 を用いた 3-hydroxybutyrate の生産
The production of 3-hydroxybutyrate using the hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 by intdroducing novel heat-resistant enzymes.
○木村 蒼一郎[1]、亀谷 将史[2,3]、新井 博之[2,3]、石井 正治[2,3] ([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生工、[3]東大微生物連携機構)
○ Soichiro KIMURA[1], Masafumi KAMEYA[2,3], Hiroyuki ARAI[2,3], Masaharu ISHII[2,3] ([1]Dept. Biochem/Biotechnol., Agric., Univ, Tokyo, [2]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]CRIIM, Univ. Tokyo)

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 は、至適温度が 52℃の好熱性水素酸化細菌であり、水素をエネルギー源として炭酸固定を行い、polyhydroxybutyrate (PHB)を合成する。TH-1 は既知の水素酸化細菌の中で独立栄養条件下での生育速度が最も高く、CO_2 からの有用物質の生産宿主としての活用が期待される。そこで、本研究では TH-1 からの有用物質合成のモデルとして、3-hydroxybutyrate (3HB)を合成することを目的とした。TH-1 は PHB の前駆体として 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA)を合成するので、acyl-CoA thioesterase II (TesB)を導入すれば 3HB を合成するようになると考えられたが、耐熱性の TesB は報告されていなかった。そこで、好熱性菌 *Tepidiforma bonchosmolovskayae* および *Thermomonospora curvata* に着目し、これらが有する TesB 様遺伝子を大腸菌で異種発現させて精製し、その特性を調べた。その結果として、いずれの酵素でも 3HB-CoA を基質とした活性および耐熱性が確認されたため、次にこれらの酵素を遺伝子組換えで TH-1 に導入した。この組換え株について培養上清などの解析を行ったので、その結果を報告する。
本研究は水産庁養殖業成長産業化技術開発事業「水素細菌を活用した養殖飼料開発」の助成を受けて行われた。

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 is a hydrogen-oxidizing bacterium, which grows optimally at 52℃. TH-1 fixes carbon dioxide using hydrogen as an energy source to produce polyhydroxybutyrate (PHB). In addition, TH-1 shows a higher growth rate than any other known hydrogen-oxidizing bacteria in autotrophic conditions. Therefore, TH-1 is a promising producer of various organic matters from CO_2. In this study, we aimed to produce 3-hydroxybutyrate (3HB) as a model of useful substance production using TH-1. For that, we planned to introduce acyl-CoA thioesteraseII (TesB) to TH-1, as TH-1 produces 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA), but thermostable TesB is not reported yet. Therefore, TesB-like-enzymes from two thermophilic bacteria, *Tepidiforma bonchosmolovskayae* and *Thermomonospora curvata*, were heterologously expressed and purified from *E. coli* to investigate their enzymatic properties. Both of them showed heat resisting property and reactivity toward 3HB-CoA. These enzymes were introduced into TH-1 by genetic recombination, and we analyzed the culture supernatant of the recombinant strains.

hydrogen-oxidizing bacteria, 3-hydroxybutyrate, heat-resistant enzyme

発表責任者：亀谷将史（akameya@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E5 会場

核酸医薬品原料である dNTP の組換え酵素を用いた One-pot 合成
One-pot production of dNTP for nucleic acid drug synthesis using recombinant enzymes
○土肥 優希[1]、美澄 幸恵[2]、寺内 裕貴[3]、星田 尚司[1,2,3]、赤田 倫治[1,2,3]（[1]山口大院創成、[2]山口大工、[3]山口大中高温）
○YUKI DOI[1], YUKIE MISUMI[2], YUKI TERAUCHI[3], HISASHI HOSHIDA[1,2,3], RINJI AKADA[1,2,3]
([1]Yamaguchi Univ., Grad. Sci. Tech. Innov., [2]Yamaguchi Univ., Dep. Appl. Chem., [3]Yamaguchi Univ., RCTMR)

COVID-19 に対する DNA、mRNA ワクチン等の核酸医薬品はヌクレオチド三リン酸をモノマー基質として酵素合成が可能である。しかし、ヌクレオチド三リン酸は一リン酸と比較して非常に高価である。本研究ではヌクレオチド三リン酸を合成するための One-pot 酵素反応系の開発を試みた。dATP の合成には、dAMP→dADP と dADP→dATP の二段階の反応が必要である。一つ目の反応ではアデニル酸キナーゼ、リン酸供与体に dATP を使用し、二つ目の反応ではピルビン酸キナーゼ、リン酸供与体にホスホエノールピルビン酸（PEP）を使用する。これらの反応が進めば dATP が合成される。合成された dATP は dAMP→dADP の反応に利用でき、また二つ目の反応は不可逆であるため、連続的な dATP 合成が可能となる。これら二種の酵素遺伝子を酵母、または大腸菌から取得し、組換え体で生産した。すると、酵母由来の酵素と比較して大腸由来の酵素を多く生産した。次に、生産した二種の酵素を dAMP、PEP と混合し、開始基質として少量の dATP を加えた。その結果、dATP の合成に成功し、効率的な One-pot 酵素反応系が得られた。

Nucleic acid drugs such as DNA and mRNA vaccines for COVID-19 can be enzymatically synthesized using nucleotide triphosphates as monomer substrates. However, triphosphates are very expensive compared to monophosphates. In this study, we developed a one-pot enzymatic reaction system for the synthesis of triphosphates from monophosphates. Synthesis of dATP requires a two-step reaction of dAMP→dADP and dADP→dATP. The first reaction uses an adenylate kinase together with dATP as the phosphate donor, while the second reaction uses a pyruvate kinase together with phosphoenolpyruvate (PEP) as the phosphate donor. If these reactions proceed, dATP is synthesized, thus can be used for the dAMP→dADP reaction. The second reaction is irreversible, allowing for continuous dATP synthesis. The genes for the two enzymes were obtained from *S. cerevisiae* and *E. coli* used for the production of recombinant enzymes. The results showed higher production of the *E. coli* derived enzyme compared to the *S. cerevisiae* derived enzyme. These two enzymes were mixed in one tube together with dAMP and PEP, and small amount of dATP was added as the starting substrate. As a result, dATP was successfully synthesized and an efficient one-pot enzyme reaction system was obtained.

nucleotide synthesis, pyruvate kinase, dATP

発表責任者：赤田倫治（rinji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3E5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E5 会場

Bacillus subtilis 由来 P450 酸化酵素 CYP107J1 のアルキル安息香酸に対する活性の解析
Catalytic activity of *Bacillus subtilis* CYP107J1 toward alkylbenzoic acids

○加藤 秀樹[1]、Stephen G. Bell[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大院・創域理工、[2]アデレード大)
○Hideki Kato[1], Stephen G. Bell[2], Toshiki Furuya[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Adelaide Univ.)

【背景・目的】シトクロム P450（CYP）は多様な化合物を酸化する酵素群であり、不活性な C-H 結合を常温常圧下で水酸化できることや、位置選択的に水酸化を行えるため、物質変換への応用が期待されている。枯草菌 *Bacillus subtilis* には 8 種の CYP が存在するが、CYP107J1 のみ詳細な機能が報告がされておらず、化合物スクリーニングによりテストステロンエナンセート（TE）に活性を示すことのみが明らかにされている [1)]。そこで本研究では、CYP107J1 に着目し、その機能解析を実施した。

【方法・結果】CYP107J1 は TE のエステル側鎖を酸化することが明らかにされている。本研究では、エステル基と類似した構造のカルボキシ基を有する芳香族化合物に焦点をあて、CYP107J1 の基質特異性を解析した。CYP107J1 遺伝子と *Pseudomonas* 属細菌由来のレダックスパートナー遺伝子を発現させた大腸菌を炭素鎖長 1 から 8 の 4-アルキル安息香酸と反応させた後、HPLC 分析により基質変換率を定量した。その結果、CYP107J1 は炭素鎖長 3 から 7 の 4-アルキル安息香酸に変換活性を示し、一酸素添加物を生成した。さらに精製酵素を用いて、基質結合による吸光スペクトルの変化を測定することで基質親和性を評価した。その結果、炭素鎖長 4 から 8 の 4-アルキル安息香酸を添加した際に type I shift を生じ、CYP107J1 はこれらの化合物に親和性を示すことが確認された。

Cytochrome P450 monooxygenases (P450s) are promising catalysts for use in the oxyfunctionalization of chemicals. Analysis of the *Bacillus subtilis* genome sequence revealed eight CYP genes. Of these, although seven CYPs have been well studied, the catalytic function of CYP107J1 remains almost unknown. There is only one report concerning CYP107J1; CYP107J1 was found to catalyze monooxygenation of testosterone enanthate using the FT-ICR/MS-based assay.[1)] In this study, we examined the catalytic function of CYP107J1 in more detail. The CYP107J1 gene was coexpressed with putidaredoxin gene and putidaredoxin reductase gene from *Pseudomonas putida* to provide the redox partners of CYP107J1 in *Escherichia coli*. When the recombinant *E. coli* cells were incubated with 4-alkylbenzoic acids, CYP107J1 exhibited catalytic activity for 4-propyl-, 4-butyl-, 4-pentyl-, 4-hexyl-, and 4-heptylbenzoic acids to generate monooxygenated products.

1) Furuya T, et al., Chem Biol, 15, 563 (2008).

Bacillus, biocatalysis, P450

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3E5p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E5 会場

リパーゼを用いたゼルンボール誘導体の立体選択的トランスエステル化

Enzymatic chiral transformation: stereoselective transesterification of zerumbol derivatives using lipase

○髙橋 亮大[1]、柏﨑 玄伍[1,2]、寺田 百合香[2]、渡部 朋子[2]、平本 梨花子[2]、河合 靖[3]、北山 隆[1,2]([1]近畿大農、[2]近畿大院農、[3]長浜バイオ)
○ Ryoto TAKAHASHI[1], Gengo KASHIWAZAKI[1,2], Yurika TERADA[2], Tomoko WATANABE[2], Rikako HIRAMOTO[2], Yasushi KAWAI[3], Takashi KITAYAMA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agric., Kindai Univ., [2]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric., Kindai Univ., [3]Nagahama Inst.)

ゼルンボンはハナショウガ（*Zingiber zerumbet* Smith）の根茎部に多く含まれる 11 員環のセスキテルペンで、その構造には複数の高反応部位が存在し、広範囲なケミカルスペースで新規な構造へ変換できる天然物である。アキラルなゼルンボンのカルボニル基を還元したり、オレフィンにエポキシ基を導入すると、キラル中心を生じるだけでなく、高反応性を持つキラルビルディングブロックとなる。カルボニル基を還元して得られるラセミ体のゼルンボールを中間体として用い、そのオレフィンを還元しエポキシ化することで、複数のゼルンボール誘導体を合成した。そして有機溶媒中でリパーゼを用い、これらの化合物をアセチルドナーと反応させることで、高立体選択的にアセチル化が進行し、高い光学純度の化合物を合成することに成功した。

その中で、2 位に存在するメチル基と水酸基の立体構造（*cis, trans*）の違いにより、アセチル化反応の立体選択性が全く逆になることを明らかにした。さらに、2 位に二重結合があるかどうかにより、立体選択性が規則的に変化することが示された。本研究では、他の誘導体を用いた場合にも同様の法則が成り立つかを検証し、興味深い結果を得た。

Zerumbone, an 11-membered ring sesquiterpene abundant in the rhizome of *Zingiber zerumbet* Smith, a renewable resource, possesses multiple highly reactive sites within its structure, allowing for the conversion to novel structures within a broad chemical space. The reduction of the carbonyl group in achiral zerumbone or the epoxidation of the olefin not only creates stereogenic centers but also generates optically active compounds that serve as significant chiral building blocks due to their high reactivity. Using the racemic zerumbol obtained by reducing the carbonyl group as a key intermediate, we further derivatized its olefin to synthesize several zerumbol derivatives with multiple chiral centers. Subsequently, by employing lipase in an organic solvent, we conducted the acetylation of these compounds with the acetyl donor, leading to successful and highly stereoselective acetylation, producing compounds with high optical purity.

Among these results, it was revealed that the stereochemical arrangement (*cis* and *trans*) of the methyl and hydroxy groups at the 2-position resulted in a completely reversed stereoselectivity in the acetylation reaction. Additionally, it was found that the presence of a double bond at the 2-position caused systematic variations in stereoselectivity. In this study, we investigated whether a similar rule applies when using other derivatives, yielding intriguing results.

Zingiber zerumbet Smith, zerumbone, lipase

講演番号：3E5p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E5 会場

微生物由来アミノ酸水酸化酵素に見いだした希少 alliin 異性体の合成活性

Stereoselective synthesis of rare alliin isomers using microbial amino acid hydroxylases

○水谷 拓[1]、勘澤 良介[1]、原 良太郎[2]、上田 誠[2,3]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]小山高専・物質工学)
○Taku MIZUTANI[1], Ryosuke KANZAWA[1], Ryotaro HARA[2], Makoto UEDA[2,3], Jun OGAWA[1] ([1]Div., Appl., Life Sci., Grad., Sch., Agric., Kyoto Univ., [2]Ind., Microbiol., Grad., Sch., Agric., Kyoto Univ., [3]Dept., Mater., Chem., Bioeng., NIT, Oyama College)

【目的】
微生物由来 Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性アミノ酸水酸化酵素は、一般的にはアミノ酸の位置・立体選択的な水酸化を触媒する。一方、一部の酵素は含硫アミノ酸に対する立体選択的スルフォキシド化も触媒する。例えば、*Bacillus thuringiensis* 2e2 由来 L-isoleucine 4-hydroxylase (IDO) は、L-isoleucine から 4-hydroxy-L-isoleucine を合成するのみならず、*S*-allyl-L-cysteine から *S*-allyl-L-cysteine sulfoxide [(+)-L-alliin] を合成する。我々はさまざまな微生物由来アミノ酸水酸化酵素を見いだし、水酸化活性を中心に評価してきたが、スルフォキシド化活性に関しては、IDO 以外は未検討であった。そこで、新たなスルフォキシド類の合成を目指し、当該酵素群の含硫アミノ酸に対するスルフォキシド化活性を評価した。
【方法・結果】
研究室保有のアミノ酸水酸化酵素を発現させた大腸菌を触媒とし、*S*-allyl-L-cysteine に対するスルフォキシド化活性を評価した。その結果、*Pantoea ananatis* AJ 13355 由来 L-isoleucine 3′-hydroxylase （HilA）及び糸状菌由来 L-pipecolic acid 4-hydroxylase (Pip4H) が、IDO の場合とは逆の立体である(−)-L-alliin を合成することを見いだした。さらに、各酵素の基質特異性を解析したところ、IDO 及び Pip4H は *S*-allyl-D-cysteine もスルフォキシド化した。ここで、生成物の立体を決定するため、アミノ酸ラセマーゼを用いて D-alliin の立体異性体を合成した。4 種類の alliin 異性体を HPLC で分離し、先の生成物の絶対配置を解析した。その結果、IDO による生成物は(+)-D-alliin、Pip4H による生成物は (−)-D-alliin であることが判明した。これにより、(+)-L-alliin のみならず、天然に希少な (−)-L-alliin や、報告のない (+)-D-alliin、(–)-D-alliin の 4 つの alliin 異性体を選択的に合成することが可能となった。

Microbial Fe(II)/α-ketoglutarate (α-KG)-dependent amino acid hydroxylases catalyze sulfoxidation toward sulfur-containing amino acids as well as hydroxylation. For example, L-isoleucine 4-hydroxylase from *Bacillus thuringiensis* 2e2 (IDO) catalyzes the conversion of *S*-allyl-L-cysteine to (+)-L-alliin. Indeed, we have found various Fe(II)/α-KG-dependent amino acid hydroxylases from microorganisms, but most of their sulfoxidation activities remain unclear. Thus, this study investigated the sulfoxidation activity in our enzyme library. Resting cell reaction with *S*-allyl-L-cysteine revealed that L-isoleucine 3′-hydroxylase (HilA) from *Pantoea ananatis* AJ 13355 and L-pipecolic acid 4-hydroxylases (Pip4Hs) from some filamentous fungi possessed the stereoselective sulfoxidation activity forming (−)-L-alliin, whose stereoselectivity was the opposite to that of IDO. When *S*-allyl-D-cysteine was used as a substrate, (+)-D-alliin and (–)-D-alliin were produced by IDO and Pip4H, respectively. Consequently, microbial enzymes enabled the stereoselective synthesis of four alliin stereoisomers, including rare (−)-L-alliin and non-natural D-alliin.

bioconversion, dioxygenase, alliin

発表責任者：小川順（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E5p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E5 会場

脂肪酸アミド合成に有用な微生物酵素の探索および基質特異性の解析

Screening of microbial enzymes useful for fatty acid amide synthesis and analysis of substrate specificity

深尾 達夫[1]、○横尾 航平[1]、森 雅輝人[1]、原 良太郎[2]、上田 誠[2,3]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]小山高専・物質工学)

Tatsuo Fukao[1], ○Kouhei Yokoo[1], Makito Mori[1], Ryotaro Hara[2], Ueda Makoto[2,3], Jun Ogawa[1] ([1]Div., Appl., Life Sci., Grad., Sch., Agric., Kyoto Univ., [2]Ind., Microbiol., Grad., Sch., Agric., Kyoto Univ., [3]Dept., Mater., Chem., Bioeng., NIT, Oyama College)

【目的】脂肪酸アミドは可塑剤や潤滑剤などの化成品の原料として有用であり，近年は抗炎症作用や鎮痛作用などを持つ機能性分子としても注目されている．現在の脂肪酸アミド生産は高温高圧条件が必要な化学合成に依存しており，温和な条件での脂肪酸アミド合成への転換が求められている．本研究では，環境負荷の低い微生物酵素を用いた脂肪酸アミド合成法の開発を目指し，脂肪酸アミド合成酵素の探索と同定，ならびに基質特異性の評価を行った．

【方法と結果】まず、脂肪酸アミド合成活性を有する微生物の探索を行った．研究室保有の菌株を対象に，基質としてオレイン酸，エルカ酸，およびアンモニアを含む溶液中で反応させ，生成する脂肪酸アミドをガスクロマトグラフィーで分析した．その結果，*Mycobacterium* sp. AKU 2014 が最も高いオレアミドとエルカミドの生産性を示した．続いて，AKU 2014 株の無細胞抽出液から 4 段階のクロマトグラフィーにより目的酵素を精製した．得られたタンパク質はデータベース上の serine peptidase と高い相同性を示した．これを踏まえ，AKU 2014 株の推定 serine peptidase 遺伝子を大腸菌において発現させ，組換え大腸菌の無細胞抽出液を用いて脂肪酸に対する基質特異性を評価した．その結果，オレアミドとエルカミドを含む C8~C22 の多様な脂肪酸アミドを合成した．今後，本酵素を用いることで多様な脂肪酸アミドを生産しうるバイオプロセスの開発に繋がることが期待される．

Fatty acid amides are as raw materials for chemical product and as functional molecules. To develop a fatty acid amide-synthesizing method using microbial enzymes, we have screened the microbial enzymes that synthesize fatty acid amides and evaluated its substrate specificity. First, through the screening of fatty acid amide-synthesizing microorganisms, *Mycobacterium* sp. AKU 2014 was found to show the highest activity for oleamide and erucamide synthesis. Subsequently, we purified the enzyme responsible for the reaction through a 4-step column chromatography. The N-terminal sequence analysis of the purifed peptide was revealed to have significant similarity to serine peptidase. Thus, we expressed the serine peptidase gene from AKU 2014 in *E. coli* and evaluated amide synthesis ability and substrate specificity. As a result, this enzyme catalyzed the synthesis of various fatty acid amides including oleamide and erucamide.

Fatty acid amides, Screening, Mycobacterium

発表責任者：小川順（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E5p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E5 会場

大腸菌による Fab 抗体の生産と自動リフォールディング技術の開発

Production of Fab antibodies in Escherichia coli and development of automatic refolding process

○HOANG ANH TUNG、加藤 晃代、中野 秀雄（名大院生命農）
○ANH TUNG HOANG, TERUYO KATO, HIDEO NAKANO (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya University)

タンパク質リフォールディングとは、変性させたタンパク質を活性のあるネイティブ構造へと巻き戻す方法であり、バイオ医薬品や酵素などの製造業界では重要な方法である。抗体の生産には、動物細胞を宿主とした方法が広く使用されているが、検査・診断向けの抗体生産には、大腸菌などの微生物を宿主とした、安価で効率の良い生産手法の開発が有効と考えられる。しかしながら、大腸菌で生産された抗体は Inclusion Body (IB)となり、リフォールディング工程が必要となる場合がある。そこで、本研究では、主に検査診断向け Fab 抗体を大腸菌で大量生産し、さらに、IB の透析法によるリフォールディングで要する時間や大量の変性剤・廃液といった環境負荷などの緒問題を解決するための方法を開発した。まず、大腸菌における Fab 抗体の生産性を増大するために SKIK タグを利用し、殆ど夾雑タンパク質のない抗体 IB を得た。さらに、二方向ポンプにより透析外液の溶液交換を行える自動リフォールディング法を開発・諸条件を検討し、活性型 Fab を得た。本手法は工業レベルにもスケールアップが容易であり、抗体生産・利用業界に大きな意味をもたらすと考えられる。

Protein refolding is a method of converting a denatured protein back to its native structure, and is an important in the biopharmaceutical and enzyme manufacturing industries. While methods using animal cells as hosts are widely used for antibody production, the development of low-cost and efficient production using microorganisms such as *E. coli* as hosts is considered effective for antibody production for diagnostic uses. However, antibodies produced by *E. coli* are often produced as Inclusion Bodies (IB) and require a refolding process. In this study, we developed a method to produce Fab antibodies in *E. coli* and automated refolding precedure which can reduce the time, amount of denaturing agents, and waeter required for refolding by the conventional dialysis method. First, to increase the productivity of Fab antibody in *E. coli*, we utilized SKIK tag and obtained antibody IB with almost no other proteins. Furthermore, we developed an automated refolding method that can exchange the solution outside of dialysis with a two-directional pump, and investigated various conditions to obtain active Fab. This method can be easily scaled up to the industrial level and is expected to be of great significance to the antibody production and utilization.

Antibody, Refolding, Escherichia coli

発表責任者：加藤晃代（teruyo@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E5p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E5 会場

出芽酵母における天然ゴム生合成関連タンパク質の発現と脂肪滴形態への影響

Expression of natural rubber synthesis-related proteins and effects on morphology of lipid droplet in yeast

○横田 早希[1]、後藤 猛[2] ([1]秋田大院理工、[2]秋田大)
○Saki YOKOTA[1], Takeshi GOTOH[2] ([1]Grad. Eng. Sci., Akita Univ., [2]Akita Univ.)

天然ゴムは植物によって生産される *cis*-1,4-ポリイソプレンを主骨格とする天然ポリマーである。パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*, Hb)は商業的に利用される唯一のゴム資源であるが，単一種に依存していることなどから将来にわたる安定調達が課題となっている。天然ゴムは, シス型プレニルトランスフェラーゼ(HRT1)と , Rubber elongation factor (REF), HRT1-REF binding protein (HRBP)の 3 つのタンパク質がゴム粒子上で複合体を形成し，これにより合成された *cis*-1,4-ポリイソプレンがゴム粒子内に蓄積されることで生合成されると考えられている。我々は微生物工場による天然ゴム生産を目指し，出芽酵母におけるこれらのタンパク質の発現および脂肪滴への影響を調べた。免疫蛍光染色により各タンパク質の局在を調べたところ，HRT1/HRBP/REF 株において HRT1 と REF は細胞膜付近に局在していることが分かった。一方，HRBP については局在を確認することはできなかったものの，HRT1/HRBP 株および HRT1/HRBP/REF 株では脂肪滴の変形が観察された。

Natural rubber (NR) is primarily composed of *cis*-1,4-polyisoprene and is the important natural polymer generated by plants. Despite *Hevea brasiliensis* (Hb) being the sole commercial source, it has some limitation such as overreliance on a single type of farm product. REF is a major protein attached to Hb rubber particles. HRT1, responsible for catalyzing the *cis*-condensation of isopentenyl diphosphate with short-chain prenyl diphosphates, and HRBP, which interacts with both HRT1 and REF, also bind to Hb rubber particles. It has recently been reported that HRT1, HRBP, and REF form a protein complex, which serves as the NR biosynthetic machinery on rubber particles. In this study, we aimed to produce NR using recombinant yeast strains carrying the genes for NR synthesis-related proteins, namely HRT1, HRBP, and REF. Our results showed that HRT1 and REF were localized near the plasma membranes in yeast cells co-expressing HRT1/HRBP/REF. Additionally, deformation of lipid droplets was observed in yeast cells expressing HRBP, although HRBP could not be detected by immunoassay.

natural rubber, rubber particle protein, bioproduction

発表責任者：横田早希（syokota@gipc.akita-u.ac.jp）

講演番号：3E6a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E6 会場

Sphingobium-Cupriavidus 属細菌株による有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティ形成

Formation of an organochlorine insecticide-degrading bacterial community by Sphingobium-Cupriavidus strains

○XIONG ZHIYU、平野 翔子、岸田 なつみ、加藤 広海、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○ZHIYU XIONG, Shoko Hirano, Natsumi Kishida, Hiromi Kato, Kouhei Kishida, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)

有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) の分解能を有する細菌集団 EB2 由来の非分解細菌 *Cupriavidus* sp. TKC 株は、EB2 由来の γ-HCH 分解細菌 *Sphingobium* sp. TKS 株および他の sphingomonad 細菌群株に対して方向性を持ったコロニー伸長（Directional Colony Growth：DCG）をする。また、TKC 株を TKS 株に対して 100 倍程度の比率で γ-HCH を唯一の炭素源として含む無機塩培地（HCH プレート）に共接種すると、TKS 株単独より γ-HCH 分解活性を長期的に維持する巨大コロニーを形成する。本研究では、TKC 株が γ-HCH 分解細菌株と巨大コロニー形成する機構に関する知見を得ることを目的とした。TKC 株を EB2 由来ではない γ-HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株に対して 10～100 倍程度の比率で HCH プレートに共接種すると TKS 株の場合と同様に巨大コロニーを形成した。この結果は、巨大コロニー形成が TKC 株と TKS 株に特異的な現象ではないことを示している。UT26 株は TKS 株に比べて遺伝学的に安定かつ取扱い法が確立されているため、巨大コロニー形成機構の解析が容易になると期待される。現在、蛍光標識した TKC 株と UT26 株を用いて巨大コロニー形成過程の観察を行っている。

Cupriavidus sp. strain TKC, a non-degrading bacterium isolated from the bacterial community EB2 that degrades an organochlorine pesticide, γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH), exhibits directional colony growth (DCG) toward γ-HCH degrading bacterium *Sphingobium* sp. strain TKS isolated from EB2 and other sphingomonad strains. The co-inoculation of TKC and TKS on the γ-HCH-containing minimal agar plate (HCH plate) at about 100-fold ratio of TKC to TKS forms larger and more sustainable colonies showing γ-HCH-degrading activity than TKS strain alone. In this study, we aimed to gain insight into the mechanism for the formation of the γ-HCH-degrading large colonies. The co-inoculation of TKC and *Sphingobium japonicum* UT26, a non-EB2-derived γ-HCH-degrading bacterial strain, on the HCH plate at 10- to 100-fold ratio of TKC to UT26 resulted in the formation of the γ-HCH-degrading large colonies as in the case of the TKS strain, indicating that the formation of the γ-HCH-degrading large colonies is not a phenomenon specific to TKC and TKS strains. Since UT26 is genetically more stable than TKS and the genetic engineering systems for UT26 are well established, it is expected to facilitate elucidating the mechanism of the large colony formation. We are currently observing the process of the large colony formation using fluorescently labeled TKC and UT26 strains.

Sphingobium, Cupriavidus, γ-HCH, bacterial community

講演番号：3E6a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E6 会場

Cupriavidus 属細菌株のコロニー周辺部が大きく広がる突然変異株の取得と解析
A mutant of *Cupriavidus* strain exhibiting thin-colony-expansion phenotype
○平野 翔子、Xiong Zhiyu、加藤 広海、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Shoko HIRANO, Zhiyu Xiong, Hiromi KATO, Kohei KISHIDA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

有機塩素系殺虫剤γ-HCH 分解細菌集団 EB2 は、本細菌集団より単離したγ-HCH 分解細菌 *Sphingobium* sp. TKS 株単独よりも、γ-HCH を唯一の炭素源として含む無機塩固体培地上で、γ-HCH 分解活性を長期的に維持する巨大コロニーを形成する。EB2 由来の単離株を用いた再構成実験により、TKS 株と非分解細菌 *Cupriavidus* sp. TKC 株のみを適当な比率で混合することでγ-HCH 分解活性を長期的に維持する巨大コロニーが形成された。また、TKC 株は sphingomonads 細菌群株に向かってコロニー周辺部を薄く伸長させる現象（Directional Colony Growth：DCG）を示す。これら結果は、TKC 株がγ-HCH 分解細菌コミュニティ形成の鍵であることを示しており、コミュニティ形成機構の解明を目的に TKC 株の遺伝学的解析進めている。その過程で、コロニー周辺の透明部が野生株より顕著に大きく広がる表現型（Thin Colony Expansion: TCE）を示す突然変異株を取得した。本突然変異株は継代培養しても TCE を示し、遺伝的に安定であると考えられたため、リシーケンシングを行った。その結果、推定 histidine kinase 遺伝子と S-adenosyl-L-methionine dependent methyltransferase 遺伝子に変異が検出された。

A γ-HCH-degrading bacterial community EB2 occasionally forms larger and more sustainable colonies showing γ-HCH-degrading activity on the γ-HCH-containing minimal agar plate than *Sphingobium* sp. strain TKS isolated from EB2. We demonstrated that co-inoculation of non-γ–HCH-degrading *Cupriavidus* sp. strain TKC isolated from EB2 and TKS formed the γ-HCH-degrading large colonies. In addition, the strain TKC shows a phenomenon called 'directional colony growth (DCG),' in which the colony periphery is thinly expanded toward sphingomonad strains. These results indicate that the strain TKC is the key to the formation of the γ-HCH-degrading community, and we are now conducting genetic analyses of the strain TKC to elucidate the community formation mechanism. In the process, we obtained a mutant exhibiting a phenotype called 'thin colony expansion (TCE),' in which the transparent area around the colony is significantly larger than that of the wild-type strain. The TCE phenotype of the mutant was genetically stable; thus, a re-sequencing analysis of the mutant was conducted. As a result, mutations on the genes encoding putative histidine kinase and S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase were detected in the mutant genome.

Cupriavidus, γ-HCH, bacterial community

発表責任者：平野翔子（hirano.shoko.p2@dc.tohoku.ac.jp）

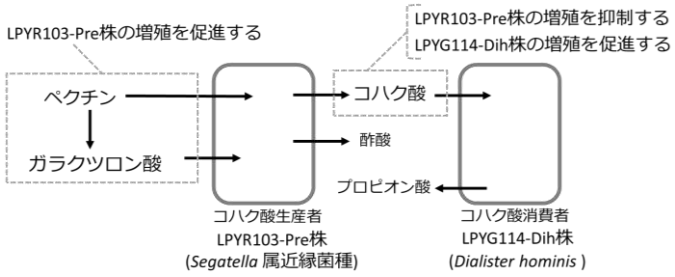
講演番号：3E6a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E6 会場

メタン発酵システムから分離された *Segatella* 属近縁菌種の特異的な炭素源要求性と *Dialister hominis* のコハク酸を介した共生関係

Microbial interaction between the succinate-utilizing bacterium *Dialister hominis* and an uncharacterized *Segatella*-like strain isolated from a methane fermentation system

○牧浦 知輝、松谷 峰之介、曽 厚嘉、藤本 尚志、大西 章博（東京農大）
○Tomoki MAKIURA, Minenosuke MATSUTANI, Hou-Chia TSENG, Naoshi FUJIMOTO, Akihiro OHNISHI (Tokyo Univ. of Agric.)

複合微生物系で進行するメタン発酵では有機物分解に寄与する未知の系統が多数存在する。本研究では、メタン発酵システムから *Segatella* 属の新規系統の LPYR103-Pre 株（近縁菌種 *S. cerevisiae* との相同性は 16S rDNA で 94.2 %、ANI 値で 77.9 %）と既知系統 *Dialister hominis* LPYG114-Dih 株を分離した。LPYR103-Pre 株は一般的な糖類（グルコース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、キシロース、フコース、リボース）の存在下では明確な増殖を示さなかったが、ペクチン、ガラクツロン酸、グルクロン酸存在下では著しく高い増殖を示し、代謝産物としてコハク酸を生産した。また、2 mM 以上のコハク酸は LPYR103-Pre 株の増殖を阻害した。一方で、*D. hominis* LPYG114-Dih 株はコハク酸を要求し、コハク酸を消費して LPYR103-Pre 株の増殖阻害を解除した。本研究により、メタン発酵過程の新規微生物 LPYR103-Pre 株の特異的な炭素源要求性と *Dialister hominis* のコハク酸を介した共生が明らかになった。



本発表では、上記の研究とともに現在取り組んでいる LPYR103-Pre 株の近縁系統の効率的な分離技術についても紹介したい。

In methane fermentation by complex microbial community, there are many uncharacterized strains that contribute to organic matter decomposition. In this study, a novel strain LPYR103-Pre belonging to genus *Segatella* and *Dialister hominis* LPYG114-Dih were isolated from a methane fermentation system. The 16S rRNA gene sequence similarity and ANI value of strain LPYR103-Pre and its closest related species, *S. cerevisiae* , were 94.2 % and 77.9 %. Strain LPYR103-Pre grew poorly in the presence of the common sugars glucose, arabinose, galactose, mannose, rhamnose, xylose, fucose, and ribose. However, the growth of strain LPYR103-Pre was enhanced by pectin, galacturonic acid, or glucuronic acid; metabolite of strain LPYR103-Pre was succinate. In addition, accumulation of succinate above 2 mM resulted to growth inhibition of strain LPYR103-Pre. On the other hand, *D. hominis* LPYG114-Dih required succinate, consumed succinate, and solved the growth inhibition of strain LPYR103-Pre. This study revealed succinate-mediated symbiosis between strains LPYR103-Pre and LPYG114-Dih in methane fermentation. Efficient isolation method for closely related strains of strain LPYR103-Pre, will also be presented in this study.

Succinate, Pectin, *Segatella*

発表責任者：大西 章博（a1ohnish@nodai.ac.jp）

講演番号：3E6a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E6 会場

ヒト腸内細菌叢の大規模継代培養実験による微生物相互作用の解析
Analysis of Microbial Interactions through Extensive Serial Culturing of Human Gut Microbiota
○前田 智也[1,2]、吹谷 智[2]、古澤 力[2,3] ([1]北大院農、[2]理研、[3]東大院理)
○Tomoya MAEDA[1,2], Satoru FUKIYA[2], Chikara FURUSAWA[2,3] ([1]Hokkaido Univ., [2]RIKEN, [3]The Univ. of Tokyo)

ヒト腸内では、他種多様な腸内細菌から構成される複雑な腸内細菌叢が形成されている。腸内細菌叢の形成ルールを明らかにすることができれば、「有益な外来種」を腸内に定着しやすくしたり、逆に病原菌などの「好ましくない外来種」を排除したりするといった、腸内細菌叢を人為的に操作できる方法が発見できる。我々は、腸内細菌叢の形成ルールを理解するために、環境選択圧を厳密に制御した実験室で人工的に腸内細菌叢を再構成することで、選択圧と再構成された細菌叢構造の対応関係を明らかにすることを目指している。そこで本研究では、ヒト糞便サンプルや、ヒト糞便から単離した腸内細菌を混合した集団を初発の微生物集団として、これが栄養の変化に伴ってどのような細菌叢構造へと変化するのかその対応関係を網羅的に解析した。腸内細菌叢の再構成には、完全合成培地に栄養源として様々な糖や有機酸を 1 つずつ添加した培地を使用し、嫌気条件下で 72 時間ごとの継代培養を 10 回繰り返した。再現性を確認するため、各条件 8 つの独立培養系列を維持した。本発表では、こうした大規模継代培養実験から明らかになってきた栄養の種類と細菌叢変化の対応関係について発表する。

In the human gut, a large number and species of bacteria form a complex microbial community as the gut microbiota. Understanding the rules governing the gut microbial community assembly could lead to the discovery of methods to manipulate and engineer microbial communities for human benefit. To understand the rules of the community assembly, we conducted experimental microcosms using a synthetic media for gut bacteria adding one of various sugars or organic acids as a nutrient. As the initial microbial communities, human fecal samples and synthetic communities composed of gut bacteria isolated from human feces were used. The bacterial cultures were grown for 30 days under a regime of growth and dilution cycle at every 72 hours. To ensure reproducibility, eight independent culture series were maintained for each condition. In this presentation, we will report the revealed relationship between nutrient types and changes in the bacterial community structure.

gut bacteria, microbial interactions, gut microbiota

発表責任者：前田　智也（tomoya.maeda@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E6a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E6 会場

液液共培養法による腸内細菌の分離と同定
Isolation and identification of gut microbes by liquid-liquid co-culture method
○久富 敦、大熊 盛也、坂本 光央（理研 BRC-JCM）
○Atsushi Hisatomi, Moriya Ohkuma, Mitsuo Sakamoto (RIKEN BRC-JCM)

腸内細菌はヒトの生理機能や多様な疾患に関係することから医薬品開発など様々な産業分野で注目されている。有用な生菌製剤の開発には難培養微生物や新菌種などの分離や培養，分類が必要不可欠である。本研究では，便希釈液を生育支持菌として支持菌の産生する代謝産物により，フィルター濾過によって選別した極小の未知細菌種の生育促進と分離が期待される，液液共培養という新たな培養法を実施した。共培養によって得られた分離株のゲノム解析の結果，未だヒトからの分離例のない *Waltera intestinalis* とその近縁の未知種が同定された。興味深いことに，フィルター濾過の選別にもかかわらず，全ての分離株は長く曲線状の特徴を有していた。分離株の細胞サイズは生育初期では短く細く，培養時間が経つごとに長く太く生育することが判明し，分離株は培養初期にフィルターを通過し，後に伸長したと考えられた。分離株をフィルター濾過した細胞は共培養のみで生育し，無処理の細胞は共培養よりも単培養での生育が良好であった。このことから，フィルター濾過した短い細胞の分離株の生育は共培養の影響を受けて促進するが，無処理である長い細胞の分離株の生育は共培養の影響を受けて抑制することが考えられた。
Gut microbes are of crucial in various industrial fields including drug development; therefore, the isolation, cultivation, and classification of difficult-to-culture microorganisms and new species are essential for the development of new live biotherapeutic products. We performed liquid-liquid co-cultures to obtain isolates using a previously unreported method. Selectively filtered fecal samples were anaerobically co-cultured under the influence of supporting bacteria. Genomic analyses showed that isolates were identified as either *Waltera intestinalis* or a new species closely related to *W. intestinalis*. Isolates in broth medium had short and thin cells during the early stages of growth, but became longer and thicker with longer duration of incubation. Therefore, the cells during the early growth stage may have passed through the filter owing to their small size and elongated at a later stage. Filter-treated isolates grew only in the co-culture, whereas untreated isolates grew better in the mono-culture than in the co-culture. This suggests that the growth of the filter-treated isolates was enhanced by the co-culture, whereas the growth of the elongated cells of the isolates was inhibited by the co-culture.

co-culture method, human gut, Waltera intestinalis

発表責任者：久富敦（atsushi.hisatomi@riken.jp）

講演番号：3E6a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E6 会場

ピレン分解菌の分解能を変化させる環境細菌の効率的な取得とその同定
Rapid screening and identification of environmental bacteria modulating pyrene degrader's degradation ability

○鈴木 仁子[1]、ベハラノ フェリペ[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、ピンヤコン オルタイ[3]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大院・農生科・AgTECH、[2]東大・微生物連携機構、[3]Chulalongkorn Univ.)
○Satoko SUZUKI[1], Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Onruthai PINYAKONG[3], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chulalongkorn Univ.)

タイのマングローブ底泥から得られた *Mycolicibacterium* sp. PO1 株はピレン分解経路に関わる全ての遺伝子を持つピレン分解菌であり、以前の研究では他の細菌との共存下で単独の状態より早くピレンを分解した [*J. Hazard. Mater.*, **342**, 561, 2018]。一般に、分解菌群を取得するための従来の集積・単離法は多大な時間と労力を要する上に、取得できる細菌が寒天培地上で培養できるものに限られる。本研究は PO1 株のピレン分解能を変化させる環境細菌を、寒天培地上での培養可能性が低いものも含めてハイスループットに取得することを目的とした。96 穴プレートの底に炭素源となるピレンを結晶化させ上層に最少培地を加え、セルソーターで PO1 株と環境細菌を 1 細胞ずつ接種して培養した。その後、蛍光顕微鏡を用いたピレン結晶由来の蛍光の経時的な測定により PO1 株単独時と比較して分解力が変化した培養物を絞り込み、756 の培養物から計 30 のコンソーシアを取得した。そのうちPO1株のピレン分解を抑制する5候補が寒天培地上で培養可能であり、1株が *Mycolicibacterium* 属細菌、4 株が *Dermacoccus* 属細菌であることを同定した。また、寒天培地で検出できなかった候補細菌について、PO1 株の 16S rRNA 遺伝子の増幅を阻害する locked nucleic acid（LNA）を使用した PCR と 16S rRNA 遺伝子配列解析により、*Paenibacillus* 属細菌の存在が示唆された。

The pyrene-degrading bacterium *Mycolicibacterium* sp. PO1 was previously isolated from mangrove sediments, and its pyrene degradation was found to be enhanced by other strains from the same source [*J. Hazard. Mater.*, **342**, 561, 2018]. Traditionally, enrichment culture method has been used, but is laborsome and time-consuming. In this study, we used a high-throughput method for screening both culturable and unculturable environmental bacteria capable of modulating PO1's pyrene degradative ability. On the bottom of 96-well plates, crystalline pyrene was deposited as the sole carbon source and minimal mineral medium was added. PO1 and environmental bacteria were individually sorted into each well by using fluorescence activated cell sorting. Remaining pyrene was quantified as crystal fluorescence over time and 30 two-strain consortia, from 756 initially sorted, were obtained. Five environmental bacteria were culturable on agar medium: one was identified as *Mycolicibacterium* sp. and four as *Dermacoccus spp*. For strains not yet detected, locked nucleic acid (LNA)-PCR was used to amplify the 16S rRNA gene of strains other than PO1, and two *Paenibacillus* strains were identified.

microbial interactions, PAH degradation, flow cytometry

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E6a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E6 会場

ニホンミツバチの菌叢解析と有用乳酸菌の単離
Bacterial community of Japanese honeybee and isolation of useful lactic acid bacteria
○櫻間 晴子[1]、田中 舞[1]、坂本 文夫[1,2]、萩下 大郎[1] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]京都ニホンミツバチ研究所)
○Haruko Sakurama[1], Mai Tanaka[1], Fumio Sakamoto[1,2], Tairo Hagishita[1] ([1]Kyoto Univ. of Adv. Sci., [2]Kyoto apis cerana japonica Lab.)

【目的】乳酸菌はその保健効果から広くプロバイオティクスとして利用されているが，昆虫に由来する乳酸菌の利用はほとんどない．これまでに，我々は，在来種であるニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）の腸や蜂蜜から様々な乳酸菌を単離してきた．本研究では，ニホンミツバチ由来の乳酸菌について，宿主に対する重要性を明らかにするとともに，γ-アミノ酪酸（GABA）生産能という視点で利用を目指すことを目的とする．
【結果と考察】ニホンミツバチ 6 個体の腸から DNA を採取し，16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象とした菌叢解析を行った結果， 6 個体全てで乳酸菌科（*Lactobacillaceae*, 平均 23%）やナイセリア科（*Neisseriaceae*, 平均 14%），ビフィズス菌科（*Bifidobacteriaceae*, 平均 2.7%）が，5 個体でパスツレラ目（*Pasteurellales*, 平均 24%）やウイークセラ目（*Weeksellaceae*, 平均 25%）が共通して検出された．よって，ニホンミツバチは共通した細菌叢を有しており，*Lactobacillaceae* は重要な役割を果たす可能性があることが示唆された．さらに，取得した乳酸菌を使った探索により，ニホンミツバチの蜂蜜から GABA 生産能を有する乳酸菌が検出された．本菌はフルクトースを基質として好むユニークな乳酸菌（フルクトフィリック乳酸菌）であったため，本菌について，ゲノム解析を行うことにより詳細な解析を行う予定である．
There is emerging interest in the novel potential of probiotic lactic acid bacteria. We have so far isolated various lactic acid bacteria from Japanese honeybees (*Apis cerana japonica*) and their honey. This study aims to clarify the importance of lactic acid bacteria from the Japanese honeybee to the host and to utilize them in terms of γ-aminobutyric acid (GABA) production. The bacterial community analysis targeting the 16S rRNA gene shows that *Lactobacillaceae* (average 23%), *Neisseriaceae* (average 14%), and *Bifidobacteriaceae* (average 2.7%) were detected in all six honeybees, and *Pasteurellales* (average 24%) and *Weeksellaceae* (average 25%) in five. This showed that Japanese honeybees share a common bacterial community and that *Lactobacillaceae* may play an important role. In addition, a GABA-producing strain was detected in the honey of the Japanese honeybee through a search using lactic acid bacteria obtained so far. Since this strain has a unique lactic acid bacterium that prefers fructose as a substrate, we are now planning to conduct a genomic analysis of this strain.

lactic acid bacteria, Japanese honeybee, Next generation sequencing

発表責任者：櫻間晴子（sakurama.haruko@kuas.ac.jp）

講演番号：3E6a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E6 会場

Evaluation of optimal cultivation conditions for the isolation of nitrifying bacteria
○Htun Inzali[1], Wakako Okada[1], Akinori Ando[1,2], Jun Ogawa[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ)

In the soil nitrogen cycle, organic nitrogen compounds are degraded by heterotrophic bacteria, followed by the conversion of ammonia nitrogen to nitrate nitrogen facilitated by nitrifying bacteria. These nitrifying bacteria, which are a crucial part of the nitrogen cycle, pose challenges in their isolation and large-scale cultivation due to their chemoautotroph. The aim of this study was to facilitate the isolation of nitrifying bacteria from the environment by optimizing culture conditions. *Nitrosomonas europaea* NBRC14298 and *Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297, representing ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB), respectively, were selected as model nitrifying bacteria. Cultivations of these representative nitrifying bacteria were performed in HEPES and Boon media, respectively, with Gellan Gum incorporated for solidification. The effects of medium composition, inoculum amount, temperature, shaking speed, and trace metal in liquid media, while the effects of medium volume, humidity, carbon dioxide concentration, and Gellan Gum concentration on solid media on the growth of nitrifying bacteria were evaluated. Optimal conditions for liquid cultivation were determined based on nitrite and nitrate ion production, while optimization for plate cultivation was based on cultivation days and colony size. Previously, *N. europaea* and *N. winogradskyi* required approximately one month for visible colony formation (0.7 mm and 0.4 mm, respectively). However, under the optimal conditions of CO_2 0.4 %, Gellan Gum 0.6 %, medium volume 60 mL, and trace metal addition, both bacteria efficiently formed colonies of comparable size within 10 days. These findings contribute to the physiology of nitrifying bacteria and provide practical insights for improving the efficiency of isolating nitrifying bacteria from the environment.

nitrifying bacteria, ammonia-oxidizing bacteria (AOB), nitrite-oxidizing bacteria (NOB), isolation

発表責任者：Jun Ogawa（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E6a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 E6 会場

活性汚泥微生物コミュニティにおける微生物間捕食とその促進

Microbial predation and its facilitation in the activated sludge microbial community

○佐藤 由也、稲葉 知大、羽部 浩（産総研）
○Yuya SATO, Tomohiro INABA, Hiroshi HABE (AIST)

活性汚泥は 100 年以上世界中で水処理に利用されてきた微生物群集であり、数千種以上から構成される複雑な微生物生態系である。その複雑さゆえ未解明な性質も多く、活性汚泥の制御には今なお様々な課題が残る。特に、系内で増えすぎた微生物（余剰汚泥）の廃棄処理は大きな課題であり、国内産業廃棄物の実に 20%を余剰汚泥が占めるため、その減容化技術には産業上非常に大きな需要がある。本研究では、細菌を食べる細菌である捕食性細菌に着目し、その捕食作用による活性汚泥の減容効果とメカニズムを解析し、さらには研究成果に基づき捕食作用の促進方法を検討した。

活性汚泥を栄養なしの条件で培養すると微生物濃度が減少し、微生物捕食の活性化が示唆された。このときの様子を顕微鏡観察したところ、原生動物等が活性汚泥のフロック（凝集体）表面に接触・定着することを見出した。そこで活性汚泥の曝気条件を変更し、汚泥が沈殿する工程を加えることで接触および捕食頻度の促進を試みたところ、6~10%ほど減容効率を向上させることができた。

さらに、活性汚泥のロット（採取日）によって減容の進みやすさが異なることを見出した。この原因を明らかにするため、活性汚泥の微生物群集構造解析、メタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析を行った。その結果、培養開始時においては優占種の存在量に顕著な差は見られず、遺伝子発現パターンも比較的似ており極端な差は見られなかった。一方で、活性汚泥の沈降性が高いほど汚泥の減容効率が高くなっていることに気づき、活性汚泥の沈降性を表す指数（SV_{30}）と活性汚泥の減容速度の相関を評価したところ両者に相関が見られた。さらに蛍光顕微鏡解析により、細胞外物質（多糖や核酸）の種類や濃度の違いが活性汚泥の沈降性に影響することを明らかにした。このように、微生物の存在量や遺伝子発現が似ていても、活性汚泥の沈降性という物理化学的性質の差異によって、微生物捕食活性および減容効率が左右されるという興味深い事象を見出した。

In activated sludge, which is a microbial community used for wastewater treatment, predator-prey interaction is of importance for shaping the microbial community. We investigated factors that influence predatory activity in activated sludge, especially focusing on predatory bacteria. By microscopy, metagenomic and metatranscriptomic analyses, we unexpectedly found that physical properties, such as the settleability of activated sludge, rather than microbial composition and gene expression profile affected the predatory activity. The settleability of activated sludge was related to differences in the composition of extracellular substances.

predatory bacteria, activated sludge, interspecific interaction

発表責任者：佐藤由也（yuya-satou@aist.go.jp）

講演番号：3E6a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 E6 会場

イネ・オオムギ二毛作における根圏微生物叢の機能とネットワーク
Function and network of microbiome in rice and barley rhizosphere

○谷 明生[1]、最相 大輔[1]、山地 直樹[1]、山下 純[1]、小橋 理絵子[1]、山本 敏央[1]、門田 有希[2]、中川 智行[3]、持田 恵一[4] ([1]岡大植物研、[2]岡大環境生命、[3]岐阜大応生科、[4]長崎大情報データ科学)
○ Akio TANI[1], Daisuke Saisho[1], Naoki Yamaji[1], Jun Yamashita[1], Rieko Kobashi[1], Toshio Yamamoto[1], Yuki Monden[2], Tomoyuki Nakagawa[3], Keiichi Mochida[4] ([1]IPSR Okayama Univ., [2]Grad Sch Environ Life Sci Okayama Univ, [3]Facalty Gppl Biol Sci, Gifu Univ, [4]Sch Info Data Sci, Nagasaki Univ)

日本の西南暖地では冬にムギ、夏にイネを栽培する二毛作が盛んであるが、二毛作の生産性を支える物理化学的環境要因と生物学的要因はほとんど明らかにされていない。岡大植物研でも二毛作栽培試験を長年継続しており、その持続的な生産性を支える要因を究明する上でのモデルとなる。本研究では、3 年間にわたるイネ・オオムギの二毛作で、酸性土壌で問題となるアルミニウム耐性の異なる品種を用い、施肥・無施肥区での根圏微生物叢、土壌の水抽出可能なイオン、作物の成長、野生植物相を経時的にデータ化し、それぞれの要因の相関を調べた。計 2388 点の土壌微生物叢の 16S rRNA アンプリコン解析により、イネ及びオオムギ特異的な微生物叢が 3 年間再現性良く繰り返されることが分かった。土壌から根圏土壌を経て根に至るまで植物に近づくにつれ特異的な微生物群集構造が形成されており、オオムギとイネ、施肥の有無にそれぞれ応答して増減する微生物の存在と異なる機能を見いだした。またそれぞれの作物において形成される微生物叢のネットワーク解析によりハブとなる OTU を見いだした。

In the west-south part of Japan, double cropping growing barley in winter and rice in summer is a popular agricultural scheme, however, the physicochemical and biological factors that support the productivity of double cropping is to be elucidated. We practice double cropping at IPSR Okayama University for a long time, and our experimental field serves as a model to investigate the factors for its sustainable productivity. In this study, we investigated relationships among the factors of fertilization, water-extractable ions, plant growth, wild plant flora, and rhizosphere microbiome of the rice and barley that have different sensitivity to aluminum toxicity grown in the same field for 3 years. We found that the microbiome structures specifically organized for each crop have been formed reproducibly for 3 years. The microbiome structure depends on the proximity to the roots, and we identified specific microorganisms and their functions that respond to each crop and fertilization. Through network analysis of the data, we also found hub OTUs for each crop.

Rice, Barley, Microbiome

発表責任者：谷 明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3E6a13
講演日時：3 月 26 日 11:58～ 1 号館 E6 会場

Bradyrhizobium sp. RB-1 株の感染によるミヤコグサの根粒形成には III 型エフェクターが関与する
Bradyrhizobium sp. RB-1 strain type III effectors are involved in nodule formation of *Lotus japonicus*

○木村 円香[1]、川原田 泰之[2]、齋藤 宏昌[1] ([1]東京農大院生命、[2]岩手大院農)
○Madoka KIMURA[1], Yasuyuki KAWAHARADA[2], Hiromasa SAITOH[1] ([1]Tokyo Univ. Agri., [2]Iwate Univ.)

Bradyrhizobium 属根粒菌は、マメ科植物の根に根粒を形成し、この根粒内部で大気中の窒素を固定してアンモニアに変換する窒素固定を行う。根粒は、根粒原基、白色根粒、ピンク根粒の順に形成され、ピンク根粒において窒素固定が行われる。根粒菌のⅢ型分泌系（T3SS）は、宿主植物細胞にⅢ型エフェクターを分泌し、根粒形成を促進または阻害することが示唆されている。そこで本研究では、*Bradyrhizobium* sp. RB-1 株のⅢ型分泌装置を欠損させた *ttsI* 株と野生株を、マメ科モデル植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* ecotype Gifu と MG75、およびマメ科緑肥作物セスバニア（*Sesbania* sp.）の田助とロストアラータに接種し、３週間後に根粒表現型を観察した。野生株または *ttsI* 株を接種した *L. japonicus* Gifu では根粒原基またはピンク根粒が、MG75 では白色根粒またはピンク根粒が、それぞれ形成された。一方、野生株と *ttsI* 株を接種した田助ではいずれも白色根粒が、ロストアラータではいずれもピンク根粒が、それぞれ形成された。以上の結果から、ミヤコグサでは、RB-1 株から分泌されるⅢ型エフェクターによって根粒形成が途中で停止すると考えられた。先行研究において、RB-1 株の *nopF* 遺伝子を発現する *Mesorhizobium loti* の形質転換体と *M. loti* の野生株を *L. japonicus* Gifu に接種し、根粒表現型を比較した結果、前者では総根粒数およびピンク根粒数が有意に減少したことから、NopF はミヤコグサの根粒形成を負に制御するⅢ型エフェクターであると考えられた。そこで、*nopF* 遺伝子の機能を逆遺伝学的に解析するため、現在、RB-1 株の *nopF* 遺伝子の欠損変異株の作出を試みている。

Members of the genus *Bradyrhizobium* are nitrogen-fixing heterotrophic bacteria which can form root nodules on several leguminous species. After inoculation with a *Bradyrhizobium* strain to the roots of compatible host legume plants, first, small uninfected nodules (nodule primordia) are formed, then white non-functional nodules are developed, and finally fully infected pink functional nodules are developed. The rhizobial type III secretion system (T3SS) secretes effector proteins (T3Es) into host plant cells, which may either promote or inhibit symbiotic nodulation. We herein demonstrated that a T3SS inactivation mutant (*ttsI* mutant) of *Bradyrhizobium* sp. RB-1 enhanced symbiosis with *Lotus japonicus* Gifu and MG75, but did not change symbiosis with two cultivars Densuke and Rostrata of the aquatic legume *Sesbania* sp. These results indicated that the T3SS of RB-1 negatively affected with *L. japonicus*, but not symbiosis with *Sesbania* sp.. A previous study demonstrated that the *Mesorhizobium loti* transformant expressing *nopF* gene from RB-1 obstructed symbiosis with *L. japonicus* Gifu. To investigate the role of NopF of RB-1 in symbiosis as a T3E, the generation of *nopF* gene knock-out mutant of RB-1 is now in progress.

Bradyrhizobium sp. RB-1, nodules, type III secretion system

講演番号：3E6p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E6 会場

木材腐朽菌の細胞壁構造及びその合成機構を目指したβグルカン合成酵素の機能解析
Analysis of cell wall structure of wood-rot fungi and functional analysis of ß-glucan synthase to elucidate its synthesis mechanism

○河内 護之[1]、大塚 唯[1]、SCHIPHOF Kim[1]、名和 義順[1]、辻 健也[1]、吉見 啓[1,2]、中沢 威人[1]、田中 千尋[1,2]、本田 与一[1] ([1]京大院農、[2]京大院地環学)
○Moriyuki KAWAUCHI[1], Yuitsu OTSUKA[1], Kim SCHIPHOF[1], Yoshinori NAWA[1], Kenya TSUJI[1], Akira YOSHIMI[1,2], Takehito NAKAZAWA[1], Chihiro TANAKA[1,2], Yoichi HONDA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]GSGES, Kyoto Univ.)

木材腐朽菌は主に担子菌類に属し、木材や農産廃棄物などのリグノセルロース性の資源を培地として効率的に成長できる唯一の生物群である。その菌糸を利用したマッシュルームレザーやミートは、カーボンニュートラルな素材または代替肉として実用化が進んでいる。一方で、素材の性質やテクスチャーを改変できるような菌糸の育種技術は現在存在しない。近年の研究成果から育種の標的として木材腐朽菌の細胞壁が重要と考えられるが、その構造・制御・合成機構の何れも解析が進んでいない。本発表では木材腐朽菌の細胞壁構造を理解する為、細胞壁多糖の組成やグルカン合成酵素の機能について、木材腐朽菌ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* をモデルに解析を行った。ヒラタケ細胞壁の多糖組成について解析した結果、これまで同じ真菌の子嚢菌をモデルに示されてきた細胞壁多糖組成とは大きく異なることが明らかとなった。また、当研究室で開発した細胞壁多重染色の結果と合わせるとグルカンの局在や量に特徴が見られた。そこで、2 つのβ-グルカン合成酵素遺伝子について遺伝子破壊を行いその破壊株の解析を実施した結果、木材腐朽菌細胞壁合成機構の個性が見えてきた。

Wood-rot fungi belong primarily to the basidiomycete phylum, the only group of organisms that can efficiently grow using lignocellulosic resources such as wood and agricultural waste as a medium. Mushroom leather and meat alternatives made from their mycelia are being commercialized as carbon-neutral material sources and meat substitutes. On the other hand, there is currently no mycelium breeding technology that can modify the properties and textures of these material. Based on recent research results, the cell wall of wood-rot fungi is an important target for breeding, but neither the structure, regulation, nor the synthesis mechanisms of the cell wall have yet been analyzed. In this presentation, to understand the cell wall structure of wood-rot fungi, we analyzed the composition of cell wall polysaccharides and the function of glucan synthases using the wood-rotting fungus *Pleurotus ostreatus* as a model. Analysis of the polysaccharide composition of the *P. ostreatus* cell wall revealed very large differences compared to that of ascomycetes. In addition, when combined with the results of a cell wall multiple staining method developed in our laboratory, the localization and amounts of glucans were also distinctive. We performed gene disruption of two ß-glucan synthase genes and analyzed the disrupted strains, which revealed the unique characteristics of cell wall biosynthesis in wood-rot fungi.

Wood-rot fungi, Cell Wall, ß-glucan

発表責任者：河内護之（kawauchi.moriyuki.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E6p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E6 会場

葉面細菌 Methylobacterium のバクテリオクロロフィル生産と遺伝子発現

Bacteriochlorophyll production and its gene expression in the phyllosphere bacteria Methylobacterium

○井口 博之[1]、宮部 業[1]、吉田 朱里[1]、谷 明生[2] ([1]京都先端大・バイオ環境、[2]岡山大・植物研)
○Hiroyuki IGUCHI[1], Gou MIYABE[1], Shuri YOSHIDA[1], Akio TANI[2] ([1]Kyoto Univ. Adv., [2]Okayama Univ.)

【背景】*Methylobacterium* / *Methylorubrum* 属は葉面に多数生息する植物共生メチロトローフ細菌である。我々は強い光を受ける葉面での本菌の光応答について研究を行ってきた。本菌は光合成機能が知られないにも関わらずバクテリオクロロフィル（Bch）生産が報告されているが、Bch の詳細な生産条件や機能は不明である。本研究では、葉面細菌における Bch の機能・役割を明らかにするため、まず本属細菌において Bch の生産条件や遺伝子発現について調べた。 【結果】Sato K., FEBS Lett. (1978)では本属モデル菌である *M. extorquens* AM1 が 1,2-propanediol という特殊な炭素源、明暗サイクルの下で Bch を生産すると記されている。本結果は再現することができ、さらにメタノールやコハク酸という一般的な炭素源では生産しないこと、暗条件でも生産しないこと、連続明条件では Bch の分解が起きることが分かった。一方で *M. phyllosphaerae* CBMB27 では、炭素源メタノール＋暗条件で Bch を生産した。Bch 生産の判断は、770 nm の吸光ピークを指標としているが、蛍光スペクトルにおいても Bch の特徴を確認できた。次に Bch 生合成遺伝子の発現レベルを調べた。*M. extorquens* AM1 は明条件で発現量が増加、*M. phyllosphaerae* CBMB27 は暗条件で発現量が増加しており、Bch 生産条件と相関することが分かった。*Methylobacterium* / *Methylorubrum* 属における Bch 生産分布を調べた結果も合わせて、本属細菌における Bch 生産条件の特徴を考察する。

【Introduction】We have been studied on the light-response of *Methylobacterium* / *Methylorubrum*, which are plant-associated methylotrophic bacteria. The genera were reported to produces bacteriochlorophyll (Bch), though they are considered as non-phototrophic bacteria. In this study, to reveal the function and role of Bch in the phyllosphere bacteria, we analyzed the Bch production condition and its gene expression. 【Results】 Sato K. (FEBS Lett., 1978) reported that *M. extorquens* AM1 produces Bch on the unique carbon source of 1,2-propanediol under light/ dark cycle. The result was reproducible in our study. We also found that Bch was not produced on methanol or succinate, was not produced under constant dark. In *M. phyllosphaerae* CBMB27, Bch was produced on methanol under dark. Then, we analyzed the Bch gene expression. The Bch gene expression was elevated under light in *M. extorquens* AM1, while the Bch gene expression was elevated under dark in *M. phyllosphaerae* CBMB27. These expression profile agreed with the Bch production. Further, we discuss on the Bch production condition in the genera.

Methylobacterium / Methylorubrum, light response, methylotroph

発表責任者：井口博之（iguchi.hiroyuki@kuas.ac.jp）

講演番号：3E6p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E6 会場

新規 CO 資化性微生物の探索―好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の CO 耐性および資化性の検証

Studies on CO tolerance and utilization of an autotrophic bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*

○千葉 洋子[1,2]、常松 奈緒[1]、亀谷 将史[3,4]、若島 朋幸[1,5]、島村 繁[6]、福山 宥斗[7]、布浦 拓郎[7]（[1]理研環境資源科学、[2]筑波大生命環境、[3]東大院農、[4]東大微生物連携機構、[5]筑波大院生物、[6]JAMSTEC 超先鋭、[7]JAMSTEC 生命理工）

○Yoko CHIBA[1,2], Nao Tsunematsu[1], Masafumi Kameya[3,4], Tomoyuki Wakashima[1,5], Shigeru Shimamura[6], Yuto Fukuyama[7], Takuro Nunoura[7] ([1]RIKEN CSRS, [2]The Univ. of Tsukuba, [3]The Univ. of Tokyo Agri, [4]The Univ. of Tokyo CRIIM, [5]The Univ. of Tsukuba Life, [6]JAMSTEC X-star, [7]JAMSTEC CeBN)

CO は反応性に優れた分子であり、初期の地球に存在したとされる。そのため、どのような生物に CO 資化能があるのか解明することは代謝進化の理解に重要である。これまでに報告された CO 資化微生物は、還元的アセチル CoA 経路を用いて CO_2 を固定するものに限られる。しかし理論的には、CO を CO_2 に酸化する CO dehydrogenase と CO_2 固定経路を有していれば、CO を資化できるのではないかと発表者らは考えた。そこで CO dehydrogenase 遺伝子および還元的 TCA 回路を有する独立栄養性細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の CO 耐性および CO 資化性を検証した。

H. thermophilus の標準的な培養条件の気層は、好気呼吸時 H_2:CO_2:O_2=75:15:10（分圧比）、嫌気硝酸呼吸（脱窒）時 H_2:CO_2:N_2=75:15:10 である。本条件に CO_2 と等モル量の CO を添加したところ、好気呼吸条件では CO 非添加と同等の増殖速度・最終菌体密度を示した。一方、硝酸呼吸条件では明確な最終菌体密度の低下が認められた。本結果は、本菌が CO 耐性を有し、CO 耐性の度合いが呼吸システムによって異なることを意味する。一方、*H. thermophilus* は CO を唯一の炭素源としては利用できないことが示唆された。本会では、CO_2 存在下での CO の挙動および硝酸呼吸時に CO によって増殖が阻害された理由についての考察も紹介する。

CO is a highly reactive molecule comparing to CO_2. Microorganisms which have been reported to use CO as a carbon source so far are limited to the ones with the reductive acetyl-CoA pathway for CO_2 fixation. We hypothesized that autotrophs with other CO_2 fixation pathways can also utilize CO if they can oxidize CO to CO_2 by CO dehydrogenase. Here, we examined the CO tolerance and CO-utilization of *Hydrogenobacter thermophilus*, a thermophilic bacterium possessing a CO dehydrogenase gene and grows autotrophically with the reductive TCA cycle.

H. thermophilus growth using H_2 as an electron donor and O_2 or nitrate as an electron acceptor. When an equimolar CO to CO_2 was added to the media, there was no clear difference in growth rate and final cell density between with and without CO under the O_2 respiration condition. On the other hand, the final cell density decreased under the nitrate respiration condition. These results suggest that *H. thermophilus* is CO tolerant and that the nitrate respiration is sensitive to CO comparing to the O_2 respiration. No growth was observed when CO_2 was substituted with CO, indicating that *H. thermophilus* cannot use CO as the sole source of carbon.

carbon monoxide, nitrate respiration, hydrogen oxidation

発表責任者：千葉 洋子（yoko.chiba.ey@riken.jp）

講演番号：3E6p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E6 会場

Na^+ が支える藍藻の光合成電子伝達系

Cyanobacteria utilizes Na^+ to regulate photosynthesis

○辻井 雅[1]、小林 歩夢[1]、狩野 文香[1]、解良 康太[1]、児島 征司[2]、彦坂 幸毅[2]、小口 理一[3]、園池 公毅[4]、浅井 智広[5]、稲垣 知実[6]、石丸 泰寛[1]、魚住 信之[1]([1]東北大院工、[2]東北大院生命、[3]公大院理、[4]早大教、[5]中央大理工、[6]立命大院生命)

○masaru Tsujii[1], ayumu Kobayashi[1], Ayaka Kano[1], Kota Kera[1], Seiji Kojima[2], Kouki Hikosaka[2], Riichi Oguchi[3], Kintake Sonoike[4], Chihiro Azai[5], Tomomi Inagaki[6], Yauhiro Ishimaru[1], Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tohoku univ., [2]Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku univ., [3]Grad. Sch. of Sci., Osaka met. univ., [4]Fac. of Edu. and Int. Art. and Sci., Waseda univ., [5]Fac. of Sci. and Eng., Chuo univ., [6]Grad. Sch. of Life Sci., Ritsumei. univ.)

【背景・目的】動物は除いて，Na^+ は生物の増殖を阻害する元素であることが広く知られている。一方、酸素発生型光合成生物であるシアノバクテリアは Na^+ 濃度の低い環境では生育が低下する Na^+要求性を示す。しかし、Na^+ がどのように生育や光合成の制御に寄与するのかに関する知見はほとんどない。本研究では、シアノバクテリアが保持する Na^+/H^+ アンチポーターに着目して、Na^+ を利用した光合成制御機構の解明を目的とした。

【結果・考察】Na^+ を含まない BG11 (K) 培地の Na^+ 濃度を段階的に増やして生育を観察した結果、光強度の上昇に伴いシアノバクテリアの Na^+ 要求性は強くなる。細胞膜に局在し、Na^+ を取り込む Na^+/H^+ アンチポーターを欠損した株 (Δ*nhaS*) を作製し、表現型を観察した結果、光強度の上昇に伴い生育速度が低下することが明らかとなった。また、Δ*nhaS* ではシトクロム b_6f 複合体を介した光合成電子伝達系が抑制されていることが示唆された。pH 依存型蛍光タンパク質や pH 指示薬を用いた細胞内 pH 測定により、Δ*nhaS* ではチラコイド膜を介した ΔpH が上昇することが明らかとなった。これらの結果から、シアノバクテリアは NhaS を介して Na^+ を取り込むことで、チラコイド膜を介した ΔpH を緩和し、光合成電子伝達鎖を適切に維持することが示された。

【Background】Na^+ is widely known to inhibit the growth of organisms except animal cells as a toxic element. On the other hand, cyanobacteria, halotolerant oxygen evolving photosynthetic organisms, have been shown to utilize Na^+ for photosynthesis regulation. However, the knowledge of how Na^+ regulates photosynthesis is limited. In this study, we focused on the Na^+/H^+ antiporters in cyanobacteria to elucidate the mechanism of Na^+-utilized photosynthetic regulation.

【Results and Discussion】At first, we determined the requirement for Na^+ in various photon flux densities. The results indicated that cyanobacteria require Na^+ as light intensity increases. The defective strain of Na^+/H^+ antiporter (Δ*nhaS*) that localizes to the plasma membrane and incorporate Na^+ into cells showed decreased growth with increasing light intensities. Photosynthetic analysis suggested that cytochrome b_6f complex mediated electron transport was suppressed in Δ*nhaS*. In addition, ΔpH across the thylakoid membrane was increased in Δ*nhaS*. These results indicated that cyanobacteria alleviate ΔpH across the thylakoid membrane by uptake of Na^+ by NhaS, thereby facilitating the photosynthetic electron transport chain.

ion transporter, cyanobacteria, photosynthesis

講演番号：3E6p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E6 会場

好酸性緑藻による粗放開放型油脂生産系確立の可能性
A potential of acidophilic green microalga for simplified open culture lipid production system
○岡澤 空汰[1]、邱 泰永[2]、小西 正朗[2] ([1]北見工大院工、[2]北見工大)
○Sorata OKAZAWA[1], Tai-ying CHIOU[2], Masaaki KONISHI[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Kitami Inst. Technol., [2]Kitami Inst. Technol.)

微細藻類は光合成による炭酸固定能力を有し次世代バイオ製品の供給源として注目されている。微細藻類の開放型培養は低コストで最も経済的実現可能な培養手法とされるが、雑菌汚染が課題となる。強アルカリや高塩分濃度での培養は雑菌汚染を予防可能なことから多く検討されている一方、強酸性条件下でのバイオマス生産は好酸性紅藻 *Galdieria spp.*を除いて調査が少ない。本研究では強酸性環境より新たに微細藻類を単離同定し、その培養特性を調査した。単離された *Chlamydomonas eustigma* は pH 約 1.7-6.0、5-30°C の広範な条件で増殖可能であり、静置条件にて良好な増殖を示した。また、混合栄養条件で培養すると 7 日間の培養で得られた乾燥菌体重量と比増殖速度はそれぞれ 3.9 g/L と 0.9 /d を示し、実用される微細藻類と同程度であった。さらに窒素またはリンの欠乏条件において、Nile Red 染色により油脂の蓄積が示唆された。以上より、強酸性環境における培養中の温度管理や攪拌を必要としない簡素な微細藻類油脂生産系の確立が期待される。本講演では前述の研究の詳細や大量培養に向けた取り組みについて紹介したい。

Microalgae show a potential as a host producing next-generation bioproducts. Even though open pond systems are the most economical methods for microalgae cultivation, they are often in an unstable due to easily microbial contamination. A general strategy involves open cultivation under strong alkaline or high saline conditions to avoid the undesirable microbial contamination. Acidic conditions can also reduce the contamination, but only a few acidophilic microalgal species have been studied. An acidophilic microalga was isolated from an acidic hot spring, and its cultivation characteristics was examined in this study. The isolate, *Chlamydomonas eustigma*, can grow at the ranging from 5 to 30 °C, and under acidophilic conditions between pH 2.0 to 6.0. The growth rate at a static condition was found to be higher than that in the shaking culture with 100 rpm shaking. Under the mixotrophic conditions, dry cells weight and growth rate for 7 days were 3.9 g/L and 0.9 /d, respectively. The biomass productivity corresponded to that of industrially applied microalgae. Furthermore, *C. eustigma* was found to be accumulated lipids in cells under nitrogen and / or phosphorus limited conditions, based on Nile red staining. The results imply that the potential for developing a lipid production with easily handled, open culture with acidification.

Microalgae, Open pond, Lipid

発表責任者：小西正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：3E6p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E6 会場

円石藻 *Chrysotila haptonemofera* NIES-1813 の低凝集性変異株の解析

Analysis of a mutant strain of *Chrysotila haptonemofera* NIES-1813

○加藤 明宏、武田 誠也、豊田 直之（セイコーエプソン株式会社）
○Akihiro Kato, Tomoya Takeda, Naoyuki Toyoda (Seiko Epson Corporation)

円石藻は細胞表面に炭酸カルシウムを主成分とする円石（ココリス）を形成する海洋性の微細藻類である。当社では、ココリスが CO2 を原料として生合成されることに注目し、円石藻を用いた CO2 固定化技術の研究開発を進めている。円石藻の一種、*Chrysotila haptonemofera* NIES-1813 の野生株（WT 株）において、細胞が凝集して粒状となり、効率的な培養が困難となる現象が発生した。そこで、重イオンビーム照射によりランダム変異を導入した細胞の中から凝集性が低下した株（LA 株）を選抜した。この株はダイゴ IMK 海水培地を用いた静置培養において凝集性が WT 株よりも低下していただけではなく、WT 株と同程度の増殖性も維持されていた。さらに、凝集性が変化していたことから、セルソーターを用いて細胞の表面構造を解析したところ、LA 株の方が WT 株よりも高い後方散乱光強度を示す細胞が多く、ココリス形成が盛んであることが示唆された。現在、LA 株のココリス形成についてより詳細な検討を進めている。以上の結果から、LA 株の形質について、低凝集性に加えて高ココリス形成の観点からも考察する。

Coccolithophores are an important group of marine phytoplankton. Their cells are covered with calcium carbonate shells called coccosphere consisting of coccolith. Coccolith production using coccolithophores is thought to be a promising method of carbon capture storage, because atmospheric carbon dioxide is fixed in calcium carbonate. However, the wild type (WT) cells of *Chrysotila haptonemofera* NIES-1813 showed the autoflocculation phenotype under our laboratory growth conditions, resulting that prolonged cultivation of this strain is failed. A mutant obtained from WT cells by heavy-ion irradiation could grow without autoflocculation and showed no growth defect compared to WT strain. Furthermore, flow cytometric measurement suggested that this mutant has a large capacity of coccolith production. Thus, further studies to analyze the phenotype of this strain are being planned.

micro algae, coccolithophores, photosynthesis

講演番号：3E6p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E6 会場

重水素耐性大腸菌変異株の分離と変異の解析
Isolation and characterization of deuterium-resistant *Escherichia coli* mutants
○正木 春彦[1]、松谷 峰之介[2]、石井 大輔[1]、矢嶋 俊介[3] ([1]東農大生命、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]東農大生命，東農大ゲノム解析セ)
○Haruhiko Masaki[1], Minenosuke Matutani[2], Daisuke Ishii[1], Shunsuke Yajima[3] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]NODAI Genome Res. Center,, [3]Tokyo Univ. of Agric., NODAI Genome Res. Center,)

重水素標識分子を得ようとして重水で調製した培地に大腸菌を植えても，即座に増殖が止まる。
この D/H 同位体効果の原因を知ろうと，重水寒天培地で耐性株分離を試みたが採れなかった。そこで，0.2% glucose を含む重水で調製した M9 最少培地を濾過滅菌し，10 本の試験管で並行して，MG1655 株を 37℃で振盪培養した。十分濁ったものを約 1%接種で植え継ぐことを約 130 世代分繰り返すと，当初の倍加時間 4 時間が 2 時間に短縮された（軽水培地中での親株の倍加時間は 110 分）。
それぞれから重水最少寒天培地で 3 コロニーを分離し，ゲノム解析して変異点を調べると，30 株すべてに共通して，分岐鎖アミノ酸合成系の最初の acetohydroxy acid synthase 遺伝子に点変異が見られた。重水素はこの酵素の活性制御に阻害的に働いたようで，親株はバリン添加でフィードバック阻害により増殖を止めるのに対し，いずれの重水素耐性株もバリン耐性となって増殖を続けた。
培地にカザミノ酸を加えると一様に生育は早まるが，上記の耐性株ではいずれも軽水に対する重水感受性が復活していたので，重水素で律速となる反応は培養条件によって異なることが推定される。

Escherichia coli hardly grows in media prepared with heavy water. To know the origin of this deuterium isotope effect, strain MG1655 was grown at 37˚C in 0.2 % glucose-containing M9-minimum medium prepared with heavy water independently in 10 test tubes. After successive cultivation for about 130 generations, the doubling time shortened from four to two hrs, compared with 110 min in a water-based medium. Three clones were isolated from each 10 tube on heavy water-based plates and genomes were sequenced. All the 30 clones acquired a single type of mutation in the genes for the first step of branched-chain amino acid synthesis, in such a way escaping the feed-back inhibition by valine.
When Casamino acids were added to the medium, the growth rates were improved along with reappearance of the deuterium sensitivity in the resistant clones, suggesting that different rate-limiting steps lie hidden according to cultivation conditions.

deuterium, experimental evolution, branched-chain amino acid synthesis

発表責任者：正木　春彦（sympho2etta@gmail.com）

講演番号：3E6p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E6 会場

oxyR 欠損した大腸菌細胞のゲル化剤によるコロニー形成の影響
Effect of gelators on colony formation in *oxyR*-deficient *Escherichia coli* cells.
○坂元 仁[1,2]、朝田 良子[1,3]、古田 雅一[1,3]、土戸 哲明[1] ([1]大阪公大・微制研セ、[2]関西大・化生工、[3]大阪公大院工)
○Jin Sakamoto[1,2], Ryoko Asada[1,3], Masakazu Furuta[1,3], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]Microorganisms Cntr. Res. Ctr., Osaka Metro. Univ., [2]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ.)

ゲル化剤を用いた寒天培地などの固体培養法はロベルト・コッホ以来、現在も主要な培養法である。自然環境中の微生物のスクリーニングでは寒天ではなくゲランガムのような別のゲル化剤に変えると新規な微生物を取得できた事例や、液体培養では培養可能でも固体培養に感受性を示す事例も知られる。また、生存しているが培養できない VBNC（viable but non-culturablea）状態や損傷菌など生存していてもコロニー形成できない現象も知られる。変異や遺伝子破壊も親株に対して持続的なハンディキャップを背負う損傷の一つであるが、大腸菌の過酸化水素応答の転写調節因子 OxyR の遺伝子欠損株は著しくコロニー形成が阻害されたが、過酸化水素スカベンジャーであるピルビン酸ナトリウムの添加でコロニー形成は回復した。当初は単純な外気に曝されたことによる酸化ストレスと考えられたが、ゲル化剤として各社数種類の寒天、ゲランガム、カラギーナン、ゾル化剤であるグアーガムで比較したところ、ほぼ全てでコロニー形成が阻害されたが、数種の寒天のみコロニー形成阻害を示さなかった。ゲル化剤の成分分析から亜鉛がコロニー形成阻害因子であることが示唆された。

Solid culture methods such as agar medium using gelators have been a major culture method since Robert Koch. In the screening of microorganisms in the natural environment, it is known that new microorganisms could be obtained by changing to other gelators, such as gellan gum, instead of agar. Additionally, some microorganisms are susceptible to solid culture even though they can be cultured in a liquid medium. There are also documented cases of VBNC (viable but non-culturable) or injured microorganisms that cannot form colonies despite being viable. Mutation or gene disruption is one type of damage that carries a persistent handicap. A gene-deficient strain of OxyR, a transcriptional regulator of the hydrogen peroxide response in *Escherichia coli*, was severely inhibited in colony formation. However, the addition of sodium pyruvate, a hydrogen peroxide scavenger, restored colony formation. Initially, this was thought to be a simple case of oxidative stress caused by exposure to open air. Still, a comparison of the gelators (agar, gellan gum, and carrageenan from various companies) and the solubilizing agent (guar gum) showed that colony formation was inhibited in almost all cases, with only a few types of agar not showing any inhibition of colony formation. Component analysis of the gelling agent suggested that zinc was the inhibitory component.

oxidative stress, gelling agent, colony formation

発表責任者：坂元 仁（jin.saka@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3E6p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E6 会場

フッ素系不活性溶媒による大腸菌の鉄取込み亢進と増殖促進

Fluorocarbon solvents affect the iron uptake and growth of *E.coli*

○細木 亮輔[1]、井澤 克秋[1]、山重 貴久[2]、川田 晃士[1]、日高 將文[1]、尾間 由佳子[1]、菊池 正二郎[3]、瀬戸山 寛之[4]、廣沢 一郎[4]、原田 昌彦[1]([1]東北大院農、[2]京大院農、[3]兵庫医科大・先端医、[4]九州シンクロトロン光研究センター)

○ ryosuke HOSOKI[1], katsuaki IZAWA[1], yoshihisa YAMASHIGE[2], koji KAWADA[1], mafumi HIDAKA[1], yukako OMA[1], shojiro KIKUCHI[3], hiroyuki SETOYAMA[4], ichiro HIROSAWA[4], masahiko HARATA[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ, [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Kyoto Univ, [3]Inst. Adv. Med. Sci., Hyogo Medical Univ, [4]SAGA-LS)

微生物や細胞は有用物質生産など幅広い分野で必要であることから、効率的な培養法の開発が求められている。これまでにフッ素系不活性溶媒(Fluorocarbon; FC)の液体培地への添加が微生物や細胞の増殖を促進することが報告されている。この現象は FC の高い酸素溶解性に起因すると考えられてきたが、我々のこれまでの研究結果は、溶解酸素に依存しない FC の増殖促進メカニズムの存在も示唆している。また、FC には細胞飽和密度を高める特徴があり、そこには培地中の鉄が細胞飽和密度の決定に重要な役割を果たすことが知られている。これらのことから、FC が生物や細胞の鉄の取り込みや鉄関連代謝系を変化させ、その結果として微生物や細胞の増殖促進に作用しているとの仮説を立てた。本研究ではその検証を目的とし、FC 添加時の大腸菌への鉄取り込み量の測定や鉄関連遺伝子の遺伝子発現解析を行った。まず LB 培地(Fe: 200 μM)を用い、FC 添加、非添加の条件で大腸菌 (BW25113)を培養後、菌体のみを回収・風乾して九州シンクロトロン光研究センターの蛍光 X 線分析装置による元素分析を行った。その結果、FC 添加培養菌体では、非添加菌体に比べて鉄を含む複数種の金属元素量が増加していた。そこで、FC 添加による鉄関連代謝系の変化を確認するために、FC 添加、非添加の M9 培地 (Fe: 10 μM)で培養した大腸菌における遺伝子発現量解析を行ったところ、鉄存在量に依存した制御を受ける遺伝子発現の変化が明らかになった。これらの結果は FC 添加が大腸菌の鉄取り込みと鉄関連代謝に影響を与えたことを示唆している。今後は、さらに詳細に FC による微生物の増殖促進メカニズムを明らかにすることで、より一層効率的な微生物や細胞の培養法開発を目指したい。

Bacteria are widely used for hosts to produce recombinant DNA, proteins, and industrial products. Therefore, the efficiency of their growth in liquid cultures affects the yield of these products. The chemical-inert fluorocarbon solvents, called FC, have already been reported to improve bacterial growth in liquid culture. Our research has suggested an unknown growth-promoting mechanism by FC, characterized by an increase in cell saturation density. Iron is known to play a key role in determining the cell saturation density. This suggests a possibility that FC may promote growth by altering the uptake of iron into the bacteria and the metabolism related to iron. In this study, we measured the iron uptake into *E. coli* and the change in the metabolic pathway involving iron with or without adding FC. *E. coli* (BW25113) was cultured in LB medium (Fe: 200 μM) with or without adding FC. The bacteria were collected and air-dried, and the samples were applied to X-ray fluorescence analysis at SAGA-LS. As a result, it was shown that adding FC increased the uptake of several metal elements, including iron, into *E. coli*. Then, we analyzed the gene expression of E. coli cultured in an M9 medium (Fe: 10 μM) with or without adding FC. Change in gene expression by adding FC supports the possibility that adding FC increased iron uptake and affected iron-related metabolic pathways.

Fluorocarbon, iron, bacterial growth

講演番号：3E6p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E6 会場

緑膿菌の硝酸イオン／亜硝酸イオントランスポーターNarK1 と NarK2 の機能解析
Study on the nitrate/nitrite transporters NarK1 and NarK2 in *Pseudomonas aeruginosa*
○岡本 洸彰[1]、亀谷 将史[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2] ([1]東大院農、[2]東大微生物連携機構)
○Hiroaki OKAMOTO[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Masaharu ISHII[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo)

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は日和見感染性の病原細菌であり、世界的に警戒されている。感染病巣の緑膿菌はバイオフィルムを形成し、嫌気的環境下で硝酸呼吸（脱窒）を行う。脱窒には硝酸イオン（NO_3^-）及び亜硝酸イオン（NO_2^-）の細胞膜を介した輸送が必須であるため、本菌が持つ NO_3^-/NO_2^-トランスポーターに注目し、その機能を解析した。

NO_3^-/NO_2^-トランスポーターの候補として、脱窒時に発現する *narK1K2* 遺伝子群に注目した。NarK1 と NarK2 は互いに相同な 12 回膜貫通型のタンパク質である。両者と他の膜輸送関連遺伝子を破壊・相補した菌株を作製し、硝酸同化条件または脱窒条件における生育試験を行ったところ、*narK1* 相補株が良好に増殖した一方で *narK2* 相補株は増殖しなかった。この結果から、少なくとも NarK1 は NO_3^-/NO_2^-アンチポーターであることが示唆されていた（2022 年度本大会）。今回、点変異により機能を欠損した *narK1* と野生型の *narK2* を相補した株が脱窒条件で増殖し、NarK2 の活性には NarK1 の共存が必要であることが示唆された。さらに、*narK2* 相補株が部位特異的な突然変異により硝酸同化条件で増殖したことから、活性に重要なアミノ酸残基の位置と種類を特定した。

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium. It resides ubiquitously in the environment and is also known as an opportunistic pathogen. Denitrification, or anaerobic nitrate respiration, has a great role in its pathogenesis. Nitrate and nitrite transport across the cell membrane is necessary for denitrification, so we focus on the functions of its nitrate/nitrite transporters.

The two homologous genes *narK1* and *narK2* were predicted to encode nitrate/nitrite transporters responsible for denitrification. Thus, growth experiments on their mutants and complementary strains were conducted under nitrate assimilation or denitrification conditions. The results suggested NarK1 was a nitrate/nitrite exchanger (JSBBA 2022). Expression of both inactive NarK1 by a point mutation and wild type NarK2 led to growth under denitrification condition, suggesting that NarK1 has an effect on NarK2 activity. We also observed growth of *narK2*-complementary strain under nitrate assimilation condition after one of highly conserved residues was mutated. With this result, an important residue for NarK2 activity was revealed.

Pseudomonas, transporter, nitrate

発表責任者：岡本洸彰（ut-agri-olk38@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E6p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 E6 会場

亜塩素酸不均化酵素様タンパクが *Pseudomonas* sp. SCT 株のヨウ素酸呼吸に与える影響

Effect of chlorite dismutase-like proteins on iodate respiration by *Pseudomonas* sp. strain SCT

○久下 陽菜[1]、天知 誠吾[2] ([1]千葉大園芸、[2]千葉大院園芸)
○Haruna KUGE[1], Seigo AMACHI[2] ([1]Fac. of Hort., Univ. Chiba, [2]Grad. Sch. of Hort., Univ. Chiba)

ヨウ素酸（IO_3^-）呼吸細菌 *Pseudomonas* sp. SCT 株では、新規 DMSO 還元酵素ファミリーを含む Idr 複合体が鍵酵素と考えられる。一方、比較プロテオーム解析において、2 種類の亜塩素酸（ClO_2^-）不均化酵素様タンパク Cld1、Cld2 がヨウ素酸呼吸条件で高発現していた。そこで本研究では、Cld 様タンパク質がヨウ素酸呼吸に与える影響を明らかにするため、*cld1* 遺伝子欠損株の作製を行った。また、野生株と Δ*cld1* をヨウ素酸、硝酸、酸素呼吸条件下で培養しその生育を比較した。

野生株と比較して Δ*cld1* は硝酸、酸素呼吸条件では生育に差がみられなかったが、ヨウ素酸呼吸条件でのみ生育が遅延することが明らかとなった。これは、ヨウ素酸呼吸の際に生じる毒性の高い中間体が Cld 様タンパク質により分解されるためと推測している。また、低濃度ヨウ素酸では Δ*cld1* 生育の遅延がみられなかったが、高濃度ヨウ素酸では生育の遅延や生育しないことが確認された。以上より、*Pseudomonas* sp. SCT 株の亜塩素酸不均化酵素様タンパクは、高濃度のヨウ素酸還元に必須であると考えられた。現在、*cld2* 欠損株の作成をおこない、詳細な機能解明に繋げる予定である。

Pseudomonas sp. strain SCT can use iodate (IO_3^-) as a terminal electron acceptor for anaerobic respiration. In this respiration, Idr, a protein complex including a novel DMSO reductase family protein, is expected to play a key role. In addition, comparative proteomic analysis revealed that two chlorite (ClO_2^-) dismutase-like proteins, Cld1 and Cld2, were expressed abundantly under iodate respiring conditions. We hypothesize that Cld may be involved in the destraction of toxic intermediate such as hypoiodite (HIO) in iodate respiration. In this study, we constructed a *Δcld1* mutant and compared its phenotype with wild type strain SCT.

At low concentration of iodate (2 mM), significant difference in cell growth was not observed between the wild type and *Δcld1* mutant strains. However, at high iodate concentrations (8 to 10 mM), significant delay of growth and complete lack of growth were observed. Based on these findings, we speculate that the chlorite dismutase-like proteins are essential for the growth of *Pseudomonas* sp. SCT under high concentrations of iodate. Currently, construction of *Δcld2* mutant is underway to further elucidation of detailed mechanism of iodate reduction.

iodate, respiration, Cld

講演番号：3E6p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 E6 会場

枯草菌芽胞に対する過酢酸の殺滅作用の相対湿度依存性とスポアコートの防御機能

Relative humidity dependence of killing effect of peracetic acid on Bacillus subtilis spores and defensive function of spore coat

○湯川 璃子[1]、Khanh VO[2]、茂田 誠[1]、大西 陽子[1]、佐野 義哉[1]、池田 卓司[1]、朝田 良子[2,3]、坂元 仁[2,4]、古田 雅一[2,3]、土戸 哲明[2] ([1]ニッタ(株)、[2]大阪公大・微制研、[3]大阪公大・院・工、[4]関西大・化生工)

○Riko Yukawa[1], VO Khanh[2], Makoto Shigeta[1], Yoko Onishi[1], Yoshinari Sano[1], Takuji Ikeda[1], Ryoko Asada[2,3], Jin Sakamoto[2,4], Masakazu Fututa[2,3], Tetsuaki Tsuchido[2] ([1]Nitta Co. Ltd., [2]Res. Ctr. Microorg. Control, Osaka Metropol. Univ., [3]Dept. Quant. Rad. Eng., Grad. Sch., Osaka Metropol. Univ., [4]Fac. Mater Chem Eng., Kansai Univ.)

〔目的〕無菌医薬品製造施設や細胞培養加工施設での除染に用いられる過酢酸の気相系での芽胞殺滅作用における相対湿度（RH）の影響を調べるとともに、その作用機構におけるスポアコート（SC）の保護効果を明らかにするため検討した。
〔方法〕枯草菌 168 株とその DNA 結合性の SASP（酸可溶性低分子タンパク質）欠失（*sspB sspA*）株と SC 欠失（*cotE gerE*）株の芽胞を調製した。過酢酸処理はその濃度と温度、湿度がオンライン計測できる自作の過酢酸処理装置中で行った。
〔結果〕過酢酸の殺芽胞作用は野生株芽胞では RH90%で顕著で RH85%以下ではかなり低下し、SASP 欠失株では野生株との間に過酢酸感受性にあまり差はなかった。一方、SC 欠失株では過酢酸感受性は顕著に高かった。気相系において過酢酸は SC にかなり捕捉され、過酢酸耐性における SC の重要性を確認できた。

〔Purpose〕Peracetic acid is used for decontamination in facilities of sterile pharmaceutical manufacturing and cell culture processing. We investigated the effect of relative humidity (RH) on the sporicidal action of peracetic acid in gas-phase systems and the protective effect of spore coats (SC) on the killing action.
〔Methods〕Spores of 168 *Bacillus subtilis* strains and their DNA-binding SASP (acid soluble low molecular weight protein) deletion (*sspB sspA*) and SC deletion (*cotE gerE*) strains were prepared. Peracetic acid preparation treatment was performed using a peracetic acid treatment system with online measurement of concentration, temperature, and humidity.
〔Results〕The peracetic acid sporicidal effect was pronounced at 90% RH for wild-type spores and was considerably reduced below 85% RH. The peracetic acid sensitivity of the SASP-deficient strain did not differ significantly from that of the wild-type strain. On the other hand, peracetic acid sensitivity was significantly higher in the SC deletion strain. In the gas phase system, peracetic acid was considerably trapped by SC, confirming the importance of SC in peracetic acid tolerance.

peracetic acid, spore, relative humidity

発表責任者：湯川璃子（ri_yukawa@nitta.co.jp）

講演番号：3E6p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 E6 会場

Paraprevotella xylaniphila におけるフコイダン資化能の検討
Investigation of fucoidan utilization ability by *Paraprevotella xylaniphila*
○野口 蒼來[1]、遠藤 万里[2]、小島 楽叶[2]、林 秀謙[1,2]、星 淡子[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Sora NOGUCHI[1], Mari ENDO[2], Gakuto KOJIMA[2], Hidenori HAYASHI[1,2], Hiroko HOSHI[1,2] ([1]Graduate School of Biotechnology, Maebashi Institute of Technology, [2]Maebashi Institute of Technology)

フコイダンはモズクやコンブなどの褐藻類に含まれる硫酸化多糖であり、生理的機能として免疫賦活作用や整腸作用、抗ウイルス作用などが報告されている。

Paraprevotella xylaniphila はヒト腸内細菌の一種で、植物の細胞壁に含まれる難消化性多糖のキシランを資化することが知られている。

我々の研究では、皮膚炎症を伴う乾癬モデルマウスにフコイダンを経口投与したところ、皮膚症状の改善を確認するとともに、糞便を用いた腸内細菌叢解析によって Bacteroidetes 門の有意な増加と Firmicutes 門の有意な減少を確認した。さらに Bacteroidetes 門の解析では *Paraprevotella* 属が有意に増加することを確認している。

これらの結果を踏まえ本研究では *Paraprevotella* 属の腸内細菌がフコイダンを資化して腸管免疫の機能改善に寄与していると仮定し、*P. xylaniphila* のフコイダン資化能について検討する。実験では *P. xylaniphila* の増殖能を濁度測定によって評価すると共に、培地中の pH の測定やフコイダンの代謝産物を TLC にて分析・評価する。また、フコイダンの分子量や硫酸化度による *P. xylaniphila* の増殖能の違いを検討する。

Fucoidan is a dietary seaweed fiber found in brown algae with immunostimulatory effects.

Paraprevotella xylaniphila is one of the human microbiota known to utilize xylan, an indigestible polysaccharide found in plant cell walls.

Our previous study reported that a mouse model of psoriasis supplemented with fucoidan from mozuku relieved facial itching and increased mucin volume and IgA contents. Fecal microbiota analysis showed that the fucoidan diet significantly increased the relative abundance of Bacteroidetes phyla and significantly decreased the relative abundance of Firmicutes phyla. Genus Analysis of Bacteroidetes phyla found that supplementation with fucoidan significantly increased the relative abundance of *Paraprevotellaceae* genera.

This study examined whether *P. xylaniphila* utilizes fucoidan by measuring the turbidity for growth rate determination, measuring the pH of the culture medium, and analyzing fucoidan digestive products. Additionally, we examined whether fucoidan, at different molecular weights and sulfation levels, promotes the growth of *P. xylaniphila*.

Paraprevotella xylaniphila, fucoidan, gut microbiota

講演番号：3E6p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 E6 会場

腸内細菌 *Paraprevotella clara* におけるフコイダン資化能の検討
Utilizability of fucoidan by *Paraprevotella clara*.
○小島 楽叶[1]、野口 蒼來[2]、林 秀謙[1,2]、星 淡子[1,2] ([1]前工大工、[2]前工大院工)
○Gakuto KOJIMA[1], Sora NOGUCHI[2], Hidenori HAYASHI[1,2], Hiroko HOSHI[1,2] ([1]Department of Biotechnology, Maebashi Institute of Technology, [2]Graduate of Biotechnology, Maebashi Institute of Technology)

フコイダンは、フコースとグルクロン酸により構成され、一部のフコースが硫酸化された難消化性多糖である。フコイダンはモズクなどの褐藻類に含まれ、抗ウイルス作用、免疫賦活作用など様々な生理機能を持つことで知られている。当研究室では、乾癬を発症したマウスにモズク由来のフコイダンを投与し、皮膚症状の改善と共に *Bacteroidetes* 門の増加などの糞便中における菌叢の大きな変化を確認している。中でも *Paraprevotella* 属の増加が確認された事から、フコイダン資化による症状改善への関与が示唆された。*Paraprevotella* 属は偏性嫌気性の腸内常在菌で、*Paraprevotella xylaniphila* と *Paraprevotella clara* の 2 種が報告されている。*P.clara* は *Paraprevotella* 属の特徴を決定づけ、基準となるタイプ種であり、*P.xylaniphila* より強いキシロース資化能を持つ事が報告されている。また、*P.clara* はフコースやグルクロン酸を認識し分解する酵素(フコシダーゼ、グルクロニダーゼ)をコードする遺伝子を持つことから、フコイダン資化能がある事が推測される。本研究では、*P.clara* に分子量、硫酸化度の異なるフコイダンをそれぞれ与えて資化試験を行い、培養後の培地 pH や培地成分を TLC により分析する事でフコイダン資化能を検討した。

Fucoidan is a high-molecular-weight (over 200,000 Da) sulfated polysaccharide in brown algae that consists mostly (i.e., ≥13%) of sulfated fucose and glucuronic acid. Fucoidan has been known to have various physiological effects, such as antiviral and immunostimulatory effects. We reported that fucoidan supplementation improved fecal microbiota composition and repaired intestinal barrier function. Psoriatic mice supplemented with fucoidan exhibited a significant change in their microbiota, including an increase in *Bacteroidetes* and *Paraprevotella* spp. and decreased skin symptoms. *Paraprevotella xylaniphila* and *Paraprevotella clara* are two species of obligate anaerobic intenstinal bacteria. *P. clara*, a type of species that determines the characteristics of the genus and serves as the reference, has been reported to have a stronger xylulose utilization ability than *P. xylaniphila* and possess enzymes encoding fucosidase and glucuronidase. We hypothesized that *P. clara* would be able to utilize fucoidan.

This study examined whether *P. clara* utilizes fucoidan based on the carbohydrate test for growth rate determination, culture medium pH measurements, and TLC analysis of fucoidan digestive products.

Paraprevotella clara, fucoidan, gut microbiota

発表責任者：小島楽叶（kojimagacto@gmail.com）

講演番号：3E7a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 1 号館 E7 会場

ムラサキイモ由来アントシアニンとポリフェノールの分子間コピグメンテーションを活用する白髪染め

Application of intermolecular copigmentation between anthocyanins from purple sweet potato and polyphenols for grey hair dyeing

○松原 孝典、長濵 沙苗、髙橋 涼、日野 真理（産業技術短大）
○Takanori MATSUBARA, Sanae NAGAHAMA, Suzu TAKAHASHI, Masamichi HINO (College of Ind. Technol.)

本研究では、ムラサキイモ色素に含まれるアントシアニンとポリフェノールの間の分子間コピグメンテーションを白髪染めに応用した。現在、白髪染めは、皮膚障害を起こすと懸念されている酸化染毛剤が利用されている。そこで、皮膚障害の可能性が低いと予想され、持続可能な材料といえ、鮮やかなアントシアニン類を含むムラサキイモ色素で染色することを試みた。

白髪人毛をムラサキイモ色素水溶液により所定条件で染色し、コピグメンテーションを引き起こすと予想されるポリフェノールを利用して後処理をおこなった。そして、洗浄・乾燥ののち、染色毛髪を得た。ムラサキイモ色素で白髪を染色すると、赤紫色に染色される。染色毛髪の吸収特性を示す K/S スペクトルは、530 nm 付近にピークを有し、濃色に染色された毛髪はその波長の K/S 値が高くなる。また、ポリフェノールで後処理をおこなうと、K/S 値が高くなり、染色性が向上する。例えば、後処理無しでは、K/S 値は 7.5 であるが、γ-レゾルシン酸で後処理すると 20.4 となる。

発表では、後処理の効果と要因の考察、後処理に用いたポリフェノールの種類について紹介する。

In this study, intermolecular copigmentation between anthocyanins and polyphenols in purple sweet potato pigments (PSPP) was applied to gray hair dyeing. Currently, oxidative hair dyes, which are feared to cause skin irritation, are used for gray hair dyeing. Therefore, we attempted to dye with PSPP, which is expected to be less likely to cause skin irritation, is a sustainable material, and contains vivid anthocyanins.

Gray human hair was dyed with an aqueous solution of PSPP under specified conditions and post-treated with polyphenols, which are expected to occur copigmentation with anthocyanins. After washing and drying, the dyed hair was obtained. When gray hair was dyed with PSPP, it was dyed reddish purple. The K/S spectrum, which indicates the absorption characteristics of the dyed hair, has a peak at around 530 nm, and the K/S value at that wavelength is higher for darker dyed hair. Post-treatment with polyphenols increases the K/S value and improves dyeability. For example, without post-treatment, the K/S value was 7.5, but after post-treatment with γ-resorcinic acid, the K/S value was 20.4.

The presentation will include a discussion of the effects and factors of post-treatment and the type of polyphenol used in the post-treatment.

Anthocyanins, Copigmentation, Hair colouring

発表責任者：松原孝典（matsubara@cit.sangitan.ac.jp）

講演番号：3E7a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 1 号館 E7 会場

紫カリフラワーに含まれるアントシアニンとその青色錯体形成

Anthocyanins in purple cauliflower and their formation of blue complexes

○馬渕 大貴、秋山 唯、本田 千尋、熊澤 茂則（静岡県立大食品栄養）
○Daiki MABUCHI, Yui AKIYAMA, Chihiro HONDA, Shigenori KUMAZAWA (University of Shizuoka)

【目的】現在、食品の青色天然着色料としてクチナシ色素やスピルリナ色素が使用されている。しかし、青色天然色素は合成着色料と比べて pH や熱安定性に制限があり、食品への利用にはまだ課題が残っている。最近、赤キャベツアントシアニンとミョウバンのアルミニウムイオンが錯体形成し、鮮やかで安定な青色を呈することが報告された。我々は、同じアブラナ科植物である紫カリフラワーが赤キャベツと同様に青色金属錯体を形成することを見出した。そこで本研究では、この青色金属錯体の形成に関与する紫カリフラワーアントシアニンの同定を試みた。
【方法】紫カリフラワーの可食部を 50%メタノール（1%トリフルオロ酢酸）で抽出し、HP-20 カラムクロマトグラフィーにより粗分画した。その後、分取 HPLC によりアントシアニンを単離、精製した。次に、NMR と MS を用いて単離した化合物の構造解析を行った。さらに単離した化合物をリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0 または 8.0）とミョウバン水溶液に溶解し、青色錯体形成能を調べた。
【結果】紫カリフラワーから計 7 個のアントシアニンを単離し、構造解析を行った。その結果、主要な 3 個のアントシアニンを cyanidin-3-(*p*-coumaroyl)-diglucoside-5-glucoside (**1**), cyanidin-3-(*p*-coumarolyl)-diglucoside-5-(methylmalonyl)-glucoside (**2**), cyanidin-3-(*p*-coumaroyl)-diglucoside-5-(malonyl)-glucoside (**3**) と同定した。pH 7.0 においては **1** と **2** は青紫、**3** は紫、pH 8.0 においては **1**～**3** すべて青色金属錯体を形成した。その他 4 個のアントシアニンの構造とそれらの青色金属錯体形成能の結果についても併せて報告する。

Currently, natural blue food colors are mainly used ingredients from gardenia and spirulina dyes. However, their use in food products is limited in pH and heat stability in comparison with synthetic colorants. Recently it has been reported that red cabbage anthocyanins produce a bright and resistant blue color pigment with aluminum ions of alum. We found that purple cauliflower, cruciferous plant family same as cabbage, also forms blue complexes with aluminum ions. In this study, we identified the anthocyanins present in purple cauliflower that contribute to form the blue pigments. 【Methods】 Edible parts of purple cauliflower were extracted with 50% methanol (1% trifluoroacetic acid) and fractionated with HP-20 column chromatography. Then, anthocyanins were isolated and purified using preparative HPLC. Structural analysis was then carried out on the isolated compounds using NMR and MS. The isolated compounds were subsequently dissolved in phosphate buffer (pH 7.0 or 8.0) and aqueous alum solution, and evaluated the ability to form blue complexes. 【Results】 Seven anthocyanins were isolated from purple cauliflower and determined their structures. Three major anthocyanins, cyanidin-3-(*p*-coumaroyl)-diglucoside-5-glucoside (**1**), cyanidin-3-(*p*-coumarolyl)-diglucoside-5-(methylmalonyl)-glucoside (**2**) and cyanidin-3-(*p*-coumaroyl)-diglucoside-5-(malonyl)-glucoside (**3**), were identified. Compounds **1** and **2** formed blue-purple metal complexes at pH 7.0, while **3** generated purple metal complexes. All the anthocyanins **1**–**3** formed blue metal complexes at pH 8.0.

anthocyanin, purple cauliflower, blue complex

発表責任者：馬渕大貴（f20023@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3E7a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 1 号館 E7 会場

国内外の黒砂糖の物理化学特性、呈味成分、ミネラル及びポリコサノールの分析

Analysis of physicochemical properties, taste-related compounds, minerals, and policosanols of brown sugars of Japan and ASEAN countries

○天野 遼、アシキン ヨナタン、高良 健作、和田 浩二 (琉大農)
○Ryo Amano, Yonathan Asikin, Kensaku Takara, Koji Wada (University of the Ryukyus)

【目的】黒砂糖（黒糖）は南西諸島で生産される代表的な含みつ糖で、特徴的な風味を持つ食品であるが、産地等により色、香り、味などが異なっている。当研究室では国内外の黒糖の香気特性の違いを明らかにしているが [1)]、その他の風味に関連するミネラル成分、ワックス成分であるポリコサノール等についての比較はまだ行っていない。そこで本研究では、国内外の黒糖の物理化学特性、呈味成分、ミネラル及びポリコサノールの分析値から黒糖の品質の違いを評価することを目的とする。
【方法】試料として黒糖 20 種（高知 1 種、鹿児島 3 種、沖縄 6 種、マレーシア 3 種、ベトナム 5 種、インドネシア 2 種）を用いた。黒糖の色調は ICUMSA 色価及び *L*a*b** 色空間により測定した。呈味成分（糖類、有機酸、アミノ酸）の分析には HPLC と ^{1}H-NMR を用い、それぞれで定量と半定量を行った。ミネラル成分は ICP-AES、ポリコサノールは GC-FID を用いて分析を行った。
【結果】ベトナム・ゲアン黒糖が最も高い ICUMSA 色価を示し、*L** 値（明度）及び *b** 値（黄色）が高いほど色価も高くなり、両者には中程度の相関が認められた。呈味成分は国内外の黒糖間で特徴的な違いは見られなかったが、HPLC と ^{1}H-NMR による糖と有機酸の分析では、フルクトース、グルコース、アコニット酸に強い相関が、スクロース、酢酸、ギ酸に中程度の相関を確認した。アミノ酸はマレーシア・ケダ黒糖の 598.2mg/100g が最も多かった。ミネラル組成は K と Ca で約 60%を占めており、その他に Mg、P、Na を多く含んでいた。一方、国内の黒糖のミネラル含量は 228～1340mg/100g とばらつきが大きく、海外の黒糖も同様の傾向を示した。また、沖縄黒糖のポリコサノールは 8.4~16.4mg/100g であり、海外の黒糖より約 1.5 倍多かった。今回対象とした分析成分により国や地域ごとの黒糖の品質の違いを特徴づけることはできなかったが、生産地ごとで成分量やその組成は大きく異なることから、黒糖の品質の違いに寄与する成分であることが明らかとなった。

This study aimed to characterize the physicochemical properties, taste-related compounds, minerals, and policosanols of brown sugars of Japan and ASEAN countries (Malaysia, Vietnam, and Indonesia). There was great variation in the color properties (ICUMSA and L*a*b* values) and chemical composition (sugars, organic acids, amino acids, and minerals) among brown sugars, wherein distinct traits were observed in certain products from domestic and overseas. Moreover, Okinawan brown sugars contained 1.5 times higher policosanols than those of ASEAN origins.

[1)] *Foods* (2023), 12, 1406; https://doi.org/10.3390/foods12071406

Brown sugar quality, Taste compounds, Policosanols

発表責任者：天野遼（k228982@eve.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3E7a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 1 号館 E7 会場

緑茶の光退色に及ぼす乳化剤の影響
Effect of emulsifiers on light fading of green tea
○安田 みどり [1]、高祖 修一 [1]、田端 正明 [2] ([1] 西九州大健栄、[2] 佐賀大理工)
○Midori YASUDA[1], Shuichi Kouso[1], Masaaki Tabata[2] ([1]Nishikyushu Univ., [2]Saga Univ.)

飲料業界では、緑茶の光による退色が問題となっている。我々はこれまでに、低濃度のアルコール水溶液中でクロロフィルが凝集体を形成することで光退色を抑えることを明らかにした。本研究では、水溶液中でクロロフィルの退色を抑えるため、乳化剤を用いてクロロフィル溶液および緑茶への光退色の影響を調べた。

乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル（SE)、比較としてエタノールおよび界面活性剤の Triton X-100（TX）水溶液を用いた。サンプル溶液に LED を照射し、時間ごとに色差、UV-Vis および蛍光スペクトルの測定を行った。また、抹茶を用いて緑茶溶液を作成し、SE を添加して同様の実験を行い、色差やカテキン類などの成分の変化を調べた。

光照射によって、エタノールおよび TX 水溶液中のクロロフィルの色差は大きく減少したが、SE を用いた場合は緑色が保持されることが分かった。これは、SE 水溶液中でクロロフィルが凝集体を形成するためであることが明らかになった。しかし、緑茶溶液中では、光退色を抑えることができず、カテキン類の著しい減少が認められた。以上より、SE を用いることにより水溶液中でクロロフィルの光退色を抑制できたが、緑茶では他の成分の影響により光退色を抑えることができなかった。

Light-induced fading of green tea is a problem in the beverage industry. We have previously shown that chlorophyll aggregates in low concentration aqueous alcohol solutions and suppresses light fading of chlorophyll. In this study, we investigated the effect of light fading on chlorophyll solution and green tea using emulsifiers to suppress chlorophyll fading in aqueous solution. Sucrose fatty acid esters (SE) were used as emulsifiers, and ethanol and surfactant Triton X-100 (TX) aqueous solutions as comparators. The sample solutions were irradiated with LEDs and color difference, UV-Vis and fluorescence spectra were measured at each time point. The same experiment was also performed by adding SE to green tea. Light irradiation significantly reduced the color difference of chlorophyll in the ethanol and TX solutions, but the SE solution retained its green color. This was due to the aggregation of chlorophyll in the SE solution. In green tea, however, light fading could not be suppressed and catechins were significantly reduced. In conclusion, SE was able to suppress light fading of chlorophyll in aqueous solution, but green tea could not suppress fading due to the influence of other components.

chlorophyll, green tea, light fading

発表責任者：安田みどり（midori@nisikyu-u.ac.jp）

講演番号：3E7a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 1 号館 E7 会場

ビール中の塩基性色素の単離と性状

Isolation and some properties of a basic pigment in beer

○東 優汰[1]、野田 響子[2]、辻井 良政[3]、村田 容常[3] ([1]東京農大院・農化、[2]お茶大・食物、[3]東京農大応生・農化)
○Yuta AZUMA[1], Kyoko NODA[2], Yoshimasa TSUJII[3], Masatsune MURATA[3] ([1]Dept. Agric. Chem., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Ochanomizu Univ., [3]Dept. Agric. Chem., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

ビールの色調はメイラード反応によって形成され、主にメラノイジンに起因する。しかし、メラノイジンは不均一な高分子であるため、化学的に同定することは困難である。そこで本研究では、ビール中の低分子色素を探索し、同定することを目的とした。

まず淡色ビール及び濃色ビールの色素を、酢酸エチルを用いて酸性物質、塩基性物質、中性物質に分画した後、各画分をダイオードアレイ検出器（DAD）付き ODS-HPLC を用いて分析した。その結果、両ビールサンプルの塩基性画分において可視領域に極大吸収を示す３つのピークが検出された。その内の２つのピークは先行研究より確認されたペルロリリンとキサントフモールであったが、もう１つのピーク（BB4）は不明であったため、単離・同定することとした。約 20 L の黒ビールを水で約２倍に希釈し pH を約 3 にした後、DIAION　HP-20 カラムに通塔した。非吸着画分を集め pH を約 12 にした後、再び DIAION　HP-20 にかけた。水洗後、BB4 をメタノールで溶出し、減圧乾固した。次いでシリカゲルを用いてジクロロメタン：メタノール系で精製した。BB4 を含む画分を集めた後さらに逆相系 HPLC で精製した。その結果、酸性下で 400 nm に極大吸収を持ち、DAD-HPLC で単一のピークを示す極微量の BB4 を得た。現在、理化学的性状を検討中である。

The beer color is formed by the Maillard reaction and is mainly attributed to melanoidins. However, it is practically difficult to identify the chemical structure of melanoidins because they are heterogeneous polymers. Here we tried to isolate and identify low-molecular-weight pigments in beer. At first, we fractionated pale- or dark-colored beer samples into the acidic, basic, and neutral fractions using ethyl acetate, and analyzed them with ODS-HPLC equipped with diode array detection. As a result, three peaks showed absorption maxima at the visible region. Although two peaks were identified perlolyrine and xanthohumol, the other one, BB4, was unknown. Then, we decided to isolate and identify it. About 20 L of black beer adjusted to pH 3 was applied to a DIAION HP-20 column, then the non-adsorbed fraction was collected. Its pH was adjusted to 12 before being applied to the same column again. BB4 was eluted with methanol and further purified with a silica gel column. Finally, a small amount of BB4 was isolated using ODS-HPLC. At present, we are investigating its physio-chemical properties.

beer, pigment, isolation

講演番号：3E7a06
講演日時：3 月 26 日 10:33～ 1 号館 E7 会場

TRPA1/TRPV1 アゴニストによる炭酸感の増強
Bubbling sensation enhancement by TRPA1/TRPV1 agonists
○柏木 貴裕、赤井 千恵、細川 陽子、寺田 育生、山崎 雄一朗、佐野 昇、星野 邦秀（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）
○Takahiro KASHIWAGI, Chie AKAI, Yoko HOSOKAWA, Ikuo TERADA, Yuichiro YAMAZAKI, Noboru SANO, Kunihide HOSHINO (Takasago International Corporation Corporate Research & Development Division)

近年、強い炭酸刺激を訴求する飲料がトレンドとなっており、香料等による風味付けにおいても炭酸感増強効果が求められている。炭酸感に関する先行研究では、侵害刺激に関わる受容体 TRPA1 が注目されてきたが、それ以外に、飲む際の灼熱感と関連する TRPV1 も重要であると考えられた。そこで本研究では、TRPA1/V1 を用いて炭酸感増強効果を示す香料原料を探索した。

まず初めに細胞内 Ca^{2+}イメージング法により、TRPA1/V1 強制発現細胞がアッセイバッファー中の炭酸濃度に依存して応答することを確認した。次に、TRPA1/V1 の両方が応答する香料原料をスクリーニングした。得られた TRPA1/V1 共通アゴニストを炭酸バッファーに添加すると、TRPA1/V1 の炭酸応答がともに増強された。匂い強度の観点でアゴニストを選抜し、炭酸飲料に添加して官能評価した結果、複数成分が炭酸感を増強する効果を示した。その中には炭酸を含まない製品にも炭酸様の感覚を付与する成分も見られた。このように、TRPA1/V1 の両方に着目した本探索手法によって、炭酸感を増強/付与する香料成分を新たに発見するに至った。

Recently, carbonated drinks with strong bubbling stimulation have become a trend, which lead to a demand on bubbling sensation enhancing flavors. Previous research on bubbling sensation has focused on TRPA1, which is associated with noxious stimuli. However, TRPV1, associated with the burning sensation, was also thought to be important. Therefore, we sought new bubbling sensation enhancing flavors through the TRPA1/V1 screening.

First, by intracellular Ca^{2+} imaging, the dose dependent response of TRPA1/V1-expressing cells to the carbonated assay buffer was confirmed. Next, flavor ingredients were screened by their TRPA1/V1 activity. By adding the common agonists of TRPA1 and TRPV1 to the carbonated buffer, the responses of both TRPA1 and TRPV1 were enhanced. Finally, in sensory evaluation of carbonated drinks, some agonists were also found to enhance the bubbling sensation effectively with low odor intensity. Furthermore, several ingredients imparted the bubbling-like sensation even when added to non-carbonated products.

In conclusion, by using this TRPA1/V1 screening method, we have newly discovered that several flavor ingredients have an enhancing/imparting effect on bubbling sensation.

Bubbling sensation, TRPA1/TRPV1, Flavor

発表責任者：寺田 育生（ikuo_terada@takasago.com）

講演番号：3E7a07
講演日時：3 月 26 日 10:44～ 1 号館 E7 会場

珈琲による脂っこさのリセット作用の科学的検証

Anti-greasiness effect on oral cavity by coffee and its components

○井関 菜月[1]、古居 優季[1]、浅田 智恵[2]、藤田 綾香[2]、坂本 裕香[2]、赤川 貢[3]、石井 剛志[1,2] ([1]神院大院栄養、[2]神院大栄養、[3]徳島大院医歯薬)
○Natsuki ISEKI[1], Yuki FURUI[1], Tomoe ASADA[2], Ayaka FUJITA[2], Yuka SAKAMOTO[2], Mitugu AKAGAWA[3], Takeshi ISHII[1,2] ([1]Grad Sch. of Kobegakuin Univ., [2]Kobegakuin Univ., [3]Grad Sch. of Tokushima Univ.)

珈琲の飲用には口腔内の脂っこさをサッパリさせる「口腔内リセット作用」が期待されているが、成分を特定しその効果を科学的に検証した研究は極めて少ない。当研究グループではこれまでに、乳化作用の有無や強弱を定量的に評価できる技術を構築し、嗜好飲料による比較において珈琲飲料が強い乳化作用を備えていること、その作用には水溶性の焙煎成分が関与する可能性を見出している。本研究では、珈琲による口腔内リセット作用の全容解明を目指し、焙煎成分の更なる解析を進めた。

同一の原料豆を異なる強度で焙煎した後に抽出液を調製し、珈琲の乳化作用を再検証した結果、焙煎強度の強い珈琲から得られる抽出液に強い乳化作用を確認した。焙煎成分の詳細な解析の結果、乳化作用を担う成分は充分な水溶性を備えているものの 50%付近のエタノール水溶液で効率的に抽出される褐色成分であり、ポリフェノール骨格を持つ高分子重合物(珈琲メラノイジン)であった。

現在、先行研究で構築した人工リン脂質膜に対する油の付着・残存性を 96 穴プレート上において定量できる評価技術を用い、珈琲の強い乳化作用による「口腔内リセット作用」の検証を進めている。

Coffee is expected to have various effects on refreshing the oral cavity. It has been believed that coffee make a good accompaniment for greasy foods because they have surfactant-like behaviors on fatty aftertaste, but there has been are little scientific studies that have elucidated.

In the present study, we evaluated the emulsion stability of oil-in-water (O/W) emulsions with coffee or its components, and characterized the components that contribute to the emulsification and/or reduce creaming. As a result of various analyses, coffee melanoidins, which are defined as high molecular weight and brown-colored compounds, were identified as a component that improve the emulsion stability.

Currently, we are characterizing the relationship between the amount of oil adhering in the oral cavity and the emulsion stability by using 96-well plate assay-based oral model with the artificial phospholipid membranes surface in order to elucidate the mechanism of action.

coffee melanoidins, emulsification, anti-greasiness effect

発表責任者：石井剛志（ishii_t@nutr.kobegakuin.ac.jp）

講演番号：3E7a08
講演日時：3 月 26 日 10:55～ 1 号館 E7 会場

小麦生地調製時における揮発性成分生成と連動した水溶性成分の変化

Changes in water-soluble compounds in conjunction with the volatile compound formation during wheat dough preparation

○成澤 朋之[1]、仲島 日出男[1]、朝倉 富子[2] ([1]埼玉産技セ北部、[2]東大院農)
○Tomoyuki Narisawa[1], Hideo Nakajima[1], Tomiko Asakura[2] ([1]SAITEC Northern Lab., [2]The Univ. of Tokyo)

うどんの加工工程において小麦粉へ加水を行った際に揮発性成分が生成されると既報にて報告した。また，これらがリポキシゲナーゼ(LOX)による不飽和脂肪酸の酸化反応に起因して生成されることが推測された。この LOX 活性は「農林 61 号」にて高く，代謝産物である揮発性成分のアルデヒド類の生成が「農林 61 号」で顕著であった。一方，小麦生地中では様々な化合物が変化していると考えられるが，これらに関する知見は現状乏しい状態である。そこで本研究では，小麦生地中での揮発性成分生成と連動した水溶性代謝産物の変化を解明することを目的に，揮発性成分の生成が多い「農林 61 号」と少ない「さとのそら」において生地形成時の水溶性化合物の変化を分析した。小麦生地の揮発性成分分析はガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)を用い，小麦粉および生地中の水溶性化合物分析にはキャピラリー電気泳動/四重極-飛行時間型質量分析装置(CE/Q-TOFMS)を用いた。その結果，アルデヒド類などの揮発性成分の生成は「農林 61 号」にて顕著であったが，小麦粉から生地形成時の水溶性化合物の変化は「さとのそら」において大きいという結果となった。

We previously reported the generation of volatile compounds during the process of adding water to wheat flour in udon noodle production. It was suggested that these compounds were produced through the oxidation reaction of unsaturated fatty acids by Lipoxygenase (LOX). The LOX activity was found to be significantly higher in the cultivar 'Norin61', resulting in a notable generation of aldehydes, which are volatile metabolic products, in this cultivar. On the other hand, while it is believed that various compounds undergo changes in wheat dough, there is limited knowledge about these changes. In this study, we aimed to elucidate the alterations in water-soluble metabolites during dough formation in correlation with the generation of volatile compounds in wheat dough. We analyzed the changes in water-soluble compounds during dough formation in cultivars with high volatile compound production (Norin61) and low production (Satonosora). GC/MS was employed for volatile compound analysis in wheat dough, and CE/Q-TOFMS was used for the analysis of water-soluble compounds in wheat flour and dough. As a result, the production of volatile compounds like aldehydes was notably higher in the cultivar 'Norin61'. However, there was a significant difference in the alteration of water-soluble compounds from wheat flour to dough, particularly pronounced in the cultivar 'Satonosora'.

Volatile compound, Water-soluble compound, Wheat dough preparation

発表責任者：成澤　朋之（narisawa-t@saitama-itcn.jp）

講演番号：3E7a09
講演日時：3 月 26 日 11:06～ 1 号館 E7 会場

山形県産そばの香気成分の分析

Analysis of aroma components of Yamagata buckwheat

○網干 貴子[1]、樋口 あかり[2]、太田 智弥[1]、遠藤 直輝[2]([1]山形大農、[2]山形県農総研セ)
○ Takako ABOSHI[1], Akari HIGUCHI[2], Tomoya OHTA[1], Naoki ENDO[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

山形県は全国有数のそばの産地である。そばは繊細な香りを有しており、その品質は官能評価が中心である。香りの評価に客観的基準を導入できれば、そばの育種や加工技術等にフィードバックさせて、品質向上につなげることができる。そこで本研究では、そばの香気成分を GC/MS で分析するとともに、匂いかぎ装置で各香気成分の匂いを嗅ぐことで、「そばらしい香り」の解明を目指すこととした。

分析試料は山形県で収穫された「でわかおり」と「最上早生」を用いた。そば粉 3g に対して水 8ml を加えて混合し、電子レンジで加熱後、再度かき混ぜた。ここから放たれる香気成分を SPME で捕集し、匂いかぎ GC/MS で分析した。その結果、ノナナールや 1-オクテン-3-オールなどの香気成分が検出された。また、複数の箇所から「そばらしい香り」がしたため、これらの成分の同定を試みた。

Yamagata Prefecture is one of the leading buckwheat growing regions in Japan. Soba has a delicate aroma and its quality is mainly based on sensory evaluation. If objective criteria can be introduced for the evaluation of aroma, this can be fed back to buckwheat breeding and processing techniques to improve quality. In this study, we analyzed the aroma components of buckwheat using GC/MS and smelled each aroma component using an odor-sniffing device, with the aim of elucidating the 'buckwheat-like aroma'.

The analyzed samples were 'Dewakaori' and 'Mogamiwase' harvested in Yamagata Prefecture. 3 g of buckwheat flour was mixed with 8 ml of water, heated in a microwave oven and stirred again. The odor components released from the mixture were collected by SPME and analyzed by odor-catching GC/MS. As a result, odor components such as nonanal and 1-octen-3-ol were detected. In addition, a 'buckwheat-like aroma' was detected from several locations, so an attempt was made to identify these components.

buckwheat, aroma, Yamagata

講演番号：3E7a10
講演日時：3 月 26 日 11:17～ 1 号館 E7 会場

納豆製造におけるピラジン類生成と納豆菌およびスレオニンとの関連

Relationship between pyrazines formation and *Bacillus subtilis* var. *natto* or threonine during *natto* production

○野田 響子[1]、五十嵐 舞乃[1]、筒浦 さとみ[2]、村田 容常[3]（[1]お茶大院ライフ、[2]新潟大農、[3]東農大農化）
○Kyoko NODA[1], Mano IGARASHI[1], Satomi TSUTSUURA[2], Masatsune MURATA[3] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Niigata Univ., [3]Tokyo Univ. Agriculture)

当グループは納豆のピラジン類生成に、ストレッカー分解だけでなく、納豆菌も関与し、スレオニン（Thr）が重要な前駆体となることを示した（1)。しかし、その詳細な生成機構は明らかになっていない。本研究では、納豆中のピラジン類生成と納豆菌および Thr との関連を明らかにするため、納豆菌がピラジン類を生成する液体培養条件について検討した。また、納豆を実験的に作成し、ピラジン類の生成と Thr の経時変化の関係を調べた。

ビオチン 0.1 μg/mL 含有 Spizizen 培地に Thr を 1 mg/mL となるように添加後、納豆菌（*Bacillus subtilis* var. *natto* NBRC3335）の芽胞懸濁液（5.0×10^5 CFU/mL）を加えた。37 °C、110 rpm で振盪培養し、培養液中のピラジン類を GC-FID を用いて分析した。その結果、培養 96 時間後に 2,5-ジメチルピラジンおよびトリメチルピラジンの生成が認められた。また、オートクレーブした大豆 30 g に芽胞懸濁液（1.0×10^4 CFU/g）を加え、37 °C で静置培養して納豆を作製し、経時的にピラジンと Thr を分析した。Thr は Fmoc 化し蛍光 HPLC で定量した。その結果、納豆菌が定常期に達した 48 時間以降に Thr およびピラジン類の量が増加した。

Our group demonstrated that *Bacillus subtilis* var. *natto* is involved in the formation of pyrazines during *natto* production and that threonine (Thr) is an essential precursor of pyrazines (1). However, the detailed mechanism underlying the formation remains unclear. To elucidate this, we investigated the conditions of liquid culture in which *B. natto* produces pyrazines. In addition, we made *natto* and examined the relationship between pyrazine formation and the increase or decrease of Thr during the *natto* production.

Spizizen medium containing 0.1 μg/mL biotin and 1 mg/mL Thr was inoculated with *B. natto* NBRC3335 (5.0×10^5 CFU/mL), which was incubated at 37 °C with shaking. After 96 h of incubation, 2,5-dimethylpyrazine and trimethylpyrazine were detected in the culture. *Natto* was prepared by inoculating *B. natto* (1.0×10^4 CFU/g) into 30 g of autoclaved soybeans, followed by incubation at 37 °C. After 48 h, when bacteria reached the stationary phase, the amounts of Thr and pyrazines increased.

(1) *J. Home Econ. Jpn.*, **73**, 39-49 (2022)

pyrazines, *Bacillus subtilis* var. *natto*, threonine

講演番号：3E7a11
講演日時：3 月 26 日 11:36～ 1 号館 E7 会場

咀嚼模擬装置を用いた時のフレーバーリリースの検討

Flavor release from food samples using a mastication simulator

○堀江 芙由美、日下部 裕子（農研機構）
○Fuyumi HORIE, Yuko KUSAKABE (NARO)

咀嚼とは歯によって食品を粉砕し、唾液と混ぜ合わせながら嚥下可能な食塊を形成する行為である。咀嚼によって口腔内に放出されて鼻に抜ける香りはレトロネーザルアロマ呼ばれ、食品のおいしさに関わっている。ヒトが食品を食べている時に感じている香りを理解するには咀嚼を考慮する必要があるが、ヒト試験の場合、咀嚼力や口腔の大きさ、唾液分泌量などに個人差があるため、データのばらつきが大きくなってしまう。そこで、本研究では、咀嚼を模した装置を用いて食品を変形させたときに放出される香気成分の分析を行い、咀嚼によって生じる香気成分の放出動態を理解することを試みた。咀嚼模擬装置によって 1 秒に 1 回の速さで食品サンプル（クラッカーサンド）を圧縮し、食品サンプルから放出された香気成分をテナックスチューブに吸着させた。捕集した香気成分は加熱脱着装置付きガスクロマトグラフ質量分析計によって分析した。咀嚼模擬装置による圧縮および食塊の状態を模すために加えた人工唾液が香気成分の放出に与える影響を検討した。また、咀嚼模擬装置によって得られた結果を官能評価と比較したのでその結果を報告する。

Masticaiton is the process of crushing food by teeth and mixing with saliva to form a swallowable food bolus. During mastication aroma volatile compounds released from food are delivered to nasal cavity and perceived as retronasal aroma which affects flavor preference. In this study we used a mastication simulator to mimic a food bolus and analyzed aroma volatile compounds released from the food bolus. Food samples were compressed using the mastication simulator and released aroma volatile compounds were collected in Tenax-TA tubes. Collected aroma volatile compounds were analyzed by a thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry method. We evaluated the effect of adding artificial saliva on flavor release. We also performed a sensory evaluation and compared results of the sensory evaluation with those of the simulator.

flavor release, mimic mastication, food bolus

講演番号：3E7a12
講演日時：3 月 26 日 11:47～ 1 号館 E7 会場

AI 解析を基盤としたフレーバーホイール自動作成法の開発

Development of an AI-based method for automatic flavor wheel creation

○辻 凌希[1,2]、伊藤 豊実[1,2]、寺田 祐子[1]、伊藤 圭祐[1,2]([1]静岡県大食品栄養、[2]合同会社 DigSense)
○Ryoki TSUJI[1,2], Toyomi ITO[1,2], Yuko TERADA[1], Keisuke ITO[1,2] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]DigSense, LLC)

【背景・目的】食品の風味を「言葉（キャラクター）」として表現/評価/共有するツールとして、対象食品の風味を網羅したフレーバーホイール（Flavor Wheel: FW）が有用である。しかし、パネルディスカッションに基づいて FW を作成する場合、客観性を持たせることが困難であり、また作成した FW がサンプルとした食品に特異的である場合、汎用性は低くなりやすい。その一方、食品は多様な素材や成分によって構成されているため、プロジェクトやサンプルごとに異なる FW を作成する必要があることも少なくない。これらの課題を解決し、より多くの場面で FW を活用するため、本研究では、AI を活用することで、客観的かつ迅速に FW を自動作成できる方法論を開発した。
【方法・結果】研究開始にあたり、3,887 種類の香気成分の匂い表現に使用される 564 種類のキャラクター、および 76 種類の香辛料とその香気成分の情報を収集した。次に、複数の香辛料を指定することで、それらによって構成される素材の FW を自動作成できる AI プログラムを開発した。また、食品に含まれる複数の香気成分を指定することで FW を自動作成できる AI プログラムも開発した。本研究で作成した FW の構成キャラクターは、過去の報告で風味表現に用いられているキャラクターとの共通性が確認されたことから、本方法論によって実用的な FW を作成可能であることが示唆された。

Flavor Wheels (FWs) are useful as tools for expressing, evaluating, and sharing the flavors of food using 'words (characters)', encompassing the entire flavor profile of targeted foods. However, FWs derived from panel discussions often lack objectivity, and those tailored for specific food samples can be less versatile. Given the diverse materials and ingredients in foods, different FWs are frequently required for each project or sample. To address these issues and expand the application of FWs, this study aimed to develop a methodology for the objective and rapid automatic creation of FWs using AI.

At the outset of the study, information on 564 characters used to describe the smells of 3,887 aromatic ingredients, as well as 76 model spices and their aromatic components, were collected. Subsequently, an AI program that automatically creates FWs for ingredients composed of specified spices was developed. Another AI program, that automatically generates FWs based on various aroma components in food products, was also developed. The FWs created in this study shared commonalities with flavor characters used in previous reports, indicating the practicality of this methodology in creating FWs.

AI (Artificial Intelligence), flavor wheel, aroma compounds

発表責任者：伊藤 圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3E7p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E7 会場

薄切およびマトリックス不要の MS イメージングを可能にする転写プレート
Thin-section- and Matrix-free Mass Spectrometry Imaging Using a Transfer Plate

○池田 貴将、小谷 政弘（浜松ホトニクス）
○Takamasa IKEDA, Masahiro KOTANI (Hamamatsu Photonics)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）を使用した質量分析イメージング（MSI）は、分子の局在を可視化する分析手法の一つで、ラベリング処理が不要（非標識分析）でありながら、質量分析ゆえの高感度検出を実現している点が大きな特徴である。MALDI-MSI 測定にあたっては、マトリックス塗布はもちろん薄切という試料の前処理が欠かせない。薄切とは、試料を凍らせて数十μm の厚さにスライスする作業である。しかし、農産物においては固さやサイズの観点から薄切に適さないサンプルも多く、薄切という前処理は、農芸化学分野への MSI 応用を大きく制限する一因となっている。

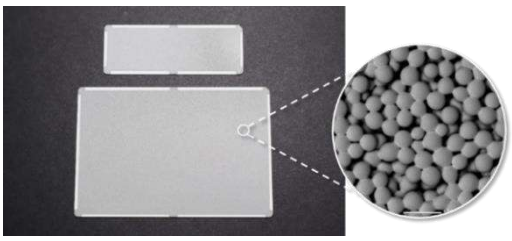


図. 転写プレートの外観と拡大 SEM 像。

我々は、上記課題を解決すべく MSI 用前処理ツール「転写プレート」を開発した。転写プレートはガラスビーズ焼結多孔体を母材としており、その有効面にイオン化を引き起こす白金膜があらかじめ成膜されている（図）。転写プレートを用いれば、試料を転写プレートに接触させるだけで前処理が完了するため、薄切はもちろんマトリックス塗布も必要ない MSI 測定が可能となる。本発表では、転写プレートの詳細とともに、イチゴ果実をサンプルとした MSI 測定例を紹介する。

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) is a powerful tool for visualizing the special distribution of chemical constituents. MALDI-MSI typically requires sample preparation such as sectioning and spraying of the matrix. Thin-sectioning generally means that a frozen sample is sectioned into approximately 5–20 μm sections (thin-sections) using a cryomicrotome. Especially, MALDI-MSI results cannot be obtained if a thin-section of a sample cannot be generated.

We prepared a Pt-coated porous plate formed from glass beads (transfer plate) as a suitable item to realize thin-section- and matrix-free MSI via the transfer process. The transfer plate has the potential to create new MSI applications that have not been explored using the traditional MALDI-MSI preparation processes. This presentation will provide the detail of a transfer plate and MSI measurement of a strawberry cross-section using a transfer plate.

Mass spetrometry imaging, MALDI, Strawberry

発表責任者：池田貴将（msi-t001@hpk.co.jp）

講演番号：3E7p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E7 会場

転写プレートを用いたヨモギ葉含有成分の MS イメージング

MS imaging of components contained in mugwort leaves using a transfer plate

○十一 浩典[1]、道下 理加[1]、池田 貴将[2]、小谷 政弘[2]、山本 卓志[3]、田中 福代[1] ([1]農研機構 分析研、[2]浜松ホトニクス、[3]島津製作所)
○Hironori JUICHI[1], Rika MICHISHITA[1], Takamasa IKEDA[2], Masahiro KOTANI[2], Takushi YAMAMOTO[3], Fukuyo TANAKA[1] ([1]NARO, [2]Hamamatsu Photonics, [3]Shimadzu Corporation)

MS イメージングは、試料表面の微小領域ごとに質量分析を行い、得られたマススペクトルの強度分布を描くことにより、含有成分の分布を視覚的に捉えることを可能とする分析技術である。この技術を農産物へ適用することにより、含有成分の局在に関する議論がさらに深まると考えられ、我々は強い関心を抱いている。しかし、本分析手法に必須となる試料切片の作製において、農作物の中には、その性状や構造によって切片化が不向きであるものが散見され、分析に際して障壁となっている。我々はこの状況を打開するひとつの手法として転写プレート（浜松ホトニクス）に着目し、その有用性を評価するため、多様な農産物試料のイメージングを行っている。これらの中から、代表的な事例としてヨモギの葉の MS イメージングを紹介する。



m/z 349.1224に検出されたイオンの分布

一般に、植物の葉表面のイメージングは特別な器具や高い技術が必要であり、その分析は難易度が高いが、転写プレートと iMScope QT（島津製作所）を組み合わせた MS イメージングを試みた結果、簡便・迅速な手法であるにもかかわらず、複数成分の分布を明瞭に示すことに成功した（図）。さらに、MS/MS スペクトルの解析により成分推定も可能であった。

MS imaging is an analytical technique that enables visualization of components in a sample by performing mass spectrometry on each microscopic region of the sample surface. We are very interested in the application of this technique to agricultural products, but some agricultural products are not suitable for sectioning due to their characteristics and structure. As a method to overcome this problem, we have focused on transfer plate (Hamamatsu Photonics), and have been imaging various agricultural samples to evaluate their usefulness. Among these, we will introduce MS imaging of mugwort leaves as a representative example.

MS imaging has been performed using a combination of a transfer plate and iMScope QT (Shimadzu Corporation). Despite being a simple and rapid method, it succeeded in clearly showing the distribution of multiple components (Figure). Furthermore, component estimation was also possible by analyzing MS/MS spectra.

Mass spectrometry imaging, Transfer plate

発表責任者：十一浩典（juichih110@affrc.go.jp）

講演番号：3E7p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E7 会場

転写プレートを用いたミニトマトの機能性成分の MS イメージング

Transfer plate-combined MS imaging of functional components in grape tomatoes

○田中 福代[1]、道下 理加[1]、池田 貴将[2]、小谷 政弘[2]、山本 卓志[3]、十一 浩典[1]([1]農研機構分析研、[2]浜松ホトニクス、[3]島津製作所)
○Fukuyo TANAKA[1], Rika Michishita[1], Takamasa Ikeda[2], Masahiro Kotani[2], Takushi Yamamoto[3], Hironori Juichi[1] ([1]NARO, [2]Hamamatsu Photonics, [3]Shimadzu Corporation)

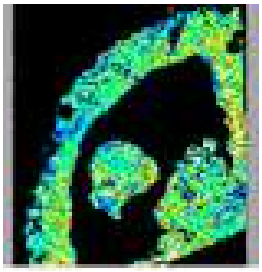
植物の二次代謝産物は環境ストレスや病害虫からの加害に対する防御や応答反応と考えられており、その代謝制御の理解は機能性成分の生産効率の向上に寄与する。私たちは、作物器官における機能性二次代謝産物とその関連物質の局在、および経時的な挙動を明らかにすることを目的に、MS イメージング（MSI）の利用を選択した。MSI の性能やスループットのすばらしさにも関わらず、熟練と長時間を要する試料切片の作製の難しさが一要因となって、本手法の植物研究への浸透は進んでいない。この問題を解消すべく、最近開発された「切片の作製が不要な転写プレート」を用いて、ミニトマトを題材に、迅速・手軽な機能性成分の局在分析法の開発を試みた。

【方法】試料:ミニトマト（アイコ）を市販培土で栽培し、7 月 3 日に収穫した。試料調製：収穫した果実は当日中に転写プレート（浜松ホトニクス）に転写した。転写はあらかじめ縦 1/2 にカットし、表面を凍結させたミニトマトの切断面を転写プレートに載せ、軽く押しあてて行った。分析：MSI は iMScope QT、DATA 解析は IMAGEREVEAL-MS(島津製作所)を用いて行った。

【結果】ミニトマトの主要な一次代謝産物や有害成分トマチン（*m/z* 1072.5094、$[M+K]^+$）、機能性成分エスクレオサイド A（*m/z* 1308.5589、$[M+K]^+$）等が観察でき、それぞれ特徴ある局在を示した。トマチンとエスクレオサイド A を中心に局在パターンやその経時変化について、また試料調製や分析条件の改善のための検討についても報告する。

MS imaging (MSI) would be the most appropriate approach to observe the localization of metabolites in plants. Despite its excellent performance, however, the difficulty of preparing sample sections in MSI (requiring proficiency and long processes) prevented its penetration into plant research. In order to solve this difficulty for quick and easy MSI of plant tissues, we attempted to utilize a recently developed transfer plate (Hamamatsu photonics) that does not require the preparation of sections.

As the results, notable components such as primary metabolites, tomatine and esculeoside A were observed by iMScope QT, and their characteristic localization were successfully illustrated using IMAGEREVEAL-MS (Shimadzu Corporation).



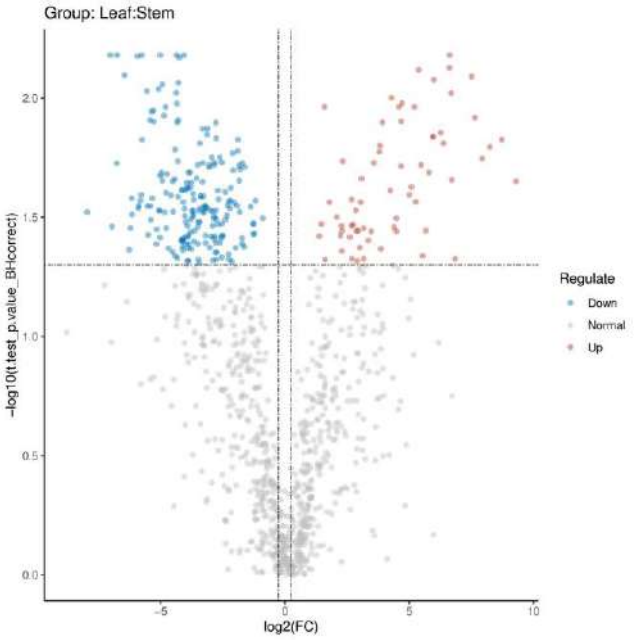
MS Image of Hexose $[M+K]^+$
m/z 219.02625

transfer plate, MS imaging, esculeoside A

発表責任者：田中福代（fukuyot@affrc.go.jp）

講演番号：3E7p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E7 会場

LC-MS/MS 分析によるアシタバの葉と茎の代謝物プロファイリング
Metabolite profiling of Ashitaba (*Angelica keiskei*) leaves and stems using LC-MS/MS analysis
○田中 啓介[1,2]、吉瀬（新井） 祐子[2]、志波 優[3,2] ([1]東情大情報、[2]東農大ゲノムセ、[3]東農大微生物)
○Keisuke TANAKA[1,2], Yuko ARAI-KICHISE[2], Yuh SHIWA[3,2] ([1]Tokyo Univ. Info. Sci., [2]Tokyo Univ. Agri., NGRC, [3]Tokyo Univ. Agri., Microbiol.)



セリ科のアシタバ（*Angelica keiskei*）は、日本原産植物の一つである。この植物の特徴的な栄養成分は、ビタミン、ミネラルが豊富に含まれているほか、ポリフェノールの一種であるカルコン類やクマリン類が多種類存在していることである。また、これらポリフェノールは、抗がん、抗エイズ、血栓防止等の薬理作用をもつことが示唆されている。そのため、アシタバは健康維持や増進に期待できる「スーパーフード」として注目されている。本研究は、アシタバの葉と茎の部位別に代謝物の網羅的なプロファイリングを行った。LC-MS/MS システムを用いて非ターゲットメタボローム解析を実施した結果、陽イオンモードで 1,028 化合物、陰イオンモードで 503 化合物が検出された。それらのうち、約 25%の化合物が差次的代謝物として推定された。本発表では、アシタバの葉と茎で検出された代謝物について紹介する。

Ashitaba (*Angelica keiskei*, belonging to the Apiaceae family) is a plant native to Japan. It is characterized by its rich nutritional content, including vitamins, minerals, and various polyphenols such as chalcones and coumarins. These polyphenols exhibit pharmacological effects, such as anticancer, anti-AIDS, and thromboprophylaxis. Therefore, Ashitaba is expected to contribute to the maintenance and promotion of good health as a 'superfood.' In this study, we conducted a comprehensive profiling of metabolites in each part of Ashitaba leaves and stems. The non-targeted metabolomic analysis was performed using an LC-MS/MS system, resulting in the detection of 1,028 and 503 compounds in positive and negative ion modes, respectively. Among them, approximately 25% were identified as differential metabolites. This presentation will highlight the metabolites detected in the leaves and stems of Ashitaba.

Ashitaba, Metabolome, LC-MS/MS

発表責任者：田中啓介（k3tanaka23@rsch.tuis.ac.jp）

講演番号：3E7p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E7 会場

サトウキビ交配後代集団における搾汁液中成分プロファイル
Compositional profiles in juice of sugarcane crossbred progeny populations
○石川 千秋[1]、大久保 めぐみ[2]、伊達 康博[3]、梅田 周[2]、樽本 祐助[2]、小野 裕嗣[3] ([1]農研機構・食品研、[2]農研機構・九沖研、[3]農研機構・分析研)
○ Chiaki ISHIKAWA[1], Megumi OKUBO[2], Yasuhiro DATE[3], Makoto UMEDA[2], Yusuke TARUMOTO[2], Hiroshi ONO[3] ([1]NFRI, [2]KARC/NARO, [3]NAAC)

【背景】サトウキビ(*Saccharum* spp. hybrids)は日本の南西諸島島嶼部の主要作物として製糖用途で生産されており、従来の育種では収量や糖度品質などの製糖に関わる形質に重点を置いた選抜が行われてきた。その一方で、搾汁液の糖以外の成分に着目することは少なく、さらに高次倍数性のため、糖以外の成分特性の遺伝等についてはほぼ検討されてこなかった。そこで本研究では、サトウキビの育種・栽培技術に対する糖以外の代謝成分特性の活用を目標とし、基礎的知見を蓄積するため、育成系統での成分特性の遺伝的多様性や、その他の成分含量・組成に関する検討を行った。
【方法】農研機構・九州沖縄農業研究センター種子島研究拠点における、育種選抜の過程で栽培したサトウキビを試料とした。農業的特性は生育期間中と収穫時に調査を行った。成分特性は糖度品質評価用搾汁液を使用し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等によって分析を行った。
【結果・考察】搾汁液の成分分析の結果から、同一の父本・母本の組合せから作出した後代集団における遊離アミノ酸成分プロファイル（濃度・組成）は農業的特性と同じく一様ではなく、様々な代謝特性を有した集団であることが確認された。このような知見の蓄積により、サトウキビの育種選抜における成分情報の活用の進展が期待される。
Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) has been cultivated in the part of Nansei Islands for the sugar production. Both yield and sugar content has been main target of sugarcane breeders, on the other hand, other constituents have not been focused on. In this study, we aimed to gain knowledge to establish new breeding and cultivation methods focused on metabolites other than sugar by investigating the conditions that affect them. To this end, we investigated metabolites in sugarcane juice of crossbred progeny populations to obtain basic knowledge about metabolomic compositional characteristics. Sugarcanes were cultivated in Tanegashima Research station, Kyushu-Okinawa Agricultural Research Center, NARO, Japan. We analyzed the constituents in pressed sugarcane juice for sugar content evaluation during the breeding program, by HPLC and so on. As a result of amino acid quantification, progeny populations from crossed same father and mother have various metabolic profiles as same as agronomic characteristics. We expect that this information will contribute effectively, to control the sugarcane juice quality and to improve the breeding selection.

sugarcane, amino acids, progeny population

発表責任者：石川千秋（ishikawac956@affrc.go.jp）

講演番号：3E7p06
講演日時：3 月 26 日 14:53～ 1 号館 E7 会場

NMR による清酒の安定同位体比分析
Stable Isotope Ratio Analysis of *Sake* by NMR
○水谷 廉、水内 らん、奥 亜祐美、宮下 昌樹、小椋 賢治（石川県大生物資源環境）
○Ren MIZUTANI, Ran MIZUUCHI, Ayumi OKU, Masaki MIYASHITA, Kenji OGURA (Ishikawa Prefectural Univ.)

生物中の安定同位体比は，生物種固有の生合成経路や生育環境を反映することが知られており，食品の原料や産地の判断材料として利用されている．本研究の目的は，NMR を用いて官能基特異的な水素安定同位体比(D/H)を測定し，清酒の原料と産地の判別に利用する方法を確立することである．

市販の清酒 59 種類を蒸留し，エタノールを精製した．400 MHz NMR 装置を用いてエタノールの D-NMR スペクトルを測定した．D-NMR スペクトルの信号強度より，エタノールのメチル基およびメチレン基それぞれの水素安定同位体比$(D/H)_{methyl}$および$(D/H)_{methylene}$を算出した．

清酒から精製したエタノールの$(D/H)_{methyl}$は製品ごとに差異が見られた．コメおよびサトウキビ醸造アルコールの$(D/H)_{methyl}$を指標として，純米酒と非純米酒を判別することができた．また，純米酒の$(D/H)_{methylene}$は醸造所所在地の緯度と弱い相関があった．

酵母の生合成経路において，エタノールのメチル基水素のうち半数はグルコースの C1,6 位水素由来であり，原料植物の水素安定同位体比を反映していると考えられる．また，メチレン基水素はピルビン酸からエタノールを生成する過程で付加されるものであり，醸造所の環境における水素安定同位体比を反映していると考えられる．

Stable isotope ratios in living organisms are known to reflect biosynthetic pathways and growth environments. Therefore, stable isotope ratio analysis is widely used for assessing the authenticity of food of origin. The purpose of this study is to measure functional group-specific hydrogen stable isotope ratios (D/H) using NMR spectroscopy and to use this method to apply the authenticity of origin of Japanese *sake*.

The D-NMR spectra of ethanol distilled from commercially available 59 *sake* samples were measured using a 400 MHz NMR spectrometer. The hydrogen stable isotope ratios $(D/H)_{methyl}$ and $(D/H)_{methylene}$ of ethanol was calculated from the signal intensities of the D-NMR spectra, respectively. The $(D/H)_{methyl}$ of *sake* could be used to distinguish *Junmai sake* from *non-Junmai sake*. The $(D/H)_{methylene}$ of *Junmai sake* was weakly correlated with the latitude of the brewery. These results can be explained by the biosynthetic pathway of the brewer's yeast.

NMR, *Sake*, Isotope

発表責任者：小椋賢治（k-ogura@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3E7p07
講演日時：3 月 26 日 15:04～ 1 号館 E7 会場

ピロカテコールのダンシル誘導体化による微量分析法の開発

Development of microanalysis method using dansyl derivatization of pyrocatechol

○横溝 永矢、中谷 祥恵、古旗 賢二（城西大院・薬・薬科）
○Eiya YOCOMIZO, Nakatani Sachie, Kenji Kobata (The Univ. of Josai)

コーヒーに含まれるピロカテコール (PC)の体内動態に関する詳細な報告は無い。我々は、コーヒーを摂取した際の PC の血中濃度が低く、定量が困難である事を予備的な実験で確認している。そこで本研究では微量の PC を定量する方法としてダンシル誘導体化（DNS 化）に着目した。今回、DNS 化した PC（DPC）の構造を決定し LC-ESI-MSMS (LC-MS)で定量限界を求めた。1 mM の PC 水溶液 250 mL と 13 mM のダンシルクロリド溶液 150 mL に 0.5 M 炭酸緩衝液 50 mL を入れ 60℃で 15 分間反応させ、液-液分配処理により淡横色の非結晶を 129 mg 得た。この非結晶について ESI-MS (MS)と NMR で構造解析を行った。また LC-MS で定量限界を求めた。生成物は MS による分子イオンピークから分子量は 576 と推定した。これは PC にダンシルクロリド 2 分子が結合したものに相当した。NMR では PC 構造由来とされる芳香族 C-H シグナルが 4 個分とダンシル構造由来の芳香族 C-H シグナルが 12 個分と N-メチル基由来の H シグナルが 12 個分見られた。以上の結果から生成物は PC の 2 個のフェノール性水酸基に対し 2 分子のダンシル基が結合していることが示された。この生成物（DPC）の収率は 90%であった。LC-MS において定量限界は PC が 100 ppb であったのに対し、DPC は 0.1 ppb であった為 PC の DNS 化により LC-MS による検出感度が 1000 倍に向上する事を確認した。この事から本法は血清中の PC を検出する方法として有力であると考えられたので、次に生体試料中の PC を DNS 化により測定する前処理条件を検討する。 There are no detailed reports on the pharmacokinetics of pyrocatechol (PC) contained in coffee. Preliminary experiments have confirmed that the blood concentration of PC when drinking coffee is low and difficult to quantify. We focused on dansyl derivatization (DNS derivatization) as a method to quantify trace amounts of PC. Here, we determined the structure of DNS-derivatized PC (DPC) and the limit of quantification using LC-ESI-MSMS (LC-MS). Add 50 mL of 0.5 M carbonate buffer to 250 mL of 1 mM PC aqueous solution and 150 mL of 13 mM dansyl chloride solution, react at 60℃ for 15 minutes, and obtain 129 mg of light yellow amorphous by liquid-liquid partitioning. . The chemical structure of this amorphous was analyzed using ESI-MS (MS) and NMR. Quantification limits were determined by LC-MS. The molecular weight of the product was estimated to be 576 from the molecular ion peak determined by MS. This corresponded to the desorption of two molecules of hydrogen chloride from one molecule of PC and two molecules of dansyl chloride. NMR showed 4 aromatic C-H signals derived from the PC structure, 12 aromatic C-H signals derived from the dansyl structure, and 12 H signals derived from the N-methyl group. Two molecules of dansyl groups were bonded to the two phenolic hydroxyl groups of PC.The yield of this product was 90%. The quantification limit of PC was 100 ppb, but the quantification limit of DPC was 0.1 ppb, and it was confirmed that detection sensitivity was improved by 1000 times by converting PC to DNS. Next, we will examine pretreatment conditions for measuring PC in biological samples by DNS conversion.

Coffee, Pyrocatecol, Dansyl derivatization

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：3E7p08
講演日時：3 月 26 日 15:15～ 1 号館 E7 会場

キシロース含有高配糖化ステビオールの探索と構造推定

Investigation and structural estimation of highly glycosylated steviol containing xylose

○渡辺 健宏[1]、藤川 紘樹[1]、浦井 聡一郎[2]、岩城 一考[3]、平井 正良[4]、宮川 克郎[4]、浦谷 宏[1]、山垣 亮[1]、長尾 浩二[3]、横尾 芳明[3]、島本 啓子[1] ([1]公益財団法人サントリー生命科学財団、[2]サントリー株式会社、[3]サントリー食品インターナショナル株式会社、[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社)

○Takehiro WATANABE[1], Kohki FUJIKAWA[1], Soichiro URAI[2], Kazunari IWAKI[3], Tadayoshi HIRAI[4], Katsuro MIYAGAWA[4], Hiroshi URATANI[1], Tohru YAMAGAKI[1], Koji NAGAO[3], Yoshiaki YOKOO[3], Keiko SHIMAMOTO[1] ([1]Suntory Foundation for Life Sciences, [2]Suntory Spirits Ltd., [3]Suntory Beverage & Food Ltd., [4]Suntory Global Innovation Center Ltd.)

Stevia rebaudiana の葉から得られるステビオール配糖体は、砂糖の 250 倍ほどの甘味を呈する天然の低カロリー甘味料であり食品産業で使用されている。その中でも、すべての糖がグルコース(Glc)残基からなる stevioside や rebaudioside A(Reb A)は含有量も多く、味質について研究がなされている。一方で、ラムノース(Rha)やキシロース(Xyl)残基を含む蓄積量が少ない成分の特性について、ステビア葉中にどのような糖鎖組成で蓄積されているかは明らかになっておらず、それらの味質も評価されていない。

本研究では、ステビア葉中から Rha または Xyl を含む微量な高配糖体化タイプを同定し、そしてそれらが個々にどのような味質を与えるかを検証するための探索および構造推定法を報告する。はじめに入手可能な標準試料の LC 分離の溶出傾向と MS/MS フラグメントパターン解析を実施する。次にステビア葉抽出物を LC-MS/MS に供し、18 種を検出し、5 種の未報告ステビオール配糖体の構造推定を行った。Rha を含むものは”dulcoside”、Xyl は”rebaudioside FX”シリーズと命名した。

Some steviol glycosides obtained from *Stevia rebaudiana* leaves exhibit sweetness that is nearly 250 times higher than that of sucrose and they are therefore utilized as a low-calorie sweetener in the food industry. Among them, the sweetness of major glycosides composed of glucose residues (e.g., stevioside and rebaudioside A) has been widely studied. However, the properties of minor natural products containing rhamnose (Rha) or xylose (Xyl) residues are poorly investigated.

In this study, we report investigation and structure estimation method to identify trace amounts of highly glycosylated steviol containing Rha or Xyl in stevia leaves and to verify what taste qualities they individually impart. First, elution trends of LC separations of available authentic samples and MS/MS fragment pattern analysis are performed. Next, stevia leaf extract was analyzed by LC-MS/MS. As a result, 18 peaks corresponding to steviol glycosides were obtained, and the structures of five new steviol glycosides were estimated, naming those containing Rha the "dulcoside" series and those containing Xyl the "rebaudioside FX" series.

Rhamnose or xylose-containing steviol glycosides, natural sweeteners, MS/MS fragmentation

発表責任者：渡辺 健宏（watanabe@sunbor.or.jp）

講演番号：3E7p09
講演日時：3 月 26 日 15:26～ 1 号館 E7 会場

キシロース含有高配糖化ステビオールの合成と甘味評価
Synthesis and sweetness evaluation of highly glycosylated steviol containing xylose
○藤川 紘樹[1]、渡辺 健宏[1]、浦井 聡一郎[2]、岩城 一考[3]、平井 正良[4]、宮川 克郎[4]、浦谷 宏[1]、山垣 亮[1]、長尾 浩二[3]、横尾 芳明[3]、島本 啓子[1] ([1]公益財団法人サントリー生命科学財団、[2]サントリー株式会社、[3]サントリー食品インターナショナル株式会社、[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社)
○Kohki FUJIKAWA[1], Takehiro WATANABE[1], Soichiro URAI[2], Kazunari IWAKI[3], Tadayoshi HIRAI[4], Katsuro MIYAGAWA[4], Hiroshi URATANI[1], Tohru YAMAGAKI[1], Koji NAGAO[3], Yoshiaki YOKOO[3], Keiko SHIMAMOTO[1] ([1]Suntory Foundation for Life Sciences, [2]Suntory Spirits Ltd., [3]Suntory Beverage & Food Ltd., [4]Suntory Global Innovation Center Ltd.)

ステビオール配糖体は、天然甘味料として食品産業で使用されている。全ての糖残基がグルコース(Glc)からなる rebaudioside A (Reb A)などのメジャー成分に対して、ラムノース (Rha)やキシロース(Xyl)を含むマイナー成分の特性についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、Rha や Xyl を含む極微量で高度にグリコシル化されたステビオールの特性を明らかにするために、質量分析を用いて検出、構造推定された Rha または Xyl を含む 5 種のステビオール配糖体の合成を行い、構造決定と甘味評価を実施した。ステビオール配糖体の合成では、簡便かつ実践的な合成を目的に、半合成戦略を採用した。天然物から誘導したステビオール配糖体の 19 位のカルボキシ基と化学合成した糖ヘミアセタール体を光延反応で縮合したところ、良好な収率かつ高いβ選択性で反応が進行する事が明らかとなった。合成標品とステビア葉抽出物の LC-MS/MS データの照合を行い 5 種類の新規ステビオール配糖体を同定する事ができた。甘味評価の結果、Xyl を含む Reb FX1 がバランスの良い甘味を示す事が明らかとなり、天然甘味料の候補として有望である事が分かった。

Steviol glycosides are used in the food industry as natural sweeteners. In contrast to major components such as rebaudioside A (Reb A), in which all sugar residues are composed of glucose (Glc), the properties of minor components including rhamnose (Rha) or xylose (Xyl) are slightly known. In this study, to characterize the properties of very small amounts of highly glycosylated steviol containing Rha or Xyl, five steviol glycosides containing Rha or Xyl, which were detected and structurally estimated by mass spectrometry analysis were synthesized and conducted structural determination and sweetness evaluation. In the synthesis of steviol glycosides, a semi-synthetic strategy was employed for a facile and practical synthesis. The condensation at the C19 carboxy group of steviol glycoside derived from natural product and the chemically synthesized glycan hemiacetal by using Mitsunobu reaction showed good yield and high β selectivity. Five novel steviol glycosides were identified by comparing the LC-MS/MS data of the synthetic samples with those of stevia leaf extract. Sweetness evaluation revealed that Reb FX1, which contains Xyl, exhibits well-balanced sweetness and is a promising candidate for a natural sweetener.

steviol glycoside, semi-synthesis, sweetness-evaluation

発表責任者：藤川紘樹（fujikawa@sunbor.or.jp）

講演番号：3E7p10
講演日時：3 月 26 日 15:37～ 1 号館 E7 会場

藻類からのフコキサンチンの効率的抽出法の検討
Efficient extraction of fucoxanthin from algae
○鵜沼 心吾、広川 安孝、細谷 孝博（東洋大院食環境）
○SHINGO UNUMA, YASUTAKA HIROKAWA, TAKAHIRO HOSOYA (Toyo Univ.)

フコキサンチン（Fx）は藻類に含まれるキサントフィル類に属するカロテノイドの一種であり、抗酸化や抗肥満、抗がん作用など数多くの生理活性が報告されている。これらの生理活性を食品に応用するために、Fx 含有率や増殖特性に優れた藻類を培養し、藻体からの抽出方法および抽出物の評価を行った。藻体から Fx を簡易的に抽出する方法を検討したところ、緑色のクロロフィルも一緒に抽出されてしまった。そこで、アルカリ処理によりクロロフィルを水溶化させ、藻体を水洗することでクロロフィルを除去する手法を検討した。藻体を様々な濃度の水酸化カリウム（KOH）で処理し、それぞれの反応時間での藻体の色を吸光度で、また Fx の分解を TLC にて確認したところ、0.1 mol/L KOH で 3 日間処理することで、クロロフィルを除去し、Fx も分解せずに藻体に留めることができた。また、追加で 1 日間同条件で処理することで、藻体中の Fx を濃縮することができた。次に、機能性評価として、未処理（試料 A）、3 日間処理（試料 B）、追加で 1 日間処理したもの（試料 C）のエタノール抽出物について、SOAC 法を用いて一重項酸素消去活性を調べたところ、試料 C で高い一重項酸素消去活性を示した。

Fuxanthin (Fx) is a type of carotenoid found in algae and belonging to the xanthophyll group. It has been reported to exhibit numerous physiological activities such as antioxidant, anti-obesity, and anticancer effects. To apply these physiological activities for food, we cultivated algae with higher Fx content and superior growth property. Extraction method from algae and properties of extract were examined.To utilize this type of algae as a food, we examined a simple method for extracting Fx from algae and found that green chlorophyll was extracted with it. Therefore, we developed a method to remove the chlorophyll by washing algae bodies in water after chlorophyll was made water soluble through alkali treatment. The algae were treated with various concentrations of potassium hydroxide (KOH), the color of the algae at each reaction time was checked by absorbance spectroscopy, and the degradation of Fx was checked by TLC. Chlorophyll was removed from the algae after 3 d treatment with 0.1 mol/L KOH, and Fx was retained in the algae without decomposition. An additional 1 d treatment with 0.1 mol/L KOH concentrated Fx in the algae was applied. Next, to evaluate the functionality, we examined the singlet oxygen scavenging activity of ethanol extracts of untreated algae, algae treated for 3 d, and algae treated for 1 d using the SOAC method and found that Algae treated for 1 d demonstrated higher singlet oxygen scavenging activity.

Fucoxanthin, Algae, Singlet oxygen

講演番号：3E7p11
講演日時：3 月 26 日 15:56～ 1 号館 E7 会場

静岡県内の 6 茶工場から回収した製茶副産物の呈味・機能性成分の特性評価
Characteristic evaluation of taste and functional components of tea byproducts collected from six tea factories in Shizuoka Prefecture

○豊泉 友康[1]、藤井 拓[1]、三宅 健司[1]、九島 祥弘[2]、小林 利彰[1]、大場 聖司[1]、小林 栄人[1]([1]静岡県茶研、[2]ChaOI フォーラム事務局)
○ Tomoyasu TOYOIZUMI[1], Taku FUJII[1], Kenji MIYAKE[1], Yoshihiro KUSHIMA[2], Toshiaki KOBAYASHI[1], Seiji OHBA[1], Eiji KOBAYASHI[1] ([1]Tea Res. Center, [2]ChaOI)

【目的】茶渋は、製茶時に機械の内側に付着する茶葉由来の固形物である。この多くが廃棄されているため、生産者から有効活用が望まれている。本研究は、茶渋の食品素材としての有用性解明を目指し、6 茶工場から回収した 8 種類の茶渋を用いて、茶の呈味に関わるアミノ酸類の含量、多彩な健康増進効果を有すカテキン類・没食子酸（GA）の含量と抗酸化能（H-ORAC・DPPH）の特性を評価した。
【結果】6 茶工場由来の茶渋のテアニン・アルギニン等のアミノ酸類の含量は、総じて文献に記載された上級煎茶の値（以後、文献値）と同等以上であった。また、遊離型カテキン類・GA は、文献値より多く、特に GA 含量は工場によっては約 5 から 7 倍多かった。一方、4 種のエステル型カテキンの含量は、文献値より少なかった。H-ORAC 値は、茶工場によっては煎茶の文献値と同等であった。また、H-ORAC 値は 4 種の遊離型カテキン含量との間に有意な正の相関が認められた。一方、DPPH 値はいずれも文献値と同等以上であった。

Tea incrustation (TI) is a solid substance derived from tea leaves that adheres to the inside of tea processing machines during tea manufacturing. Much of this TI is discarded, thus tea farmers hope to make effective use of it. This study aims to elucidate the usefulness of TI as a food material, and evaluated the characteristics of amino acids content, catechins/gallic acid (GA) contents, and antioxidant capacity using eight types TIs collected from six tea factories.

The content of amino acids such as theanine and arginine in the TIs derived from the six tea factories was generally equal to or higher than the values for high-grade sencha described in the literature (literature value). In addition, free catechins and GA were higher than the literature values, and in particular, the GA content was about 5 to 7 times higher depending on the factory. On the other hand, the content of four types of ester type catechins was lower than the literature value. H-ORAC values were comparable to literature values for sencha in some tea factories. Furthermore, a significant positive correlation was observed between the H-ORAC value and the content of four types of free catechins. On the other hand, all DPPH values were equal to or higher than the literature values.

Tea byproduct, Amino acids, Catechins

発表責任者：豊泉友康（tomoyasu1_toyoizumi@pref.shizuoka.lg.jp）

講演番号：3E7p12
講演日時：3 月 26 日 16:07～ 1 号館 E7 会場

乳酸菌を用いた新規微生物発酵茶の解析

Analysis of novel post-fermented tea using Lactobacillus

○志村 大輝[1]、山澤 倫子[2]、柴田 貴子[3]、高橋 淳[3]、椎葉 究[1]、安部 智子[1]([1]東京電機大院・理工、[2]東京電機大・理工、[3]埼玉県茶業研究所)
○Daiki SHIMURA[1], Rinko YAMAZAWA[2], Takako SHIBATA[3], Atsushi TAKAHASHI[3], Kiwamu SHIIBA[1], Tomoko ABE[1] ([1]Grad. Sch. of Science and Engineering, Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki Univ., [3]Saitama Tea Research Institute)

6 月以降に収穫する二・三番茶は苦み渋みが強く、商品価値が低いために加工されずに廃棄されることがある。我々は二・三番茶の商品価値の向上を目的に微生物を用いた発酵させたお茶（後発酵茶）の開発を行ってきた。後発酵により、新規の機能性成分や独特な風味が生じることが報告されており、後発酵茶は特徴的な風味をもつ健康飲料として今後広く普及する可能性がある。本研究では、発酵の際にタケの葉を茶葉に混ぜ合わせて用いる方法も検討した。タケには高い抗酸化活性などの機能性が報告されており、新たな風味や機能性をもつ後発酵茶の開発が期待される。

チャの葉およびタケの葉の後発酵には、これまで当研究室で発酵食品中から単離、選抜したいくつかの乳酸菌を用いた。後発酵の際には、葉のまま固体発酵させる方法と、葉から抽出した抽出液を液体発酵させる方法を検討した。発酵開始から経時的に発酵液を採取して菌数や pH 等を測定した。菌数の増加、pH の低下が確認された試料においては、発酵液の成分分析および官能評価を実施した。成分分析では、茶発酵液中の全糖量が後発酵過程で減少したことが確認された。さらに、カテキン類などの茶の主要な成分の減少も確認された。官能評価では後発酵過程が茶に独特な風味を与えたことが確認された。

The 2nd and 3rd crop of teas are sometimes discarded unprocessed due to their low commercial value. Post-fermented tea is produced by fermenting tea leaves with microorganisms after the enzymes in the leaves have been inactivated. The product has the potential to become widely used as a health drink with a unique flavor. In this study, the use of bamboo leaves mixed with tea leaves were examined. Bamboo has been reported to have high antioxidant activity and other functional properties.

In order to develop a method for stable production of a new post-fermented tea, lactic acid bacteria isolated from fermented foods were used, and the fermentation conditions were examined. From these, some lactic acid bacteria suitable for post-fermentation were selected. Two methods, tea-bamboo leaf (solid) fermentation and tea-bamboo leaf extract (liquid) fermentation, were tested for post-fermentation. In the post-fermentation process, an increase in the number of lactic acid bacteria cells and a decrease in pH were confirmed. Component analysis showed that the total sugar content and catechins in the tea leaf decreas.

post-fermented tea, Bamboo, Lactobacillus

発表責任者：安部智子（t_abe@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3E7p13
講演日時：3 月 26 日 16:18～ 1 号館 E7 会場

UF 法による焙煎大麦食品（麦茶）のキサンチンオキシダーゼ阻害物質の探索

Search for xanthine oxidase inhibitors in roasted barley food (Mugicha) by UF method

○谷口 明日香、大久保 花梨、増田 晃子、亀田 和美、増田 俊哉（大阪公立大院生活科学）
○Asuka TANIGUCHI, Karin OKUBO, Akiko MASUDA, Kazumi KAMEDA, Toshiya MASUDA (Osaka Metropolitan Univ)

食品の調理加工操作において加熱は最も基本的なものである。中でも焙煎といわれる，200℃前後の高温加熱では熱に安定とされる食材成分においてもその化学構造を変化させる。このような焙煎による構造変換によって生じた機能性物質は，焙煎食品の有する機能性を特徴づけ，かつヒトが実際に食する食品の成分として重要である。キサンチンオキシダーゼ（XO）は，過剰に働くと痛風の原因となる尿酸を蓄積するとともに，活性酸素も発生し，各種疾病の発現に関わるとされている。我々は，これまでの研究で，焙煎大麦食品に強力な XO 阻害能を確認し，そのうち麦茶から強い XO 阻害物質としてピロガロールを同定した[1)]。その一方，ピロガロールが検出されなかった麦茶画分にも XO 阻害能を確認した。この画分は，HPLC 分析では明確なピークを示さない焙煎食品特有の複雑な混合物分画であり，通常の精製単離法では困難が予想された。ところで，最近，酵素に親和性のある物質のみを限外濾過ユニットを用いて選択的に検出する方法が報告されている（UF 法）。今回，この方法で，上記分画から XO 阻害物質の選択的検出を試みた。UF 法には，まだ確立された操作法がないため，XO 阻害活性を有するフラボノイドを用いて最適条件を検討した。確立した条件を用いて，新たに麦茶から調製したピロガロールを含まない XO 阻害活性画分に UF 法を適用した。その結果，330 nm に極大吸収を有する 1 つのピークを検出できた。現在，このピークを示す物質の特定を検討している。

1) Taniguchi, A. et al., *Food Sci. Technol. Res.* **29**（2023）in press.

Roasting, a food processing method using high-temperature processing at around 200°C, alters the chemical structures of even thermally stable food components. We previously discovered pyrogallol as a potent XO inhibitor in roasted barley tea; xanthine oxidase (XO) is an enzyme that produces uric acid and reactive oxygen species, which cause gout and life-style related diseases. Further studies revealed that XO inhibitory activity was also present in the other barley tea fraction, which does not contain pyrogallol and is composed of complex components unique to roasted foods. Therefore, we attempted to adapt the ultrafiltration (UF) method to selectively detect only substances with enzyme affinity. As a result, we detected an HPLC peak of the substance adsorbed on XO. We are currently identifying the substance as another potent XO inhibitor in barley tea.

roasted barley food, anti-gout, xanthine oxidase inhibitor

講演番号：3E7p14
講演日時：3 月 26 日 16:29～ 1 号館 E7 会場

大麦穀粒へのパーリング(精麦)処理が麦芽やビールの品質に及ぼす影響

Effect of pearling process in barley grains on malt and beer quality

○木原 誠、時園 佳朗、丸海老 純也、佐藤 千鶴、七森 理仁、保木 健宏（サッポロビール）
○ Makoto KIHARA, Yoshiro Tokizono, Junya Maruebi, Chizuru Sato, Masahito Nanamori, Takehiro Hoki (SAPPORO BREWERIES LTD.)

麦芽の製造（製麦）は、主に浸麦、発芽、焙燥の 3 つの工程からなる。これらの工程では、水やエネルギーが消費されるため、各工程の短縮は、製麦時の環境負荷軽減につながることが期待される。2023 年度の本大会で、大麦穀粒をパーリング（精麦）処理した後、浸麦することにより、浸麦工程を短縮できる可能性や、ラボスケールでの麦芽製造、醸造試験による製麦特性や醸造特性を報告した。今回は、100L スケールの醸造試験により、より詳細な醸造特性の評価を行った。原料には、サッポロビール社が北海道向けに開発した LOX レス品種「札育 2 号」を用いた。前回の報告と同様に、精麦処理により、目標の浸麦度に達するまでの浸麦時間を短縮することができた。精麦処理後に製造された麦芽を 50%配合し、醸造試験を行った結果、精麦処理の有無で、仕込工程や発酵工程に大きな差は見られなかった。製品を分析した結果、一部の成分は、精麦処理により変化するが、官能評価では、精麦処理の有無で大きな差は認められなかった。以上の結果から、精麦処理により浸麦工程を短縮して製造された麦芽を、ビールの原料として使用できる可能性が示唆された。

Malting consists of three main processes: steeping, germination and kilning. These processes consume water and energy. Therefore, shortening each process is expected to reduce the environmental impact of malting. In 2023, we reported on the possibility of shortening the steeping process by pearling barley grains, and the malting and brewing characteristics were also reported through laboratory-scale malting and brewing trial. In this presentation, more detailed evaluation of brewing characteristics was conducted using a 100L-scale brewing trial. The material used was the LOX-less variety “Satuiku 2 go" developed by Sapporo Breweries, Ltd. for Hokkaido area. As in the previous report, pearling treatment reduced the steeping time to reach the target steep-out moisture. Brewing trial was conducted with 50% malt produced after the pearling process, and the results showed no significant differences in the brewing or fermentation processes with or without the pearling process. Analysis of the product showed that specific component was changed by the pearling process, but sensory evaluation showed no significant differences between the products with and without pearling treatment. These results suggest that malt produced by pearling to shorten the steeping process could be used as a raw material.

pearling, malt quality, beer quality

発表責任者：木原　誠（makoto.kihara@sapporobeer.co.jp）

講演番号：4B2a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 B2 会場

ラクトスタチン（IIAEK）による腸アルカリ性ホスファターゼを介した コレステロール吸収調節系の分子機構解析

Molecular mechanistic analysis of intestinal alkaline phosphatase mediated regulation of cholesterol absorption by lactostatin(IIAEK).

○小田 夏暉[1]、竹内 朝陽[1]、海老原 章郎[3]、本多 裕之[2]、長岡 利[1] ([1]岐阜大応生食品分子機能学、[2]名古屋大工生命分子、[3]岐阜大応生生体分子機能学)
○Natsuki ODA[1], Asahi TAKEUCHI[1], Akio EBIHARA[3], Hiroyuki HONDA[2], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu Univ. Applied Life Science Molecular Function of Food, [2]Nagoya Univ. Eng. Biomolecular Engineering, [3]Gifu Univ. Applied Life Science Biomolecular Chemistry)

コレステロール(CHOL)低減化ペンタペプチド IIAEK は、腸アルカリ性ホスファターゼ（IAP）を標的とすることで CHOL 代謝を改善する（1）。しかし、IIAEK-IAP 間の相互作用に関する詳細な分子メカニズムは不明である。そこで、表面プラズモン共鳴(SPR)や Discovery Studio Client を用いて IIAEK-IAP 間の相互作用解析を実施した。興味深いことに、IIAEK は、IAP の生体内基質として知られるピリドキサールリン酸（PLP）よりも 3 倍強くヒト IAP と相互作用した。また、IIAEK-ヒト IAP の相互作用は PLP 濃度依存的に競合阻害された。さらに、IIAEK アラニン変異体では、IIAEK で見られたヒト IAP との相互作用は消失した。Discovery Studio Client を用いた分子ドッキングシミュレーションより、PLP と比較して IIAEK は IAP の基質結合部位と安定して相互作用した（Fig.1）。以上より、CHOL 低減化ペンタペプチド IIAEK は、IAP の基質結合部位と特異的に相互作用することが示唆された。

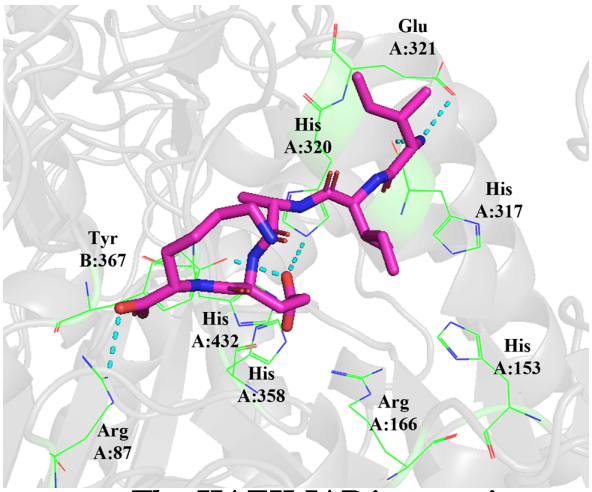


Fig.1 The IIAEK-IAP interaction

IIAEK, a cholesterol-lowering pentapeptide, targets intestinal alkaline phosphatase (IAP) to improve cholesterol metabolism (1). However, the detailed molecular mechanism of the IIAEK-IAP interaction remains unknown. Here we found that the direct interaction between IIAEK and human IAP was about 3 times stronger than the interaction between pyridoxal phosphate (PLP; the natural substrate of IAP) and human IAP. Moreover, PLP was competitive with the interaction of IIAEK and IAP in a concentration-dependent manner. Further, IIAEK alanine substitutes showed markedly less interaction with IAP compared to IIAEK. molecular docking study using Discovery Studio Client showed that IIAEK interacted more stably with the substrate binding site of IAP compared to PLP, supporting the SPR results (Fig.1). In conclusion, we suggested that IIAEK, a cholesterol-lowering pentapeptide, interacted specifically with the substrate binding site of IAP.

（1）Takeuchi, A. *et al. Nutrients* 12, 2859 (2020)

peptide, IIAEK, intestinal alkaline phosphatase

発表責任者：長岡　利（nagaoka.satoshi.d8@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B2a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 B2 会場

脂質代謝改善ペンタペプチド IIAEK が誘導するコレステロール吸収抑制には、腸アルカリ性ホスファターゼとの相互作用が必須である

Cholesterol-lowering pentapeptide IIAEK interacts with intestinal alkaline phosphatases to ameliorate cholesterol metabolism in mice

○竹内 朝陽[1]、小田 夏暉[1]、久松 賢太郎[1]、奥村 菜月[1]、杉光 祐紀[1]、葉 宇陽[1]、高田 敬梧[1]、森崚輔[1]、會田 拓巳[1]、柳瀬 笑子[2]、上野 義仁[2]、長岡 利[1] ([1]岐阜大応生食品分子機能学、[2]岐阜大応生生物有機化学)

○ Asahi TAKEUCHI[1], Natsuki ODA[1], Kentaro HISAMATSU[1], Natsuki OKUMURA[1], Yuki SUGIMITSU[1], Yuyang YE[1], Keigo TAKADA[1], Ryosuke MORI[1], Takumi AIDA[1], Emiko YANASE[2], Yoshihito UENO[2], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu Univ. Applied Life Science Molecular Function of Food, [2]Gifu Univ. Applied Life Science Bio-organic Chemistry)

牛乳乳清 β-ラクトグロブリンより新規血清コレステロール（CHOL）低減化ペプチドとしてラクトスタチン（IIAEK）を発見した。これまでに IIAEK を含む食品タンパク質由来オリゴペプチドの腸受容体は未発見である。そこで、小腸で IIAEK と相互作用する標的分子を同定するために、光親和性標識した IIAEK を蛍光物質導入により可視化する新規分子プローブ IIXEK を化学合成した。ラット腸粘膜及び Caco-2 細胞の脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験と MS 分析により、IIAEK と相互作用する標的分子として腸アルカリ性ホスファターゼ（IAP）を同定し、IAP の IIAEK 共通結合配列として GFYLFVEGGR を特定した（1）。興味深いことに、8 時間培養 Caco-2 細胞への IAP siRNA 導入により、IIAEK が誘導する CHOL 代謝改善遺伝子 ABCA1 の mRNA レベルの有意な低下は消失した。驚くべきことに、*Akp3* KO マウスでは、野生型マウスで IIAEK が誘導する血清や肝臓 CHOL の低下、糞中ステロイド排泄量の亢進、CHOL 吸収抑制作用は全て消失し、IIAEK が誘導する CHOL 吸収抑制には、IAP との相互作用が必須であることが明らかになった。以上より、IAP は従来から知られている脱リン酸化酵素としての酵素的機能の他に、IIAEK の受容体として CHOL 代謝に直接関与することを世界に先駆けて発見した。

IIAEK (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys, lactostatin) is a novel cholesterol-lowering pentapeptide from bovine milk β-lactoglobulin. To date, receptors for oligopeptides derived from food proteins, including IIAEK, have not yet been discovered. Therefore, we chemically synthesized a novel molecular probe, IIXEK, which can visualize a complex of target proteins interacting with photoaffinity-labeled IIAEK by fluorescent substances. Through photoaffinity labeling and MS analysis with IIXEK for the rat small intestinal mucosa and intestinal lipid raft fractions of Caco-2 cells, we identified intestinal alkaline phosphatase (IAP) as a specific molecule interacting with IIAEK and discovered the common IIAEK-binding amino acid sequence, GFYLFVEGGR (1). Interestingly, Transfection with IAP siRNA counteracted the IIAEK-induced decrease in ABCA1 mRNA levels in Caco-2 cells. Surprisingly, IIAEK-induced amelioration of cholesterol metabolism via suppression of intestinal cholesterol absorption disappeared in IAP knockout (*Akp3* KO) mice. In conclusion, we found for the first time in the world that IAP served not only as an enzyme (phosphatase) but also as a GPI-anchored specific receptor for an oligopeptide (IIAEK).

（1）Takeuchi, A. *et al. Nutrients* 12, 2859 (2020)

IIAEK, intestinal alkaline phosphatase, mouse

講演番号：4B2a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 B2 会場

肥満、高コレステロール血症、非アルコール性脂肪肝を改善する 新規プロタミン由来トリペプチド RPR（Arg-Pro-Arg）の発見
Discovery of a novel protamine-derived tripeptide RPR (Arg-Pro-Arg) that improves obesity, hypercholesterolemia, and non-alcoholic fatty liver.
○松葉 翔也[1]、森 崚輔[1]、MIJITI Maihemuthi[1]、中南 健太郎[2,3]、藤田 美華[2,3]、須藤 慶太[2,3]、長岡 利[1] ([1]岐阜大応生食品分子機能学、[2]フォーデイズ（株）、[3]東京農工大 農学)
○Shoya MATSUBA[1], Ryosuke MORI[1], Maihemuthi MIJITI[1], Kentaro NAKAMINAMI[2,3], Mika FUJITA[2,3], Keita SUDO[2,3], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu Univ. Applied Life Science, [2]Fordays Co., Ltd, [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

近年、体内に脂質が蓄積して生じる動脈硬化により誘発される疾患は世界の死因の第一位であり、全体の約 27%を占めている。そのため、脂質代謝を改善することは病気の予防や改善に重要である。我々は抗肥満・コレステロール低下作用を有するトリペプチド RPR を動物実験で発見した。また、非アルコール性脂肪肝モデルである HepG2 細胞では、RPR がトリグリセリド蓄積抑制効果を示すことを明らかにした。脂質負荷 HepG2 細胞において RPR 添加により、脂質代謝関連転写因子 SREBP1 及び脂質合成遺伝子 SCD1 の mRNA レベルは対照群及び OA（オレイン酸）群と比較して、RPR 及び OA+RPR 群で有意に減少、又は減少傾向を示した。SCD1、SREBP1 のタンパク質レベルは RPR 添加により、有意に低下した。また、ペプチド輸送担体（PepT1） siRNA 処理により、RPR の影響は消失した。以上より、我々は RPR がヒト肝臓細胞において、PepT1 を介して、脂質合成系である SREBP1-SCD1 の下方制御により、トリグリセリド蓄積（脂肪肝）を抑制していることを発見した。

In recent years, diseases induced by atherosclerosis, which is caused by the accumulation of lipids in the body, have become the leading cause of death in the world, accounting for about 27% of all deaths. Therefore, improving lipid metabolism is important for disease prevention and improvement. We have discovered the tripeptide RPR, which has anti-obesity and cholesterol-lowering effects, in animal experiments. We also found that RPR inhibited triglyceride accumulation in HepG2 cells, a non-alcoholic fatty liver model. In lipid-loaded HepG2 cells, the mRNA levels of lipid metabolism-related transcription factor SREBP1 and lipid synthesis gene SCD1 were significantly decreased or showed a decreasing trend in RPR and OA+RPR groups compared to control and OA (oleic acid) groups. mRNA levels of SCD1 and SREBP1 protein levels were significantly decreased by the addition of RPR. The effect of RPR was abolished by peptide transport carrier (PepT1) siRNA treatment. In conclusion, we found that RPR suppresses triglyceride accumulation (fatty liver) in human hepatocytes by downregulating the lipid synthesis system, SREBP1-SCD1, through PepT1.

peptide, RPR, HepG2

発表責任者：長岡　利（nagaoka.satoshi.d8@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B2a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 B2 会場

新規脂質代謝改善ジペプチド Phe-Pro（FP）の作用機構解析
Analysis of the mechanism of action of Phe-Pro (FP), a novel dipeptide that improves lipid metabolism
○西野 七海[1]、山本 真子[1]、小田 夏暉[1]、兪 蘭花[1]、坂野 新太[1]、海老原 章郎[2]、長岡 利[1]([1]岐阜大応生食品分子機能学、[2]岐阜大応生生体分子機能学)
○Nanami NISHINO[1], Mako YAMAMOTO[1], Natsuki ODA[1], RanHwa YU[1], Arata BANNO[1], Akio EBIHARA[2], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu Univ. Applied Life Science Molecular Function of Food, [2]Gifu Univ. Applied Life Science Biomolecular Chemistry)

当研究室では 400 種類のジペプチドにおいて、Phe-Pro（FP）が動物実験と細胞実験の両方でコレステロール（CHOL）代謝を改善することを初めて発見した。先行研究より門脈血漿中から定量された濃度で、脂質蓄積モデル HepG2 細胞に FP を添加したところ、細胞内 CHOL は減少し、CYP7A1 と PPARαの mRNA 発現量は増加した。本研究では PPARα阻害剤を用いることで、FP の細胞内 CHOL 低下作用が消失することを明らかにした。更にタンパク質構造予測プログラムの AlphaFold2_advanced を用いることにより、FP はヒト PPARαリガンド結合ドメイン（hPPARα-LBD）と直接結合することが示唆された。また FP の構成アミノ酸である F+P、FP のアミノ酸残基をそれぞれアラニン置換した Phe-Ala（FA）、Ala-Pro（AP）の添加により、FA が細胞内 CHOL を低下させることを明らかにした。更に AlphaFold2_advanced により、FA は hPPARα-LBD と直接結合することが示唆された。hPPARα-LBD と結合するジペプチドの構造的特徴を調べるために、400 種類のジペプチドの複合体形成予測を行った。その結果、131 種類のジペプチドが直接結合することが示唆された。以上より生理的血中濃度の FP が HepG2 細胞において、CHOL 蓄積を改善することを初めて発見した。
Our laboratory was the first to discover that Phe-Pro (FP) improves cholesterol metabolism in 400 dipeptides in both animal and cellular experiments. Addition of FP to lipid-accumulating model HepG2 cells at concentrations quantified from portal plasma from a previous study decreased intracellular CHOL and increased mRNA expression of CYP7A1 and PPARα. In the present study, we found that the PPARα inhibitor abolished the intracellular cholesterol lowering effect of FP. Furthermore, by using the protein structure prediction program AlphaFold2_advanced, it was suggested that FP binds directly to the hPPARα-LBD. We also found that the addition of FA and AP, which are alanine substituted amino acid residues of F+P and FP, respectively, decreases intracellular cholesterol. Furthermore, AlphaFold2_advanced showed that FA directly binded to hPPARα-LBD. To investigate the structural characteristics of dipeptides that bind to hPPARα-LBD, we predicted the complex formation of 400 dipeptides. The results suggest that 131 dipeptides bind directly to hPPARα-LBD. In conclusion, we found for the first time that physiological blood levels of FP improved cholesterol accumulation in HepG2 cells.

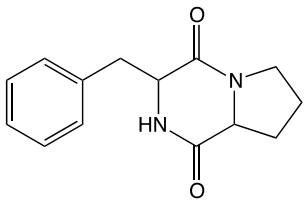
peptide, FP, HepG2

発表責任者：長岡利（nagaoka.satoshi.d8@f.gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B2a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 B2 会場

麦茶に含まれる PPARγ活性化物質の探索
Development of PPARγ activators contained in roasted barley extract
○松浦 信康[1]、長島 陽生[2]、張 智偉[3]、五十嵐 康弘[3]、社本 基宏[4]、松浦 浩一[4] ([1]岡山理大生命科学、[2]岡山理大理、[3]富山県大、[4]福玉米粒麦（株））
○Nobuyasu MATSUURA[1], Yousei NAGASHIMA[2], Chiei CHOU[3], Yasuhiro IGARASHI[3], Motohiro SHAMOTO[4], Kouichi MATSUURA[4] ([1]Okayama Univ. of Sci., Biosci., [2]Okayama Univ. of Sci. Sci., [3]Toyama Pref. Univ., [4]Fukutama Co.)

生活習慣病予防及び治療薬開発を目的として、repoter gene assay 法を用いて天然食資源より核内受容体 PPARγ活性化資源の探索を行い、麦茶抽出エキスに活性を見出した。そこで各種クロマトグラフィーを用いて活性物質の単離精製を行った後、各種機器スペクトルデータを用いて構造解析を行ったところ、diketopiperazine 骨格を有する cyclo (Pro-Phe)であることが明らかとなった。これまで麦茶には cyclo (L-Pro-D-Phe)の存在が報告されていること、また麦茶に含まれるアミノ酸のほとんどは L 体であることから、今回精製された cyclo (Pro-Phe)は、L-Pro-L-Phe、L-Pro-D-Phe、D-Pro-L-Phe、D-Pro-D-Phe の 4 種から構成されていると推定された。そこで塩酸加水分解後、アミノ酸ラベル化法を用いて L, D 体含量比について検討を行った結果、Proline (L : D = 7 : 3), Phenlyalanine (L : D = 5 : 1)であることが明らかとなった。そこで現在、4 種の化合物を合成し、それらの PPARγアゴニスト活性評価を行っている。発表ではこれらについても報告を行う予定である。



cyclo (Pro-Phe)

With the aim of developing lifestyle-related disease prevention and treatment remedy, we searched for nuclear receptor PPARγ activation resources from natural food resources using the reporter gene assay method, and found activity in roasted barley extract. After isolation and purification of the active compound using various types of chromatography, structural analysis was performed using spectrum data from NMR and MS spectrum, and it was revealed that it was cyclo (Pro-Phe) with a diketopiperazine skeleton. Since the presence of cyclo (L-Pro-D-Phe) has been reported in barley tea and most of the amino acids contained in barley tea are in the L form, the purified cyclo (Pro-Phe) was estimated to be composed of four types: L-Pro-L-Phe, L-Pro-D-Phe, D-Pro-L-Phe, and D-Pro-D-Phe. Therefore, after hydrochloric acid hydrolysis, we investigated the L and D content ratio using amino acid labeling method and found that they were Proline (L : D = 7 : 3) and Phenlyalanine (L : D = 5 : 1). Currently, we have synthesized four types of compounds and are evaluating their PPARγ agonist activity.

roasted barley, PPARgamma, diketopiperazine

発表責任者：松浦信康（nobuyasu@ous.ac.jp）

講演番号：4B2a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 B2 会場

SREBP 活性抑制能を指標とした抗肥満作用を有するブロッコリー品種の選別
Selection of broccoli varieties with anti-obesity activity based on their ability to inhibit SREBP activity.

○増尾 翼[1]、二瓶 遥[1]、藤巻 貴宏[2]、島田 康彦[3]、鈴木 司[2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]([1]東農大院・応生科、[2]東農大・応生科・農化、[3]株式会社サカタのタネ)
○Tsubasa MASUO[1], Haruka NIHEI[1], Takahiro FUJIMAKI[2], Yasuhiko SHIMADA[3], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]SAKATA SEED CORPORATION)

【背景・目的】ブロッコリー由来のスルフォラファン（SFaN）は Nrf2 活性化を介して生体防御作用を高めることが知られており、抗がん作用や抗炎症作用を示すことが報告されている。我々はこれまでに SFaN が脂質代謝を包括的に制御する転写因子 SREBP の活性を抑制すること、および高脂肪食摂取による体重増加を低減することを明らかにしてきた。本研究ではブロッコリーに着目し、SREBP 活性を指標として、その抑制能の強いブロッコリーの品種や部位を選別することを目的とした。
【方法】株式会社サカタのタネのブロッコリー国内外 29 品種（品種番号 1-29）を花蕾、花茎、葉の 3 部位に分けた 87 検体を検討に用いた。FAS のプロモーター領域を導入したルシフェラーゼ安定発現 Huh-7 細胞株（Huh-7/FAS-Luc 細胞）を使用してこれら 87 検体の SREBP 活性を評価し、SREBP 活性の抑制能の強い品種や部位の選別を行なった。次に、肥満モデルマウスを用いて長期摂食実験を行い、選別した品種が抗肥満効果を発揮するかどうかを検討した。
【結果】ブロッコリーの部位ごとで SREBP 活性の抑制能は異なり、その強さは花茎、花蕾、葉の順であった。活性の抑制能を指標とした順位づけを行った結果、花茎と花蕾でともに強い抑制能を示した品種「9」「13」の花茎・花蕾を選別した。また、動物試験において、品種「13」は有意な差はないものの体重の減少傾向が見られ、加えて肝臓での FAS を含む SREBP 標的遺伝子の発現量を低下させることが示された。

We have shown that SFaN from broccoli suppresses the activity of SREBP, a transcription factor that comprehensively regulates lipid metabolism, and prevents weight gain induced by a high-fat diet. In this study, 29 broccoli varieties (variety numbers 1-29) were divided into three parts: flower buds, flower stems, and leaves, and the broccoli varieties and parts with strong suppression of SREBP activity were selected using a luciferase assay. The anti-obesity effect of dietary SFaN was examined using obese model mice.
Varieties "9" and "13" were selected as having the strongest suppression of SREBP activity. In animal experiments, variety "13" showed a weight loss tendency and decreased expression of SREBP target genes in the liver.

SREBP, Broccoli, Anti-obesity

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：4B2a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 B2 会場

SREBP 活性を抑制する化合物のブロッコリー抽出物からの探索
Exploring compounds that inhibit SREBP activity from broccoli extracts

○兼行 紗矢[1]、藤巻 貴宏[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2] ([1]東農大院、[2]東農大)
○ Saya KANEYUKI[1], Takahiro FUJIMAKI[2], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景と目的】生活習慣病の患者数は年々増加しており、生活習慣病は脂質代謝調節の破綻によって引き起こされると考えられる。転写因子 SREBP は脂質代謝を包括的に制御している。肥満や糖尿病の肝臓では SREBP-1c が過剰に活性化していること、さらに SREBP の活性抑制によってそれらの症状が改善することが知られており、SREBP の活性抑制は抗肥満の標的として期待されている。これまでに脂肪酸合成酵素遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイにより、ブロッコリー由来成分であるスルフォラファン（SFaN）が SREBP 活性を抑制することを明らかにしてきた。そこで、SREBP 活性の抑制能を指標としてブロッコリー品種の選別を行ったところ、SREBP 活性を抑制するが、SFaN をほとんど含まない品種（抽出物）を見出した。その品種を用いて、SFaN 以外の SREBP 活性を抑制する成分をブロッコリーから単離・同定し、その作用機構の解明を目的とする。
【方法と結果】該当品種ブロッコリーの酢酸エチル抽出物を 60%MeOH と塩化メチレンで分液したサンプルを上記評価方法で測定した結果、塩化メチレン層で活性の抑制が見られた。さらに、塩化メチレン層をシリカゲルクロマトグラフィーで 40 画分まで細分化したサンプルを同様に測定した結果、活性抑制画分が複数確認された。抑制画分を HPLC 測定で測定し、特異的なピークが見られた画分に着目した。対応する画分を用いた ^{1}H-NMR による分析は現在検討中である。

The transcription factor SREBP comprehensively regulates lipid metabolism, and suppression of SREBP activity is expected to be a target for anti-obesity. We evaluated about 300 food-derived components by reporter assay using the promoter region of the fatty acid synthase gene, a target gene of SREBP-1c, and found that sulforaphane (SFaN), a component from broccoli, inhibits SREBP activity. Our laboratory has selected broccoli varieties that have a strong ability to suppress SREBP activity, and in the process, we have found broccoli varieties that suppress SREBP activity but contain only a small amount of SFaN. The purpose of this study is to identify components other than SFaN that inhibit SREBP activity from such broccoli varieties.

EtOAc extracts of the relevant variety of broccoli were fractionated with 60% MeOH and methylene chloride. As a result of measuring the samples by the above evaluation method, inhibition of FAS promoter activity was observed in the methylene chloride fraction. Furthermore, the methylene chloride fraction was subdivided and measured in the same manner, resulting in multiple fractions that suppressed FAS promoter activity. Analysis by ^{1}H-NMR with the corresponding fractions is currently under investigation.

SREBP, obesity, broccoli

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：4B2a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 B2 会場

脂質代謝を制御する転写因子 SREBP の活性を低下させる化合物の探索
Search for compounds that decrease the activity of SREBP, a transcription factor that regulates lipid metabolism

○寺田 晴哉[1]、小高 愛未[1]、松永 優輝[2]、鈴木 司[1]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]([1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化)
○Seiya Terada[1], Manami Kodaka[1], Yuki Matsunaga[2], Tsukasa Suzuki[1], Yuji Yamamoto[1,2], Jun Inoue[1,2] ([1]Tokyo univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】Fatty acid synthase (FAS)は脂肪酸の *de novo* 合成を触媒する酵素であり、肝臓及び脂肪組織における脂質蓄積を調節する因子であることが知られている。我々はこれまでに、FAS 遺伝子プロモーター領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより FAS プロモーター活性を抑制する小分子化合物の探索を行い、候補成分の一つとして NPD7426 を見出した。本研究では、NPD7426 が FAS プロモーター活性を抑制する分子メカニズムの解明を目的とした。
【方法】肝がん由来 Huh-7 細胞を 30μM NPD7426 で 24 時間処理し、内因性 FAS 遺伝子や FAS 以外の SREBP 標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR により測定した。また、NPD7426 の処理濃度や時間を変動させ、SREBP-1、-2 のタンパク質レベルへ及ぼす影響をイムノブロットにより検討した。次に成熟体 SREBP-1 を過剰発現させ、NPD7426 がその活性を抑制するかについて、FAS 遺伝子プロモーター領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。さらに、NPD7426 が成熟体 SREBP-1 タンパク質の分解を促進するかどうかをシクロヘキシミド実験により検討した。最後に、プロテアソーム阻害剤である MG132 の同時処理により、NPD7426 処理による成熟体 SREBP-1 タンパク質の分解が抑制されるか検討した。
【結果】NPD7426 は FAS 遺伝子を含む SREBP 標的遺伝子発現をおしなべて低下させた。NPD7426 は成熟体 SREBP タンパク質レベルを低下させること、さらにその低下はプロテアソーム経路を介した核内型 SREBP の分解に起因することが示された。以上の結果より、NPD7426 は成熟体 SREBP タンパク質の分解を促進することで FAS を含む SREBP 標的遺伝子の発現を低下させることが明らかになった。

We have found NPD7426 as a small molecule compound that suppresses the promoter activity of the FAS gene. The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism of this repression. Huh-7 cells were treated with 30-μM NPD7426 for 24 h to determine the effect of NPD7426 on SREBP target gene expression and SREBP-1 and -2 protein levels. NPD7426 decreased SREBP target gene expression and mature forms of SREBP protein levels. This decrease was attributed to degradation of mature SREBP via the proteasome pathway. These results indicate that NPD7426 reduces the expression of SREBP target genes by promoting the degradation of mature SREBP proteins.

FAS, SREBP, proteasomal degradation

発表責任者：井上　順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：4B2a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 B2 会場

Role of Gnetin C in Regulating Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathology in Mice

○Tohfa Kabir[1], Haruki Yoshiba[1], Afifah Zahra Agista[1], Halima Sultana[1], Yusuke Ohsaki[1], Chiu-Li Yeh[1,2], Suh-Ching Yang[1,2], Michio Komai[1], Hitoshi Shirakawa[1] ([1]Lab. Nutr., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Sch. Nutri. Health Sci., Taipei Med. Univ.)

Background and objectives: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most prevalent type of chronic liver disease, can progress to hepatic steatosis, inflammation, and advanced fibrosis, increasing the risk of cirrhosis. Additionally, NAFLD can lead to other lifestyle-related conditions such as diabetes mellitus and hypertension. Therefore, preventing NAFLD is crucial to increasing the lifespan and maintaining a healthy lifestyle. Resveratrol (RSV), a natural polyphenol with antioxidant and anti-inflammatory properties, is beneficial in treating multiple metabolic diseases. Gnetin C (GC), an RSV derivative obtained from Melinjo seed extract, is thought to have similar health-promoting properties. We investigated the role of GC in preventing NAFLD in a mouse model and compared the application of GC as a dietary intervention with that of RSV.

Methods: Male C57BL/6J mice were fed a control diet (10% calories from fat), a high-fat choline-deficient (HFCD) diet (46% calories from fat), and an HFCD diet supplemented with GC (150 mg/kg BW·day^{-1}) or RSV (150 mg/kg BW·day^{-1}) for 12 weeks.

Results: GC supplementation reduced body and liver weight, and improved blood glucose levels and insulin sensitivity. Both GC and RSV reduced hepatic steatosis, with GC also decreasing liver lipid content. GC and RSV ameliorated HFCD diet-induced hepatic fibrosis. The mRNA expression results and western blot analyses showed that GC and, to some extent, RSV downregulated fibrosis markers in the TGF-β1 signaling pathway, indicating a possible safeguarding mechanism against NAFLD. These results suggest that GC supplementation may protect against lipid deposition and hepatic fibrosis.

Conclusion: The results suggest that dietary supplementation with GC may have protective effects against fat deposition as well as hepatic fibrosis.

NAFLD, Resveratrol, Gnetin C

発表責任者：Hitoshi Shirakawa（shirakah@tohoku.ac.jp）

講演番号：4B2a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 B2 会場

アデノシン皮下投与がインスリンの分泌と作用に及ぼす影響
Effect of adenosine on the secretion and action of insulin
○三宅 絢女、小西 良子、服部 一夫、只石 幹（東農大応生）
○Ayame MIYAKE, Yoshiko SUGITA-KONISHI, Kazuo KOBAYASHI-HATTORI, Miki TADAISHI
(Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

我々は以前、アデノシン（ADO）が糖代謝に及ぼす影響を検討し、ADO 皮下投与が肝臓中のグリコーゲン分解を介して血糖値を上昇することを示した（PLoS One, 2018, 13）。しかし、その後の反応について不明点が多く残されている。そこで本研究では、C57BL/6 マウスを用いて ADO 皮下投与がインスリンの分泌と作用に及ぼす影響を検討した。対照群には PBS、ADO 群には ADO 溶液 100 mg/kg を皮下投与した。その結果、血糖値の経時的変化は ADO 投与後 30 分、60 分、90 分において有意に上昇し、血糖上昇のピークは 60 分であった。さらに、投与 60 分後において、血漿インスリン濃度は ADO 投与により有意に上昇したが、肝臓と筋肉中の Akt の活性化は認められなかった。インスリン抵抗性の要因の一つと言われる血漿遊離脂肪酸（NEFA）濃度を測定した結果、ADO 投与により有意に上昇した。以上より、ADO 投与は、血糖値の上昇に伴いインスリン分泌を促進するが、インスリンシグナルの中心的な因子である Akt を活性化しないことが示唆された。これは、ADO 投与による血中 NEFA の増加がインスリンシグナルの活性化を阻害することで、インスリンの作用に影響を及ぼしている可能性がある。

We previously examined the effects of adenosine (ADO) on glucose metabolism and showed that ADO subcutaneous administration increased blood glucose levels via glycogenolysis in the liver (PLoS One, 2018, 13). However, much remains unclear about the subsequent responses. In this study, we examined the effects of ADO administration 100 mg/kg on the secretion and action of insulin in mice. The results showed that blood glucose levels significantly increased at 30, 60, and 90 min after ADO administration, with a peak increase in blood glucose at 60 min. Furthermore, at 60 min after the administration, ADO significantly increased plasma insulin concentration, but Akt phosphorylation ratio were unchanged in the liver and muscle. The plasma concentration of non esterified fatty acid (NEFA), one of the factors contributing to insulin resistance, was significantly increased by ADO. These results suggest that ADO administration stimulates insulin secretion as blood glucose levels rise, but does not activate Akt, a central factor in insulin signaling. The increase in blood NEFA by ADO administration may affect insulin action through inhibiting insulin signal.

Adenosine, Insulin signal, NEFA

講演番号：4B2a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 B2 会場

かまぼこ製造時の廃棄物「水さらし液」は血中 GLP-1 およびインスリン量を制御することにより血糖値上昇を抑制する
Mizusarashi-eki, a fish processing waste material, suppresses blood sugar elevation via regulating insulin and glucagon-like peptide-1 levels

○八田 日和[1]、田中 照佳[1,2]、池田 くる美[1]、藤井 有希[1]、福田 隆志[1,2,3]、安藤 正史[1,2] ([1]近大農・水産、[2]近大院農・水産、[3]アグリ技研)
○Hiyori HATTA[1], Teruyoshi TANAKA[1,2], Kurumi IKEDA[1], Yuki FUJII[1], Takashi FUKUDA[1,2,3], Masashi ANDO[1,2] ([1]Kindai Univ., [2]Grad. Kindai Univ., [3]ATIRI)

【目的】かまぼこは、日本の伝統的な水産加工食品である。「水さらし」の操作により、白身魚の皮や骨を除いた身を水洗することで得られる筋原繊維タンパク質がかまぼこの原料として利用される。水さらし液は、水洗後の上澄み液で、かまぼこの製造過程で大量に廃棄される。本研究では、未利用廃棄物である水さらし液の有効利用法を探索する目的で水さらし液の血糖値上昇抑制作用を検討した。
【方法】C57BL/6NCr 系統 12 週齢の雄性マウスを対照群(n=10)と水さらし液投与群(n=10)の 2 群に分け、糖負荷試験を行った。マウスを 19 時間絶食後、対照群にはグルコース(1,000 mg / kg BW)、水さらし液投与群にはグルコース(1,000 mg / kg BW)と水さらし液乾燥物(1,000 mg / kg BW)を、胃ゾンデを用いて経口投与した。サンプル投与後、採血を行い、血清を得たのち市販キットにより血糖値、血清インスリンおよび活性型 GLP-1 (glucagon-like peptide-1)濃度を測定した。
【結果・考察】水さらし液の投与は、対照群と比較し、30、60、90 分で有意に血糖値上昇を抑制した。また、水さらし液投与群の投与 5 分後の血清インスリンと活性型 GLP-1 濃度は、対照群と比較し有意に高値を示したことから、水さらし液の経口摂取は、血中 GLP-1 濃度の調整を介してインスリン分泌を促進することで血糖値上昇を抑制することが示唆された。したがって、日本の伝統的な水産加工食品であるかまぼこ製造時の廃棄物である「水さらし液」は糖尿病予防食品として期待される。

Kamaboko is a traditional Japanese processed fish product, composed of myofibrillar protein derived from white fish. It is obtained while washing the fish in a step called “mizusarashi”. Mizusarashi-eki is the post-wash liquid that is discarded in large quantities during kamaboko manufacturing. However, the possible clinically relevant effects of mizusarashi-eki remain unknown. In this study, we investigated the potential of mizusarashi-eki in suppressing the elevation in blood sugar levels. Twelve-week-old, male, C57BL/6NCr mice were divided into control (n=10) and mizusarashi-eki groups (n=10), and subjected to a glucose tolerance test. Administration of mizusarashi-eki significantly suppressed blood sugar elevation following the glucose challenge. In addition, serum insulin and glucagon-like peptide-1 levels in the mizusarashi-eki group were significantly higher than that in the control group. These results suggest that mizusarashi-eki suppresses blood sugar elevation via regulating concentrations of insulin and glucagon-like peptide-1. Thus, “mizusarashi-eki” is a potential functional food resource that may have therapeutic value for treating diabetes.

kamaboko, blood sugar level, insulin

発表責任者：田中照佳（t-tanaka@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B2a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 B2 会場

脂肪細胞におけるオレアミドの機能性解明
Function of oleamide in adipocytes
○日向 宏成[1]、櫃石 香菜[1]、中島 史恵[1]、内田 浩二[2]、柴田 貴広[1] ([1]名大院生命農、[2]東大院農)
○ Hironari HYUGA[1], Kana HITSUISHI[1], Fumie NAKASHIMA[1], Koji UCHIDA[2], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Nagoya University, [2]The Univ. of Tokyo)

オレイン酸由来の第一級脂肪酸アミドであるオレイン酸アミド（オレアミド）は、これまでに睡眠誘導作用や抗炎症作用等の生理的機能が報告されている。これまでに当研究室では、高脂肪食負荷マウスにおいて、オレアミドが抗肥満効果を有することを明らかにしてきた。そこで本研究では、マウス由来の前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を用いてオレアミドによる抗肥満効果に関する分子メカニズムの解明を目的とした。まず、脂肪蓄積に対するオレアミドの影響を検討した。3T3-L1 細胞に分化誘導培地でオレアミドを投与した後、Oil Red O 染色で脂肪蓄積の程度を評価した。その結果、予想に反してオレアミドを投与した細胞において脂肪蓄積が促進された。次に、3T3-L1 細胞の分化初期に発現し、分化に必要となる転写因子 C/EBP α と PPAR γ の遺伝子発現量を解析した。分化誘導開始から 48 時間後の細胞を回収して RT-qPCR に供した結果、オレアミド投与によりどちらの遺伝子も発現量が増加した。また、分化後の細胞におけるアディポカインの遺伝子発現量を RT-qPCR で解析した結果、抗肥満性アディポカインであるアディポネクチンの遺伝子発現量が増加していた。現在、培養上清中のアディポネクチンを ELISA によって解析している。

Oleamide, a primary fatty acid amide derived from oleic acid, has been reported to have physiological functions such as sleep induction and anti-inflammatory effects. We previously found an anti-obesity effect of oleamide in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of the anti-obesity effect of oleamide using murine preadipocytes 3T3-L1 cells. To examine the effect of oleamide on lipid accumulation, 3T3-L1 cells were treated with oleamide in differentiation induction medium, and the lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining. Contrary to expectations, lipid accumulation was enhanced in the oleamide-treated cells. Next, gene expression levels of C/EBP α and PPAR γ , which are essential transcription factors for differentiation, were analyzed by RT-qPCR. As a result, oleamide treatment increased the gene expression levels of both C/EBP α and PPAR γ . In addition, RT-qPCR analysis of adipokine gene expression in differentiated cells showed that gene expression of adiponectin, which is anti-obesity adipokine, was increased.

oleamide, adipocyte, obesity

講演番号：4B2a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 B2 会場

カツオエラスチンペプチド摂取が日本人型 DOHaD モデルのインスリン抵抗性発症に及ぼす影響
Effect of bonito elastin peptide on the development of insulin resistance of Japanese DOHaD model
○田口 達博[1]、増田 誠司[1,2,3]、竹森 久美子[1,2] ([1]近畿大学院農学研究科応用生命化学専攻、[2]近畿大学農学部食品栄養学科、[3]近畿大学アンチエイジングセンター)
○Tatuhiro Taguchi[1], Seiji Masuda[1,2,3], Kumiko Takemori[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, KINDAI University, [2]Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, KINDAI University, [3]Anti-Aging Center, KINDAI University)

我々は、日本人女性の低栄養(厚生労働省：若年女性の推定エネルギー必要量の 85%)を再現するモデルラットを作製した。このモデルラットでは、交配前および出生前の血清コルチコステロン濃度が対照群に比べ高値を示し、胎仔は継続的な低栄養ストレスに暴露されていた。この母獣から生まれた仔(UN)は、対照母獣から出生した仔に比べて血糖値と血漿インスリン濃度が高く、骨格筋量の減少をともない、*p*-Akt(インスリンシグナル伝達因子)の発現が抑制されていることが明らかになった。そこで本研究では、DPP-IV 阻害活性を有するカツオエラスチンペプチド(EP)が低体重モデル母獣から生まれた仔のインスリン抵抗性発症に及ぼす影響を検討した。 血糖値には有意差は見られなかったが、UN に EP を投与すると、血漿インスリン濃度の上昇と骨格筋における Akt、*p*-Akt、GLUT4 タンパク質発現の抑制が改善され、対照群に近づいた。さらに、UN と比較して EP 投与群では白血球における DPP-IV および iNOS mRNA 発現が低値を示した。したがって、EP は白血球の不活性化を介して慢性炎症を抑制し、インスリン抵抗性を予防する可能性が示された。

Here we have established animal model rats to mimic undernourished Japanese women (85% of the energy required for those with normal activity levels). The serum corticosterone concentration was increased in these rats in premating and prenatal states. Therefore, these maternal animals were under constant stress from malnutrition. Furthermore, we also revealed that blood glucose and plasma insulin levels were higher in the offspring born from these dams (UN) than in Control, and expression of *p*-Akt (insulin signaling factor) was suppressed along with a decrease in skeletal muscle mass. In this study, we investigated the effects of bonito elastin peptide (EP), which has DPP-IV inhibitory activity, on the occurrence of insulin resistance in offspring born from Japanese underweight model dams. Although no significant difference was found in blood glucose levels, plasma insulin levels and downregulation of Akt, *p*-Akt, GLUT4 protein expression in skeletal muscle were improved by the treatment with EP in UN. In addition, compared to the UN, DPP- IV and iNOS mRNA expression in leukocytes were lower in the EP treated group. In summary, EP may prevent insulin resistance by suppressing chronic inflammation via leukocyte inactivation.

mild undernutrition, insulin resistance, DOHaD

発表責任者：田口達博（mizuhasi343@gmail.com）

講演番号：4B2a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 B2 会場

トルコ伝統食材「ブルグル」の血糖値変動に及ぼす影響
Effect of traditional Turkish food “Bulgur” on blood glucose level fluctuations
○伊井 桃子[1]、東口 夢[1]、廣田 安美[1]、鈴木 靖志[1,2] ([1]武庫川女子大学食物栄養科学部食創造科学科、[2]武庫川女子大学バイオサイエンス研究所)
○Momoko II[1], Yume Higashiguchi[1], Ami Hirota[1], Yasushi Suzuki[1,2] ([1]School of Food Sci. and Nutr. Mukogawa Women's Univ., [2]Bioscience Lab. Mukogawa Women's Univ.)

【目的】トルコの伝統的な食材「ブルグル」はデュラム小麦を精麦せずに炊飯し、ピラフやサラダの材料として利用されている。本研究ではこの「ブルグル」のグリセミックインデックス(GI)を測定し、血糖値変動への影響の少ない食材としての価値を評価した。【方法】12 名の被験者に 12 時間の絶飲食後、グルコース溶液または塩水で炊飯したブルグルをそれぞれ異なる試験日に、いずれも糖質 25g 相当となるように摂取させ、摂取直前、摂取 15 分、30 分、45 分、60 分、90 分、120 分後の血糖値を測定し、摂取前血糖値からの変動量（Δ 血糖値）、血糖値下面積(AUC)および GI 値を算出した。【結果】12 名の被験者の AUC では全ての被験者についてブルグル摂取時の値がグルコース摂取時と比較して低値であった。12 名の Δ 血糖値の平均値比較では、ブルグル摂食時は 0 分と 120 分を除くすべてのタイムポイントでグルコース摂取時よりも有意な低値（$p<0.01$）を示した。グルコース摂取時に対するブルグル摂食時の AUC の割合（=GI）は 54.9 であり、低 GI 食品の目安である 55 を下回った。以上の結果より、塩水で炊飯したプレーンブルグルは、「低 GI 食品」に分類されることを確認した。
[Purpose] Bulgur, a traditional Turkish food, is unrefined durum wheat and is used as an ingredient in pilafs and salads. In this study, we measured the glycemic index (GI) of this “bulgur" and evaluated its value as a food ingredient that has little effect on blood glucose (BG) level fluctuations. [Method] After 12 hours of fasting, 12 subjects ingested bulgur cooked in salt water or a glucose solution on different test days, each equivalent to 25 g of carbohydrates. BG levels were measured immediately before ingestion, and 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after ingestion. The amount of change from the pre-ingestion BG level (Δ BG), the area under the BG level (AUC), and the GI value were calculated. [Results] The AUC values for all 12 subjects were lower when taking bulgur than when taking glucose. A comparison of the average ΔBG blood of the 12 subjects showed that the values during bulgur ingestion were significantly lower than those during glucose ingestion at all time points except 0 and 120 min ($p<0.01$). The ratio of AUC during bulgur intake to glucose intake (=GI) was 54.9%, which was lower than 55, which is the standard for low GI foods. From the above results, plain bulgur cooked in salt water is confirmed to be classified as a "low GI food".

Low glycemic index, Blood glucose level, Durum wheat

講演番号：4B3a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 B3 会場

5-Hydroxy-7-methoxyflavone による GPR97 を介した筋肥大促進機構の解明

Elucidation of myotube hypertrophy by 5-hydroxy-7-methoxyflavone via GPR97

○木村 彩乃[1]、北風 智也[1]、原田 直樹[1]、山地 亮一[1,2]（[1]大阪公大院農、[2]大阪公大院生資）
○Ayano KIMURA[1], Tomoya KITAKAZE[1], Naoki HARADA[1], Ryoichi YAMAJI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Osaka Metrop. Univ., [2]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Metrop. Univ.)

【目的】黒ショウガ（*Kaempferia parviflora*）に含まれる 5-hydroxy-7-methoxyflavone（HMF）類縁体が，マウス由来 C2C12 筋管細胞を肥大させ，老化促進モデルマウス SAMP1 のヒラメ筋重量を増加させることを見出したが [1)]，その詳細な分子機構は不明である。本研究では HMF による筋管細胞肥大における接着型 G タンパク質共役型受容体である GPR97 の関与を評価し，その分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】GPR97 を高発現させた C2C12 筋管細胞は肥大し，HMF はその筋肥大効果を増強した。一方，siRNA を用いて GPR97 の発現をノックダウンすると HMF による筋肥大効果が消失したが，その消失は siRNA 耐性 GPR97 を高発現させることにより回復した。また HMF 存在下で筋管細胞を培養すると，細胞膜表面における GPR97 の発現レベルは減少した。C2C12 筋芽細胞に SRF 応答ルシフェラーゼレポーターベクターと GPR97 発現ベクターを形質導入し，HMF 存在下で培養したところ，HMF は GPR97 高発現下で SRF 活性を増加させた。ROCK 阻害剤は，HMF による SRF の転写活性増加効果と筋管細胞での肥大効果を一部抑制した。これらの結果より，HMF は GPR97 を介して SRF シグナル経路を活性化し，筋管細胞肥大を促進することが示唆された。

【 Purpose 】 We found *Kaempferia parviflora*-derived 5-hydroxy-7-methoxyflavone (HMF) derivatives promote C2C12 myotube hypertrophy and increase soleus muscle mass in SAMP1 mice[1)]. However, its mechanism remains unclear. In this study, we investigated the involvement of the adhesion G protein-coupled receptor GPR97 in HMF-induced myotube hypertrophy.

【Methods/Results】Overexpression of GPR97 induced C2C12 myotube hypertrophy, and HMF enhanced its induction. Knockdown of GPR97 using siRNA inhibited HMF-induced myotube hypertrophy, and overexpression of siRNA-resistant GPR97 rescued its inhibition. Further, HMF decreased the cell surface GPR97 level. The luciferase reporter assay indicated that HMF increased SRF activity in GPR97-overexpressed myoblasts. A ROCK inhibitor suppressed HMF-increased SRF activity and HMF-induced myotube hypertrophy. These results suggested that HMF promotes myotube hypertrophy by activating the SRF signaling pathway via GPR97.

1) Ono S, Yoshida N, Maekawa D, *et al., Food Sci. Nutr.* (2019) 7:312-321

5-hydroxy-7-methoxyflavone, GPR97, skeletal muscle

講演番号：4B3a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 B3 会場

骨格筋形成におけるレチノイン酸受容体γの機能の解析
Function of retinoic acid receptor γ in skeletal muscle formation
○岡野 結衣[1]、大場 智貴[2]、北風 智也[1,2]、原田 直樹[1,2]、山地 亮一[1,2,3]（[1]大阪公大院・農、[2]大阪府大・生命環境、[3]大阪公大・生資センター）
○Yui OKANO[1], Tomoki OBA[2], Tomoya KITAKAZE[1,2], Naoki HARADA[1,2], Ryoichi YAMAJI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Agric., Osaka Metrop. Univ., [2]Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Ctr. R&D Bioresou., Osaka Metrop. Univ.)

【目的】骨格筋は，筋衛星細胞の増殖と筋芽細胞への分化，さらに筋芽細胞の増殖と筋管細胞への分化のような複雑な過程を経て筋線維へと成熟して形成される。レチノイン酸受容体（RAR）は 3 つのサブタイプ（α, β, γ）として存在し，活性型ビタミン A（ATRA）は RAR を介してその機能を発揮する。我々は RARγ 依存的に発現の増加したトランスグルタミナーゼ 2 が筋管細胞の肥大を促進することを見出した。本研究では骨格筋形成における RARγ の役割に関する情報を得ることを目的とした。
【方法・結果】RARγ アゴニストはマウス由来 C2C12 筋芽細胞の増殖を抑制した。さらに C2C12 筋芽細胞を分化させて形成した筋管細胞の短径を ATRA は変化させないが，RARγ アゴニストは増加（肥大）させた。RARγ アゴニスト特異的に発現の変動する遺伝子を解析するため，筋管細胞を ATRA または RARγ アゴニスト CD1530 存在下で培養した。RNA シークエンス解析の結果，control に比べて ATAR と CD1530 によって変動した遺伝子数はそれぞれ 210 個と 206 個あり，そのうち ATAR と CD1530 によって特異的に変動した遺伝子数はそれぞれ 116 個と 97 個であった。これらの結果から，骨格筋の形成において RARγ は筋芽細胞の増殖抑制に寄与し，さらに RARγ アゴニストは RARγ に特異的な遺伝子の発現を制御することで筋肥大促進に寄与する可能性が示された。
[Purpose] Skeletal muscle is formed through complex processes such as proliferation and differentiation of satellite cells and myoblasts and maturation of myotubes. ATRA, an active metabolite of vitamin A, exerts its function through three subtypes of RARs (α, β, and γ). We found that RARγ-responsive TG2 induces myotube hypertrophy. The purpose of this study was to obtain information regarding the role of RARγ in skeletal muscle formation. [Methods/Results] RARγ agonists suppressed the proliferation of myoblasts. Furthermore, RARγ agonists, but not ATRA, induced myotube hypertrophy. To assess the presence of RARγ agonist-specific genes, myotubes were cultured in the presence of ATRA or RARγ agonist (CD1530). RNA-seq analysis showed that compared to control, ATAR and CD1530 changed the expression of 210 and 206 genes, respectively, and that among them, the number of genes specific to ATAR and CD1530 was 116 and 97, respectively. These results suggest that RARγ contributes to suppressing myoblast proliferation and that expression of RARγ agonist-specific genes may contribute to promoting myotube hypertrophy.

ATRA, Retinoic acid receptor γ, skeletal muscle

発表責任者：山地亮一（yamaji@omu.ac.jp）

講演番号：4B3a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 B3 会場

分泌型セリンプロテアーゼ HtrA3 の骨格筋における機能について

Functions of secretory serine protease HtrA3 in skeletal muscle cells

○北風 智也[1]、原田 直樹[1]、山地 亮一[1,2] ([1]阪公大院・農、[2]阪公大・生資センター)
○Tomoya KITAKAZE[1], Naoki HARADA[1], Ryoichi YAMAJI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Osaka Metropol. Univ., [2]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Metropol. Univ.)

【背景・目的】骨格筋はマイオカインと呼ばれる分泌因子を産生し、骨格筋自身や他の臓器の発達やエネルギー代謝を調節する機能を持つ。ビタミン A は骨格筋の分化や肥大を促進する機能を持つ。我々は RNA-sequence を用いたビタミン A に応答する分泌タンパク質の網羅的解析から、分泌型のセリンプロテアーゼである HtrA3 の発現量がビタミン A により増加することを見出しているが、骨格筋における HtrA3 の機能は不明である。本研究では HtrA3 の骨格筋における機能を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞に活性型ビタミン A (ATRA)及びレチノイン酸受容体γ選択的アゴニストを作用させた結果、mRNA レベル及びタンパク質レベルで HtrA3 の発現量が増加した。また、ATRA によって培養上清中の HtrA3 が増加した。C2C12 筋芽細胞において HtrA3 を高発現させた結果、筋分化が促進され、筋構成タンパク質であるミオシン重鎖の発現量が増加した。一方で、HtrA3 をノックダウンした細胞では筋分化が抑制された。以上のことから、HtrA3 は骨格筋の分化に関与することが明らかとなり、ビタミン A による筋分化促進作用を担う分泌因子の一つであることが示唆された。
[Objectives] Skeletal muscle produces secreted factors called myokines, which have the function of regulating the development and energy metabolism of skeletal muscle itself and other organs. Vitamin A promotes differentiation and hypertrophy of skeletal muscle cells. We have found that the expression level of HtrA3, a secreted serine protease, is increased by vitamin A from prediction of transcripts encoding ATRA-responsive secreted proteins using RNA-seq and bioinformatics analysis. The purpose of this study was to clarify the function of HtrA3 in skeletal muscle.
[Methods and Results] ATRA and retinoic acid receptor γ-selective agonist increased HtrA3 expression at both the mRNA and protein levels. Furthermore, ATRA increased HtrA3 in the culture medium. Overexpression of HtrA3 in C2C12 myoblasts promoted myoblast differentiation and increased expression of myosin heavy chain, a muscle constituent protein. On the other hand, muscle differentiation was suppressed in cells in which HtrA3 was knocked down. These results indicated that HtrA3 is involved in myoblast differentiation, and suggested that HtrA3 is one of the secreted factors responsible for the action of vitamin A to promote myoblast differentiation.

skeletal muscle, myokine, vitamin A

発表責任者：北風智也（kitakaze@omu.ac.jp）

講演番号：4B3a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 B3 会場

霊長類膵管 tuft 細胞 in vitro 分化誘導および機能評価系の開発
Establishment of a novel method for functional analysis of monkey and human pancreatic tuft cells in vitro

○米谷 達哉[1]、坂口 恒介[1]、今井 啓雄[2]、岩槻 健[1]([1]東農大・応生、[2]京大・霊長類研)
○ Tatsuya KOMETANI[1], Kosuke SAKAGUCHI[1], Hiroo IMAI[2], Ken IWATSUKI[1] ([1]Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agri., [2]Primate Res. Inst., Kyoto Univ.)

tuft 細胞は消化管や気道に存在し、寄生虫排除など生体防御機能を担っている。膵臓の膵管上皮上には低頻度で tuft 細胞が存在するが、膵管での生理的機能は不明である。そこで、膵管 tuft 細胞の機能解明に寄与する三次元 *in vitro* 培養系の作製および評価系の確立を目的とした。

まず、霊長類であるサルより膵管オルガノイドの作製を行った。その結果、サル膵管オルガノイド上には通常の培養条件下では tuft 細胞は存在せず、分化誘導条件下にのみ tuft 細胞マーカー陽性細胞が出現した。さらに single cell RNA sequence 解析の結果、分化誘導条件下においてのみ、tuft 細胞マーカーを発現する新たなクラスターが形成されることが明らかになった。これらのことから、サル膵管オルガノイドを応用したサル膵管 tuft 細胞分化誘導系の確立に成功したと判断した。また、ヒト膵管オルガノイドを本研究へ導入し、ヒト膵管 tuft 細胞の誘導を試みた結果、同分化誘導条件下において tuft 細胞マーカー遺伝子複数の発現上昇が mRNA レベルで観察された。即ち、サルと同様ヒト膵管オルガノイドにおいても *in vitro* で tuft 細胞の分化誘導が可能であると示唆された。現在、ヒト膵管 tuft 細胞の機能解析に向けた tuft 細胞マーカーのタンパク質発現解析を行っている。

Tuft cells that reside in the intestine and trachea play rolls in biophylaxis, such as eliminating parasites. In addition, small numbers or pancreatic tuft cells (PTCs) are identified, although the function is unclear. Therefore, in this study, we aim to establish a novel PTC culture model which contributes to uncover their functions.

First, we performed PTC differentiation by using monkey pancreatic duct organoids (mkPD organoids). As a result, we observed tuft cell markers in mkPD organoids only when organoids were cultured under a differentiation condition. Single cell RNA sequencing analysis of mkPD organoids showed that the new cluster of tuft cells were formed cluster under the differentiation condition. These results suggest that we succeeded in establishing a monkey PTC culture model *in vitro*. Furthermore, we carried out the same experiment by using human PD organoids, and obtained the similar result as in monkey that is the increase in tuft cell marker gene expression when human PD organoids were differentiated. The result implies that human PTCs could be induced *in vitro* as was shown in monkey. We are currently analyzing the protein expression of tuft cell markers to unravel the function of human PTCs.

pancreatic duct, tuft cell, organoid

発表責任者：岩槻 健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：4B3a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 B3 会場

膵臓β細胞においてインスリンは caspase-12 の発現抑制を介して小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制する
Insulin suppresses ER stress-induced apoptosis in pancreatic ß cells by decreasing caspase-12
○村田 菜々子[1]、西村 佳那[2]、原田 直樹[1,2]、北風 智也[1,2]、乾 博[1,2,3]、山地 亮一[1,2,4] ([1]阪公大院農、[2]阪府大院生環、[3]大手前健栄、[4]阪公大生資開発センター)
○Nanako MURATA[1], Kana NISHIMURA[2], Naoki HARADA[1,2], Tomoya KITAKAZE[1,2], Hiroshi INUI[1,2,3], Ryoichi YAMAJI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Agr., Osaka Metrop. Univ., [2]Osaka Prefect. Univ., [3]Otemae Univ., [4]Ctr. R&D of Bioresou., Osaka Metrop. Univ.)

【目的】2 型糖尿病の発症は，インスリンを産生する膵臓β細胞の細胞死によるインスリン分泌量の低下が一因となる。慢性的な高血糖によりインスリン産生が亢進すると，小胞体に負荷がかかりβ細胞にアポトーシスが誘導される。インスリンは，血糖値降下作用を持つだけでなく細胞生存・増殖にも関与する。本研究では，β細胞における小胞体ストレス誘導性アポトーシスに対するインスリンの作用とそのメカニズムの解明を目的とした。【方法・結果】ラット膵臓β細胞株 INS-1 において,インスリンは小胞体ストレス誘導剤 tunicamycin（TM）または thapsigargin による細胞生存率の低下を抑制した。インスリンは TM による小胞体ストレスマーカー（ATF4, Spliced XBP1, GRP78, CHOP）の mRNA 発現増加を抑制しなかった。一方，アポトーシスマーカーである cleaved caspase-9 と cleaved caspase-3 は，TM によって増加しインスリンはその増加を抑制したが，TM によるミトコンドリアからサイトゾルへの cytochrome *c* の放出は起こらなかった。小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関与する caspase-12 のタンパク質発現は，TM によって増加しインスリンはその増加を抑制した。Caspase-12 の阻害剤は TM による細胞生存率の低下および cleaved caspase-3 の増加を抑制したが，cleaved caspase-9 の増加を抑制しなかった。さらに，caspase-12 の高発現によって細胞生存率が低下し, この作用はインスリンによって抑制された。これらの結果より, インスリンは caspase-12 の増加抑制を介して小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制することが示唆された。
【Objective】Type 2 diabetes is caused by the deficiency of insulin due to cell death of pancreatic β-cells. Insulin production is increased under chronic hyperglycemia, which induces endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis in β-cells. Insulin not only lowers blood glucose levels but also contributes to cell viability and cell proliferation. Here, we aimed to elucidate the effect of insulin on ER stress-induced apoptosis in β-cells.【Methods and Results】In INS-1 rat pancreatic β-cell line, insulin suppressed the decrease in cell viability induced by tunicamycin (TM) or thapsigargin. Insulin suppressed the TM-induced increase of cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, and caspase-12 protein levels. A caspase-12 inhibitor suppressed TM-induced the decrease in cell viability and the increase of cleaved caspase-3, but didn't suppress the increase of cleaved caspase-9. Furthermore, caspase-12 overexpression decreased cell viability, which was suppressed by insulin. These results suggest that insulin protects ß-cell apoptosis by suppressing caspase-12.

Insulin, ER stress, Apoptosis

発表責任者：原田直樹（naoki.harada@omu.ac.jp）

講演番号：4B3a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 B3 会場

鼓索神経と舌咽神経支配の NaCl 応答細胞の特性

Characteristics of NaCl responsive taste cells innervated by the Chorda tympani nerve and the Glossopharyngeal nerve

○井上 心、林 由佳子（京大院農）
○Kokoro INOUE, Yukako HAYASHI (The Univ. of Kyoto)

【背景と目的】塩味は主に塩化ナトリウム(NaCl)によって引き起こされる。NaCl 応答細胞はアミロライドによって抑制されるアミロライド感受性(AS)とアミロライド非感受性(AI)の少なくとも 2 種類に分類される。AS 細胞は Na^+選択的に受容し、舌前方のみに存在する。一方で AI 細胞は NaCl に加えて苦味・酸味などの刺激にも応答する多様な細胞であり、舌全体に分布することが報告されている。しかし、AI 細胞の応答性が舌の部位によって異なるかは不明である。そこで本研究では NaCl 応答細胞の舌部位特性を調べることを目的とした。
【結果と考察】舌の異なる部位に分布する有郭乳頭・葉状乳頭(前方・後方)・茸状乳頭から味細胞を単離し、カルシウムイメージングを行った。また、それらの細胞特性を特定するために細胞免疫染色を行った。結果、NaCl 応答細胞は苦味応答する細胞と酸味応答する細胞および NaCl のみに応答する細胞に分けられた。また舌後方の乳頭に存在する NaCl 応答細胞のほうが苦味や酸味に応答する細胞が多いことが分かった。つまり、塩味受容細胞の応答特性には舌の部位特異性があることが示唆された。

The salt taste can be triggered by NaCl in mammals. NaCl-responsive cells are categorized into at least two types: amiloride-sensitive (AS) and amiloride-insensitive (AI). The AS cells selectivity respond to $Na^+$and is located in the anterior part of the tongue, whereas AI cells respond to bitter and acidic stimuli in addition to NaCl. These AI cells are also found in both the anterior and posterior parts of the tongue. However, it remains unclear whether the responsiveness of AI cells is site-specific in the tongue. Therefore, our purpose was to characterize the response of NaCl-responsive cells in the different areas of the tongue.
We analyzed the characteristics of NaCl-responsive cells in the circumvallate, foliate papillae (the anterior and posterior part), and fungiform papillae using calcium imaging followed by taste cell immunostaining. We found that these NaCl-responsive cells were classified into three types: responsive to bitter, responsive to sour, and solely responsive to NaCl. Additionally, more NaCl-responsive cells in the posterior part of the tongue responded to bitter and sour. These results suggest that at least 3 types of NaCl-responsive cells exhibit regional specificity in their response.

salt taste, mouse

講演番号：4B3a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 B3 会場

抗酸化応答マスター転写因子 NRF2 の欠損が及ぼすマスト細胞機能への影響

Effects of deficiency of NRF2, antioxidant response master transcription factor, on mast cell function.

○野口 桜花[1]、長田 和樹[1]、杉原 彩夏[1]、芦刈 翼[1]、荒海 咲苗[1]、中野 信浩[2]、原 むつ子[2]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]順大院アトピー疾患研究センター)
○ Sakura NOGUCHI[1], Kazuki NAGATA[1], Ayaka SUGIHARA[1], Tsubasa ASHIKARI[1], Sanae ARAUMI[1], Nobuhiro NAKANO[2], Mutsuko HARA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo Univ. Sch. Med)

NRF2 は、活性酸素種や親電子性物質によって活性化される酸化ストレス誘導性の転写調節因子である。近年、スルフォラファンやケルセチンなどの食品成分中のフィトケミカルの作用機序として、NRF2 経路を活性化し抗炎症および抗アレルギーに寄与することが報告されている。NRF2 欠損マウスでは、炎症性腸疾患や接触性皮膚炎が悪化することから、NRF2 は自己免疫疾患や炎症性疾患の耐性に寄与すると考えられる。一方、I 型アレルギー反応のエフェクター細胞であるマスト細胞（MC）もポリフェノールによる活性調節を受けるが、MC の機能や生体アレルギー反応における NRF2 の機能は不明である。そこで本研究では、*Nrf2*$^{-/-}$マウスに IgE 依存的な受動的アナフィラキシーを展開すると共に、*Nrf2*$^{-/-}$MC の機能解析を行った。全身性アナフィラキシー反応によって引き起こされる体温低下を比較したところ、*Nrf2*$^{-/-}$マウスでは *Nrf2*$^{+/+}$マウスと比べ体温低下が有意に緩和することが判明した。局所皮膚アナフィラキシー反応における皮膚の腫れの程度も、*Nrf2*$^{-/-}$マウスで減弱化していた。腹腔中のマスト細胞をフローサイトメトリー解析した結果、*Nrf2*$^{-/-}$マウスでは MC 数が有意に少なく、細胞表面の IgE 受容体レベルが有意に低下していた一方、皮膚に局在する MC 数は *Nrf2*$^{+/+}$マウスより有意に多かった。ポリフェノールの一種である Kaempferol で骨髄由来 MC（BMMC）を処理すると、IgE 刺激による脱顆粒反応が抑制されたが、Kaempferol による脱顆粒抑制は *Nrf2*$^{-/-}$MC と *Nrf2*$^{+/+}$MC で同等であった。以上から、NRF2 の欠損は MC の分化や局在、IgE 受容体発現レベルに影響を及ぼしながら、IgE 依存的なアレルギー反応には、増悪化ではなくむしろ減弱化にはたらくことが示唆された。さらに、ポリフェノールによる MC 活性化抑制効果に、NRF2 は関与しない可能性が示され、フィトケミカルによる抗炎症効果作用点と位置付けられる NRF2 は、MC においては他細胞とは異なる役割を果たす可能性が考えられる。

NRF2 is a master transcription factor of antioxidant stress-related genes. Although the deficiency of NRF2 deteriorates autoimmune diseases and inflammatory diseases, the roles of NRF2 in allergic disease and function of mast cells (MCs) are largely unknown. In the present study, we utilized passive anaphylaxis model to *Nrf2*$^{-/-}$ mouse, and found that the pathology of anaphylaxis was suppressed in *Nrf2*$^{-/-}$ mice. NRF2 deficiency affected number and FcεRI expression level of peripheral MCs. The suppressive effect of kaempferol on IgE-induced degranulation of MCs was not affected by the NRF2 deficiency. These results suggest a unique roles of NRF2 in MCs.

Mast cell, NRF2, Full knock out

発表責任者：西山千春 教授（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4B3a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 B3 会場

I 型アレルギー反応を標的とした新規免疫抑制化合物の開発
Development of novel immunosuppressive compounds targeting type I allergic reactions
○関 健人[1]、長田 和樹[1]、沼田 向陽[1]、坂田 文弥[1]、平野 弘之[2]、長田 裕之[2,3]、吉田 優[1]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]理研環境資源科学研究センター、[3]静県大薬)
○Kento SEKI[1], Kazuki NAGATA[1], Koyo NUMATA[1], Fumiya SAKATA[1], Hiroyuki HIRANO[2], Hiroyuki OSADA[2,3], Suguru YOSIDA[1], Chiharu NISIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]RIKEN CSRS, [3]Dept. Pharm. Univ. Shizuoka)

TUS204-2 は、我々の先行研究において、樹状細胞(DC)を標的とした新規免疫抑制のスクリーニングにより、理研 NPD ライブラリーから選抜された化合物である。我々はこれまでに、TUS204-2 が DC の LPS 刺激依存的な炎症性サイトカイン産生を抑制すること、炎症性腸疾患をはじめとした炎症性疾患の病態を改善することを、マウス細胞並びに病態モデルを用いて明らかにしてきた。今回、TUS204-2 適用範囲の拡大可能性を検証するべく、I 型アレルギー反応のエフェクター細胞であるマスト細胞(MC)への作用を解析した。マウス骨髄由来培養 MC(BMMC)を調製し、BMMC の IgE 依存的な脱顆粒反応や LPS 刺激誘導性のサイトカイン分泌を測定したところ、TUS204-2 処理は細胞毒性を示さない濃度条件下で用量依存的に脱顆粒反応やサイトカイン産生を抑制することが判明した。続いて、TUS204-2 とその構造類縁体、合計 10 種類を合成し、MC の活性化抑制作用を比較した結果、TUS204-2 より強い抑制効果を示す化合物 SY3 が選抜された。最後に、マウスアナフィラキシーモデルを用いて、生体の MC 活性化反応に及ぼす化合物の効果を解析した。その結果、TUS204-2 や SY3 を事前に腹腔投与することにより、局所性皮膚アナフィラキシーによる皮膚の肥厚が有意に緩和すること、事前投与回数は 1 回で十分であることが明らかとなった。
We have previously identified TUS204-2 as the most effective immunomodulator from RIKEN NPD library through a 3-step screening using dendritic cells (DCs). We demonstrated that TUS204-2 inhibited LPS-induced expression of inflammatory cytokine genes in DCs, and that administration of TUS204-2 ameliorated the pathology of several inflammatory diseases including DSS-induced colitis. In the present study, we evaluated the effects of TUS204-2 on mast cell (MC), which plays critical roles in type I allergy. IgE-induced degranulation of bone marrow-derived MCs (BMMCs) and cytokine release from LPS-stimulated BMMCs were suppressed by treatment with TUS204-2 in a dose-dependent manner without affecting viability of BMMCs. We also synthesized 10 related compounds, involving TUS204-2 itself, and found that SY3 exhibited higher suppressive activity than TUS204-2 in the degranulation and cytokine production of BMMCs. Finally, we utilized anaphylaxis mouse model, to examine the effects of TUS204-2 and SY3 in vivo, and revealed that intraperitoneal injection of TUS204-2 or SY3 significantly suppressed footpad swelling in passive cutaneous anaphylaxis.

mast cell, allergy, chalcone

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4B3a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 B3 会場

NK 活性制御因子 NKG7 の発現メカニズムの解析

Gene expression of NKG7: central role in NK activity

○柾 明弘、阿蘇 晴香、新妻 史絵、遠藤 勝紀、田中 沙智 (信州大院)
○ Akihiro MASAKI, Haruka ASO, Humie NIITSUMA, Katsunori ENDO, Sachi TANAKA (Shinshu University)

NK 活性とは NK 細胞が有する細胞傷害活性のことであり、がんやウイルス感染を防ぐうえで重要な役割を果たしている。Natural killer cell granule protein 7（NKG7）という分子が、標的細胞にアポトーシスを誘導する細胞傷害性顆粒の分泌に関与することが示唆されている。しかし、NKG7 の遺伝子発現に関わるシグナルについては明らかになっていない。そこで、本研究では NK 活性増強のための重要分子として NKG7 に着目し、発現メカニズムの解明を目的とした。
マウス脾臓細胞に recombinant IL-15（rIL-15）を添加し、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行ったところ、NKG7 の遺伝子発現が増加した。また、マウス脾臓細胞に AKT、STAT5 または MAPK 経路の阻害剤をそれぞれ rIL-15 とともに添加し、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、それぞれの阻害剤の添加により NKG7 の遺伝子発現が低下した。
本研究の結果から、IL-15 が NKG7 の遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。また、NKG7 の遺伝子発現には AKT、STAT5、MAPK 経路が関与していることが示唆された。

NK activity is the cytotoxic activity of NK cells and plays an important role in preventing cancer and viral infections. Natural killer cell granule protein 7 (NKG7) has been shown that regulate secretion of cytotoxic granules that induce apoptosis in target cells. However, it is not clear what kind of signaling molecules regulate NKG7 gene expression. In this study, we focused on NKG7 as a key molecule for enhancing NK activity and aimed to elucidate the mechanism of gene expression.
When the mouse spleen cells were treated with recombinant IL-15 (rIL-15), the expression of NKG7 was significantly increased compared with non-stimulation. In addition, the treatment of AKT, STAT5, or MAPK pathway inhibitor together with rIL-15 significantly decreased the gene expression of NKG7 in mouse spleen cells.
These results suggest that IL-15 induces the gene expression of NKG7, which is regulated by AKT, STAT5, and MAPK signaling pathways.

NK cell, NKG7, IL-15

発表責任者：柾　明弘（23as213f@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4B3a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 B3 会場

細胞内 Ca^{2+}量による mTORC1 制御メカニズムの解明
Analysis of mTORC1 regulation by intracellular Ca^{2+} levels
○雨宮 優奈、池田 奈央、牧 正敏、柴田 秀樹、高原 照直（名大院・生命農）
○ YUNA AMEMIYA, NAO IKEDA, MASATOSHI MAKI, HIDEKI SHIBATA, TERUNAO TAKAHARA (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

mTORC1（mechanistic target of rapamycin complex 1）は栄養などの細胞外からのシグナルを統合し、動物細胞の大きさや増殖の制御に中心的な役割を果たす。当研究室で mTORC1 活性化機構の研究が進められてきた中で、細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が Ca^{2+}センサーである CaM（Calmodulin）を介して mTORC1 の活性化を引き起こすことが明らかにされた。さらに CaM が Ca^{2+}依存的に、TSC2（tuberous sclerosis complex 2）と結合することが明らかになった。TSC2 は mTORC1 の活性化因子である Rheb に対する GAP（GTPase activating protein）として働くことから、Ca^{2+}/CaM は TSC2 による Rheb の不活性化を抑制すると考えらえるが、その分子基盤は不明である。そこで本研究では Ca^{2+}/CaM-TSC2 を介した mTORC1 経路の制御機構の詳細を解明することを目的とした。

まず、CaM による mTORC1 活性調節における TSC2 の関与を確認したところ、TSC2 ノックアウト細胞ではアミノ酸飢餓や CaM 阻害剤処理による mTORC1 活性低下に耐性を示した。さらに、CaM が TSC2 と Rheb との相互作用に与える影響を HiBiT Lytic Assay にて評価した。その結果、大腸菌で発現・精製した His-CaM の添加量に応じて、Ca^{2+}依存的に TSC2-Rheb 間の結合が低下することがわかった。これらのことから、Ca^{2+}/CaM が TSC2 と結合することで、TSC2 と Rheb との相互作用が負に調節され、mTORC1 活性が制御されるという新規制御機構の存在が明らかになった。

mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) integrates extracellular signals, such as nutrients and plays a central role in the regulation of mammalian cell size and proliferation. Previous studies in our lab revealed that intracellular Ca^{2+} rise modulates mTORC1 activation via CaM (Calmodulin). In addition, we found that CaM binds TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) in a Ca^{2+}-dependent manner. TSC2 is known as a crutial negative regulator of mTORC1 by inhibiting Rheb, an mTOR activator, by its GAP (GTPase activating protein) activity.

In this study, we uncovered the molecular mechanism of Ca^{2+}-induced mTORC1 activation through TSC2-CaM. First, we evaluated effect of CaM inhibitor on mTORC1 activity in TSC2 KO cells, and found that TSC2 KO cells is resistant to mTORC1 inactivation by amino acids starvation or a CaM inhibitor. Furthermore, we revealed that addition of purified CaM decreases TSC2-Rheb binding in HiBiT Lytic Assay. In summary, we uncovered attenuation of TSC2-Rheb interaction by Ca^{2+}/CaM as a novel mechanism in mTORC1 regulation.

mTORC1, Calmodulin, TSC2

発表責任者：雨宮優奈（amemiya.yuna.a8@s.mail.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4B3a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 B3 会場

好塩基球特異的プロテアーゼの遺伝子発現を制御する転写因子とエピジェネティック修飾

Role of transcription factors and epigenetic modifications regulating gene expression of basophil-specific proteases.

○戸島 遼太郎、長田 和樹、新井 貴大、伊藤 直人、笠倉 和巳、西山 千春（東理大院先進工）
○Ryotaro TOJIMA, Kazuki NAGATA, Takahiro ARAI, Naoto ITO, Kazumi KASAKURA, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci)

好塩基球（Baso）とマスト細胞（MC）は、共にⅠ型アレルギー反応のエフェクター細胞であり、共通前駆細胞から分化するなど複数の類似点を有する白血球であるが、これらを区別する転写調節機構の解明は各細胞の生理的意義を研究する上で重要である。マウス骨髄細胞を IL-3 存在下で維持すると、Baso 様細胞と MC 様細胞の両者が誘導される。この培養細胞に転写因子 C/EBPαの siRNA を導入したところ MC 関連転写因子である MITF、GATA1、GATA2 の mRNA 量が増加すると共に Baso 特異的 MCPT-8、11 の mRNA 量は有意に減少し、C/EBPαの過剰発現では MCPT-8、11 の mRNA 量が増加した。GATA2 の siRNA 導入は MITF や PU.1、Runx1 の mRNA 発現を抑制したが、一方で C/EBPαの発現量に影響を及ぼすことなく MCPT-8、11 の発現量を減少させた。さらに、PU.1 ノックダウンは GATA2、C/EBPα、MCPT-8、11 の発現をいずれも促進した。阻害剤を用いた実験から、GATA1 と MITF の遺伝子発現はヒストンアセチル化により促進され、C/EBPα、MCPT-8、11 の発現は DNA メチル化やヒストンアセチル化により抑制されることが判明した。MC 分化促進効果が知られる TGF-βを培地に添加したところ、GATA2、C/EBPα、Mcpt-8、Mcpt-11 いずれの mRNA 量も増加した。以上まとめると、C/EBPαは MCPT-8、11 遺伝子の転写を活性化し MC 遺伝子発現を抑制すること、GATA2 は MC 分化だけでなく C/EBPαとは独立した経路で MCPT-8/11 発現に寄与すること、PU.1 の発現低下は MC と Baso の分化を促進すること、ヒストンアセチル化は MC 遺伝子発現を促進すると同時に Baso 特異的転写を抑制すること、TGF-βは MC だけでなく Baso の分化も促進すること、などが明らかとなった。

Basophil (Baso) and mast cell (MC) possess several common features and the common progenitors. In the present study, we analyzed the roles of Baso- and MC-related transcription factors in transcriptional regulation of the Baso-specific protease genes, *Mcpt8* and *Mcpt11*, and regulatory relationship between related transcription factors. We performed siRNA-mediated knockdown of various transcription factors against bone marrow (BM)-derived cells maintained in the presence of IL-3, which are consistent of Baso-like cells and MC-like cells. We also treated BM cells with TGF-β and inhibitors of DNA methylation and histone acetylation. From the results obtained by quantitative PCR of mRNAs, we conclude that C/EBPα is a transactivator of Baso-specific protease genes, and that GATA2, and TGF-β signaling also positively regulates the transcription of Baso-specific protease genes under the modification of epigenetic regulation.

Basophil, Gene expression, Transcription factor

講演番号：4B3a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 B3 会場

脳の虚血再灌流障害におけるミトコンドリアカルパイン-5 の役割
Role of mitochondrial calpain-5 in cerebral ischemia/reperfusion injury
○忠海 優作、伊藤 銀河、尾崎 拓（岩大院・理工）
○Yusaku CHUKAI, Ginga ITO, Taku OZAKI (Iwate Univ.)

カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインは、細胞内のカルシウムシグナルに応答して基質タンパク質を切断する。ヒトでは 15 種類のアイソフォームが報告されており、主に細胞質に局在している。一方、当研究室では、マウスの各組織における網羅的解析の結果、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸を含む主要な組織の細胞質およびミトコンドリアにカルパイン-5 が局在することを明らかにした。その酵素学的性質や生体内での機能は未解明であったため、本研究では、特に発現量の多い脳組織におけるカルパイン-5 の酵素学的性質を in vitro Ca^{2+} assay により解析した。その結果、細胞質カルパイン-5 に比べて、ミトコンドリアカルパイン-5 が迅速に活性化することがわかった。さらに、in vivo 虚血再灌流障害モデルマウスにおいて、ミトコンドリアカルパイン-5 のみが活性化することが示された。このミトコンドリアカルパイン-5 の活性化は、培養細胞系において炎症反応を促進するカスパーゼ-4/-11 の切断・活性化を誘導し、炎症反応を促進している可能性が示された。現在は、カルパイン-5 の機能阻害が細胞にもたらす影響を解析しており、上記の結果を含めた最新の知見を報告する。

Calpains, a family of calcium-dependent cysteine proteases, respond to intracellular calcium signals, leading to the cleavage of their substrates. Fifteen isoforms of calpains have been identified in humans. Our previous study revealed the presence of calpain-5, a member of the calpain isoform, in the cytosol and the mitochondria. Furthermore, cytosolic and mitochondrial calpain-5 was expressed widely in various tissues, including the brain, heart, lung, liver, kidney, spleen, stomach, and intestine of mice. In the present study, we focused on analyzing the enzymatic properties of calpain-5, particularly in brains that expressed calpain-5 abundantly. Through in vitro Ca^{2+} assays and an in vivo mouse model of ischemia/reperfusion injury, we found that the mitochondrial calpain-5 was rapidly activated in response to Ca^{2+}. The activation of mitochondrial calpain-5 induced the cleavage and activation of caspases-4/11, known inducers of the inflammatory pathway. In our ongoing research, we are analyzing the effects of calpain-5 inhibition on cell functions and we will present the latest findings.

calpain, mitochondria, ischemia/reperfusion injury

発表責任者：尾崎 拓（tozaki@iwate-u.ac.jp）

講演番号：4B3a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 B3 会場

リコテトラオース処理における正常ヒト皮膚線維芽細胞の遺伝子発現の解析
Analysis of Gene Expression in Normal Human Dermal Fibroblasts Treated with Lycotetraose.
○窪田 愛華[1]、西光 由真[1]、赤井 美帆[1]、神保 有亮[3]、角谷 晃司[1,2] ([1]近畿大・薬学総合研、[2]近畿大・アンチエイジングセ、[3]クレハ中央研)
○Aika Kubota[1], Yumi Nishimitsu[1], Miho Akai[1], Yusuke Zimbo[3], Kouzi Kakutani[1,2] ([1]PRTI of Kindai Univ., [2]Anti-Aging Centers of Kindai Univ., [3]Kureha Co.,Ltd)

【目的】リコテトラオース（LT）は、α-トマチンを加水分解した際に得られる四糖である。これまで、LT には高い保水効果や抗糖化作用の他、正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）の増殖効果などを明らかにしている。そこで本研究では、LT 処理した NHDF の遺伝子発現について網羅的な解析を検討した。
【方法】本研究には、NHDF を用い、マルトテトラオース（MT）、ニストース（NT）、スタキオース（ST）および LT 処理での細胞増殖への影響を WST-1 Assay 法と MTT 法で評価した。また、各四糖処理区と無処理区における NHDF の経時的な細胞変化を観察した。さらに各処理区の細胞から total RNA を抽出し、RNA-Seq 解析による既知遺伝子の発現定量解析を行った。
【結果・考察】経時的観察の結果、MT、NT、ST 処理では細胞増殖は確認できなかったが、 LT の低濃度区では軽度の細胞増殖が確認された。そこで、各四糖を処理した細胞で発現する遺伝子を解析したところ、LT 処理において、細胞老化随伴分泌現象（SASP）因子に関する EREG、FGF、VEGF などの特異的な発現上昇がみられた。これらの発現は NHDF の細胞増殖の他、上皮がんの抑制にも関与している。今後は、LT 処理による SASP の発現メカニズムについて、詳細な解析を行う予定である。
Lycotetraose (LT) is a tetrasaccharide obtained through the hydrolysis of α-tomatine. We have elucidated the moisturizing effects, anti-glycation effects, and proliferation effects on normal human dermal fibroblasts (NHDF) of LT. In this study, I conducted a comprehensive analysis of gene expression in NHDF treated with LT.
The cell viability and proliferation of NHDF treated with maltotetraose (MT), nystose (NT), stachyose (ST), and LT were assessed using the MTT assay or Cell Proliferation Reagent WST-1. The total RNA from NHDF was extracted from the group treated with four oligosaccharides and then sequenced. The data were analyzed for differentially expressed genes.
NHDF cells did not exhibit significant proliferation when treated with MT, NT, and ST; however, a slight promotion was observed with the low-concentration treatment of LT. During LT processing, specific genes such as EREG, FGF, and VEGF emerged, particularly associated with the cell aging-related secretion phenomenon (SASP).

Lycotetraose, Gene expression, NHDF

講演番号：4B3a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 B3 会場

ダイズシストセンチュウの化学走性を制御する G タンパク質
G proteins regulating chemotaxis of soybean cyst nematode.
○佐伯 靖将[1]、細井 昂人[2]、内山 博允[2]、佐々木 康幸[1]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東農大バイオ、[2]東農大 GRC)
○ YASUMASA SAEKI[1], AKITO HOSOI[2], HIRONOBU UCHIYAMA[2], YASUYUKI SASAKI[1], SHUNSUKE YAJIMA[1], SHINSAKU ITO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]NODAI GRC)

ダイズシストセンチュウ (Soybean cyst nematode: SCN) による農業被害が世界中で深刻である。SCN の 2 期幼虫は宿主植物が分泌する宿主由来物質に応答して根へと移動し、寄生する。宿主へ寄生できない場合餓死することから、宿主への誘引や寄生といった宿主認識行動は新たな防除標的と言える。しかし、SCN の宿主認識行動の機構には未だ不明な点が多い。これまでに我々は、宿主認識時特異的な発現変動遺伝子を RNA-seq によって複数見出しており、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つが宿主認識行動に特異的に関与することを明らかにした。GPCR にリガンドが結合すると G タンパク質 α サブユニット (Gα) が活性化することが知られており、化学感覚受容において Gα は重要である。しかし、SCN の宿主認識行動における Gα の機能は未だわかっていない。そこで我々は宿主認識時特異的に発現量が変動する Gα 遺伝子を探索し、*Hg-gpa-3* を発見した。RNAi によって *Hg-gpa-3* 機能抑制体を作製したところ、硝酸イオンに対する化学走性と宿主の根への誘引頭数は低下したが、不快な温度刺激に対する温度走性には影響しなかった。以上の結果から、*Hg-gpa-3* が宿主への誘引を含む化学走性に関与することが明らかになった。

Soybean cyst nematode (SCN) causes serious agricultural damage worldwide. Second-stage juveniles of SCN are attracted to and infest roots in response to host-derived compounds produced by host crops. Host recognition behaviors such as attraction and infestation are new targets for SCN control, because SCN cannot survive without infestation of host crops. However, the mechanism of host-recognition behavior remains unclear. We have previously identified genes that changes expression level specifically in host recognition. Among differentially expressed genes, one of the G protein-coupled receptors (GPCR) is specifically involved in host recognition behavior. Generally, G protein α subunit (Gα), which is important in chemosensory perception, is activated after binding a ligand with GPCR. However, the effect of Gα on host recognition behavior in SCN is still unknown. Therefore, we explored for Gα genes that change expression levels specifically in host-recognition and found *Hg-gpa-3*. RNAi silencing of *Hg-gpa-3* reduced chemotaxis to nitrate and attraction to host roots, whereas thermotaxis was not affected. These results indicate that *Hg-gpa-3* is involved in chemotaxis, including host attraction.

nematode, G protein, chemotaxis

発表責任者：佐伯靖将（03or7suisui@gmail.com）

講演番号：4B4a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 B4 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の生育におけるスーパーオキシドジスムターゼの機能的重要性
Functional importance of superoxide dismutase in *Aspergillus nidulans*.
○金丸 京子[1]、前田 祐未子[2]、木村 真[2]、小林 哲夫[2] ([1]中部大応用生物、[2]名大院生命農)
○Kyoko KANAMARU[1], Yumiko MAEDA[2], Makoto KIMURA[2], Tetsuo KOBAYASHI[2] ([1]Chubu Univ., [2]Nagoya Univ.)

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は、細胞内で発生した活性酸素種 (ROS) を無毒化し、DNA やタンパク質、脂質の酸化を防止する重要な酵素である。細胞には Cu、Zn、Mn など重金属をコファクターにした SOD が複数存在し、細胞内の適切な場所に局在して機能する。

分生子形成に十分な酸素の供給が不可欠な糸状菌においても、SOD は細胞内の酸化防止に機能すると考えられるが、SOD の種類や糸状菌の生育における重要性についてほとんど解明されていない。本研究では、まず、*Aspergillus nidulans* のゲノム情報をもとに、SOD をコードする 5 つの推定 *sod* 遺伝子を選定した。そのうち、*sodA* は細胞質に局在する Cu-SOD であり、*sodB* はミトコンドリアに局在する Mn-SOD をコードすると推定された。各 *sod* 遺伝子の破壊株を作製したところ、ΔsodA と ΔsodB 株が酸化剤に対して感受性を示した。野生株、ΔsodA と ΔsodB 株の細胞抽出液を核、細胞質、ミトコンドリアに分画し、Native-PAGE 後の NBT 染色によって SOD 活性を検出した。その結果、*A. nidulans* では SodA と SodB が SOD 活性を示すタンパク質のバンドとして検出された。寒天培地上での生育速度、分生子数、分生子の発芽や菌糸伸長、エタノールや Tween20 などを炭素源にした生育を観察することで、SodA と SodB の細胞内 ROS の無毒化における重要性、細胞内での機能分担について考察する。

Superoxide dismutase (SOD) is an important enzyme that detoxifies reactive oxygen species (ROS) generated in cells and prevents oxidation of DNA, proteins, and lipids. Each cell contains multiple SODs co-factored with heavy metals such as Cu, Zn, and Mn, which localize and function at appropriate intracellular locations. In this study, we first selected five putative *sod* genes encoding SOD based on *Aspergillus nidulans* genomic information. Disruption strains of each *sod* gene were constructed, and the ΔsodA and ΔsodB strains were sensitive to oxidants. Cell extracts from wild-type, ΔsodA and ΔsodB strains were fractionated into nuclear, cytoplasmic and mitochondrial fractions, and SOD activity was detected by NBT staining after Native-PAGE. The rate of growth on agar medium, the number of spores, spore germination and mycelial elongation, and growth under carbon sources such as ethanol and Tween 20 were observed. The importance of SodA and SodB in detoxification of intracellular ROS and their role in *A. nidulans* will be discussed.

filamentous fungi, intracellular ROS, detoxification

講演番号：4B4a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 B4 会場

アカパンカビにおける分泌型ホスホリパーゼ A_2 の生理機能の解析

Analysis of physiological function of secretory phospholipases A_2 in *Neurospora crassa*

○中野 美羽[1]、有岡 学[1,2] ([1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Miwa NAKANO[1], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

ホスホリパーゼ A_2（Phospholipase A_2; PLA_2）はリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解し、1-アシルリゾリン脂質と脂肪酸を遊離する酵素である。このうち分泌型 PLA_2（secretory PLA_2; $sPLA_2$）は最大のグループを形成し、動物では重要な情報伝達系の酵素として研究が進められている。微生物由来の $sPLA_2$ については知見が乏しいが、当研究室では麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの $sPLA_2$ について生理学的、酵素学的な解析が行われ、分生子形成や酸化ストレス応答に関わる可能性が示唆されていた。本研究では同じく 2 つの $sPLA_2$ 遺伝子を持つアカパンカビ *Neurospora crassa* における $sPLA_2$ の機能の解明を目的として生理学的解析を試みた。

他グループからの先行研究で $sPLA_2$ 遺伝子である *NCU06650* の破壊株が温度感受性を示すと報告されていることから、本遺伝子ともう一つの $sPLA_2$ 遺伝子 *NCU09423* の単独破壊株および二重破壊株の酸化ストレスと高温ストレスに対する耐性を調べた。その結果全ての破壊株において生存率の低下が認められた。遺伝子相補株では耐性が回復し、また活性中心変異型遺伝子で相補した株では耐性が回復しなかったことから、$sPLA_2$ がその酵素活性を通じて酸化・高温ストレス応答に関わっている可能性が示唆された。また、qRT-PCR による発現解析の結果、酸化・高温ストレスによって $sPLA_2$ 遺伝子の発現が上昇すること、単独破壊株ではもう片方の $sPLA_2$ 遺伝子の発現上昇が抑制されることを見出した。現在、熱ショックタンパク質やカタラーゼの遺伝子発現との関連を調べることで $sPLA_2$ が関わる酸化・高温ストレス応答機構の更なる解明を試みている。

Phospholipase A_2 (PLA_2) is an enzyme that hydrolyzes the ester bond at the *sn*-2 position of phospholipids. Among these, secreted PLA_2 ($sPLA_2$) forms the largest group, and $sPLA_2$ from animals has been studied as an important signaling enzyme. In our previous study, two $sPLA_2$ genes in *A. oryzae* were analyzed physiologically and enzymatically, and we aimed to elucidate the function of two $sPLA_2$s in *N. crassa* by physiological analysis. It has been reported that high temperature sensitivity in the *NCU06650* deletion strain, so we measured the tolerance to oxidative and heat stresses in the single and double deletion strains of *NCU06650* and *NCU09423*. Decreased survival in all deletion strains, recovery in the complemented strains, and loss of recovery in the strains complemented by active center mutants indicated that $sPLA_2$ genes are involved in stress tolerance. Expression analysis demonstrated that $sPLA_2$ genes were upregulated in response to stress. We are now attempting to elucidate the underlying mechanism by examining the expression of heat shock protein and catalase genes.

secretory phospholipase A_2, *Neurospora crassa*, stress responses

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B4a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 B4 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPCR-G α 間相互作用の網羅的解析
Comprehensive analysis of GPCR-Gα interactions in *Aspergillus oryzae*
○坂元 勇月[1]、有岡 学[1,2] ([1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Itsuki SAKAMOTO[1], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は特異的なリガンドによる刺激を G タンパク質のαサブユニット（Gα）との相互作用を介して細胞内へと伝えている。麹菌 *Aspergillus oryzae* では 16 種類の GPCR と 3 種類の Gα（AoGpaA、AoGpaB、AoGanA）が配列上の特徴から同定されているが、どの GPCR と Gαが相互作用するのかは未解明である。そこで本研究では Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を用いて GPCR-Gα間相互作用の網羅的解析を行った。その結果 12 通りの相互作用が示された。また当研究における先行研究で *A. oryzae* の Gαシグナル伝達を抑制する Regulator of G protein Signaling (RGS) ドメインを持つ GPCR (AoGprK-1, AoGprK-2, AoGprR) をコードする遺伝子の多重破壊株で菌核形成が促進されたことから、Gαシグナル伝達と菌核形成の関係を解析した。菌核は菌糸が凝集してできる構造体で *A. oryzae* の耐久性に寄与する可能性が示唆されている。Gαの恒常的活性型変異体（$G\alpha^{QL}$ 株）および Gα破壊株（ΔGα株）を作製し表現型を観察したところ、$AoGpaA^{QL}$ 株で菌核数が上昇し、ΔAoGpaA 株で減少することがわかった。また、菌核形成に関わる転写因子 (*AonsdC*, *AonsdD*, *AosclR*) の発現は $AoGpaA^{QL}$ 株で増加していた。これらの結果から AoGpaA が菌核形成を促進することが示唆された。現在、本研究で AoGpaA との相互作用が示された 2 つの GPCR (AoGprM, AoGprO) と菌核形成の関連について解析を行っている。

G protein-coupled receptors (GPCRs) transmit stimuli from specific ligands into the cell via interaction with the α subunit of G proteins. In *Aspergillus oryzae*, 16 GPCRs and 3 Gα proteins (AoGpaA, AoGpaB, AoGanA) have been identified, but their selectivity has not been clarified. In this study, we performed a comprehensive analysis of GPCR-Gα interactions and showed 12 interactions using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assay. We also analyzed the relationship between Gα signaling and sclerotia formation, since a previous study in our laboratory showed that the disruption of genes encoding the Regulator of G protein Signaling (RGS) proteins which suppress Gα signaling in *A. oryzae* promoted sclerotia formation. We constructed constitutively active mutants of Gα ($G\alpha^{QL}$ strains) and disruptants of Gα (ΔGα strains) and observed their phenotypes. As a result, the number of sclerotia increased in $AoGpaA^{QL}$ strain and decreased in ΔAoGpaA strain. Besides, the expression levels of transcription factors (*AonsdC, AonsdD,* and *AosclR*) involved in sclerotia formation increased in $AoGpaA^{QL}$ strain. These results suggest that AoGpaA promotes sclerotia formation. We are currently studying the function of two GPCRs (AoGprM and AoGprO) that have been shown to interact with AoGpaA in this study.

GPCR, G protein, sclerotia

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B4a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 B4 会場

冬虫夏草サナギタケの *veA* 遺伝子破壊株の作出とその機能解析
The construction of *veA* gene knock-out strains and their functional analysis of *Cordyceps militaris*
○張 吉麗[1]、小野 晶子[1,2]、森井 風詩[3]、松田 里菜[1]、佐藤 匠[1]、三ッ國 佳祐[1]、崔 宰熏[3,4,5]、河岸 洋和[3,5]、道羅 英夫[4,5]、鈴木 智大[1,5]([1]宇都宮大・バイオ、[2]森林総合研究所、[3]静大・農、[4]静大・グリーン研、[5]静大・キノコ科研)
○JiLi Zhang[1], Akiko Ono[1,2], Futa Morii[3], Rina Matsuda[1], Takumi Sato[1], Keisuke Mitsukuni[1], Jae-Hoon Choi[3,4,5], Hirokazu Kawagishi[3,5], Hideo Dohra[4,5], Tomohiro Suzuki[1,5] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]FFPRI, [3]Fac. of Agr., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [5]Res. Inst. for Mushr. Sci., Shizuoka Univ.)

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、世界的に約 600 種が確認されている。その 1 種であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*）は栄養補助食品や漢方として広く利用されている。また、サナギタケには 2 つの交配型（MAT-α型および MAT-HMG 型）が存在することが明らかになっている。本研究で着目した VeA は、真菌に特異的に存在する Velvet family protein の 1 種であり、VelB と複合体を形成し、光による制御を受けて核内移行することで、真菌の様々な二次代謝に関与していることが明らかになっている。我々これまでに、サナギタケ NBRC 100741 株から分離した MAT-α型および MAT-HMG 型の比較ゲノム解析の結果から、MAT-α型において *veA* 遺伝子が偽遺伝子化していることを明らかにした。さらに、MAT-α型と MAT-HMG 型の遺伝子発現差解析を行った結果、MAT-α型で各種二次代謝に関わる遺伝子の発現が顕著に低下したことが確認された。そこで本研究では、サナギタケの *veA* 遺伝子破壊株を作出し、その機能解析を行うことを目的とした。アグロバクテリウム法を用いて、*veA* 遺伝子破壊株 6 株の作出に成功した。また、上記破壊株の菌糸体の表現型、分生子形成能、色素形成能、子実体形成能の評価を行った結果、MAT-HMG 型において正常に機能する *veA* 遺伝子を破壊することで、その表現型が MAT-α型に類似することが示唆された。

Cordyceps militaris is one of the insect pathogenic fungi widely used as a health supplement and Chinese medicine. Fungi are generally known to use reproductive strategies including two-generation cycles, asexual generation and sexual generation. *C. militaris* has two mating types, MAT-α and MAT-HMG. To date, our research group performed the comparative genome analysis between these two mating types, suggesting that the *veA* gene, which is a type of transcription factor, was specifically pseudogenized in the genome sequence of MAT-α type. Thus, *veA* gene knockout strains were constructed and characterized to identify the function of *veA* gene in *C. militaris* in the present study.As a result, a total of six *veA* knockout strains were successfully constructed using the Agrobacterium-mediated transformation. In order to examine the phenotype of the resulting knockout strains in detail, we evaluated the mycelial growth and the ability of conidia, fruiting body, and pigment formation of these strains. All the results obtained in this study indicated that knockout of the *veA* gene in the MAT-HMG type resulted in a phenotype similar to that of the MAT-α type.

veA gene, *Cordyceps militaris*, knock-out strains

講演番号：4B4a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 B4 会場

出芽酵母 *Ogataea naganishii* の一次ホモタリズムによる有性生殖の制御
Regulation of the mating type genes in *Ogataea naganishii*
○前川 裕美（九大院農）
○Hiromi MAEKAWA (Kyushu Univ.)

ホモタリズムは酵母の有性生殖の特徴の一つであり、子嚢菌出芽酵母においてはモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 3MAT 型及びメタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* の Flip-flop 型接合型変換機構が知られている。これらは二次ホモタリズムと呼ばれ、接合型遺伝子（MAT）近傍の相同配列を用いたゲノム変化を伴う。一方、一次ホモタリズムでは転写レベルでの制御機構が予想されるが、検証されていない。*O. polymorpha* の近縁種 *Ogataea naganishii* の MAT 領域には明らかな相同配列は見られない一次ホモタリズムとされており、異なる分子機構を持つと考えられる。同一染色体上に約 7kb 離れている 2 つの *MAT* 遺伝子座にコードされる a1, a2, α1, α2 遺伝子は栄養条件では発現せず、飢餓条件で転写誘導されることが分かった。*MAT* 遺伝子はどちらもセントロメアヒストン Cse4 領域内に位置しており、Cse4 に依存したサイレンシングを受けると考えられる。飢餓条件で転写量が上がるヒストン脱アセチル化酵素複合体 Rpd3L の構成因子の欠失により *MAT* 遺伝子の転写が低下することから、*MAT* 遺伝子発現はヒストン又は他のタンパク質のアセチル化による制御を受けることが示唆された。

Homothallism (self-fertile) by the three MAT and Flip-flop types of mating type switching has been investigated in Ascomyceteous budding yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Ogataea polymorpha*, which alter the mating type loci (MAT)-containing DNA sequence by utilising homologous sequences near MAT loci. Another type of homothallism, primary homothallism, is also reported in budding yeast, in which no genome rearrangements are predicted. *Ogataea naganishii*, closely related to *Ogataea polymorpha*, lacks the inverted repeats adjacent to the two MAT loci (one encodes **a** and the other alpha) essential for the Flip-flop type mating type switching. Investigation of the MAT expression revealed that all mating-type genes are repressed in nutrition-rich media and induced under starvation conditions. Both MATs reside in the centromere histone Cse4-containing region on the same chromosome and are likely subject to Cse4-dependent silencing. Continuous Cse4-occupancy at the MAT loci under starvation conditions suggested the MAT gene transcription is regulated at a level other than the Cse4 incorporation into the MAT regions. Deleting components of the histone deacetylase complex, Rpd3L, reduced the MAT gene expression, suggesting the primary homothallism in *O. naganishii* is regulated directly or indirectly by the Rpd3-dependent regulation of protein acetylation.

mating type, yeast, primary homothallism

発表責任者：前川裕美（hmaekawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4B4a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 B4 会場

エタノールは *adh1* 依存的に資化されアフラトキシン産生を増加させてしまう
Low-dose ethanol increases aflatoxin production due to the *adh1*-dependent incorporation of ethanol into aflatoxin biosynthesis
○古川 智宏[1]、久城 真代[1]、中川 博之[2]、榎元 廣文[3]、作田 庄平[3]([1]農研機構食品研、[2]農研機構分析研、[3]帝京大理工)
○Tomohiro FURUKAWA[1], Masayo KUSHIRO[1], Hiroyuki NAKAGAWA[2], Hirofumi ENOMOTO[3], Shohei SAKUDA[3] ([1]NARO・NFRI, [2]NARO・NAAC, [3]Teikyo Univ.)

アフラトキシンは既知の天然物質で最も強い発がん性を持つかびの有毒二次代謝産物であり，その産生調節メカニズムの解明と，産生抑制手法の開発が求められている。最近，エタノールのアフラトキシン産生抑制効果が報告されたが，我々は低濃度のエタノールが逆に *Aspergillus flavus* のアフラトキシン産生を増加させてしまうことを見出した。[1-^{13}C]-エタノールの添加により，^{13}C がアセチル CoA を経てアフラトキシン B_1 に取込まれることが明らかになり，質量分析の各同位体ピークの面積値の回帰分析から，アフラトキシン B_1 の産生増加分は [1-^{13}C]-エタノール取込み分と一致することがわかった。アルコール脱水素酵素遺伝子 *adh1* の破壊株では，アフラトキシン B_1 への [1-^{13}C]-エタノール取込みが大幅に減少し，*adh1* がエタノールの資化に関与していると考えられた。一方，1-プロパノール，1-ブタノールは低濃度から一貫してアフラトキシン産生阻害活性を示し，エタノールと異なりアフラトキシン産生抑制剤として有望と考えられる。

2-プロパノールについては，エタノールとは異なる経路でアフラトキシン生合成に取り込まれ，アフラトキシン産生量を増加させることを見出しており，本講演ではこれについても紹介したい。

Aflatoxins are potent carcinogens produced by some *Aspergillus* species, including *Aspergillus flavus*. Elucidation of the regulatory mechanism of its production and development of effective methods to prevent its contamination is required. Recently, ethanol has attracted attention as an inhibitor of aflatoxin production. However, we found that low-dose ethanol conversely increased aflatoxin production by *A. flavus*. It was revealed that ^{13}C of [1-^{13}C]-ethanol added to the culture was incorporated into aflatoxin via acetyl CoA. Regression analysis of the area values of the isotope peaks in the mass spectrum indicated that the increments in aflatoxin amount are equal to aflatoxin derived from [1-^{13}C]-ethanol. In the alcohol dehydrogenase gene *adh1* disruption strain, [1-^{13}C]-ethanol incorporation into aflatoxin was greatly reduced, indicating that *adh1* plays a key role in ethanol metabolism. On the other hand, 1-propanol and 1-butanol inhibited aflatoxin production in concentration-dependent manner, suggesting that they are promising agents for the control of aflatoxin contamination.

Interestingly, 2-propanol was also incorporated into aflatoxin biosynthesis by a different pathway than ethanol, and 2-propanol increased aflatoxin production more strongly than ethanol. These analyses will also be presented.

Aspergillus flavus, aflatoxin, ethanol

発表責任者：古川智宏（furukawat795@affrc.go.jp）

講演番号：4B4a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 B4 会場

希少糖 5-ケト-D-フルクトースの油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における代謝経路の解析

Metabolic pathway analysis of the rare sugar 5-keto-D-fructose in the oil yeast *Lipomyces starkeyi*

○田中 吾朗[1]、野寄 裕暉慧[1]、佐藤 里佳子[2]、高久 洋暁[2]、竹下 圭[3]、竹川 薫[1]（[1]九大院 生資環、[2]新潟薬科大 応生科、[3]伏見製薬所）
○Goro TANAKA[1], Yukie NOYORI[1], Rikako SATO[2], Hiroaki TAKAKU[2], Kei TAKESHITA[3], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Nigata Univ. of Pharmacy and Medical and Applied Life Sciences, [3]FUSHIMI Pharmaceutical Co., Ltd)

希少糖 5-ケト-D-フルクトース(5-KF)は、酢酸菌の「酸化発酵」による生成物の一つである。酢酸菌は生産した 5-KF を細胞内に取り込み、5-ケトフルクトースリダクターゼによりフルクトースへと変換して利用していることが最近報告された(Ngyen et al. J. Bacteriol, 203, e00558-20, 2021)。これまでに 5-KF を資化する真核微生物の報告および代謝に関する遺伝子の報告はないが、我々は油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* が 5-KF 資化能を有していることを見出した。そこで、5-KF 含有培地で特異的に発現量が上昇する遺伝子を RNA-seq および RT-qPCR により探索・解析した。その結果、複数の遺伝子が 5-KF 含有培地で発現が上昇することが分かった。さらに、これらの遺伝子の持つ推定機能より、*L. starkeyi* における 5-KF 代謝経路を予測した。

また代謝に関与する遺伝子について大腸菌用にコドンを最適化した DNA を合成して、大腸菌 pCold プラスミドに連結して発現・精製を試み、本タンパクを高度に精製することができた。得られた精製酵素を用いた酵素活性測定の結果もあわせて報告し、*L. starkeyi* の新規代謝経路を明らかにしたい。

The rare sugar 5-keto-D-fructose (5-KF) is one of the products of "oxidative fermentation" by acetic acid bacteria. It was recently reported that acetic acid bacteria take the produced 5-KF into their cells and convert it to fructose by 5-ketofructose reductase for utilization (Ngyen et al. J. Bacteriol, 203, e00558-20, 2021). Although there have been no reports of eukaryotic microorganisms that can capitalize 5-KF or genes related to its metabolism, we found that the oilseed yeast *Lipomyces starkeyi* has the ability to capitalize 5-KF. Therefore, we searched for and analyzed genes whose expression levels were specifically upregulated in 5-KF-containing medium by RNA-seq and RT-qPCR. As a result, we found that several genes were upregulated in 5-KF-containing medium. Based on the presumed functions of these genes, we predicted the metabolic pathway of 5-KF in *L. starkeyi*.

We also synthesized codon-optimized DNA for the genes involved in metabolism for E. coli and linked it to the E. coli pCold plasmid for expression and purification, and were able to highly purify this protein. The results of enzyme activity assay using the purified enzyme obtained will also be reported to clarify the novel metabolic pathway of *L. starkeyi*.

5-KF, *Lipomyces starkeyi*, Sorbitol dehydrogenase

講演番号：4B4a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 B4 会場

分裂酵母のミトコンドリア局在型 NAD(H) kinase Pos5 は CoQ 合成に関与する
Mitochondrial NAD(H) kinase Pos5 affects CoQ biosynthesis in *S. pombe*

○西原 昇瑚[1]、西田 郁久[2]、柳井 良太[3]、松尾 安浩[1,3,4]、戒能 智宏[1,3,4]、川向 誠[1,3,4]（[1]島根大院・自然科学、[2]新潟大・日本酒学、[3]島根大・生物資源、[4]島根大・農生命科学系）
○Shogo NISHIHARA[1], Ikuhisa NISHIDA[2], Ryota YANAI[3], Yasuhiro MATSUO[1,3,4], Tomohiro KAINO[1,3,4], Makoto KAWAMUKAI[1,3,4] ([1]Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., Shimane Univ., [2]Sakeol. Ctr., Niigata Univ. (SCNU), [3]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [4]Inst. of Agricul. and Life Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q (CoQ, ユビキノン) は電子伝達系の必須因子である。当研究室では、これまでに CoQ_{10} を生合成する分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 生合成酵素遺伝子を同定してきた。CoQ のキノン骨格は、水酸化、メチル化、脱炭酸化が行われるため、様々な基質や補酵素が必要と考えられるが、その詳細は不明である。そこで、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーの中からミトコンドリア関連遺伝子の破壊株を用いて CoQ 量を測定し、CoQ 生合成に関与する遺伝子の探索を行った。その結果、CoQ_{10} 量が野生株の約 0.2 倍に減少していた *Δpos5* 株を見出した。Pos5 は、局在解析とオルソログである出芽酵母 Pos5 を用いた相補試験の結果、ミトコンドリア局在型 NAD(H) kinase であることが示唆され、ミトコンドリア内の NADP(H)生成を担っていると考えられる。そこで、Pos5 のミトコンドリア移行シグナル (MTS) を削った ΔMTSPos5 を *Δpos5* 株に発現させると、CoQ が検出できなかった。一方で、MTS を付加した出芽酵母のサイトゾル局在型 NAD^+ kinase Utr1 を *Δpos5* 株に発現させると CoQ 量がコントロール株の約 1.3 倍に回復していた。CoQ 合成経路において間接的に NAD(P)H を利用する反応として Coq6 が考えられた。*Δpos5* 株に Coq6 を過剰発現させると、CoQ 量はベクター株の約 1.7 倍に増加していた。これらの結果から、Pos5 が Coq6 の反応を介して CoQ 合成に関与していることが示唆された。現在、ミトコンドリア画分の NADP(H)量を測定中である。

Coenzyme Q (CoQ) is an essential component of the electron transport, and ten genes involved in *S. pombe* CoQ biosynthesis have been identified in our laboratory. To identify the novel genes for CoQ biosynthesis, we screened the Bioneer deletion library, and found the *Δpos5* strain produced 0.2-fold decreased CoQ content. Pos5 appeared to be a mitochondrial NAD(H) kinase based on its localization and complementation test using Pos5 ortholog from *S. cerevisiae*. We constructed mitochondrial transit signal (MTS)-deleted Pos5 (ΔMTSPos5) and MTS fused *S. cerevisiae* cytosolic NAD^+ kinase (MTS-Utr1), and expressed them in the *Δpos5* strain. CoQ was detected in *Δpos5* cells expressing MTS-Utr1 but not that expressing ΔMTSPos5. Among the CoQ biosynthetic protein, only Coq6 (monooxygenase) is thought to utilize NADPH. Therefore, we overexpressed *coq6* in the *Δpos5* strain and found CoQ_{10} content was increased to 1.7-fold of that without its expression. These results indicated that Pos5 is involved in CoQ biosynthesis probably via the Coq6 reaction. Measurement of NADPH level in mitochondria of *Δpos5* cells is underway.

CoQ, Fission yeast, NADP(H)

講演番号：4B4a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 B4 会場

独立栄養性細菌 *Thermodesulfatator indicus* が有する未知のセリン生合成経路の探索

Search for the unknown serine biosynthesis pathway in the autotrophic bacterium *Thermodesulfatator indicus*

○若島 朋幸[1,2]、福山 宥斗[3]、島村 繁[4]、常松 奈緒[1]、布浦 拓郎[3]、千葉 洋子[1,5]([1]理研環境資源科学、[2]筑波大院生物、[3]JAMSTEC 生命理工、[4]JAMSTEC 超先鋭、[5]筑波大生命環境)
○Tomoyuki WAKASHIMA[1,2], Yuto FUKUYAMA[3], Shigeru SHIMAMURA[4], Nao TSUNEMATSU[1], Takuro NUNOURA[3], Yoko CHIBA[1,5] ([1]CSRS, RIKEN, [2]Biology, Univ. of Tsukuba, [3]CeBN, JAMSTEC, [4]SUGAR, JAMSTEC, [5]Life and Env., Univ. of Tsukuba)

硫酸還元型の化学合成独立栄養細菌である *Thermodesulfatator indicus* は、その増殖特性からセリン生合成能を有することが明らかである。しかし、本菌の遺伝子情報からはセリン生合成経路が推定できないことから、未知の経路もしくは酵素を用いていることが示唆される。そこで本菌のセリン生合成経路を探索した。

まず、炭素安定同位体（^{13}C）トレース実験を行ったところ、糖新生系の中間産物を出発物質とする既知のリン酸化経路でセリンが生合成されていることが示唆された。一方、*T. indicus* は本経路の最終反応を担う phosphoserine phosphatase (PSP) の遺伝子を欠く。そのため、本種が既知の PSP ホモログではない新規 PSP を有する可能性があると考え、*T. indicus* の菌体破砕液を用いて活性測定を行った。その結果 PSP 活性が検出され、^{13}C トレース実験で推定されたリン酸化経路によるセリンの生合成の存在が裏付けられた。さらに、*T. indicus* の PSP 活性には、既知の PSP には認められない補酵素依存性が確認された。本会では PSP 活性測定の詳細と、特定された *T. indicus* のセリン生合成経路についての考察を紹介する。

Thermodesulfatator indicus is expected to have a serine biosynthesis pathway because it grows chemolithoautotrophically. However, the serine biosynthesis pathway cannot be identified from the genome information, suggesting that *T. indicus* uses an unknown pathway or enzyme for it. Therefore, we aimed to identify the serine biosynthesis pathway in this bacterium.

First, stable carbon isotope (^{13}C) tracing experiments were performed, suggesting that serine is synthesized through the known phosphorylated pathway which provide serine from phosphoserine. *T. indicus* lacks the gene for phosphoserine phosphatase (PSP), which catalyzes the last reaction in this pathway. In contrast, the cell lysate of *T. indicus* showed PSP activity. Furthermore, the PSP activity showed a characteristic coenzyme dependency which has not been observed in known PSPs. These data strongly suggested that *T. indicus* has a novel PSP that is not homologous to known PSPs and synthesize serine via the phosphorylated pathway.

amino acid metabolism, serine biosynthesis, enzyme activity

発表責任者：若島朋幸（tomoyuki.wakashima@riken.jp）

講演番号：4B4a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 B4 会場

プラスミド保持に伴う負荷を回避するための代謝制御様式の解明
Host metabolism reducing fitness cost imposed by plasmid carriage
○日高 聖覚[1]、水口 千穂[1,2]、鈴木 研志[1,2]、岡田 憲典[1]、岡橋 伸幸[3]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]阪大院・情報)
○Masaaki HIDAKA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kenshi SUZUKI[1,2], Kazunori OKADA[1], Nobuyuki OKAHASHI[3], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Osaka Univ)

プラスミドは宿主に様々な新規形質を付与する一方で、その保持は宿主に負荷を及ぼすことがある。当研究室の過去の研究で、*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株において、様々な不和合性群のプラスミドを保持させても宿主に負荷が生じない「プラスミド非感受性」が見出された。過去の研究では、分解プラスミド pCAR1PK 保持に伴い負荷が生じた Tn*5* 変異株を 2 種類取得し、トランスクリプトーム解析を行った結果、プラスミド非感受性の発揮には硫黄代謝系の主要転写制御因子である CysB と、その制御下の 3 つの転写制御因子 (SpiR1～3) が重要な役割を果たすことが示された。本研究では CA10dm4R(pCAR1PK)株と、当該株のプラスミド感受的な変異株 (2 つの Tn*5* 変異株、*spiR3* 破壊株) を用いてメタボローム解析を行うことで、プラスミド非感受性が発現するメカニズムの解明を目的とした。各株をコハク酸を唯一の炭素源とする培地で対数増殖期まで培養し、細胞内の代謝産物をメタノールで抽出後、CE-TOFMS で解析したところ 216 種の化合物が検出された。主成分分析の結果、変異株は野生型株と比べ異なる代謝プロファイルを示した。更に、その違いはシステイン代謝やグルタミン酸代謝、及びペントースリン酸経路上の化合物の増加に起因し、これらの経路がプラスミド非感受性の発揮に重要である可能性が示唆された。

Plasmids can provide new traits to host bacteria, while plasmid carriage sometimes imposes fitness costs on the host. Our previous study showed that *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 can avoid the fitness costs imposed by plasmid carriage (“plasmid insensitivity”). The transcriptional network consists of CysB, a master regulator of sulfur metabolism, and three CysB-regulated transcriptional regulators (SpiR1~3) were suggested to play essential roles for the plasmid insensitivity. Here we performed metabolome analysis using the wild-type strain CA10dm4R(pCAR1PK) and three mutant strains (two Tn*5* mutants and the deletion mutant of *spiR3*). The cells were grown until early log-phase on mineral media supplemented with succinate as a sole carbon source. Intracellular metabolites were extracted with methanol and analyzed by CE-TOFMS. Principal component analysis revealed differences between the wild-type and the mutant strains. Compared to the wild-type strain, higher amounts of the compounds related to cysteine metabolism, glutamate metabolism and pentose phosphate pathway were detected in the mutants, suggesting that these metabolic pathways are important for the plasmid insensitivity.

Pseudomonas, plasmid, metabolome analysis

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B4a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 B4 会場

代謝改変によるリグニン由来芳香族分解菌 *Sphingobium lignivorans* SYK-6 株へのグルコース資化能の付与とメチオニン要求性の解除

Metabolic engineering of *Sphingobium lignivorans* SYK-6 to confer glucose metabolic capacity and remove methionine auxotrophy

○水出 暁登、加藤 諒、上村 直史、政井 英司（長岡技科大・物質生物）
○Akito MIZUIDE, Ryo KATO, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

リグニン由来のさまざまな芳香族化合物を分解できる *Sphingobium lignivorans* SYK-6 株を活用したリグニンからの物質生産が期待されている。しかし、SYK-6 株は汎用的な増殖基質であるグルコースを利用できず、メトキシ基を有するリグニン由来芳香族化合物以外を炭素源とした場合にメチオニン(Met)要求性を示す。本研究は、SYK-6 株にグルコース資化能を付与し、Met 要求性を解除することを目的とした。SYK-6 株はグルコースを取り込めないと推定されたため、グルコースを利用可能な *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 株のグルコース輸送体遺伝子を同定し、SYK-6 株に導入した。その結果、グルコースでの生育が示された。SYK-6 株の 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸（5,10-メチレン-THF)レダクターゼ（MetF)は通常の逆反応を触媒するため Met 生合成に必要な 5-メチル-THF を 5,10-メチレン-THF から作ることができない。そこで SYK-6 株に DSM 12444 株の一般型 *metF* を導入したが、Met 要求性は解除されなかった。次に SYK-6 株に存在しない Met シンターゼ遺伝子 *metH* を *metF* と共に導入した結果、SYK-6 株は Met 非存在下での生育能を獲得した。本研究の一部は、JST 共創の場形成支援プログラム JPMJPF2104 の支援を受けて実施した。

Sphingobium lignivorans SYK-6, one of the best-characterized lignin-degrading bacteria, is expected to be used to produce valuable products from lignin. However, SYK-6 cannot utilize glucose and exhibits methionine (Met) auxotrophy when using a carbon source other than lignin-derived aromatic compounds with a methoxy group. This study aimed to create a strain of SYK-6 that could grow on glucose and had no Met auxotrophy. Since SYK-6 was thought to be unable to take up glucose, the glucose transporter genes from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 that could utilize glucose were identified and introduced into SYK-6. Then SYK-6 cells with the transporter genes were able to grow using glucose as a carbon source. It was found that 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-methylene-THF) reductase (MetF) of SYK-6 catalyzed the reverse reaction of the general MetF. Therefore, 5-methyl-THF, required for Met biosynthesis, is not produced from 5,10-methylene-THF. We then introduced the general type of *metF* from DSM12444 into SYK-6. However, the Met auxotrophy was still not removed. Finally, the methionine synthase gene *metH*, which is absent in SYK-6, was introduced together with *metF*. As a result, SYK-6 cells acquired the ability to grow in the absence of Met.

lignin, metabolic engineering, *Sphingobium lignivorans* SYK-6

発表責任者：政井 英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4B4a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 B4 会場

Rhodococcus qingshengii N9T-4 株の *n*-アルカン分解機構の解明
Identification of *n*-alkane degrading enzymes in *Rhodococcus qingshengii* N9T-4
○佐藤 佑香[1]、小尾 信博[1]、吉田 信行[1]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2] ([1]静大・院総合科技、[2]静大・グリーン研)
○ Yuka SATO[1], Nobuhiro OBI[1], Nobuyuki YOSHIDA[1], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,2] ([1]Grad.Sch.Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST.)

Rhodococcus qingshengii N9T-4 株は，日本の備蓄原油中から単離され，低温環境である 15℃でも 30℃と同様に *n*-アルカンを唯一の炭素源として生育可能である．我々は，低温環境における本菌株のアルカン分解の分子機構の解明を目指して研究を行っている．先行研究の結果から，本菌株のアルカン分解には AlkB を含む複数の因子が寄与すると示唆された．*alkB* 遺伝子をすべて破壊した六重破壊株を用いてミニトランスポゾン変異株ライブラリーを構築した．その後，炭素数 14 のアルカン（テトラデカン）を代謝できず，その推定分解産物であるテトラデカノールを代謝できる変異株を選抜したところ，ミニトランスポゾンはプラスミド pN9T4-2 上に存在する *cyp153*$_{\text{pN9T4-2}}$ 遺伝子とその転写制御を担う *cypR*$_{\text{pN9T4-2}}$ 遺伝子に集中して挿入されていた．ガスクロマトグラフィーを用いたアルカン分解試験を実施した結果，*cyp153*$_{\text{pN9T4-2}}$ 変異株および *cypR*$_{\text{pN9T4-2}}$ 変異株はアルカン資化能を完全に失っていることが示された．30℃条件下では，六重破壊株のアルカン分解の進行が野生型株に比べて遅かったことから，AlkB が 30℃のアルカン分解に寄与すると考えられた．一方 15℃条件下では，六重破壊株と野生型株のアルカン分解の様子に違いが認められなかったことから，低温環境のアルカン分解には，AlkB ではなく Cyp153$_{\text{pN9T4-2}}$ が主要な酵素として寄与することが示唆された．現在，破壊された遺伝子の相補実験と，野生型株を用いた *cyp153*$_{\text{pN9T4-2}}$ 遺伝子破壊株の作製を行っている．

Rhodococcus qingshengii N9T-4 was isolated from Japanese crude oil reserves and can grow at 15°C as well as at 30°C, with n-alkane as the sole carbon source. We are studying the molecular mechanism of alkane degradation in low-temperature environments. A transposon mutant library using six *alkB*-gene-deleted strain was constructed. As a result, we succeeded in obtaining 18 mutant strains that could not grow on tetradecane as a carbon source. The transposon was inserted in *cyp153*$_{\text{pN9T4-2}}$ gene and the *cypR*$_{\text{pN9T4-2}}$ gene, which is responsible for its transcriptional regulation. Alkane degradation tests using gas chromatography showed that the *cyp153*$_{\text{pN9T4-2}}$ and *cypR*$_{\text{pN9T4-2}}$ mutants lost their alkane degradation ability. The lack of difference in alkane degradation between the *alkB* deletion mutant and wild-type strains at 15°C suggests that Cyp153$_{\text{pN9T4-2}}$ is the major enzyme contributing to alkane degradation in the low-temperature environment. We are currently constructing complementation experiments of the disrupted genes and generating *cyp153*$_{\text{pN9T4-2}}$ gene disruption strains.

Rhodococcus, alkane degradation, Cytochrome P450

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4B4a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 B4 会場

Rhodococcus sp. LC-2 株のルミクロム分解機構の解明
Lumichrome-degradation mechanism in *Rhodococcus* sp. LC-2
○塩田 大地[1]、土肥 裕希[1,2]、高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○Daichi Shiota[1], Yuki Doi[1,2], Naoki Takaya[1,2] ([1]Institute of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Microbiology Research Center for Sustainability, University of Tsukuba)

【目的】リボフラビンはフラビン酵素の補酵素である FAD や FMN の前駆体であり、自然環境中に広く存在する。細胞外に漏出したリボフラビンの一部は、光分解や微生物酵素によってルミクロムへと変換されるが、その環境動態は明らかにされていない。本研究では、ルミクロム分解菌である *Rhodococcus* sp. LC-2 株を用いて、微生物によるルミクロム分解機構の解明を目的とした。
【結果】ルミクロム存在下では、LC-2 株が有する線状プラスミド上の遺伝子クラスター（GM6114-6140）の転写量に顕著な増加が認められた。本菌株のルミクロム分解能は、当該遺伝子クラスター内の遺伝子の破壊によって大きく低下したことから、この遺伝子クラスターがルミクロム分解に寄与することが示された。GM6131 遺伝子にコードされているシトクロム P450 水酸化酵素は、ルミクロムのメチル基部位を水酸化した。GM6140、GM6139、GM6134 遺伝子にコードされていた酵素タンパク質は、ルミクロム/水酸化ルミクロムのピリミジン環部位の開裂（GM 6140）、開裂部位のカルバモイル基の脱離（GM6139）およびアミノ基の脱離（GM6134）反応をそれぞれ触媒した。これらから、LC-2 株のルミクロム分解には、水酸化反応を経由する経路と経由しない経路が存在することが示唆された。

-BACKGROUNDS- Riboflavin is a precursor of FAD and FMN known as coenzyme for flavin enzymes and widely presents in the natural environments. Lumichrome is a derivative of riboflavin, which is generated by photolysis and/or bacterial enzyme reactions, but the environmental dynamics of the lumichrome remain unclear. This study identified bacterial lumichrome-degradation pathway using a lumichrome-degrading bacteria *Rhodococcus* sp. strain LC-2.
-RESULTS- In the strain LC-2, the lumichrome-responsive gene cluster (GM6114-6140) was found on a linear plasmid. The lumichrome-degrading capacity decreased by disruption of those genes, which indicated that proteins encoded in the gene cluster was essential for the lumichrome degradation in LC-2. Methyl group of lumichrome was hydroxylated by cytochrome P450-like oxidoreductase encoded by the GM6131 gene. The pyrimidine ring of lumichrome/hydroxylumichrome was cleaved by hydantoinase-like protein encoded by the GM6140 gene to carbamoyl- and amino-group. Subsequently, the carbamoyl-group was eliminated by GM6139 protein and then the amino-group was deaminated by GM6134 protein. These results indicated that lumichrome is degraded via the hydroxylation and/or non-hydroxylation pathway in LC-2.

lumichrome, riboflavin, cytochrome P450

講演番号：4B4a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 B4 会場

ダイズ根由来のイソフラボン分解菌の単離と分解特異性の解析
Isolation and degradation specificity analysis of isoflavone-degrading bacteria from soybean roots
○佐藤 友昭[1]、松田 陽菜子[1]、高松 恭子[1]、青木 愛賢[1]、安藤 晃規[2]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、増田 幸子[3]、柴田 ありさ[3]、白須 賢[3]、島﨑 智久[4]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京大生存圏、[2]京大院農・応用生命、[3]理研 CSRS、[4]北大院理)
○Tomoaki SATO[1], Hinako MATSUDA[1], Kyoko TAKAMATSU[1], Noritaka AOKI[1], Akinori ANDO[2], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Sachiko MASUDA[3], Arisa SHIBATA[3], Ken SHIRASU[3], Tomohisa SHIMASAKI[4], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]RIKEN CSRS, [4]Faculty of Sci. Hokkaido Univ.)

根圏とは植物の根から影響を受ける土壌領域である。植物は根圏へ種々の特化代謝物を分泌することが知られており、ダイズの根から分泌されるイソフラボンは、根粒菌の根粒形成や根圏微生物叢形成に関与する。ダイズ根圏細菌によるイソフラボン代謝を理解することは、ダイズと根圏微生物の相互作用の分子機構解明につながる。これまでに、ダイズ根から単離されたダイゼイン分解菌 V35 株（*Variovorax* sp.）と A79 株（*Acidovorax* sp.）を用いた遺伝子の機能解析より、イソフラボン代謝遺伝子群 isoflavone catabolism（*ifc*）gene cluster を見出し、これら単離菌のゲノムにイソフラボンの酸化的な代謝経路が存在すると推定された。本研究では、根圏細菌によるイソフラボン分解の特異性を解析し、構造の異なるイソフラボンが土壌微生物叢形成に及ぼす影響を評価した。

V35 株、A79 株、*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 株のイソフラボン分解能の特異性を確認するため、3 種類のイソフラボン（ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン）を用いて分解試験を行った。また、3 種類のイソフラボンを添加した土壌から抽出した DNA の 16S rRNA アンプリコンシークエンス解析を行ったところ、グリシテイン添加土壌で特徴的な微生物叢の形成が見出された。さらに、ダイズ根内の細菌をグリシテインを栄養源とした培地で集積培養し、新たにイソフラボン分解菌を単離した。現在、これらの菌株のイソフラボン分解の特異性や遺伝子の解析を行っている。

Soybean roots secrete a variety of isoflavones into the rhizosphere. Isoflavones are symbiotic signals for rhizobial symbiosis and are also involved in modulating rhizosphere microbial community. We previously isolated daidzein-degrading bacteria from soybean roots and found an isoflavone catabolism (*ifc*) gene cluster by their genome analysis. In this study, we conducted the isoflavone degradation assay of rhizosphere bacteria toward various isoflavones and evaluated the effect of those metabolites on the structure of soil microbial community.

To verify the specificity of the isoflavone degradation capacity of 3 bacterial strains isolated from soybean rhizosphere, we analyzed degradation activities using 3 isoflavones: daidzein, genistein, and glycitein. We also performed 16S rRNA amplicon sequencing of the extracted DNA from the soil treated with those isoflavones and found the distinctive communities of glycitein-treated soil. We are currently isolating glycitein-degrading bacteria and analyzing their metabolic functions.

isoflavone catabolism, rhizosphere bacteria, soybean

講演番号：4B5a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 B5 会場

共有結合型核内受容体リガンドの抗炎症作用における構造－活性研究

Structure-activity study of covalent ligands for nuclear receptor on anti-inflammation

○宮澤 しなの [1]、酒井 美紗 [1]、大前 勇馬 [2]、繁森 英幸 [3,4]、宮前 友策 [3] ([1] 筑大院 T-LSI、[2] 筑大院 SIGMA、[3] 筑大生命環境、[4] 筑大 MiCS)
○ Shinano MIYAZAWA[1], Misa SAKAI[1], Yuma OMAE[2], Hideyuki SHIGEMORI[3,4], Yusaku MIYAMAE[3] ([1]Univ. of Tsukuba, T-LSI, [2]Univ. of Tsukuba, SIGMA, [3]Univ. of Tsukuba, ILES, [4]Univ. of Tsukuba, MiCS)

核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor （PPAR）γは、リガンド依存的な転写因子として知られ、生体の炎症応答に関わる。現在まで様々な PPARγリガンドが報告されてきたが、PPARγの転写活性に対する機能と炎症抑制の関係性を包括的に明らかにした研究は少ない。本研究室では以前、PPARγの不可逆的アンタゴニストである GW9662 と、植物由来の桂皮酸誘導体の構造をあわせもつ化合物群の設計及び合成が行われ、PPARγの転写活性に対するリガンドの機能を明らかにした。本研究ではこれらの化合物の抗炎症活性を評価し、リガンドの機能との相関を明らかにすることを目的とした。各化合物の抗炎症活性は、LPS 刺激下の RAW264 細胞において放出される一酸化窒素及び interleukin-6 (IL-6)の産生量を測定することによって評価した。その結果、PPARγと共有結合を形成するリガンドは炎症マーカーの産生を強く抑制した。一方、非共有結合型リガンドは比較的弱い活性を示した。また、共有結合型リガンドのうち、パーシャルアゴニストとアンタゴニストではほぼ活性が変わらなかった。これらの結果から PPARγに対する共有結合形成能が炎症抑制活性に重要であり、転写機能に対する作用の有無と直接関係しないことが示唆された。

PPARγ is a ligand-activated transcription factor that is involved in cellular inflammatory response. Although various types of ligands have been reported, little is known about the relationship between molecular function and anti-inflammatory effect. Previously, our research group synthesized a series of PPARγ ligands that have combined structure of GW9662, an irreversible PPARγ antagonist, and cinnamic acid derivatives. In addition, the functions of synthesized ligands on transcription activity of PPARγ were reported. In this study, we investigated the relationship between the function and anti-inflammatory effects of PPARγ ligands. The anti-inflammatory effects of test compounds were assessed by measuring the level of interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide in LPS-stimulated RAW64 cells. The results showed that the covalent ligands strongly suppressed the biomarker level in transcription level while the non-covalent ligands showed relatively weak effects. In addition, among the covalent ligands, the partial agonist and antagonist show little difference. These results suggest that the ability of covalent binding to PPARγ is important while the function on transcription activity may not be directly related to inflammation suppression.

PPARγ, Anti-inflammation, Covalent ligand

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B5a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 B5 会場

アゾ基を導入した核内受容体リガンドの合成と生物活性評価

Synthesis and bioactivity evaluation of nuclear receptor ligands that bear azo group

○酒井 美紗[1]、繁森 英幸[2,3]、宮前 友策[2] ([1]筑大院 T-LSI、[2]筑大生命環境、[3]筑大 MiCS)
○Misa SAKAI[1], Hideyuki SHIGEMORI[2,3], Yusaku MIYAMAE[2] ([1]Univ. of Tsukuba, T-LSI, [2]Univ. of Tsukuba, ILES, [3]Univ. of Tsukuba, MiCS)

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)は、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である。これまで当研究グループでは、不可逆的アンタゴニスト GW9662 と食品由来桂皮酸誘導体（CA）の構造をリンカーにより接続した、PPARγ に対し高い親和性を有する種々の共有結合型リガンド群の取得に成功した。その過程で、両構造ユニットの接続における配向性が、PPARγ に対する作動性の発現に重要であることを見出した。一方、リンカー構造の種類が PPARγ との相互作用やその分子機能に与える影響については十分調査されていない。本研究では、両構造ユニットの連結部位が芳香環同士の接続から成ることに着目し、アゾ基のリンカーとしての利用可能性について検討を行った。

アゾ基を介して、GW9662 のアニリン環のパラ位、またはメタ位に CA を接続した ***p*-Azo** 及び ***m*-Azo** を設計した。全 5 工程の化学合成により ***p*-Azo** を総収率 26%で、また ***m*-Azo** を総収率 6%で得た。さらに、得られたアゾベンゼン誘導体の転写活性を、レポーターアッセイにより評価した。その結果、***p*-Azo** は PPARγ の転写活性を濃度依存的に抑制する、逆アゴニストであることが示唆された。

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) is a transcriptional factor that belongs to nuclear receptor superfamily. Previously, our research group developed a new type of covalent PPARγ agonists, which have hybrid structure of the irreversible antagonist GW9662 and a food-derived cinnamic acid derivative (CA) connected by linkers. We also found that the orientation of both units for linkage is important for the agonism. However, it has not been fully investigated whether the structure of linkers affects the interaction with PPARγ and its function. By focusing on that the position connecting two units consists of the concatenation of aromatic rings, this study aimed to examine the availability of azo group as an alternative linker.

We designed ***p*-Azo** and ***m*-Azo** with CA connected to the *para* or *meta* position of the aniline ring of GW9662 via an azo group. Through 5 steps of chemical synthesis, ***p*-Azo** *and* ***m*-Azo** were successfully obtained in total yield of 26% and 6%, respectively. Luciferase reporter assay revealed that ***p*-Azo** inhibited the transcriptional activity of PPARγ in a concentration-dependent manner, suggesting that it behaves as an inverse agonist.

PPARγligand, azobenzene, inverse agonist

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B5a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 B5 会場

褐藻ノコギリモク由来メロテルペノイド化合物のアミロイドポリペプチド凝集阻害活性
Amyloid polypeptide aggregation inhibitory activity of meroterpenoids from the brown algae Sargassum macrocarpum

○戸澤 悠太[1]、堀内 真郁[2]、篠田 清哉[2]、栗本 慎一郎[3]、関口 光広[2]、宮前 友策[4]、繁森 英幸[4,5]([1]筑波大理工情報生命、[2]石川県大生物資源環境、[3]岡山大医歯薬、[4]筑波大生命環境、[5]筑波大 MiCS)
○Yuta TOZAWA[1], Mafumi HORIUCHI[2], Seiya SHINODA[2], Shin-ichiro KURIMOTO[3], Mitsuhiro SEKIGUCHI[2], Yusaku MIYAMAE[4], Hideyuki SHIGEMORI[4,5] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech. Univ. of Tsukuba, [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Okayama Univ., [4]Fac. Life Environment Sci. Univ. of Tsukuba, [5]MiCS Univ. of Tsukuba)

アルツハイマー型認知症（AD)および 2 型糖尿病（T2D)は、根本治療法が確立していないことから大きな健康問題になっている。AD では脳内でアミロイド β（Aβ）が、T2D では膵臓でヒト膵島アミロイドポリペプチド（hIAPP)が凝集して蓄積し、細胞死を引き起こすことで発症へつながると考えられている。本研究では、能登産褐藻ノコギリモクより単離し構造決定された 19 個のメロテルペノイド化合物について、Aβ42 および hIAPP 凝集阻害活性を評価した。

チオフラビン-T（Th-T)アッセイにより、Aβ42 および hIAPP 凝集阻害活性を評価した結果、全ての化合物が用量依存的に活性を有しており、Aβ42 および hIAPP の線維伸長を阻害していることが明らかとなった。また、透過型電子顕微鏡（TEM)を用いた画像解析では、化合物が Aβ42 および hIAPP の凝集を阻害していることが直接観察された。化合物の構造と活性を比較すると、*p*-キノン構造よりも *p*-ハイドロキノン構造を有する化合物の方が強い活性を有することが明らかとなった。

本研究によって、ノコギリモクの新たな利用価値を創出できるほか、AD および T2D の予防法の開発への貢献が期待される。

Alzheimer's disease (AD) and type 2 diabetes (T2D) have become major health problems due to the lack of established basic treatments. In AD, amyloid β (Aβ) accumulates in the brain, while in T2D, human islet amyloid polypeptide (hIAPP) aggregates and accumulates in the pancreas, leading to the onset of the disease by causing cell death. In this study, 19 meroterpenoid compounds isolated and structurally determined from the brown algae Sargassum macrocarpum from Noto were evaluated for their inhibitory activity against Aβ42 and hIAPP aggregation.

Using the thioflavin T (Th-T) assay, all compounds showed dose-dependent activity, indicating that they inhibited fiber elongation of both Aβ42 and hIAPP. In addition, transmission electron microscopy (TEM) image analysis directly observed the inhibition of Aβ42 and hIAPP aggregation by the compounds. When the structure and activity of the compounds were compared, it was found that compounds with a *p*-hydroquinone structure had stronger activity than those with a *p*-quinone structure. This research is expected to create new uses for Sargassum macrocarpum and contribute to the development of preventive methods for AD and T2D.

Amyloid polypeptide, Brown alga, Meroterpenoids

発表責任者：戸澤悠太（tozawa.yuta.au@alumni.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B5a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 B5 会場

細菌ヒスチジンキナーゼを阻害するナフトキノン誘導体の合成と生物活性評価
Synthesis and biochemical characterization of naphtoquinone derivatives that inhibit bacterial histidine kinases

○石川 彰彦[1]、江口 陽子[2]、五十嵐 雅之[3]、岡島 俊英[4]、林 千草[3]、谷 昭義[5]、小早川 千衣[5]、春田 純一[5]、内海 龍太郎[4] ([1]岡大院教育、[2]近大生物理工、[3]微化研、[4]阪大産研、[5]阪大院薬)
○Teruhiko ISHIKAWA[1], Yoko EGUCHI[2], Masayuki IGARASHI[3], Toshihide OKAJIMA[4], Chigusa HAYASHI[3], Akiyoshi TANI[5], Chie KOHAYAKAWA[5], Jun-ichi HARUTA[5], Ryutaro UTSUMI[4] ([1]Okayama Univ., [2]BOST Kindai Univ., [3]BIKAKEN, [4]Sanken Osaka Univ., [5]Osaka Univ.)

Waldiomycin はヒスチジンキナーゼ（HK）阻害剤であり、ATP 結合領域には影響を与えず HK の H-box 領域に作用する。Waldiomycin のナフトキノン部分構造が H-box 領域との相互作用に重要と考えられるが、本研究では、その部分構造を模倣的に簡略化する分子設計により、新規 HK 阻害剤の開発を行った。構造活性相関の調査のため、種々の 2-アミノナフトキノン、及びナフト［2, 3-*d*］イソオキサゾール-4, 9-ジオンを合成した。これらの化合物について、*B. subtilis* 増殖に必須の HK である WalK に対する阻害活性、及び最小阻害濃度を調査したところ、新規 HK 阻害剤が見出された（IC_{50}: 12.6～305 μM、MIC: 0.5～128 μg/ml）。また 4 種のナフトキノン誘導体について WalK/WalR 調節遺伝子の発現に対する影響を調査したところ、それら誘導体は WalK/WalR システムによって負に制御される *iseA*（*yoeB*、細胞壁加水分解酵素）の発現を誘導した。HK 阻害ナフトキノン誘導体が waldiomycin と同様な相互作用を有するか確認するため AS/MS 実験を行ったところ、３種の誘導体が waldiomycin の WalK への結合を競合的に阻害することが明らかとなり、ナフトキノン誘導体が H-box 領域に結合し HK 活性を阻害することが示唆された。

Waldiomycin[1] is a inhibitor of histidine kinase (HK), acting on the H-box region of HK without affecting the ATP binding region. The naphthoquinone moiety of waldiomycin is important to interact with the H-box region. In this study, we developed new HK inhibitors through molecular design that mimics and simplifies the moiety. To evaluate the structure-activity relationships, various 2-aminonaphthoquinones and naphtho [2,3-*d*] isoxazole-4,9-diones were synthesized. These compounds were tested for their inhibitory activity against WalK, an essential HK for *B. subtilis* growth, and their MICs. As a result, novel HK inhibitors were obtained. The effect of representative derivatives on the expression of WalK/WalR regulated genes in *B. subtilis* was investigated. Four naphthoquinones induced the expression of *iseA* (*yoeB*, a cell wall hydrolase), whose expression is negatively regulated by the WalK/WalR system. Affinity selection/mass spectrometry analysis was performed to identify whether these naphthoquinones act on WalK similarly to waldiomycin. Three derivatives were found to competitively inhibit the binding of waldiomycin to WalK, suggesting that they bind to the H-box region and inhibit HK activity.

1. Eguchi et al., *J Antibiot (Tokyo)*, **70**, 251, 2017.

histidine kinase inhibitor, H-box, synthesis

発表責任者：石川彰彦（teruhiko@cc.okayama-u.ac.jp）

講演番号：4B5a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 B5 会場

細菌ヒスチジンキナーゼを阻害するナフトキノン誘導体の阻害メカニズム
Inhibition mechanism of naphthoquinone derivatives that inhibit bacterial histidine kinases
○江口 陽子[1]、櫻井 一正[2]、玉置 和也[1]、石川 彰彦[3]、岡島 俊英[4]、五十嵐 雅之[5]、内海 龍太郎[4]
([1]近大生物理工、[2]近大先端技術研、[3]岡大院教育、[4]阪大産研、[5]微化研)
○Yoko EGUCHI[1], Kazumasa SAKURAI[2], Kazuya TAMAKI[1], Teruhiko ISHIKAWA[3], Toshihide OKAJIMA[4], Masayuki IGARASHI[5], Ryutaro UTSUMI[4] ([1]BOST Kindai Univ., [2]Inst. Adv. Tech. Kindai Univ., [3]Okayama Univ., [4]Sanken Osaka Univ., [5]BIKAKEN)

抗生物質が効かない多剤耐性菌問題には抗菌剤の新しい標的が必要である。我々は細菌に広く保存される情報伝達系である２成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼ（HK）を新しい標的として捉え、HK の活性化領域である H-box（自己リン酸化部位であるヒスチジン残基を中心とした領域）に結合して阻害する化合物を探索している。すでに H-box 阻害剤として見出された waldiomycin[1] をもとに合成されたナフトキノン誘導体をスクリーニングした結果、waldiomycin と競合的に HK に結合することが予想される HK 阻害剤が得られた。これら HK 阻害剤の阻害メカニズムの解明を本研究の目的とした。H-box 周辺が標的かどうかを検討するために大腸菌の HK である EnvZ を使用した。H-box が含まれる二量体化ドメイン（$EnvZ_{223-289}$）を ^{15}N で標識し、NMR を用いた ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル測定より各アミノ酸残基のシグナルを得た。ここに HK 阻害剤を加え、$EnvZ_{223-289}$ のどの残基が影響を受けるかを検討した。その結果、waldiomycin は H-box 付近と２本目のαヘリックスの上方領域に影響するのに対し、化合物 2o では H-box 付近と２本目のα-helix の下方領域への影響が認められた。現在、NMR 解析と EnvZ の部位特異的変異体を用いて化合物 2o およびその他の HK 阻害剤の阻害メカニズムをさらに検討している。

New targets for antimicrobial agents are needed to address the problem of multidrug resistance in pathogens. Considering the two-component system, a signal transduction system widely conserved among bacteria, as a novel drug target, we are searching for sensor histidine kinase (HK) inhibitors, specifically those that bind to the H-box region (a conserved region containing the autophosphorylated His). Screening of naphthoquinone derivatives that were synthesized based on the previously discovered H-box inhibitor, waldiomycin[1], resulted in the identification of HK inhibitors that were expected to bind to HK competitively with waldiomycin. To investigate whether these HK inhibitors targeted the H-box region, we used the EnvZ HK from *Escherichia coli*. The dimerization domain containing the H-box ($EnvZ_{223-289}$) was labeled with ^{15}N and subjected to ^{1}H-^{15}N-HSQC experiment. We further added the HK inhibitors to examine which residues were affected. Whereas waldiomycin affected the H-box area and the upper region of the second α-helix, compound 2o affected the H-box area and the lower region of the second α-helix. Currently, we are further investigating the inhibition mechanism of compound 2o and others.

1 Eguchi et al., *J Antibiot (Tokyo)*, **70**, 251, 2017.

histidine kinase inhibitor, H-box, NMR

発表責任者：江口陽子（eguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4B5a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 B5 会場

コレラ菌 Na^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素に対する阻害剤の作用機構の解明

Elucidating the action mechanism of inhibitors against Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○石川 萌[1]、岸川 淳一[2]、桝谷 貴洋[1]、村井 正俊[1]、加藤 貴之[3]、Barquera Blanca[4]、三芳 秀人[1]
([1]京大院農、[2]京都工繊大応生、[3]阪大蛋白研、[4]レンセラー工科大)
○Moe ISHIKAWA[1], Jun-ichi KISHIKAWA[2], Takahiro MASUYA[1], Masatoshi MURAI[1], Takayuki KATO[3], Blanca BARQUERA[4], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]KIT, [3]IPR, [4]RPI)

Na^+輸送性 NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (NQR) は、基質の酸化還元と共役して Na^+を輸送する膜タンパク質複合体である（**図 1**）。本酵素はコレラ菌などの病原性細菌の生育に必須であり、ミトコンドリアに存在する H^+輸送性 NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）とは進化的にも構造的にも全く異なるため、選択性に優れた抗菌剤の創薬標的として期待できる。現在、NQR の強力な阻害剤として aurachin D-42（AD）と korormicin A（KR）の２つが報告されている。我々はこれまでに、AD および KR が結合した状態のコレラ菌 NQR のクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）構造を明らかにした（**図 1**）。これによって、柔軟な NqrB サブユニットの N 末端領域が阻害剤結合時に固定化されることが明らかにできたが、詳細な作用機構は不明なままである。本研究では作用機構研究をさらに進展させるため、KR に対して耐性を示す変異酵素の構造解析を実施すると同時に、等温滴定カロリメトリーによって結合親和性の定量的評価を行った。

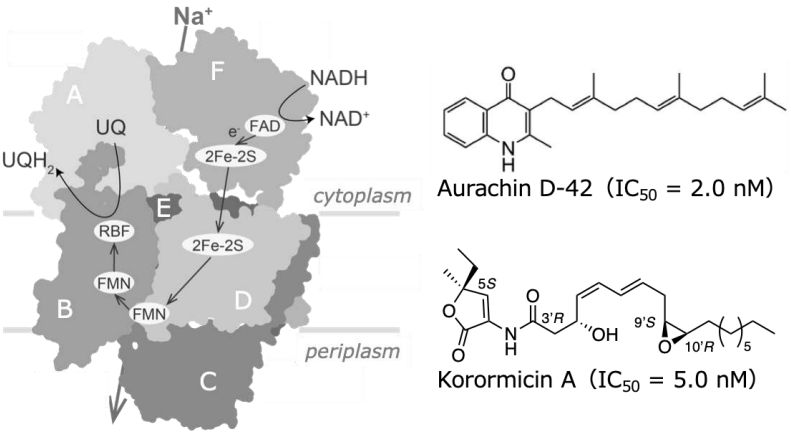


図 1. コレラ菌 NQR の cryo-EM 構造と阻害剤構造.

The Na^+-pumping NADH-ubiquinone (UQ) oxidoreductase (NQR) couples electron transfer from NADH to UQ with Na^+-pumping, playing an essential role in the energy consumption of pathogenic bacteria. Since NQR is structurally unrelated to H^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase (respiratory complex I), it is a promising target for highly selective antibiotics. Now, only two regents are known as potent Na^+-NQR inhibitors: korormicin A (KR) and aurachin D-42 (AD). Although we previously revealed the structures of *V. cholerae* Na^+-NQR with or without bound inhibitor by single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM), the detailed inhibitory mechanism of these inhibitors remains elusive. In the present study, we focused on the mutant of Na^+-NQR resistant to KR ($G141A^{NqrB}$) because finding the factor(s) responsible to the resistance may allow us to understand how KR inhibits the enzymatic mechanism of Na^+-NQR. We analyzed the structure of $G141A^{NqrB}$ Na^+-NQR with bound KR by cryo-EM under different conditions. We also quantitatively evaluated the binding affinity of KR to WT or $G141A^{NqrB}$ enzyme by isothermal titration calorimetry.

inhibitor, redox, cryo-EM

発表責任者：石川萌（ishikawa.moe.83u@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B5a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 B5 会場

アオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化ペプチド Pc-1 の活性化部位の探索

Search for the active site of TRPV1 activating peptide Pc-1 from slug caterpillar (*Parasa consocia*) venom

○川村 有、岡咲 洋三、勝崎 裕隆（三重大院生資）
○Yuu Kawamura, Yozo Okazaki, Hirotaka Katsuzaki (Mie Univ.)

アオイラガ(*Parasa consocia*)はチョウ目イラガ科の昆虫で、その幼虫には多数の棘が存在する。棘が皮膚に触れると激しい痛みが引き起こされ、原因として棘の先端から分泌される液によるものと考えられている。痛みの研究においては、痛みと密な関係があると示唆されている transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)が着目されている。TRPV1 は活性化されると Ca^{2+}が細胞内に流入する。先行研究より、アオイラガ幼虫分泌液から単離された TRPV1 活性化ペプチド Pc-1 のアミノ酸配列などが決定されている。本研究では、Pc-1 の活性化部位の探索を目的とした。

Pc-1 において、現在活性があると考えている断片 2 か所それぞれについて、更に細かく分けた 3~6 残基のペプチドを Fmoc 固相合成法で合成した。合成した断片を RP-HPLC により分取した。分取した画分について TRPV1 活性化試験を行った。その結果、活性化の見られた断片配列が複数見られた。活性が見られた 3~6 残基断片において、同一のアミノ酸配列を含むことが確認された。AlphaFold2 を用いたシミュレーションにより 3 残基の配列部分をクモ毒の DkTx などと比較した。それらの結果をもとに、同一の配列部分それぞれ 3 残基を合成し、TRPV1 活性化試験を行ったところ、活性がみられた。

Parasa cosocia is an insect of the Lepidoptera Limacodidae family. The caterpillars of *parasa consocia* has poisonous hair. Touching the poisonous hair cause a pain. In pain research, transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), which has been suggested to be closely related to pain. The amino acid sequence of Pc-1, a TRPV1 activating peptide isolated from *parasa consocia* has been determined from previous studies. The purpose was to explore the active site of Pc-1.

For each of the two currently active fragments of Pc-1, peptides of 3-6 residues were synthesized by Fmoc solid-phase synthesis. The synthesized fragments were purified by RP-HPLC. The fragments activated the TRPV1 receptor on the activated test. The 3 to 6 residue fragments that showed activity contained the same amino acid sequences. The 3 residue sequences were compared to spider venom DkTx and other venoms by AlphaFold2 simulation. Based on these results, we synthesized 3 residues of the sequence and performed the TRPV1 activation test, which showed activity.

TRPV1, venom, parasa consocia

講演番号：4B5a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 B5 会場

ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液「Pll-3」の TRPV1 活性化部位の探索

Search for TRPV1 active sites in Pll-3 peptide derived from *Parasa lepida lepida*

○井畑 柊馬、大西 真吾、岡咲 洋三、勝崎 裕隆（三重大院生資）
○Shuma IBATA, Shingo ONISHI, Yozo OKAZAKI, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

ヒロヘリアオイラガ（*Parasa lepida lepida*）は鱗翅目イラガ科の昆虫であり、幼虫はサクラやカキの木に生息している。イラガ科幼虫は日本では電気虫とも呼ばれるように、体表の毒針毛に触れると激しい痛みが生じる。この痛みの原因物質は毒針毛から出される分泌液によるものと考えられている。痛みに関連する受容体として transient receptor potential vanilloid 1（TRPV1）が挙げられる。この受容体は活性化によって Ca２＋が細胞内に流入する。先行研究によって、ヒロヘリアオイラガ幼虫から TRPV1 を活性化させる物質として Pll-3 が単離され、シスチンノットモチーフを持った 31 残基からなるペプチドであることが判明した。本研究では、Pll-3 の活性化部位の探索を目的とした。

Pll-3 をトリプシン酵素処理によって断片化した結果、24-31 断片での活性の消失が見られた。AlphaFold2 を用いた立体構造予測の結果から、酵素がβヘアピンと予測される部分を切断していることが判明した。そこでβヘアピンを含むと予測される 16-31 断片を Fmoc 固相合成法で合成したところ、TRPV1 活性を示した。また、Cys 残基を Ala 残基に置き換えた断片でも活性を示した

Parasa lepida lepida is an insect of the *lepidopteran* family *Limacodidae*, and its larvae inhabit cherry and persimmon trees. In Japan, larvae of the *Limacodidae* family are also known as "denki mushi" (meaning electrically charged insect in Japanese) because contact with the urticating hairs on their bodies can cause intense pain. The substance responsible for this pain is believed to be a secretion from the urticating hairs. The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor is related to the pain sensation. Activation of TRPV1 leads to the influx of Ca^{2+} into the cell. Previous studies have identified Pll-3 as a substance from *Parasa lepida lepida* larvae that activates TRPV1. Pll-3 is a peptide consisting of 31 residues with a cysteine motif. The aim of this study was to explore the active site of Pll-3. As a result of trypsin enzyme treatment, fragmentation of Pll-3 led to the disappearance of activity in the 24-31 fragment. Based on the predicted three-dimensional structure using AlphaFold2, it was revealed that the enzyme cleaved a region predicted to be a ß-hairpin. Therefore, a fragment spanning residues 16-31, predicted to include the ß-hairpin, was synthesized using Fmoc solid-phase synthesis, and it exhibited TRPV1 activity. The fragments with cysteine residues replaced by alanine also showed activity.

TRPV1, venom, *Parasa lepida lepida*

講演番号：4B5a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 B5 会場

ヤエヤマサソリ毒液に含まれる K^+チャネル毒素類似ペプチドの殺虫活性の評価
Evaluation of insecticidal activity of K^+ channel toxin-like peptides in the venom of scorpion *Liocheles australasiae*

○熊谷 木香、岸本 拓実、中川 好秋、宮下 正弘（京大院農）
○Konoka Kumagai, Takumi Kishimoto, Yoshiaki Nakagawa, Masahiro Miyashita (Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液は多くの生理活性ペプチドによって構成され、その中には殺虫性を示すものがある。当研究グループにおいては、これまでにヤエヤマサソリの毒液の分析を進めてきたが、成分として K^+チャネル毒素類似 (KTx) ペプチドが多く存在することを明らかにしている。KTx ペプチドは構造や活性をもとに 7 つのファミリーに分類されるが、ヤエヤマサソリ毒液においては特に α タイプの KTx ペプチドが多く確認された。しかしながら、これらのペプチドの生理活性については不明であった。そこで本研究においては、これらの α-KTx ペプチドの中に殺虫活性を示すものがあると推定し、その活性評価をおこなった。さらに、殺虫活性を示したペプチドについては、その活性発現に重要なアミノ酸残基について調べた。
【結果】ヤエヤマサソリ毒液中で存在が確認され、合成が完了している 4 種の α-KTx ペプチドについて、コオロギに対する注射法により殺虫活性を評価した。その結果、このうちの一つ（La-αKTx1）が殺虫活性（LD_{50} =16 nmol/g）を示すことが分かった。さらに、La-αKTx1 の配列中の塩基性あるいは芳香族性アミノ酸残基を Ala に置換した類縁体を合成し、それらの殺虫活性を評価した。その結果、C 末端領域の ^{35}Lys ならびに ^{37}Tyr 残基を置換した類縁体の活性が大幅に低下したことから、これらが殺虫活性発現に重要であると分かった。

Scorpion venom is a complex mixture of bioactive substances. The main components of the venom are peptides, some of which show insecticidal activity. In our previous study, we identified a variety of potassium channel toxin-like (KTx) peptides the *Liocheles australasiae* venom. KTx peptides are further classified into 7 families based on their structure and activity. In the *L. australasiae* venom, many α-KTx peptides were identified, but their bioactivity remains unknown. In this study, we evaluated the insecticidal activity of these peptides. The result of biological evaluation showed that one of the α-KTx peptides (La-αKTx1) has insecticidal activity (LD_{50} =16 nmol/g) against crickets. To further identify amino acid residues important for the insecticidal activity of La-αKTx1, analogues in which basic or aromatic residues in its sequence were substituted with Ala were synthesized and evaluated for their insecticidal activity. The result indicated that ^{35}Lys and ^{37}Tyr residues in the C-terminal region were particularly important for the activity of La-αKTx1.

Scorpion venom, Insecticidal peptides, Neurotoxin

発表責任者：宮下　正弘（miyashita.masahiro.6e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B5a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 B5 会場

Androctonus australis サソリ毒液由来の殺虫性ペプチドである AaIT5 の化学合成
Chemical synthesis of an insecticidal peptide AaIT5 identified from the *Androctonus australis* scorpion venom

○堺 祥一、中川 好秋、宮下 正弘（京大院農）
○Shoichi SAKAI, Yoshiaki NAKAGAWA, Masahiro MIYASHITA (Kyoto university)

【目的】AaIT5 は北アフリカ・中東地域に生息するサソリである *Androctonus australis* の毒液から同定された 61 残基の殺虫性ペプチドであり、4 つのジスルフィド結合をもつ。AaIT5 は、Na^+チャネルに作用するサソリ毒素ファミリー（β-toxin）に分類されるが、他の毒素とは異なり鱗翅目昆虫に対して比較的強い活性を持つことが示唆されている。しかし、毒液から得られる量が少ないこともあり、その生理活性については不明な点が多い。そこで本研究では、詳細な活性の評価を目的として、AaIT5 を化学合成した。

【方法・結果】AaIT5 の直鎖前駆体の合成は、2 つのペプチドを縮合させる native chemical ligation 法を用いておこなった。AaIT5 の配列中には、ペプチド伸長反応中に異性化（アスパルトイミド化）を起こす Asp-Gly 配列が 2 カ所存在する。そこで、Asp-Gly 間のアミド結合が修飾されたジペプチドである Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH を用いることで、この副反応が起こらないようにした。得られた直鎖前駆体ペプチドを、グルタチオンを含む酸化還元緩衝液に加えて撹拌することで 4 つのジスルフィド結合を形成させた。得られたペプチドは鱗翅目昆虫 (*Spodoptera litura*) ならびに直翅目 (*Acheta domesticus*) に対して毒性を示したことから、AaIT5 が正しく合成できていることが確認できた。

AaIT5 is an insecticidal peptide identified from the venom of the scorpion *Androctonus australis*, which inhabits the North African and Middle Eastern regions. The peptide consists of 61 residues cross-linked with four disulfide bridges and belongs to the β-toxin family that exhibits insect-specific activity by acting on Na^+ channels. Previous study suggested that AaIT5, unlike other β-toxins, has relatively potent activity against lepidopteran insects. However, due to the limited amount of AaIT5 obtained from the venom, little is known about its activity. In this study, we chemically synthesized AaIT5 to evaluate its insecticidal activity in detail. The linear precursor was synthesized by the native chemical ligation method, in which two peptide segments are condensed. A protected-dipeptide Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)Gly-OH, in which the amide bond between Asp and Gly is modified, was used to prevent a side reaction (aspartimide formation). Disulfide bridge formation was conducted using a glutathione redox buffer. The synthesized peptide showed toxicity both against lepidopteran (*Spodoptera litura*) and orthopteran (*Acheta domesticus*) insects, indicating that AaIT5 was successfully obtained.

scorpion venom, peptide, chemical ligation

発表責任者：宮下正弘（miyashita.masahiro.6e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B5a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 B5 会場

MA026 の TJ 開口における Claudin-1 依存性検討

Investigation of Claudin-1 dependence on TJ opening of MA026

○向山 海凪、南雲 陽子、臼井 健郎（筑波大・生命環境）
○Minagi MUKAIYAMA, Yoko NAGUMO, Takeo USUI (Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】 上皮組織で細胞同士を密着させているタイトジャンクション（Tight Junction: TJ）は、外界からの異物侵入を防ぐバリア機能を担っているが、同時にバイオ医薬品をはじめとする難吸収性薬剤の吸収障壁にもなっており、これらの投与に注射や点滴など侵襲的手法が必要な原因となっている。我々は TJ を薬剤投与時のみ一時的に緩めること（可逆的 TJ 開口）により、難吸収性薬剤の非侵襲的投与が可能になると考え、化合物探索や作用機構解析を進めている。*Pseudomonas* sp.から単離された環状デプシペプチド MA026 は、TJ 形成に必須なタンパク質 Claudin-1 (Cld1) との相互作用が示唆されており、可逆的に TJ を開口させる化合物である。そこで本研究では、細胞レベルでの MA026 と Cld1 間相互作用を解析することで、Cld1 の分子標的としての役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 MA026 が Cld1 との相互作用により TJ 開口を引き起こすならば、Cld1 を発現していない細胞では MA026 による TJ 開口作用が減弱し、Cld1 のみを発現する細胞では MA026 による TJ 開口活性が顕著になると考えられる。そこで MDCK II 細胞を元に、Cld1 のみを破壊した細胞、及び Cld1 のみを発現する細胞を構築し、MA026 による TJ 開口活性を検討したので報告する。

Tight junctions (TJ) are intercellular barriers between epithelial cells that separate the internal and external environments of cellular sheets, and control invasion of foreign substances and a diffusion of solutes and water across the epithelium. Macromolecules such as biologics with high molecular weight and hydrophilicity are unable to diffuse through the lipid bilayer of the cell membrane. Control of TJ opening by attenuating the barrier function of TJ has proved to be attractive because it could allow safe and controllable transepithelial administration of macromolecules.

MA026, a cyclic depsipeptide, is a natural product isolated from *Pseudomonas* sp. It was recently suggested that MA026 binds to claudin-1. Because claudin is the essential component of TJ complex, we investigated the effects of MA026 on TJ and found that MA026 opens TJ reversibly. Here, we examined the involvement of claudin-1 in the TJ opening by MA026, using claudin-1 knock-out and knock-in experiments.

Tight Junction, epithelial, Claudin

発表責任者：臼井 健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B5a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 B5 会場

プレニルフラボノイド化合物モルシン処理したマウス精子の運動能および体外受精で得た胚の発生に対する影響
Effects of morusin, a prenylflavonoid compound, on mouse sperm motility and the development of embryos obtained by in vitro fertilization with the treated sperm
○荒舘 忠、谷井 一郎（富山大・教養教育院　生物学）
○Tadashi ARADATE, Ichiro TANII (Univ. of Toyama, Medical Bio)

哺乳類精子の受精には精子鞭毛の大きな振幅を特徴とする超活性化運動が必須である。我々は、精子活性化剤の開発を目指してマウス精子の超活性化を誘導する植物成分を探索し、ヤマグワ根皮からプレニルフラボノイド化合物、モルシン(MS)、クワノン A(KA)、クワノン T(KT)を分離した。これらの成分で処理した精子による体外受精において、MS(10~20 μM)処理精子による体外受精率が有意な上昇を示した。それから、精子運動解析装置(SMAS)による各成分で処理した精子の評価および MS(20 μM)処理精子による受精卵の発生に影響が無いか調べるために、2 細胞期胚を偽妊娠マウスの卵管へ移植を行った。SMAS による測定では、MS 処理精子は曲線速度と高速運動精子の割合が有意に上昇した。胚移植において、仔マウスの出生率はコントロール(0.25%EtOH)処理群と比較して有意な差はなかった。よって、マウス精子の MS 処理は、曲線速度を上昇させることで体外受精率を向上させ、マウス受精卵の発生に影響はなかった。

We searched for plant components that induce mouse sperm hyperactivation with the aim of developing sperm activators, and isolated three prenylflavonoids, morusin (MS), kuwanon A (KA), and kuwanon T (KT), from Yamaguwa (*Morus australis*) root bark. On in vitro fertilization (IVF) by sperm treated with these compounds, MS (10~20 μM)-treated sperm was a significant increase in the IVF rate. Thence, the motility of sperm treated with those compounds were evaluated by a Sperm Motility Analysis System (SMAS), and to investigate whether there was no effect on the development of fertilized eggs, two-cell stage embryos from IVF by sperm treated with/without MS were transferred into the oviducts of pseudopregnant mice. In analysis by SMAS, MS (20 μM)-treated sperm was significantly elevated curvilinear velocity and percentage of fast motile sperm. In embryo transfers, the birth rates of the offspring mice obtained by embryos with MS-treated sperm were not significantly different compared with those of the control (0.25%EtOH)-treated group. Thus, MS-treatment of mouse sperm was increased the IVF rate by elevating their curvilinear velocity and had no effect on the development of fertilized mouse eggs.

sperm hyperactivation, in vitro fertilization, embryo transfer

発表責任者：荒舘　忠（aradate@las.u-toyama.ac.jp）

講演番号：4B5a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 B5 会場

イネにおける非タンパク質性アミノ酸β-チロシンのジャポニカ品種特異性についての遺伝学的・化学的研究

Genetic and chemical studies on *japonica* rice-specific distribution of nonproteinogenic amino acid β-tyrosine in rice

○阪本 駿太[1]、吉川 貴徳[2]、吉永 直子[1]、佐藤 豊[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]遺伝研ゲノム・進化)
○Shunta SAKAMOTO[1], Takanori YOSHIKAWA[2], Naoko YOSHINAGA[1], Yutaka SATO[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]National Institute of Genetics)

栽培イネ（*Oryza sativa* L.）には，ジャポニカ品種とインディカ品種 2 つの主要な亜種が存在し，それぞれ独自の形質をもつ．近年われわれは，そうした種内の多様な形質のひとつとして，ジャポニカ品種（日本晴）から植物界で新規な非タンパク質性アミノ酸である（*R*)-β-チロシンおよび β-チロシン生合成を担う遺伝子チロシンアミノムターゼ（*TAM1*）を同定した．さらに，*TAM1*・β-チロシンはインディカ品種と比べてジャポニカ品種に特徴的だとわかった．しかし，ジャポニカ品種が亜種分化の過程で *TAM1*・β-チロシンを獲得したのか，インディカ品種が欠失したのか，いまだ明らかではない．そこで本研究では，栽培イネにおける *TAM1*・β-チロシンの進化の軌跡を明らかにするため，栽培イネの直接祖先である野生イネ *Oryza rufipogon* に着目した．そして，遺伝的・地理的に多様な *O. rufipogon* 110 系統における *TAM1*・β-チロシンの有無を調べた結果，インディカ品種が亜種分化の過程で *TAM1*・β-チロシンを欠失したと考えた．

There are two major subspecies of cultivated rice (*Oryza sativa* L.), *japonica* rice and *indica* rice, each with unique traits. Recently, we identified a novel nonproteinogenic amino acid, (*R*)-β-tyrosine, and the gene responsible for β-tyrosine biosynthesis, tyrosine aminomutase (*TAM1*), in the *japonica* cultivar Nipponbare as one of the examples of intraspecific diversity in cultivated rice. Furthermore, we found *TAM1* and β-tyrosine were more characteristic of *japonica* rice than *indica* rice. However, it is still unclear whether the *japonica* cultivars acquired *TAM1* and β-tyrosine or whether the *indica* cultivars lacked them during the subspeciation. Therefore, we focused on wild rice *Oryza rufipogon*, the direct ancestor of cultivated rice to understand the evolutionary trajectory of *TAM1* and β-tyrosine in cultivated rice. In this study, we investigated the presence/absence of *TAM1* and β-tyrosine in 110 genetically and geographically diverse accessions of *O. rufipogon* and found that *indica* rice lacked *TAM1* and β-tyrosine during the subspeciation.

wild rice, intraspecific diversity, evolution

発表責任者：阪本駿太（sakamoto.shunta.44m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B5a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 B5 会場

代謝フロー研究を見据えた Dead carbon 化コオロギの作出の試み
Dead carbonized-cricket for investigation of metabolic flow
○永田 晋治[1]、清家 瞳[1]、祝 貞[1]、伊藤 茂[2]、河野 重行[3] ([1]東大院新領域、[2]パレオ・ラボ、[3]機能性バイオ)
○Shinji NAGATA[1], Hitomi SEIKE[1], Zhen Zhu[1], Shigeru ITO[2], Shigeyuki KAWANO[3] ([1]GSFS Univ of Tokyo, [2]Paleo Labo, [3]Functional Bio)

【背景と目的】体内における物質フローはこれまで安定同位体や特定化合物を用いた放射性同位体を用いて研究されている。一方で、体内の物質フローをマクロの視点で分析するためには、特定化合物を追跡するだけでは体全体としての栄養分や代謝物の消長を総合的にとらえる必要がある。そこで本研究では、C12 以外の同位体を含まない炭素(Dead carbon)で構成された生物を調整することで、C13 や C14 を含む Modern carbon を追跡することを体全体のレベルで実現させることを目指している。本大会では Dead carbon 化(DC 化)の昆虫を試みたことを報告する。
【方法と結果】DC 化した藻類を餌としたフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を飼育する実行的な生態系を構築したことを報告する。最終的には 48%以上の DC 化効率で DC 化コオロギの作出に成功した。このことは、将来的に昆虫の代謝系を体全体で考えた物質フローを研究するだけでなく、コオロギを餌として DC 化マウスの調整などに応用できる可能性を秘めている。

The experimental strategies for tracing the flow of metabolites and nutrients in the body have been studied using stable isotopes and radioisotopes of specific compounds so far. In order to analyze substance-flow throughout the body, it is necessary to capture the total flow of metabolites and nutrients in the body by tracking non-specific compounds. The present study aims to achieve this by preparing animals composed of dead-carbon that does not contain isotopic atoms other than C12. Then, tracking modern carbon, containing C13 and C14 would support to overview of the flow of metabolites and nutrients. In this conference, we successfully prepared dead-carbonized insects (DC-insects) using two spotted cricket, *Gryllus bimaculatus* by feeding on DC-algae. Resulting DC-crickets exhibited over 48% of DC conversion efficiency. This indicates the potential for further applications not only to future researches on the metabolic flow in insects at a whole-body level, but also to the application for DC-ized mice by DC-crickets as dietary source.

Cricket, Deadcarbon, metabolism

講演番号：4C2a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 C2 会場

耐熱性カビ *Hamigera avellanea* と動物細胞との共培養による新規天然物の探索

Search for new natural products by co-culturing *Hamigera avellanea* with animal cells

○岩田 千怜[1]、齋藤 駿[1]、矢口 貴志[2]、荒井 緑[1] ([1]慶應大理工、[2]千葉大真菌セ)
○Chisato IWATA[1], Shun SAITO[1], Takashi YAGUCHI[2], Midori ARAI[1] ([1]Fac. Sci. Tech., Keio Univ., [2]Med. Myc. Res. Cent., Chiba Univ.)

これまで真菌からは有用な二次代謝物が多数単離されてきたが、近年新規化合物の報告は減少傾向にある。一方で真菌の生合成遺伝子の多くは通常の実験室条件下では休眠状態であることが明らかになり、休眠遺伝子を活性化できれば新規化合物の取得に繋がると考えられている。我々のグループはヒトと微生物の相互作用に着目し、微生物と動物細胞との共培養により新規化合物の取得に成功している[1]。これまで本共培養は微生物の至適温度である 28 ℃で行っていたが、細胞の至適温度である 37 ℃の方が動物細胞と菌はより相互作用するのではないかと考えた。そこで高温でも生存可能な耐熱性カビに着目し動物細胞と 37 ℃で共培養することにより、新規化合物の取得を目指した。

千葉大学真菌医学研究センター保有の耐熱性カビ 3 属 8 種 8 株とマウスマクロファージ様細胞 J774.1 との共培養を行った。その結果、*Hamigera avellanea* と J774.1 との共培養において 2 つの化合物の産生量が共培養時に増加することを見出した。これらの化合物を単離し構造解析した結果、1 つを 4-hydroxybenzaldehyde (Hav1) と同定し、もう 1 つを新規化合物 *N,N'*-((1*Z*,3*E*)-1-(4-hydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)buta-1,3-diene-2,3-diyl)diformamide (Hav2) であると推定した。さらに、それぞれの化合物が免疫細胞の NO 産生へ与える影響を評価したところ、Hav2 は IC_{50}=52.4 μM で NO 産生阻害活性を示した。

Most of actinomycetes and fungi have a multitude of silent biosynthetic genes. Activating of silent genes is important for production of new natural products. Our group designed a co-culture method based on the interaction between microorganisms and animal cells, and succeeded in isolating new compounds. In previous studies, microorganisms and cells were co-cultured at 28 °C, the optimal temperature for microorganisms. However, microorganisms and cells might interact better at 37 °C, the optimal temperature for cells. In this study, animal cells were cultured with heat-resistant molds that can survive at 37 °C. As a result, two compounds, Hav1 and Hav2 were isolated by co-culturing with *Hamigera avellanea* and animal immune cells J774.1. Hav1 was identified as 4-hydroxybenzaldehyde and Hav2 was estimated as *N,N'*-((1*Z*,3*E*)-1-(4-hydroxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)buta-1,3-diene-2,3-diyl)diformamide. Furthermore, Hav2 was a new compound and inhibited productions of nitric oxide (NO) at IC_{50}=52.4 μM.

[1] Hara, Y. et al. Org. Lett. 2018, 20, 5831-5834.

co-culture, silent gene, fungi

講演番号：4C2a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 C2 会場

休眠遺伝子活性化を目指した病原真菌と免疫細胞の共培養
Co-culture of pathogenic fungi and immune cells for activating silent genes
○氏江 優希子[1]、齋藤 駿[1]、桑原 るり[2]、原 康雅[2,3]、深谷 圭介[4]、占部 大介[4]、矢口 貴志[5]、石橋 正己[2,6]、荒井 緑[1]([1]慶大理工、[2]千葉大院薬、[3]香川大農、[4]富山県大工、[5]千葉大真菌セ、[6]国際医福大福岡薬)
○Yukiko UJIE[1], Shun SAITO[1], Ruri KUWAHARA[2], Yasumasa HARA[2,3], Keisuke FUKAYA[4], Daisuke URABE[4], Takashi YAGUCHI[5], Masami ISHIBASHI[2,6], midori ARAI[1] ([1]Keio Univ., [2]Chiba Univ., [3]Kagawa Univ., [4]Toyama Prefectural Univ., [5]MMRC Chiba Univ., [6]International Univ. of Health and Welfare)

放線菌や真菌の二次代謝物生合成遺伝子の大半は休眠状態であり、それを活性化することで新規天然物が得られると考えられている[1]。我々は「病原微生物は免疫細胞から攻撃されると、生き残るために化合物を産生するのでは」と考え、病原放線菌と免疫細胞の共培養を行い、新規天然物を単離している[2]。本研究では、新たな探索資源として、臨床検体から分離した病原真菌と免疫細胞を共培養することで、新規天然物の探索を目指した。

これまでに病原真菌 18 種 22 株と免疫細胞の共培養を行い、2 組において共培養特異的に生産される代謝物を検出している。*Aspergillus fumigatus* と RAW264 細胞との共培養では、新規天然化合物として fumigatinolactone (**1**)を単離した。**1** は静岡県大渡辺らの fumimycin の生合成研究[3]から、fumigatin と fumarylazlactone が非酵素的に縮合したものであると予想される。実際に fumigatin の前駆体である asperfumtone B (**2**)や orsellinic acid (**3**)を共培養特異的化合物として単離・同定した。現在は fumigatin と fumarylazlactone の縮合により **1** が生成されるのかを *in vitro* で検討している。さらに、*Aspergillus terreus* と THP-1 細胞との共培養により butyrolactone Ia (**4**)を単離した。**4** は炎症応答の指標である一酸化窒素 (NO)の産生を抑制したことから、**4** は免疫細胞に対する防御物質と考えられる。現在、共培養特異的化合物 **1-4** の産生メカニズムの解明に取り組んでいる。

Recently, our group designed co-culture method and isolated new natural products based on the idea that pathogens might produce immune suppressors to avoid their elimination by immune cells. In this study, we aimed at search for new natural products by co-culture with immune cells and pathogenic fungi isolated from clinical specimens. Several compounds were detected and isolated by co-culture with *Aspergillus fumigatus* and RAW264 cells specifically, one of them was named as fumigatinolactone (**1**). In addition, asperfumtone B (**2**) and orsellinic acid (**3**) expected to be related to biosynthesis of **1** were isolated. On the other hand, butyrolactone Ia (**4**) was isolated by co-culture with *Aspergillus terreus* and THP-1. **4** inhibited productions of nitric oxide (NO), an inflammatory mediator. We are currently working on elucidation of production mechanism of co-culture specific compounds **1-4**.

[1] Keller, N. P. *et al. Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 937-947. **[2]** Hara, Y. *et al. Org. Lett.* **2018**, *20*, 5831-5834. **[3]** Kishimoto, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 3221-3228.

Co-culture, silent gene, fungi

発表責任者：荒井緑（midori_arai@bio.keio.ac.jp）

講演番号：4C2a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 C2 会場

神経幹細胞を若返らせる転写因子 Plagl2 の天然物由来転写活性化剤の探索

Search for transcriptional activator of Plagl2, a transcription factor that rejuvenates neural stem cells, derived from natural products

○目細 航、齋藤 駿、荒井 緑 (慶應理工)
○Ko MEBOSO, Shun SAITO, Midori ARAI (Fac. Sci. Tec., Keio Univ.)

近年、神経変性疾患の患者数が増加し、根本的治療法の開発が求められている。ニューロンを増やすことが根本的治療となり得、本研究では、その方法として神経幹細胞の「若返り」に注目した。老化神経幹細胞は増殖能・分化能をもたないが、若返らせることで再び増殖と分化を行うようになり、長期的なニューロンの増加が見込まれる。最近、Plagl2 の強制発現と Dyrk1a のノックダウンの組み合わせにより神経幹細胞が若返ることが発見された [1]。ここで、Dyrk1a 阻害剤は多く開発されている一方で、Plagl2 活性化剤の報告は未だなく、かつ若返り効果へ寄与は大きい。

本研究では Plagl2 活性化に着目し、放線菌エキスライブラリー1542 種から Plagl2 活性化剤のスクリーニングを行った。ヒットエキスの内、放線菌 BX40 株について大量培養及び活性を指標とした分画を行った。その結果、新規 Plagl2 活性化合物 BX40-A の単離に成功した。BX40-A は 21 μM で 177%のレポーター活性化を示した。

Recently, the number of patients with neurodegenerative diseases has increased, and there is a need to develop fundamental treatments. In this study, we focused on the rejuvenation of neural stem cells (NSCs) as a possible method to increase the neurons. Aged NSCs lack the ability to proliferate and differentiate, but rejuvenating them will allow them to proliferate and differentiate again, leading to a long-term increase in the number of neurons. Recently, it was discovered that the combination of forced expression of Plagl2 and knockdown of Dyrk1a can rejuvenate NSCs. While many Dyrk1a inhibitors have been developed, no Plagl2 activators have yet been reported, and their contribution to the rejuvenation effect is significant.

In this study, we screened a library of 1542 actinomycete extracts for Plagl2 activators and found reporter activity in 7 of them. Among them, the actinomycetes strain BX40 was cultured in large quantities and fractionated using its activity as an indicator. As a result, a new active compound BX40-A was successfully isolated. Evaluation of its activity revealed a 177% increase in reporter activity at 21 μM.

[1] Kaise, T. *et al. Genes Dev.* **2022**, *36*, 23-37.

natural products, neural stem cell, rejuvenation

講演番号：4C2a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 C2 会場

ヤマカガシ・ヒキガエルにおける遺伝的境界と防御用毒組成の関係
The relationship between genetic boundaries and defensive toxin profiles in *Rhabdophis tigrinus* and toads

○内藤 正成[1]、井上 貴斗[2]、森 哲[3]、森 直樹[2]（[1]京大農、[2]京大院農、[3]京大院理）
○ Masashige NAITO[1], Takato INOUE[2], Akira MORI[3], Naoki MORI[2] ([1]Agri.,Kyoto Univ., [2]Grad.Sch.Agri.,Kyoto Univ., [3]Grad.Sch.Sci.,Kyoto Univ.)

【背景・目的】ヤマカガシ（*Rhabdophis tigrinus*）は日本に生息するユウダ科のヘビであり、ヒキガエルを捕食し、ヒキガエル由来の強心性ステロイド化合物 bufadienolide 類（BD 類）を頸腺と呼ばれる器官に防御物質として蓄積する。ヒキガエルとヤマカガシの遺伝的境界は山口県中部にある。しかし、毒組成にも同様の違いがあるかについて解析した研究はない。そこで本研究では、遺伝的境界と毒組成の関係性、および毒源の毒組成が捕食者の毒組成に与える影響の解明を目的とし、遺伝的境界がある山口県、隣接する広島県、島根県および九州地方の両者における BD 組成の地域差を解析した。
【方法・結果】広島県、島根県、山口県東部、山口県西部および九州地方におけるヒキガエルとヤマカガシの毒液を LC-MS 分析し BD 組成を解析した。その結果、両者とも遺伝的境界と同様に「広島県、島根県、山口県東部」と「山口県西部、九州地方」間で、BD 組成に地域差が見られた。具体的には、ヒキガエルにおいて「広島県、島根県、山口県東部」で 2 成分、「山口県西部、九州地方」で 3 成分が、ヤマカガシにおいて「山口県西部、九州地方」で 2 成分が地域特異的に検出された。ヒキガエルにおいて、「山口県西部、九州地方」で特異的に検出された成分の 1 つを既知化合物 bufotalin と特定した。また、「山口県西部、九州地方」のヤマカガシで特異的に検出された成分の 1 つ 419K の構造を NMR によって同定した。

A Japanese natricine snake, *Rhabdophis tigrinus*, preys on toads and accumulates toad-derived cardiotonic steroids, bufadienolides (BDs), as defensive toxins in the nuchal glands. Previous studies on *R. tigrinus* and toads showed that in both animals the genetic boundaries are present in the center of Yamaguchi. In this study, we focused on Hiroshima, Shimane, and Yamaguchi Prefectures and Kyushu District, where genetic and BD boundaries were found for both animals, to explore the relationship between their genetic boundaries and BD profiles. We analyzed BDs in the Hiroshima, Shimane, and Yamaguchi Prefectures and Kyushu District by LC-MS for the analysis of BD profiles. As a result, the boundaries of BD profiles of both animals were found between the "Hiroshima, Shimane and Eastern Yamaguchi" area and the "Western Yamaguchi and Kyushu District" area as in the genetic boundaries. In toads, one of the compounds specifically detected in Western Yamaguchi and Kyushu District was identified as the known compound bufotalin. In addition, in *R. tigrinus*, we determined the structure of 419K, a compound that was specifically abundant in Western Yamaguchi and Kyushu District.

biotoxin, bufadienolide, toxin profile

講演番号：4C2a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 C2 会場

ヤマカガシ属ヘビの毒組成におけるヒキガエルの影響とヘビ自身の変換能力による影響の比較
Comparison of the influence of toads and of the snakes' conversion ability on the toxin composition of *Rhabdophis* snakes

○井上 綾[1]、井上 貴斗[1]、森 哲[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]京大院理)
○AYA INOUE[1], TAKATO INOUE[1], AKIRA MORI[2], NAOKI MORI[1] ([1]Grad. School. Agri., Kyoto Univ, [2]Grad. School. Sci., Kyoto Univ)

日本に生息するユウダ科のヘビ,であるヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) はヒキガエルを食べ, 頸腺と呼ばれる首付近の皮膚の下に存在する特殊な袋状器官に, ヒキガエル由来の強心性ステロイド化合物 bufadienolide 類 (BDs) を防御物質として蓄積する. また、ヤマカガシはヒキガエルから摂取した BD 類の一部を構造変換して蓄積する. ヤマカガシのように, 餌から摂取した毒素を構造変換し、かつ専用の器官に蓄積する種は他の脊椎動物では知られていない. 頸腺を持つヤマカガシ属ヘビは海外に生息する種も含めて全部で 19 種知られ, これまでに, 各種の BD 組成が種ごとに異なることを明らかにしてきた. 本研究では,「毒源であるヒキガエルの種の違いとヘビ自身の変換能力の差のどちらがヤマカガシ属ヘビにおける BD 組成の種間差に与える影響力が大きいか」を明らかにすることを目的とした。台湾に生息するヤマカガシ属ヘビ 2 種 (*R. formosanus* と *R. swinhonis*) それぞれの BD 組成を、これらのヘビが毒源としているヒキガエルの毒液を給餌する前と給餌した後の *R. tigrinus* の BD 組成と比較した。その結果、給餌前の *R. tigrinus* と *R. formosanus* の BD 組成を比較した際に *R. formosanus* でのみ検出された成分のうち、68 % が *R. formosanus* の特異的な変換能力によるものであると示唆された. 同様に, *R. swinhonis* でのみ検出された成分のうち, 100 % が *R. swinhonis* の特異的な変換能力によるものであると示唆された.

A Japanese snake, *Rhabdophis tigrinus* (*Rt*), preys on toads and accumulates bufadienolides (BDs), derived from toads, in specialized organs located under the skin near the neck (nuchal glands). The snake has the ability to structurally convert some of the BDs ingested from toads. We have already found that BD profiles differ among species. In this study, we analyzed the BD profiles of two species of snakes, *R. formosanus* (*Rf*) and *R. swinhonis* (*Rs*) distributed in Taiwan, in order to determine which has a greater influence on the interspecific differences in the BD profiles: the difference in the toxin source (toads) or the difference in the conversion ability of the snakes. The BD profile of each of the two snake species in Taiwan was compared with that of *Rt* before and after feeding with toxin from Taiwanese toads which are toxin sources of the two species in Taiwan. The results suggest that 68 % of the components detected only in *Rf* when comparing the BD profiles between *Rt* before feeding and *Rf* were due to the specific conversion ability of *Rf*. Similarly, of the components detected only in *Rs*, 100 % were suggested to be due to the specific conversion ability of *Rs*.

Biotoxin, Bufadienolide, *Rhabdophis* snakes

発表責任者：井上綾（inoue.aya.43w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C2a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 C2 会場

母ヤマカガシ（*Rhabdophis tigrinus*）の毒による子孫への化学的ケア―餌由来毒素の供給におけるトレードオフ―
Chemical affection of mother snake for her offspring—trade offs in maternal provisioning of defensive steroids, bufadienolides by the Japanese snake *Rhabdophis tigrinus*—
○井上 貴斗[1]、森 哲[2]、堀中 真野[3]、吉永 直子[1]、酒井 敏行[3]、森 直樹[1]（[1]京大院農、[2]京大院理、[3]府立医大院医）
○Takato INOUE[1], Akira MORI[2], Mano HORINAKA[3], Naoko YOSHINAGA[1], Toshiyuki SAKAI[3], Naoki MORI[1]（[1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch.Sci., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Med., Kyoto Pref. Univ. Med.）

【背景・目的】日本に生息するヘビであるヤマカガシは餌のヒキガエルから強心性ステロイドである bufadienolide 類 (BD 類) を摂取し、頸腺と呼ばれる特殊な器官に防御毒素として蓄える。5 月–7 月上旬 (妊娠季節) に妊娠しているメスは子へ BD 類を母体供給する。本研究では、妊娠メスが BD 類を自身の防御用器官である頸腺から子孫へ供給できるか検証すること、および頸腺からの BD 類供給による、母ヘビの化学的防御力への影響と、孵化幼体の化学的防御力を評価することを目的とした。特に、ヤマカガシのメス成体と孵化幼体の頸腺液中 BD 類の総量および頸腺液の毒性に着目した。
【方法・結果】単一個体群内において、妊娠季節中の成体メス 77 個体、非妊娠季節中の成体メス 25 個体の頸腺液を採取した。また、別に妊娠メス 8 個体を BD 類を与えずに産卵前の約 2 週間飼育し、産卵、孵化させることで幼体を得た。妊娠季節中、および飼育・産卵後のメスの頸腺液中 BD 濃度は非妊娠季節中のメスよりも有意に低かった。孵化幼体の頸腺液中 BD 濃度は自然条件下における非妊娠季節中のメスと同程度であった。A549 ヒト肺がん細胞を用いて、妊娠季節のメス、非妊娠季節のメス、飼育・産卵後のメス、孵化幼体の頸腺液の毒性試験を行った。その結果、毒性の高さは、孵化幼体＞非妊娠季節のメス＞妊娠季節のメス＞飼育・産卵後のメスの順となった。

A snake *Rhabdophis tigrinus* sequesters cardiotonic steroids, bufadienolides (BDs), from ingested toads and stores them in the nuchal glands as defensive toxins. From May to early July (gestation season), gravid females provision BDs to embryos in their oviducts. In this study, we aimed to verify whether BDs that are provisioned to offspring by gravid females are delivered from the nuchal glands, and to evaluate the effects of BD supply from the nuchal glands on the chemical defense of the dams and on the chemical defense of the hatchlings. Within a single population, nuchal gland fluids were collected from 77 adult females during the gestation season (FG) and 25 adult females during the non-gestation season (FN). In addition, 8 gravid females were reared under BD-free conditions for approximately 2 weeks prior to oviposition, and hatchlings were obtained from them. The nuchal gland fluids were collected from these 8 dams after oviposition (FD). The BD concentrations in the nuchal glands of FG and FD were significantly lower than those of FN. BD concentrations in the nuchal glands of the hatchlings were similar to those of FN. Toxicity tests were conducted on the nuchal gland fluids of FG, FN, FD, and the hatchlings using A549 human lung cancer cells. The results showed that the order of toxicity was: hatchlings > FN > FG > FD.

Biotoxin, Chemical defence, dietary toxin

発表責任者：井上貴斗（chem-riku.it@outlook.jp）

講演番号：4C2a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 C2 会場

昆虫エクジステロイド生合成酵素を標的とした新規蚊用殺虫化合物の構造解析に基づく研究
Structure-based studies of novel mosquito insecticidal compounds targeting insect ecdysteroid biosynthetic enzymes

○海老原 佳奈[1]、稲葉 和恵[1]、千田 美紀[2]、安孫子 ユミ[3]、佐久間 知佐子[4]、小祝 孝太郎[2]、高谷 大輔[5]、渡邉 千鶴[4]、今村 理世[6]、岡部 隆義[6]、小島 宏建[6]、大野 修[5]、半田 佑磨[5]、福澤 薫[5]、小田川 太一[7]、嘉糠 洋陸[7]、藤川 雄太[8]、井上 英史[8]、本間 光貴[4]、千田 俊哉[2]、丹羽 隆介[1] ([1]筑波大、[2]KEK、[3]長崎大、[4]理研、[5]阪大、[6]東大、[7]慈恵医大、[8]東薬大)
○Kana EBIHARA[1], Kazue INABA[1], Miki SENDA[2], Yumi ABIKO[3], Chisako SAKUMA[4], Kotaro KOIWAI[2], Daisuke TAKAYA[5], Chhiduru WATANABE[4], Riyo IMAMURA[6], Takayoshi OKABE[6], Hirotatsu KOJIMA[6], Shu Ono[5], Yuma HANDA[5], Kaori FUKUZAWA[5], Taichi ODAGAWA[7], Hirotaka KANUKA[7], Yuta FUJIKAWA[8], Hideshi INOUE[8], Teruki HONMA[4], Toshiya SENDA[2], Ryusuke NIWA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]High Energy Accelerator Research Organization, [3]Nagasaki Univ., [4]RIKEN, [5]Osaka Univ., [6]The Univ. of Tokyo, [7]Jikei Univ., [8]Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci.)

地球上で最も危険な動物、それは蚊である。マラリアには年間 247 万人の人々が感染し、60 万人以上の人々の命を奪うと推定されている。そのため、蚊を適切に駆除することは世界的に重要な課題である。現在、感染症を媒介蚊に対する有効な殺虫剤があるが、これらの既存殺虫剤に対して抵抗性を示す蚊の出現が確認されている。したがって、既存薬剤とは化学構造や標的が異なる、新規殺虫剤の開発が強く望まれる。この問題を解決するために我々は、昆虫の脱皮と変態に必須のステロイドホルモンであるエクジステロイドの生合成経路を標的とした殺虫剤の開発を目指し、エクジステロイド生合成酵素の一つ Noppera-bo (Nobo)を標的とした阻害剤探索を行った。ここで、我々は既知の Nobo 阻害剤よりもさらに高い阻害活性を示す Nobo 阻害化合物群を見出した。そして、この化合物と Nobo の結合様式を X 線結晶構造解析にて決定した。そして、重要なアミノ酸残基の同定のため点変異タンパク質を作製し、相互作用解析を行なった。また、殺虫試験・哺乳類細胞に対する毒性試験も実施し、哺乳動物に対する安全性を確認した。

Mosquitoes are responsible for the largest number of human deaths. They are vectors for many pathogenic or parasitic infections, including malaria, dengue fever, yellow fever and Zika fever, which infect 2.47 million people and kill more than 600,000 people annually. Mosquitoes are the leading cause of human death worldwide, acting as vectors for infectious diseases such as malaria, yellow fever, and dengue fever. Mosquito control is crucial for reducing the impact of these diseases. Currently, there are insecticides that are effective against mosquitoes that transmit infectious diseases, but the emergence of mosquitoes that are resistant to these existing insecticides has been confirmed. Therefore, there is a need to develop new insecticides with different chemical structures and targets than these existing insecticides. To solve this problem, I have been searching for inhibitors targeting Noppera-bo (Nobo), one of the ecdysteroid biosynthetic enzymes, to develop insecticides targeting the biosynthetic pathway of ecdysteroids, which are steroid hormones essential for insect molting and metamorphosis. Here, we identified a new group of compounds that inhibit the enzymatic activity of Nobo more potently than known inhibitors of Nobo, and determined the crystal structures of Nobo and these compounds. In addition, we generated point mutant proteins to identify key amino acids. We also conducted insecticidal and cytotoxicity assays to confirm their safety in mammals.

structure analysis, Insect hormone, agricultural chemicals

発表責任者：海老原 佳奈（5315010e@gmail.com）

講演番号：4C2a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 C2 会場

天然化合物ライブラリーから見出した 3 種の原虫に対する抗寄生虫化合物

Antiprotozoal compounds identified by cell-based screening of natural product library

○森 美穂子[1]、大野 春香[1]、カルティカ サリ デフィ[1]、ジラーニ グラム[1]、村松 秀行[2]、五十嵐 雅之[2]、塩見 和朗[2]、野崎 智義[1] ([1]東大院医、[2]微化研)
○ Mihoko MORI[1], Haruka OHNO[1], Defi KARTIKA SARI[1], Ghulam JEELANI[1], Hideyuki MURAMATSU[2], Masayuki IGARASHI[2], Kazuro SHIOMI[2], Tomoyoshi NOZAKI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Inst. Microb. Chem. (BIKAKEN))

【目的】アカントアメーバ角膜炎、アメーバ赤痢、トリコモナス膣炎はそれぞれ異なる単細胞の寄生虫（原虫）が感染することにより起こる。アメーバ赤痢とトリコモナス膣炎に対する治療は長年にわたり抗菌薬のメトロニダゾール一剤に依存しており、そのため特にトリコモナス膣炎では耐性原虫の増加が懸念されている。またアカントアメーバ角膜炎に対する治療薬は存在しない。本研究ではこれら治療薬開発が望まれている寄生虫感染症に対し、新規創薬シーズ骨格を導出することを目的として天然化合物ライブラリーから抗寄生虫化合物を探索した。
【方法】天然化合物ライブラリー（724 化合物、各 3 mg/ml の DMSO 溶液）は微生物化学研究所にて調製されたものを用いた。培養した 3 種の原虫（*Acanthamoeba castellanii*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*）をそれぞれ 96 穴プレートに分注し、化合物溶液を終濃度 10 μg/ml となるよう添加した。各原虫の生育に適した条件で培養した後、レサズリンあるいは WST-1 を用いて原虫の生死、増殖抑制を調べた。対照としてヒト繊維芽細胞 MRC-5 に対する細胞毒性を測定した。本スクリーニングで寄生虫選択的な活性を認めた化合物については同様の方法により IC_{50} 値を測定した。
【結果】ヒト細胞毒性に比べいずれかの原虫に対する抗原虫活性が優れている化合物は 35 化合物（全体の 5%）であった。3 種全ての原虫に対し強力に抗寄生虫活性を示す化合物は存在しなかったが、2 種あるいは 1 種の原虫に対して活性を示した。自由生活性で様々な環境に存在するアカントアメーバは、嫌気的な環境で生育する赤痢アメーバ及びトリコモナスとは系統的に離れており、シデロフォア類などアカントアメーバにのみ活性を示す化合物が存在した。

Drugs for parasitic diseases has been insufficient for several decades. Especially only one drug, metronidazole has been used for treatment of amoebiasis and trichomonas infection, and there is no drug for treatment of *Acanthamoeba* keratitis. To break through this situation we screened anti-protozoan compounds using structurally-diversed natural product library of Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN). Cell-based screening using *Acanthamoeba castellanii, Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis* was performed and selected anti-protozoan compounds. Human fibroblast cell line, MRC-5, was used for determining cytotoxicity against mammal. We found selective antiprotozoan activity in 35 compounds (5%) out of 724 compounds. The hit compounds against *Acanthamoeba* were different from those against *Entamoeba/Trichomonas*.

Acanthamoeba castellanii, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*

発表責任者：森美穂子（mori_gon5454@yahoo.co.jp）

講演番号：4C2a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 C2 会場

Fusarium 属真菌によるタイプ A トリコテセン系カビ毒の産生に対する抗真菌剤の影響
Effect of antifungal agents on type A trichothecene production by *Fusarium* species
○吉成 知也、永井 望美、渡辺 麻衣子、工藤 由起子（国立医薬品食品衛生研究所）
○Tomoya YOSHINARI, Nozomi NAGAI, Maiko WATANABE, Yukiko KUDO (National Institute of Health Sciences)

トリコテセン系カビ毒は、*Fusarium* 属等の真菌が産出する二次代謝産物であり、食品における汚染は大きな問題となっている。数あるトリコテセン系カビ毒の中で、タイプ B に分類されるデオキシニバレノール（DON）は、穀類から非常に高い頻度で検出されることから、日本を含め世界各地で食品における基準値が定められている。一方で、タイプ A に分類される T-2 トキシンや HT-2 トキシンについては、毒性は DON より高いにもかかわらず、食品汚染が認められる地域が寒冷地に限られているため、規制を行っている国は少ない。我々が実施したカビ毒汚染実態調査の結果、国産の農作物から高頻度で T-2 トキシンが検出された。農作物における DON 汚染を防除するために、様々な抗真菌剤が農薬として使用されているが、それらがタイプ A トリコテセン系カビ毒の汚染防除に対しても有効かほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、カビによるタイプ A トリコテセン系カビ毒の産生に対する化合物の影響を評価するアッセイ系を構築し、DON 汚染防除用の農薬の効果を調べた。さらに、カビによるアフラトキシンなどの産生を抑制することを我々が発見したキチン生合成酵素の阻害剤についても評価を行った。その結果、DON の汚染防除用の農薬については、多くが T-2 トキシンの産生菌に対して強い生育抑制活性を示し、カビ毒の産生を抑制した。一方、キチン生合成酵素の阻害剤は、カビの生育を抑制せず、T-2 トキシンの産生を特異的に阻害した。これらの結果より、既存の農薬やキチン生合成酵素阻害剤は、T-2 トキシンの汚染防除に有効であると考えられた。
Trichothecene mycotoxins are a group of secondary metabolites mainly produced by the *Fusarium* species. Not only deoxynivalenol (DON), a type B trichothecene mycotoxin, but also type A trichothecene mycotoxins including T-2 toxin and HT-2 toxin were frequently detected in cereals from Japan. In this study, a bioassay system for evaluating the inhibitory activity against type A trichothecene mycotoxin production by fungi was developed. The inhibitory activities of some agricultural chemicals for preventing DON contamination in cereals and chitin synthase inhibitors which were reported to inhibit aflatoxin production were evaluated by the bioassay system. As a result, most agricultural chemicals showed the growth inhibitory activity against the fungi and inhibited T-2 toxin production. The chitin synthase inhibitors specifically inhibited T-2 toxin production by fungi without affecting its growth. These results indicated that the tested chemicals are effective for preventing type A trichothecene mycotoxin contamination in cereals.

Fusarium, type A trichothecene, production inhibitor

発表責任者：吉成知也（t-yoshinari@nihs.go.jp）

講演番号：4C2a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 C2 会場

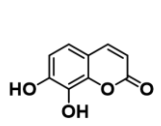
クマリン系化合物を基礎としたがん転移抑制薬の探索

Seeking cancer metastasis inhibitors based on coumarin compounds

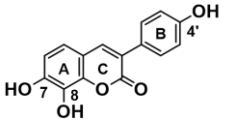
○服部 恭尚、杉山 雄輝、戸田 侑紀、細木 誠之、中村 誠宏、芦原 英司（京都薬大）
○Yasunao HATTORI, Yuki SUGIYAMA, Yuki TODA, Shigekuni HOSOGI, Seikou NAKAMURA, Eishi ASHIHARA (Kyoto Pharm. Univ.)

これまでに、多くの抗がん薬や分子標的治療薬が開発されているが、がん転移の有無は治療成績に大きな影響を与え、がん転移のある患者の生命予後は今もなお不良である。血管内皮細胞増殖因子などを標的分子とする転移抑制を目的とした化合物が開発されたが、臨床段階におけるがん転移抑制効果は認められず治療薬には至っていない。以上のことから、新たな作用機序を有するがん転移抑制薬の開発を行うこととした。

化合物には、7,8-dihydroxycoumarin (daphnetin) が、がん転移の重要なステップである浸潤・遊走を抑制することが報告されていることからクマリン系化合物を選択した。評価系には、肺への転移能が高いマウス骨肉腫 LM8 細胞を用い、細胞増殖抑制を示さない濃度域で浸潤抑制作用を有する化合物を探索した。その結果、細胞増殖に影響を及ぼさない濃度域で LM8 細胞の浸潤・遊走を抑制する多くの化合物を見出し、今回評価した中では 7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxy-phenyl)coumarin (DHC) が最も良好な浸潤・遊走抑制活性を示したので報告する。



7,8-dihydroxycoumarin
(daphnetin)



7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin
(DHC)

Although many anticancer agents and molecular target drugs have developed to date, the survival prognosis of patients with cancer metastasis remains poor. Compounds targeting vascular endothelial growth factor are ineffective against cancer metastasis in clinical trials. The absence or presence of cancer metastasis significantly impacts treatment outcomes. However, drugs for inhibiting cancer metastasis have not yet been developed. Based on the above, we planned to create anti-metastatic compounds with a new mechanism of action.

We previously reported that 7,8-dihydroxycoumarin (daphnetin) showed inhibitory activity of invasion and migration, which are essential steps in cancer metastasis. With a high ability to metastasize to the lungs, mouse osteosarcoma LM8 cells were used for evaluation. It is noteworthy that we screened for coumarin-based compounds that inhibited invasion and migration without inhibiting cell proliferation using LM8 cells. As a result, many compounds suppressed the invasion and migration of LM8 cells at concentrations that did not affect cell proliferation. As far as we have investigated, 7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC) was the most effective compound. Thus, we report that coumarin-based compounds exhibited significant invasion and migration inhibitory activity in this annual meeting.

Coumarin, Metastasis, Inhibitor

発表責任者：服部　恭尚（hattori@mb.kyoto-phu.ac.jp）

講演番号：4C2a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 C2 会場

α-グルコシダーゼを創薬標的とした新規フラボノイド誘導体の開発

Synthesis of novel flavonoid analogues targeting alpha glucosidase

○水野 美麗、福原 潔 (昭和大薬)
○Mirei MIZUNO, Kiyoshi FUKUHARA (Showa University)

【目的】近年、天然抗酸化物質の多様な生物活性が注目されており、サプリメントとして広く市場に流通している。しかし、各活性は決して強力ではなく、医薬品への実用化に至らないことが課題である。本研究は、フラボノイド骨格を有する天然抗酸化物質に注目した。フラボノイドは分子内の自由度が高く、標的分子に誘導適合して多様な生理作用が発現する。我々は、分子内の自由回転が多様な生物活性の発現に寄与する一方、各活性が減弱する一因だと推測し、分子内の自由回転を制御することによって特定の活性を増強できると考えた。本研究では、フラボノイド骨格を有する化合物をリード化合物とした。これら化合物の自由回転を制御した新規誘導体を合成し、各種生物活性を評価した。本発表では、新規誘導体におけるα-グルコシダーゼ阻害作用について発表する。
【方法：結果・考察】フラボノイド骨格を有する(+)-catechin, (-)-epicatechin, silibinin, procyanidin B3 をリード化合物とし、分子内の自由回転を制御した計８種類の新規誘導体を合成した。α-グルコシダーゼ阻害作用を評価したところ、多くの誘導体にα-グルコシダーゼ阻害作用の増強がみられた。なかでも、分子全体の平面性が高い化合物に強力な阻害作用がみられた。分子内の自由度を制御し、かつ平面性を高めることで、強力なα-グルコシダーゼ阻害作用を示すことを明らかにできた。

Natural antioxidants are known to have a wide variety of bioactivities, but it is difficult to apply medicines because of their low activities. Since free rotation in molecules seems to depress their activities, we consider that restricted free rotation in molecules enhances their activities. In this study, we focus on antioxidants which have flavonoid skeleton as lead compounds, and tried to constrain free rotation in molecules. We synthesized eight kinds of novel analogues by intramolecular cyclization or by introducing high planarity compounds into several flavonoids. Then the inhibitory activity of alpha-glucosidase in these compounds was evaluated. We could demonstrate that not only constrained free rotation in molecules but also high planarity in molecules enhance alpha glucosidase activity. The details of this study will be reported in this presentation.

flavonoid, diabetes, alpha glucosidase

講演番号：4C2a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 C2 会場

SARS-CoV 3CL protease を標的としたフタルイミド型阻害剤の合成研究
Synthesis and evaluation of phthalimide type inhibitors against SARS-CoV 3CL protease
○佐野 陽菜[1]、遠藤 龍生[1]、照屋 健太[2]、服部 恭尚[3]、矢野 成和[1]、今野 博行[1] ([1]山形大院理工、[2]東北大院医、[3]京都薬科大)
○Hinata SANO[1], Ryusei ENDO[1], Kenta TERUYA[2], Yasunao HATTORI[3], Shigekazu YANO[1], Hiroyuki KONNO[1] ([1]Yamagata University, [2]Tohoku University, [3]Kyoto Pharmaceutical University)

重症急性呼吸器症候群(SARS)は 2002 年中国で流行したコロナウイルス感染症であり、SARS-CoV によって引き起こされる。さらに 2019 年から流行している Coronavirus disease 2019 (COVID-19) は SARS-CoV-2 が原因ウイルスであり、これらは高い相同性を持つことが知られている。COVID-19 は現在も完全に収束していないため、本感染症に対する根本治療薬の開発が求められている。今回我々は 3C-Like (3CL) protease に注目した。3CL protease はウイルス増殖時に生成されるポリペプチド pp1a, pp1ab のプロセシングを担うタンパク質分解酵素である。これらはウイルスの増殖サイクルに必須であることから、創薬ターゲットとなりえる。

我々は二環式化合物であるフタルイミドが効果的なリード化合物になると考え、構造活性相関研究を行ったところ SARS-CoV 3CL protease に対して 3,4,5,6-tetrabromo-N-hydroxyphtalimide(TBNHPI)が 170 μM で 51%の阻害率を示した。そこで様々な TBNHPI およびフタルイミド誘導体の合成とその評価を行った。その結果、フタルイミドの窒素原子ならびに TBNHPI の N-O 部分が SARS-CoV 3CL protease の活性部位である Cys145 のチオール基と水素結合を形成できることが推測され、阻害活性に影響していると考察した。

Severe acute respiratory syndrome (SARS) caused by SARS-CoV. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 in China in 2019. SARS-CoV and SARS-CoV-2 have high homology. For the creation of the inhibitor against these viruses, we focused on 3C-like (3CL) proteases that are responsible for the processing of two virus precursor polypeptides, pp1a and pp1ab. 3CL proteases are reasonable target proteins for the drug discovery.

We considered that phthalimide structure was effective lead compound and therefore, a structure-activity relationship was performed. 3,4,5,6-Tetrabromo-N-hydroxyphtalimide (TBNHPI) with 170 μM showed inhibitory activity with 51% against SARS-CoV 3CL protease. Next various TBNHPI and phthalimide derivatives were synthesized and evaluated. As the result, the N-atom of phthalimide and N-O motif of TBNHPI affect the inhibitory activity. It was expected to form the hydrogen bond to the thiol functional group of Cys145 which is active site of SARS-CoV 3CL protease.

Coronavirus infection, Phthalimide type inhibitors, SARS-CoV 3CL protease

発表責任者：佐野　陽菜（t231285m@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4C2a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 C2 会場

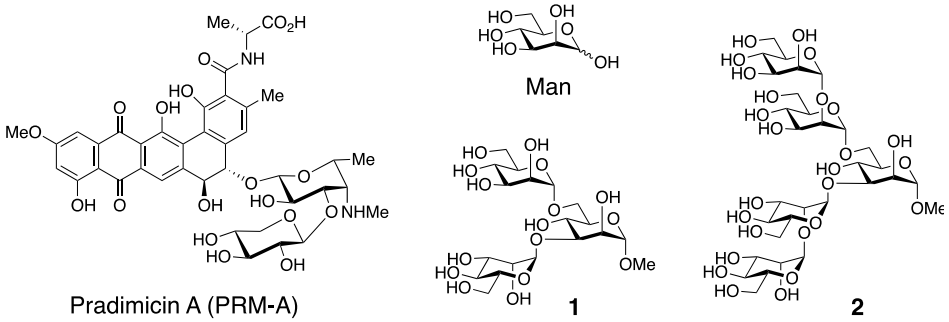
プラディミシン A はオリゴマンノース含有糖鎖に結合して SARS-CoV-2 の感染を抑制する
Pradimicin A suppresses SARS-CoV-2 infection by binding to oligomannose-containing glycans

○中川 優[1,2]、藤井 将人[1]、伊藤 那奈香[1]、小鹿 一[1]、木下 貴明[3]、櫻井 康晃[3]、安田 二朗[3]、五十嵐 康弘[4]、伊藤 幸成[5]([1]名大院生命農、[2]名大 iGCORE、[3]長崎大 CCPID、[4]富山県大生工、[5]阪大院理)
○Yu NAKAGAWA[1,2], Masato FUJII[1], Nanaka ITO[1], Makoto OJIKA[1], Takaaki KINOSHITA[3], Yasuteru SAKURAI[3], Jiro YASUDA[3], Yasuhiro IGARASHI[4], Yukishige ITO[5] ([1]Nagoya Univ., [2]iGCORE, [3]Nagasaki Univ., [4]Toyama Prefectural Univ., [5]Osaka Univ.)

放線菌由来の Pradimicin A (PRM-A) は，マンノース (Man) を特異的に認識するユニークな天然物である。近年，新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のスパイクタンパク質に Man 含有糖鎖が多数付加されていることが報告され，PRM-A が SARS-CoV-2 の糖鎖に結合する可能性が指摘されている。そこで本研究では，SARS-CoV-2 が有する糖鎖と PRM-A との結合解析を行うとともに，PRM-A の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した。

SARS-CoV-2 が有する糖鎖の部分構造に対応するオリゴ糖 9 種を化学合成し，PRM-A に対する結合活性を真菌マンナンとの競合結合試験によって評価した。その結果，PRM-A は **1** および **2** に強く結合することが確認され，これらのオリゴ糖構造を有する糖鎖に結合できることが示唆された。そこで，野生型 SARS-CoV-2 のヒト肺上皮由来 Calu-3 細胞に対する感染阻害試験を行なったところ，PRM-A がウイルス感染を顕著に阻害することが明らかとなった。さらに，この感染阻害活性は **1** 存在下で大幅に低下したことから，PRM-A の標的が糖鎖であることが確認された。これらの結果は，PRM-A が糖鎖を標的とした類稀な抗 SARS-CoV-2 薬リードとなることを示唆している。

Pradimicin A (PRM-A) is a unique natural product with the lectin-like property to bind mannose (Man). In this study, we performed binding assay of PRM-A with synthetic oligosaccharides, which reflect the structural motifs characteristic of glycans found in envelope glycoproteins of SARS-CoV-2. PRM-A was found to bind strongly to **1** and **2**, suggesting that PRM-A could bind to viral glycans containing these oligomannose units. We also demonstrate for the first time that PRM-A inhibits infection of human lung epithelium-derived Calu-3 cells by SARS-CoV-2. Significantly, the antiviral effect of PRM-A was attenuated in the presence of **1**, supporting that the blockage of SARS-CoV-2 infection originates from glycan binding of PRM-A. These results suggest that PRM-A could serve as a promising lead for anti-SARS-CoV-2 drugs targeting glycans.



antiviral drug, Pradimicin, SARS-CoV-2

発表責任者：中川　優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4C2a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 C2 会場

ブラジル産プロポリスのアトピー性皮膚炎モデルマウスに対する効果

The effects of Brazilian propolis on atopic dermatitis model mice.

○日高 宗明[1]、菊池 恭[1]、黒川 昌彦[1]、堤 重敏[2]、鈴木 彰人[1] ([1]九州保健福祉大学、[2](株)アマゾンフード)
○Muneaki Hidaka[1], Kyo Kikuchi[1], Masahiko Kurokawa[1], Shigetoshi Tsutsumi[2], Akito Suzuki[1] ([1]Kyushu Univ. of Health and Welfare, [2]Amazonfood)

【目的】アトピー性皮膚炎(Atopic Dermatitis; AD)は、Ⅰ型アレルギー反応が関与する炎症性疾患である。ブラジル産プロポリス(AF-08)には、抗アレルギー作用、抗炎症作用が報告されている。そこで本研究では、ブラジル産プロポリスの AD に対する効果を明らかにすることを目的として、AD モデルマウスを用いて検討した。
【方法】1-Chloro-2,4-dinitrobenzene; DNCB (2w/v%)を Hos:HR-1 ヘアレスマウス(7 週齢・雄)の背中の皮膚に 100 μL 塗布し、AD の感作とした。対照群、ワセリン塗布群、ステロイド塗布群(AD 治療薬の一種：リンデロン V®軟膏 0.12%)、AF-08 塗布群(10w/w%、50w/w%)で検討を行った。各群において AD 感作後 1 日 2 回背中の皮膚に軟膏剤として塗布した。さらに、1 日おきに DNCB(1w/v%)を 100 μL 塗布し、AD を誘発した。評価は、実験終了時の皮膚乾燥具合(4 段階)、血清 IgE 及び IL-4、IL-5 の濃度変化、皮膚組織学的構造について行った。皮膚組織変化については、背中皮膚を HE 染色した後に顕微鏡下で評価した。
【結果・考察】AF-08 塗布群はステロイド塗布群と比較した際、皮膚状態、血清 IgE において有意に改善していた。さらに、AF-08 塗布群は、肥満細胞の浸潤を有意に抑制していた。以上より、AF-08 は AD に対して効果が期待できると考える。

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory condition involving type I allergic reactions. Brazilian propolis (AF-08) has been reported to possess anti-allergic and anti-inflammatory effects. Therefore, this study aimed to elucidate the effects of Brazilian green propolis on AD using an AD model in mice. Methods: We induced AD to Hos:HR-1 hairless mice (7 weeks old, male) by using 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene. The control group, petrolatum group, steroid application group (using Lindane V® cream at 0.12%), and AF-08 application groups were studied. We evaluated skin dryness, skin tissue structure, and serum IgE concentration at the end of the experiment. Results: The AF-08 application group showed significant improvements in skin condition and serum IgE compared to the steroid application group. Furthermore, the AF-08 application group significantly suppressed infiltration of mast cells. Therefore, AF-08 is considered to have potential efficacy against AD.

brazilian propolis, atopic dermatitis

発表責任者：日高宗明（mhidaka@phoenix.ac.jp）

講演番号：4C3a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 C3 会場

セシウム蓄積細菌 Rhodococcus sp. RD011135 の固定化菌体による溶液中からのセシウム除去の検討

Investigation of cesium removal from solution using immobilized cells of cesium-accumulating bacterium Rhodococcus sp. RD011135

○乗安 奏斗[1]、木暮 優冴[1]、吉岡 潤一[2]、林 秀謙[1,2]（[1]前橋工科大工、[2]前橋工科大院工）
○Kanato NORIYASU[1], Yugo KOGURE[1], Junichi YOSHIOKA[2], Hidenori HAYASHI[1,2] ([1]Maebashi institute of technology, [2]Grad. Maebashi institute of technology)

<緒言> *Rhodococcus* sp. RD011135 は高いセシウム蓄積能力を持つ放線菌である。昨年、アガロースゲル中に本菌を包括し固定化菌体を作成し、CsCl 溶液中よりセシウム除去の最適条件の報告を行った。昨年に引き続き固定化菌体よるセシウム除去条件の検討を行ったので報告する。**<方法>** *Rhodococcus* sp. RD011135 を培養後、菌体を 2%アガロースゲルに固定化した。40 ml の 1 mM CsCl を含む 50 mM HEPES 緩衝液（pH7）に固定化菌体を添加し、経時的に CsCl 溶液を回収し、原子吸光光度計により CsCl 濃度を測定し、セシウム除去率を算出した。アガロースに包括する菌数、セシウム溶液に添加する固定化菌体量、KCl および脱共役剤（FCCP）添加時のセシウム除去量などの諸条件検討を行った。**<結果および考察>** 40 ml のセシウム溶液に添加するアガロース量は 8 ml が最適であった。アガロースに包括する菌体量は 10^9 個/ml 時が最適な菌体量であった。10^{10} 個/ml でアガロースに添加するとセシウム除去率は上がるが、アガロースの強度が低下した。セシウム溶液中に KCl または FCCP を添加するとセシウム除去率が低下した。菌体内へのセシウムの取り込みにカリウム輸送体が関与していると思われる。死菌体を固定化後、セシウム除去試験を行ったところ、セシウム除去率が低下した。セシウムは主に菌体内に蓄積するが、若干のセシウムは菌体表層に吸着していると思われる。

Rhodococcus sp. RD011135 is an actinomycete with high cesium accumulation ability. We investigated the optimal conditions for cesium removal using immobilized bacterial cells last year. This time, we report on further investigation of cesium removal conditions. *Rhodococcus* sp. RD011135 were immobilized on a 2% agarose gel. The immobilized cells were added to 1 mM CsCl solution. The CsCl solutions were collected over time, these concentrations were measured using an atomic absorption spectrophotometer, and the cesium removal rate were calculated in the solution. Various conditions were investigated, including the number of bacteria cells included in agarose, the number of immobilized bacteria added to the cesium solution, and the amount of cesium removed when KCl and an uncoupling agent (FCCP) were added. The optimal amount of agarose to be added to 40 ml of cesium solution was 8 ml. The optimal number of bacteria to be included in agarose was 10^8 cells/ml. When KCl or FCCP was added to the cesium solution, the cesium removal rate decreased. Potassium transporters appear to be involved in the uptake of cesium into the bacterial cells. The cesium removal test was conducted after immobilizing the dead bacteria cells, and the cesium removal rate decreased. Cesium mainly accumulates within the bacterial cells, but some cesium is thought to be adsorbed on the bacterial cell surface.

Rhodococcus sp., cesium, immobilized cell

発表責任者：林 秀謙（h-hayashi@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4C3a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 C3 会場

Acid Orange7 の微生物による脱色及び完全分解
Biodecolorization and biodegradation of Acid Orange7

○三好 望実、喜多 晃久、早瀬 伸樹（新居浜高専）
○Nozomi Miyoshi, Akihisa Kita, Nobuki Hayase (Niihama College)

合成染料の一種であるアゾ染料は、世界で最も多量に使用されている染料である。アゾ染料の一種である Acid Orange7（OrangeⅡ）は、アゾ染料脱色微生物により嫌気条件下でスルホン化芳香族アミン化合物であるスルファニル酸が生じる。このスルホン化芳香族アミン化合物は一般的に難分解性で、特殊な微生物により酸化分解されることが報告されている。本研究では、アゾ染料の完全分解を目的とし、OrangeⅡ脱色微生物と好気条件でスルファニル酸を酸化分解する微生物の組み合わせによる OrangeⅡの完全分解を検討した。

新たに分離した OrangeⅡ脱色菌 *Bacillus* M8 株を用いて、振とう培養及び静置培養で 100mg/L の OrangeⅡ脱色実験を行ったところ、どちらの条件においても 85%以上の脱色が観察された。また、M8 株とスルファニル酸分解微生物である *Aminobacter* 11A 株の混合培養により、振とう培養において脱色時に生成したスルファニル酸の完全分解が確認できた。現在、これら菌株の固定化による OrangeⅡの完全分解を検討している。

Among the numerous classes of synthetic dyes, azo dyes are the most common in both the number and amount produced. Sulfanilic acid, representative sulfonated aromatic amine, is caused by cleaving the azo-bond of azo dyes such as Acid Orange7 (Orange Ⅱ) under anaerobic condition. Sulfanilic acid is not readily degraded by microorganisms. There have been few reports on the degradation of sulfanlic acid by mixed and pure bacterial cultures. In this study, we try to degrade Orange Ⅱ by the coculture of Orange Ⅱ-decolorizing bacteria and sulfanilic acid-degrading bacteria.

When 100 mg /L of Orange Ⅱ was decolorized by newly isolated *Bacillus* sp. M8 under static or shaking conditions, more than 85% of Orange Ⅱ was decolorized and sulfanilic acid was released under both conditions. Sulfanilic acid was completely degraded by the coculture of strain M8 and sulfanilic acid-degrading bacterium, *Aminobacter* sp.11A.

The degradation of Orange Ⅱ using immobilized strains M8 and 11A will also be presented in this symposium.

acid orange7, sulfanilic acid, biodecolorization

発表責任者：早瀬伸樹（n.hayase@niihama-nct.ac.jp）

講演番号：4C3a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 C3 会場

鉱山廃水生物処理法導入の基礎データとなる 40 種坑廃水中の微生物叢解析

Microbial community analysis of 40 mine drainage samples for their biological treatment

○羽部 浩[1]、青柳 智[1]、堀 知行[1]、稲葉 知大[1]、佐藤 由也[1]、保高 徹生[2]([1]産総研・環境創生、[2]産総研・地圏資源)
○Hiroshi HABE[1], Tomo AOYAGI[1], Tomoyuki HORI[1], Tomohiro INABA[1], Yuya SATO[1], Tetsuo YASUTAKA[2] ([1]EMRI, AIST, [2]GREEN, AIST)

【背景・目的】重金属を含む鉱山廃水処理に、微生物や植物など自然力を活用した処理法（パッシブトリートメント）を導入する場合は、最適な浄化システムの選定や水質浄化のメカニズムについて事前検証を行っておくことが重要である[1)]。特に微生物処理の導入に向けては、各鉱山現場の実情に合ったプロセスの最適化や、浄化対象となる処理水の水質のみならず、坑廃水中に存在する微生物種についても分析して基礎データを収集・保有しておく必要があると考えた。そこで本研究では、全国 30 ヶ所の休廃止鉱山から採取した 40 種類の坑廃水について菌叢解析を行った。
【方法・結果】各坑廃水サンプルをろ過して微生物が付着したメンブレンから、溶菌法とビーズ細胞破砕法を用いて微生物核酸を抽出した。次世代シークエンサーを用いた大規模塩基配列解析に供した後、データは独自に確立したパイプラインによって解析し、微生物種の同定を行った。まず、対象 40 坑廃水中の微生物群集構造の全体像を俯瞰するため主座標分析（PCoA）を行ったところ、全体的な傾向として、坑廃水の pH や鉄濃度によって菌叢が大きく異なっており、これら水質と菌叢との関係性が示唆された。多くの坑廃水において、鉄酸化細菌など複数の金属酸化細菌が属する Betaproteobacteria 綱の微生物が優占化しており、坑廃水中の土着微生物を活用した新たなパッシブトリートメントの提案に向け、有用な鉱山微生物データベースになることが期待される。

Mine drainage containing toxic metals is a by-product of mining and metallurgical industries, and its contamination to the environment still remain a major problem. One of treatment methods of mine drainage is a passive treatment, in which the biological and geochemical processes in natural environment systems are used[1)]. For applying passive treatment with microorganisms to mine drainage remediation, we should know whether mine drainage may contain several useful microorganisms possibly applied for various passive systems. In this study, we investigated and compared the microbiomes of forty untreated mine drainages obtained from thirty abandoned mines using an Illumina sequencing of 16S rRNA gene amplicons. Microbial compositions of 40 untreated mine discharges from 30 abandoned mines were evaluated by calculating alpha diversity indices and weighted UniFrac distances for principal coordinate analysis (PCoA). The PCoA scatter plot indicated the plot positions of microbial communities in respective mine discharges were associated with their pH values as well as iron concentrations in respective mine drainage samples.

1) Habe et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104, 6893 (2020)

metal-oxidizing bacteria, microbial community analysis, mine drainage

発表責任者：羽部浩（hiroshi.habe@aist.go.jp）

講演番号：4C3a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 C3 会場

腐植を用いた廃水浄化技術のメカニズムに関する研究

Study on the mechanism of wastewater purification technology using humus

○川合 隆博[1]、谷津 大気[1]、謝 小毛[1]、並木 伸明[1]、前 一廣[2] ([1]JNC エンジニアリング株式会社、[2]京大名誉教授)
○Takahiro KAWAI[1], Takiki YATSU[1], Xiaomao XIE[1], Nobuaki NAMIKI[1], Kazuhiro MAE[2] ([1]JNC Engineering Co.Ltd., [2]Professor Emeritus, Kyoto Univ.)

自然浄化法は 1980 年代に内水護博士により提唱された廃水浄化技術で、①高濃度有機廃水を無希釈で処理できる、②悪臭の発生が少ない、③汚泥の沈降性が良い、など優れた特徴を持つ。しかしそのメカニズムは解明されていない。

この浄化技術には土壌由来の腐植物質を用いているが、1996 年 Lovley らのグループにより、嫌気環境で腐植物質は、微生物の電子受容体として機能し、更に電子メディエーターとして鉄を還元することが報告された。その後腐植物質の環境浄化機能について様々な報告がされている。

そこで我々は、自然浄化法の活性汚泥中でも嫌気環境において、腐植物質が電子メディエーターとして機能することで Fe^{2+}が生成し、更に好気環境で発生する H_2O_2 とのフェントン反応により、ヒドロキシラジカルが発生するという仮説を立てた。そして自然浄化法の活性汚泥にテレフタル酸をプローブとして加えたところ、ヒドロキシテレフタル酸が生成することを確認した。このことから自然浄化法の汚泥中ではヒドロキシラジカルによる酸化分解が行われていることが示唆された。

The natural purification method is a wastewater purification technology proposed by Dr. Mamoru Uchimizu in the 1980s, and has excellent features such as: (1) treatment of highly concentrated organic wastewater without dilution, (2) less generation of bad odor, and (3) good settling of sludge. However, its mechanism has not been clarified.

In 1996, Lovley *et al.* reported that humic substances function as electron acceptors for microorganisms in an anaerobic environment and also reduce iron as an electron mediator. Since then, various reports on the environmental purification function of humic substances have been published.

We hypothesized that in activated sludge in the natural purification method, humic substances function as electron mediators in the anaerobic environment to produce Fe^{2+}, which in turn generates hydroxyl radicals through a Fenton reaction with H_2O_2 generated in the aerobic environment. When terephthalic acid was added as a probe to activated sludge in the natural purification method, it was confirmed that hydroxy terephthalic acid was generated. This suggests that oxidative degradation by hydroxyl radicals is taking place in the sludge of the natural purification method.

wastewater treatment, humus, hydroxyl radical

講演番号：4C3a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 C3 会場

油脂廃水処理に優れる *Kinneretia* sp. E2 株の凝集能発現に関わるバイオフィルムの解析

Biofilm analysis of *Kinneretia* sp. strain E2, a superior oil and fat containing wastewater treatment strain, for expression of agglomerating ability

○梅田 郁斗、伊藤 貴文、木元 久、日ビ 隆雄（福井県大院生物資源）
○Ikuto UMETA, Takafumi ITOH, Hisashi KIMOTO, Takao HIBI (Fukui Pref. Univ.)

[背景と目的] 近年、産業廃水に活性汚泥等を用いた生物学的処理方法が用いられてきたが、処理条件の設定が複雑で、処理能力の安定性にも問題を抱えてきた。TOC 値の減少を指標に食肉加工場の廃水中から、油脂を含む汚染物質の凝集能に優れた *Kinneretia* 属細菌 1 株を取得し、E2 株と命名した。本菌株が産生するバイオフィルムが廃水中の汚染物質の凝集に関与することが示唆された。本研究では、E2 株バイオフィルムの構造や機能等を明らかにすることを目的とした。
[方法と結果] 分散させた活性炭に E2 株菌体、精製バイオフィルムを添加することで速やかに凝集が生じた。これをプロテアーゼ K で処理すると、完全に凝集能を失った。本フィルムの FT-IR/ATR スペクトルを測定した結果、アミド I とアミド II の顕著な吸収ピークが認められ、バイオフィルムの主要成分がペプチドであることが示唆された。5.1 Mbp の 本菌株の gDNA 配列を解析し、4595 個の遺伝子が同定されたが、バイオフィルムと機能推定される遺伝子は認められなかった。現在、MALDI-MS および Orbitrap LC-MS 分析を用いて、バイオフィルムの PMF 解析を行っている。

[Background] Traditional methods for treating industrial wastewater, such as activated sludge processes, have been effective but need help maintaining treatment stability due to complex conditions. *Kinneretia* sp. E2 has been identified to address this. This strain is noteworthy for its ability to produce a biofilm that appears to play a crucial role in the agglomeration of contaminants. This study aimed to elucidate the structure and function of the biofilm produced by the strain E2.
[Method and Results] Adding the E2 strain and the purified biofilm to dispersed activated charcoal resulted in rapid flocculation. Notably, treating the biofilm with protease K led to a complete loss of its agglomerating ability. The FT-IR/ATR spectrum analysis revealed significant absorption peaks for amide I and amide II, suggesting that peptides constitute the major component. Furthermore, this strain's 5.1 Mbp gDNA sequence was determined, and 4595 genes were identified. However, no genes were found to be presumed to function with the biofilm. They were currently using MALDI-MS and Orbitrap LC-MS analysis for PMF analysis of these biofilms.

wastewater treatment, agglomeration, biofilm

発表責任者：日ビ 隆雄（hibi@fpu.ac.jp）

講演番号：4C3a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 C3 会場

Isolation of crude glycerol-utilizing oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* mutants

○ Bhismo Srenggoro Kuntonugroho[1], Hiroyuki Kajiura[2], Ryo Misaki[2], Kazuhito Fujiyama[2]
([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech)

Microbial lipids in the form of triacylglycerol (TAG) produced by oleaginous yeast can be transesterificated to obtain fatty acid methyl ester (FAME). FAME can be converted to biodiesel to reduce fossil fuel usage. However, biodiesel production is not wasteless, with crude glycerol (CG) as their main byproduct. This study aims to adapt prominent oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* NBRC 0880 into a CG-utilizing mutant. To reuse and recycle CG, *R. toruloides* yeast must be mutated to obtain tolerance against CG impurities, such as sodium oleate (SO) and potassium oleate (PO), which inhibits its growth. Wildtype yeast was cultivated in YPD (Yeast, Peptone, D-Glucose) with 3% SO iteratively. Surviving mutants were isolated and cultivated in higher SO content until they reached tolerance to 5% SO and PO. Mutants were screened further by cultivating it in a media which D-glucose is replaced entirely with CG. The screening was carried out over generations until they could grow with 5% CG. Four top mutants were selected and entered the lipid production phase with CG. Mutants have more lipid content per dry cell weight when using CG. Mutants also have distinctive lipid composition, producing more linoleic acid (C18:2) while having less palmitic acid (C16:0) compared to wildtype in both normal and CG media. The lipid production analyses showed that yeast mutants can now utilize CG for accumulating biomass and lipids.

Oleaginous yeast, Lipid production, Crude glycerol

発表責任者：Kazuhito Fujiyama（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C3a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 C3 会場

Elucidation of the Genes Affecting Lipid Overproduction in *Rhodotorula mucilaginosa*

○Ma. Christine Cabatlao[1], Ryuto Masui[1], Sayaka Maeda[1], Chih-Chan Wu[1], Hiroyuki Kajiura[2], Ryo Misaki[2], Savitree Limtong[3], Kazuhito Fujiyama[2] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Univ. ICBiotech, [3]Kasetsart Univ.)

Microbial lipids have been studied extensively for the multiple advantages they provide as a source of renewable energy, such as flexibility on the use of substrates, independence from seasonal weather conditions, and the high quality of oleic acid produced. *Rhodotorula mucilaginosa* DMU3 TK-16 can accumulate lipids by about 60% of its dry cell weight. RNA-Seq analysis revealed that its thermotolerant derivative, *Rhodotorula mucilaginosa* L1-1, had an increase in the expression levels of some genes related to lipid synthesis. Previous studies showed that L1-1 produced higher lipid amount than the wildtype, DMU3 TK-16. The main objective of this research is to determine the genes responsible for improving lipid production from the upregulated genes isolated from *R. mucilaginosa* L1-1. Results show that out of the ten candidate genes, two genes may have positive effects on increased lipid production and four genes may involve in changing the lipid composition, as measured by the lipid content and lipid amount. In conclusion, although the relationship of these genes in fatty acid production remains unknown, the six candidate genes play important roles in improving lipid production.

Oleaginous yeast, lipid production, RNA-Seq analysis

発表責任者：Kazuhito Fujiyama（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C3a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 C3 会場

海洋利用型微生物燃料電池の開発

Development of microbial fuel cell for marine utilization

○梶原 将[1]、陳 馨玥[1]、佐藤 宏樹[1]、高橋 慧[1]、横山 浩[1,2] ([1]東工大生命理工学院、[2]農研機構畜産研究部門)
○ Susumu KAJIWARA[1], Xinyue CHEN[1], Hiroki SATO[1], Kei TAKAHASHI[1], Hiroshi YOKOYAMA[1,2] ([1]Tokyo Institute of Technology, [2]National Agriculture and Food Research Organization)

淡水系で低コストかつ大型化に成功した炎酸化ステンレスを負極材料に用いた微生物燃料電池（MFC）を基盤として海洋利用 MFC を開発することを目標とした。最初に、海水および海底土壌をサンプリングして構築して閉鎖系 MFC の発電実験を行った結果、最大電力量 0.627 mW の発電を得ることができた。以前の淡水系での研究では、低消費電力用キャパシタを使用すれば最大電力量 0.627 mW で温度センサーの駆動および無線通信が可能であると報告したが、低コスト化するためには安価で汎用性のある市販キャパシタを用いた MFC を開発することが必要である。そのためには、2 mW 以上の最大電力量の MFC を構築する必要があるため、スケールアップ閉鎖系 MFC を作製して発電実験を実施した。スケールアップ MFC は 2 か月後には最大電力量 2.46 mW の発電を得ることができた。また、閉鎖系 MFC の負極表面に付着したバイオフィルムの DNA 解析から、*Desulfobulbaceae* 属細菌の割合が最も増えていることが分かった。

The goal is to develop a marine-use microbial fuel cell (MFC) based on a MFC using flame-oxidized stainless steel as the anode material, which has been successfully developed in a freshwater system at low cost and large scale. First, power generation experiments were conducted on a closed system MFC constructed by sampling seawater and sea sediment, resulting in a maximum power output of 0.63 mW. In our previous study on freshwater systems, we reported that temperature sensors can be driven and wireless communication is possible with a maximum power of 0.63 mW if low-power capacitors are used, but it is necessary to develop an MFC using inexpensive and versatile commercial capacitors to reduce the cost of the system. Since it is necessary to construct an MFC with a maximum power capacity of more than 2 mW, a scale-up closed system MFC was fabricated and power generation experiments were conducted. The scale-up MFC was able to generate a maximum power of 2.46 mW after two months. DNA analysis of the biofilm on the anode surface of the closed-system MFC showed that the percentage of *Desulfobulbaceae* species increased the most.

microbial fuel cell, marine use, monitoring

講演番号：4C3a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 C3 会場

酸化チタン光アノードと組換え大腸菌の全細胞反応を用いたバイオカソード系による光電気化学的水素生産

Photo-electro-biochemical H_2 production using a combination of a TiO_2 photoanode and an H_2-forming biocathode based on recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis

○濵川 怜那、結城 里沙、本田 裕樹、藤井 浩（奈良女大理）
○Reina HAMAKAWA, Risa YUKI, Yuki HONDA, Hiroshi FUJII (Fac. Sci., Nara Women’s Univ)

【背景・目的】水素はクリーンなエネルギーキャリアとして注目されている。一方で、工業的な水素生産は化石燃料の消費に依存しており、自然エネルギーとくに太陽光による水の分解での水素生産への転換が期待される。演者らは、無機半導体光触媒の光―化学エネルギー変換と、水素生成酵素[FeFe]-ヒドロゲナーゼ（HydA）による効率的な水素生産を組み合わせた無機―バイオ複合系による光水素生産を提案してきた。本講演では、酸化チタン光アノードと、HydA を大量生産する組換え大腸菌細胞を用いる水素生成カソード系を用いた光電気化学系による水素生産について報告する。
【方法】フッ素ドープ酸化スズ被膜を有するガラス板上に酸化チタン薄膜を形成し、これを光アノードとした。カソードにはカーボンペーパーを用いた。光アノードとカソードはナフィオン膜で隔て、電解液にはリン酸緩衝液を用いた。カソード側には電子メディエーター（メチルビオローゲン、MV）と HydA を大量生産する組換え大腸菌細胞を懸濁させ、バイオカソード系とした。光源には 350 nm LED を使用した。カソード側のヘッドスペース中の水素生成量は GC-TCD で定量した。
【結果】CV 測定から、カーボンペーパー上で還元された MV がメディエーターとなり細胞内の HydA へ電子伝達され水素が発生することを明らかにした。光アノードとバイオカソード系を導線でつなぎ、光照射すると、外部電圧の補助なしで光照射依存的な水素発生が確認でき、無機―バイオ複合系による光電気化学的水素生産系の構築に成功した。
(論文) Y. Honda, et al., *ChemSusChem*, 2023, in press. DOI:10.1002/cssc.202300958

An inorganic/bio hybrid system, which incorporates biocatalysts that catalyze efficient and selective material conversions under mild conditions into existing catalytic reactions, have attracted considerable attention in the development of new catalytic systems. In this study, we constructed a H_2-forming biocathode system based on a carbon material combined with whole-cell biocatalysis from recombinant *Escherichia coli* expressing [FeFe]-hydrogenase genes for photoelectrochemical H_2 production via water splitting. H_2 production on the cathode side occurs in the whole-cell biocatalyst suspension by intracellular [FeFe]-hydrogenase with the electron-mediator compound methylviologen, which can be easily reduced on the carbon paper. The carbon material-based biocathode system wired with TiO_2 photoanode can be a photo-electro-biochemical H_2 production system without external voltage supply under natural pH.

hydrogen production, hydrogenase, water splitting

発表責任者：本田裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：4C3a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 C3 会場

フラボノイド分子の自発配向分極
Spontaneous orientation polarization of flavonoids
○赤池 幸紀 [1]、細貝 拓也 [1]、小野 裕太郎 [2]、鶴田 諒平 [2]、山田 洋一 [2] ([1] 産総研、[2] 筑波大)
○Kouki AKAIKE[1], Takuya Hosokai[1], Yutaro Ono[2], Ryohei Tsuruta[2], Yoichi Yamada[2] ([1]AIST, [2]The Univ. of Tsukuba)

自発配向分極（SOP）とは、極性分子の双極子モーメントの平均的な配向度が基板法線方向にある程度揃うことで生じる巨視的な電気分極である。この現象は、低温に保持した基板に吸着させた水や N_2O などの薄膜や、有機発光ダイオードに用いられるπ共役系分子の蒸着膜で見出されている。本研究では、生薬のオウゴン（黄芩）に含まれるバイカレインが SOP を示し、100 nm の薄膜に対して 5500 mV を超える巨大表面電位（GSP）を示すことを実証した[1]。バイカレインを高真空下で蒸着すると、平滑でアモルファスな膜が得られ、大気中のケルビンプローブ法による測定により、57 mV/nm の GSP が生じる。この傾きは、GSP を示す有機半導体の代表格であるトリス(8-ヒドロキシキノリン)アルミニウム(III)(Alq_3)に匹敵する値である。通常 GSP は、光照射で発生した光電荷が分極電荷を相殺することで減衰する。バイカレインの場合は励起状態の寿命が短く、光電荷の生成効率が低いため、Alq_3 膜に比べて GSP の光安定性が優れていることもわかった[1]。

Spontaneous orientation polarization (SOP) is macroscopic electric polarization that is attributed to a constant orientational degree of dipole moments of polar molecules on average. The phenomenon has been found in small molecules like H_2O at low temperatures and π-conjugated molecules employed in organic light-emitting diodes. In this study, we demonstrate that a thin film of baicalein, a flavonoid found in Scutellaria Root, exhibits SOP and resultant giant surface potential (GSP) exceeding 5500 mV at a film thickness of 100 nm [1]. Vacuum-deposition of baicalein under high vacuum results in smooth and amorphous films, which enables the generation of GSP with a slope of 57 mV/nm in air, a value comparable to the representative of an organic semiconductor showing GSP, tris(8-hydroxyquinoline)aluminum(III) (Alq_3). In general, GSP is attenuated by the photocarriers generated under illumination, which cancels out polarization charges. We found that the GSP of a baicalein film is more stable than that of an Alq_3 film because the short lifetime of the excited states of baicalein lowers generation efficiency of photocarriers[1].
＜文献＞
[1] K. Akaike, T. Hosokai, Y. Ono, R. Tsuruta, Y. Yamada, *Sci. Rep.*, **13**, 19402 (2023).

flavonoids, spontaneous orientation polarization, thin film

発表責任者：赤池幸紀（kouki.akaike@aist.go.jp）

講演番号：4C3a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 C3 会場

微生物存在下での電位走査によるステンレス鋼腐食のタイムラプス観察

Time-lapse observation of stainless steel corrosion by potential scanning in the presence of microorganisms

○若井 暁、小川 真弘 (海洋研・超先鋭)
○Satoshi WAKAI, Masahiro Ogawa (JAMSTEC)

微生物が金属材料の腐食現象に関わることは古くから知られており、耐食性の高いステンレス鋼に対しても腐食を発生させる場合があることが分かっている。一方で、実際にステンレス鋼の腐食を引き起こす微生物の培養実験等の報告はほとんど存在せず、腐食メカニズムは明らかになっていない。我々は、実環境におけるステンレス鋼の腐食の微生物群集構造解析から電気化学活性を持つ微生物がカソード反応を担う反応モデルを提唱しており、加えて、淡水環境及び海水環境のいずれにおいても腐食部分から硫黄酸化能を持つ微生物の集積を確認している。そこで、微生物と電気化学的な作用による腐食を検証する目的で実験室レベルでの腐食試験システムを構築し、微生物存在下での電気化学的な作用によるステンレス鋼の腐食試験を実施した。ポテンショガルバノスタットを用いた定電位保持を行い、その時の電流量を計測しながらデジタルマイクロスコープを用いたタイムラプス撮影により、人工海水中で腐食の発生点と腐食の進展を捉えることに成功した。これまでに人為的な電位制御下でのステンレス鋼の腐食発生とその進展をリアルタイムに捉えた報告はなく、本成果は微生物によるステンレス鋼の腐食発生メカニズムの解明に向けた重要な知見となる。

Microbiologically influenced corrosion of metal materials, including highly corrosion-resistant stainless steel, has long been recognized. However, reports on the cultivation experiments of microorganisms that actually induce corrosion in stainless steel are scarce, leaving the corrosion mechanisms unclear. We proposed a reaction model wherein electrochemically active microorganisms play a role in the cathodic reaction, based on microbial community structure analysis in the actual environment of stainless steel corrosion. In addition, we have observed the enrichment of sulfur-oxidizing microorganisms in corroded stainless steels in both freshwater and marine environments. To validate corrosion through microbial and electrochemical interactions, we constructed a laboratory-level corrosion testing system and conducted corrosion tests on stainless steel in the presence of microorganisms. Employing a potentio/galvanostat for potential holding, we successfully captured the initiation and progression of corrosion in artificial seawater through time-lapse imaging using a digital microscope. This real-time observation of stainless steel corrosion under controlled potential conditions contributes to understanding the mechanisms underlying microbial-induced corrosion of stainless steel.

corrosion, microorganism, electrochemical

発表責任者：若井暁（wakais@jamstec.go.jp）

講演番号：4C3a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 C3 会場

円石藻 *Pleurochrysis carterae* の結晶成長制御に関与する酸性多糖 PS-2 の構造機能解析
Structural and functional analysis of acidic polysaccharides PS-2 involved in crystal growth control of coccolithophorid *Pleurochrysis carterae*

○上野 友紀[1]、岡村 幸輝[1]、駱 衍祺[1]、千田 陸[2]、馳平 加代[2]、宮西 伸光[2]、長坂 征治[1]([1]東洋大院生命、[2]東洋大院食環)
○ Yuki Ueno[1], Tomiki Okamura[1], YANQI LUO[1], Riku Chida[2], Kayo Hosehira[2], Nobumitsu Miyanishi[2], Seiji Nagasaka[1] ([1]Life science, Toyo Univ., [2]Food science, Toyo Univ.)

海洋性藻類の円石藻は、細胞表面がココリスと呼ばれる円盤状の鱗片で覆われている。ココリスは、楕円形の有機基盤の周縁部または全面に石灰化により形成された $CaCO_3$ の単結晶が連なって形成されている。円石藻 *Pleurochrysis carterae* の $CaCO_3$ 結晶には 3 種類の酸性多糖(PS-1・PS-2・PS-3)が含まれていることが報告されており、これらの多糖は結晶成長制御に関与していると考えられている。しかし、この多糖の構造や機能については未解明な部分が多い。本研究では、ココリス形成分子機構の解明を目的として、単離した酸性多糖の糖鎖構造解析及び結晶形成制御作用の解析を行った。

P. carterae を人工海水で培養後、EDTA 溶液で酸性多糖を溶出し、溶媒抽出、分別沈殿、HPLC 法(イオン交換・サイズ排除)を用いて PS-1・PS-2・PS-3 の酸性多糖を分離した。本報告では、PS-2 の構造解析結果を中心に報告する。PS-2 は繰り返し構造を持っていることが予想されており、長さの異なる分子から構成されている。これらをサイズ毎に 5 つに分画し、それぞれ IR スペクトルと ABEE による組成分析を行った結果、PS-2 の分子サイズによって官能基に起因するピーク強度、糖の組成比が異なることが示唆された。現在、PS-2 繰り返し構造の糖鎖断片を MALDI-TOF/MS 解析でいくつか確認できているため、PA 化標識・LC-MS・NMR による PS-2 の糖鎖断片の同定を進めている。

Coccolithophorids, marine microalgae, have disk-shaped scales called coccoliths on the cell surface. Each coccolith arranges $CaCO_3$ crystals on an oval organic base plate. It has been reported that CaCO3 crystals of *Pleurochrysis carterae* contain three acidic polysaccharides (PS-1, PS-2, and PS-3), which may have roles in crystal growth control. However, their structure and function still need to be elucidated. This study aims to clarify molecular mechanisms of coccolith formation by using isolated acidic polysaccharides to analyze their glycan structures and their effects on regulating crystal formation. *P. carterae* was cultured in artificial seawater and acidic polysaccharides were eluted using an EDTA solution. PS-1, PS-2, and PS-3 were isolated by solvent extraction, fractional precipitation and HPLC (Ion-exchange, Gel filtration). Since PS-2 is composed of molecules of different lengths, it was fractionated into five fractions by size. Compositional analysis of these by IR spectrum and ABEE suggested that the peak intensities attributed to the functional groups and the composition ratios of the sugars were different. We are currently conducting structural analysis through alternative techniques.

coccolithophore, coccolith, acid polysaccharides

発表責任者：上野友紀（s39102200041@toyo.jp）

講演番号：4C3a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 C3 会場

異なる Ca 濃度で培養した円石藻 *Pleurochrysis carterae* のココリス形成の分子メカニズム解明
Deciphering the Molecular Mechanism of Coccolith Formation in *Pleurochrysis carterae* Cultured at Different Ca Concentrations

○駱 衍祺、上野 友紀、岡村 幸輝、長坂 征治（東洋大院生命）
○YANQI LUO, Yuki Ueno, Tomoki Okamura, Seiji Nagasaka (Life sciences. Toyo Univ)

円石藻 *Pleurochrysis carterae* は世界の海洋に広く生息している単細胞真核藻類である。円石藻の細胞表面は石灰化と呼ばれる $CaCO_3$ 結晶生成で作られる円盤状のココリスで覆われている。ココリスの構造は楕円形の有機物の周縁部あるいは全体に $CaCO_3$ の結晶が整列して形成さるため精密に制御されていると考えられている。また，海洋で円石藻のブルームが発生すると、1 日で数百トン単位の二酸化炭素を吸収し固定しているため、円石藻の石灰化は，海洋の炭素循環で大きな役割を担っていると考えられている。そのため，ココリス形成の分子機構は，結晶成長制御や地球環境の持続に向けた対策に貢献できるものとして注目されている。

P.carterae を異なる Ca 濃度培地で培養すると、高 Ca 濃度と低 Ca 濃度における円石藻のココリスの形成に大きな差が生じた。この結果をもとにココリスの形成に関与する遺伝子群を同定するため、異なる Ca 条件で培養した *P.carterae* から RNA を抽出し、RNA-seq を実施し，*de novo* 解析を行った。培養液中の Ca 濃度の変化に伴って発現量が変化する遺伝子群が多数存在し，これらはココリス形成関連遺伝子の候補と考えられた。しかし，これらの遺伝子の中で Ca 代謝関連などココリス形成への関与が直接的に期待される遺伝子群は少なく，多くが，機能未知遺伝子であった。今後、解析データの詳細な解析，他の円石藻種との比較などにより，これらの機能未知遺伝子の中にココリスの形成に関連する遺伝子の探索を進める。

Pleurochrysis carterae, a single-celled alga found in the illuminated layer of the ocean, creates disk-like scales called coccoliths through a process known as calcification. While some details of coccolith structure are known, the specific genes involved in their formation remain unclear. Cultivating the algae in media with different calcium levels revealed significant differences in coccolith formation between high and low calcium conditions.

We cultivated algae under different Ca concentrations and conducted de novo RNA-seq data analysis to identify the gene groups involved in coccolith formation. Although gene groups with varying expression levels were determined with changing calcium levels, among these genes, there were few directly associated with Ca metabolism or other processes crucial to coccolith formation, and many were genes with unknown functions. Further detailed data analysis and comparative studies with other coccolithophore species uncover genes related explicitly to coccolith formation.

coccolith, coccolithophore, calcium

発表責任者：駱 衍祺（s39102300356@toyo.jp）

講演番号：4C3a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 C3 会場

堆肥化施設由来試料の非培養と培養における微生物群集構造

Microbial community structure in non-culture and culture of samples from composting facilities

○森本 一、西山 すの（株式会社 komham）
○Hajime MORIMOTO, Suno NISHIYAMA (komham inc.)

脱炭素化に向けた動きが世界的に加速化しており、コンポストは二酸化炭素排出量削減および資源循環を可能にすることから課題解決策の選択肢として期待されている。有機性廃棄物処理施設において菌床に定着した微生物が有機性廃棄物の分解・資化を担い、エネルギー代謝による熱産生にて 60℃以上の高温環境を維持している。処理環境にて分解に寄与する微生物群集の把握とその内の単一微生物の生理活性について理解を深めることは有用な微生物資材の開発に繋がる。処理施設の微生物群集解析や単離培養を行った報告は多く報告されている。一方で環境現場の微生物群集と処理施設由来試料を実験室で液体培養した産物の微生物群集について次世代シーケンサーを用いて比較解析した報告はほとんどない。実際の現場環境に生息する微生物叢と実験室内の液体培養にて増殖した微生物叢の比較解析を実施することで in situ と in vitro 間での含有微生物の分布を明かにすることを本報告の目的とした。そのため、本発表では有機性廃棄物サンプルを 3 つの異なる人工的制御環境下で培養することで制御環境が微生物群集に及ぼす影響について報告する。

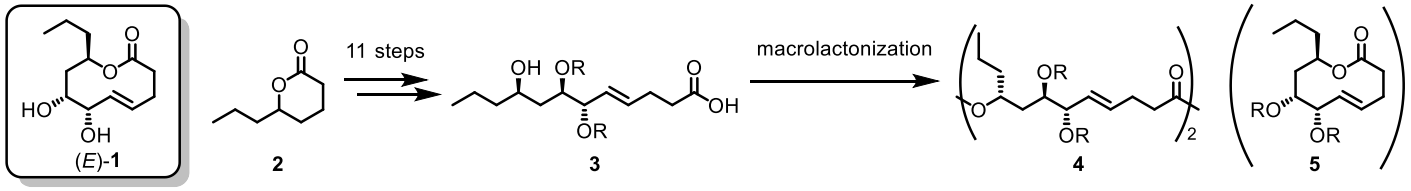
As the global trend toward decarbonization accelerates, composting is expected to be a problem-solving option that reduces carbon dioxide emissions and enables resource recycling. Microorganisms are responsible for the decomposition of organic wastes. There are many reports on the analysis, isolation, and cultivation of microbial communities at treatment facilities. On the other hand, there are few reports on comparative analysis of microbial communities between environmental sites and liquid cultured products using next generation sequencers. Therefore, we report here a comparative analysis of the microbial community in the onsite environment and that grown in the laboratory.

compost, microbial community, next generation sequencing

講演番号：4C4a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 C4 会場

Herbarumin IV の合成研究
Synthetic study of Herbarumin IV
○橋本 拓郎、勝田 亮、若森 晋之介、石神 健（東農大・生命）
○Takuro HASHIMOTO, Ryo KATSUTA, Shinnosuke WAKAMORI, Ken ISHIGAMI (Tokyo Univ. of Agric.)

微生物由来の 10 員環ラクトン類には植物生長を制御する化合物が多く存在する。Herbarumin IV ((*E*)-**1**)は植物内生菌である *Phomopsis* sp.より単離された 10 員環ラクトンであり、植物の発芽および幼根に対する生長阻害活性を示す[1]。これまでに閉環メタセシス反応を環化段階として(*Z*)-**1** を合成する方法が報告されているものの[2-4]、(*E*)-**1** の合成は達成されていない。そこで我々はマクロラクトン化を用いた(*E*)-**1** の合成研究を計画した。まずδ-オクタノラクトン(**2**)を出発原料として、ジヒドロキシ化を含む 11 段階にてヒドロキシ酸 **3** を合成した。本化合物のマクロラクトン化を試みたところ、10 員環ラクトン **5** ではなく 20 員環ラクトン **4** のみが生成する結果となった。ヒドロキシ酸 **3** の環化においては高希釈条件においても分子間反応が優先することが判明した。



Herbarumin IV (**1**) is a ten-membered lactone, isolated from the solid cultures of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. HCCB03520. Compound **1** showed inhibitory activity on germination and radicle growth of plants. Therefore, a synthetic study of compound **1** was attempted using macrolactonization chemistry. However, lactonization of hydroxy acid **3** gave twenty-membered lactone **4** as the sole product instead of desired ten-membered lactone **5**.

参考文献） 1) D. Chen *et al. Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 403. 2) P. R. Krishna *et al. RSC Adv.* **2013**, *3*, 23343. 3) B. Das *et al. Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 67. 4) B. Das *et al. Tetrahedron* **2016**, *72*, 7135.

lactone, synthesis

講演番号：4C4a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 C4 会場

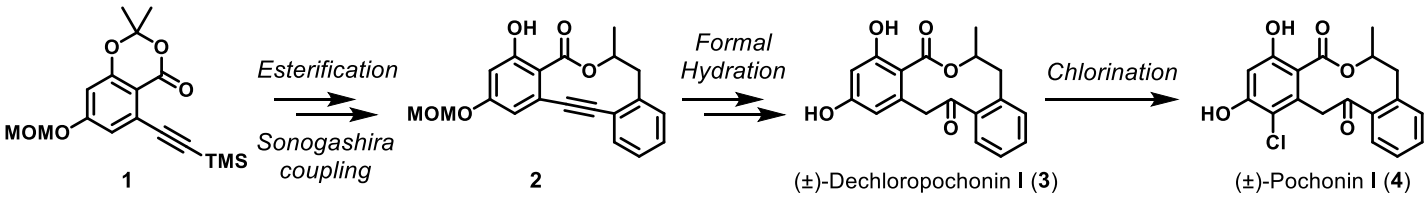
WNT-5A 誘導阻害を有する(±)-pochonin I の合成

Synthesis of (±)-pochonin I with inhibition of WNT-5A induction

○柴田 夏帆、鈴木 悠生、勝田 亮、若森 晋之介、矢島 新、額田 恭郎、石神 健（東農大・生命）
○Natsuho SHIBATA, Hisao SUZUKI, Ryo KATSUTA, Shinnosuke WAKAMORI, Arata YAJIMA, Tomoo NUKADA, Ken ISHIGAMI (Tokyo Univ. of Agric.)

Pochonin I は子嚢菌の一種である *Pochonia chlamydosporia* の培地より単離及び構造決定されたレゾルシン酸ラクトンである。本化合物は、脱毛に関与する分泌型糖タンパク質 WNT-5A の誘導阻害活性を有することから、毛髪成長物質として期待されている。構造上、10 員環ラクトンとジフェニルエタン構造を含む点が特徴的である。我々は WNT-5A に対する構造活性相関の解明を指向し、本化合物の効率的な合成経路の開発に着手した。

2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸より調製したアルキン **1** とブロモアルコールとのエステル交換反応と続く、分子内薗頭カップリングを行うことでラクトン **2** を合成した[1]。金触媒を用いたアルキンのヒドロアルコキシ化と加水分解により、(±)-dechloropochonin I (**3**)を合成した。最後に塩素化を行うことで(±)-pochonin I (**4**)の初の全合成を達成した。



Pochonin I is a characteristic resorcylic acid lactone with a diphenylethane structure isolated from *Pochonia chlamydosporia*. This compound is expected to be a hair-growing substance due to its WNT-5A-inducing inhibitory activity. In order to elucidate the structure-activity relationship of this compound expression the synthetic study for pochonin I was initiated. Ten-membered lactone **2** was successfully synthesized from 2,4,6- trihydroxybenzoic acid derived alkyne **1** and a bromoalcohol by esterification followed by intramolecular Sonogashira coupling. The first synthesis of (±)-dechloropochonin I (**3**) and (±)-pochonin I (**4**) was achived after Au(0)-catalyzed hydroalkoxylation.

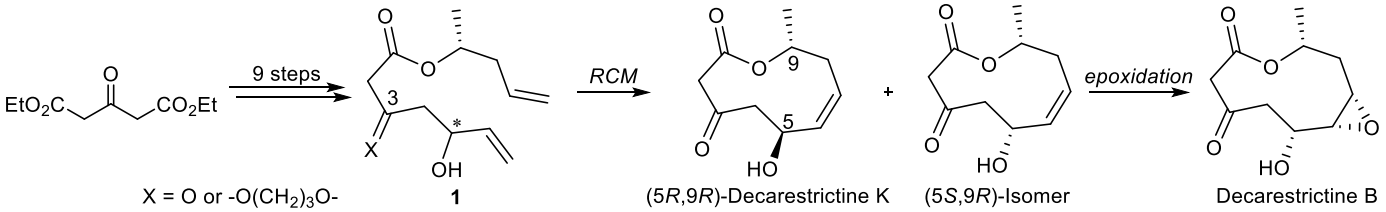
参考文献　1）鈴木 悠生ら、2021 年度 日本農芸化学会大会講演要旨集 2021, p. 356.

Lactone, Synthesis

講演番号：4C4a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 C4 会場

Decarestrictine K 及び B の合成研究
Synthetic study of decarestrictine K and B
○上羽 隼平、鈴木 隆之介、勝田 亮、若森 晋之介、石神 健（東農大・生命）
○ SHUMPEI UEBA, Ryunosuke SUZUKI, Ryo KATSUTA, Shinnosuke WAKAMORI, Ken ISHIGAMI (Tokyo Univ. of Agric.)

Decarestrictine 類は *Penicillium simplicissimum* から単離された、主として 10 員環ラクトンからなる化合物群である [1,2]。構造の差異によりコレステロールの生合成を促進もしくは抑制することが報告されているが、活性発現機構は未解明である。我々は本化合物群の合成研究の一環として、(5*R*,9*R*)-decarestrictine K の合成及び相対立体配置の決定について 2022 年度本会で発表した [3,4]。合成においては 3-オキソグルタル酸ジエチルを出発原料として 9 段階でジエン **1** を合成し、閉環メタセシス(RCM)を用いる経路を採用した。今回、異性体混合物 **1** の RCM において(5*R*,9*R*)-decarestrictine K とともに生成する(5*S*,9*R*)-異性体を分離し、この異性体の二重結合をエポキシ化することにより decarestrictine B の初の合成に成功したので報告する。



Penicillium derived ten-membered lactones, decarestirictines are known to regulate the cholesterol biosynthesis. Recently, we reported the synthesis and the determination of relative configuration of decarestrictine K using ring-closing metathesis (RCM). In this study, the first synthesis of decarestrictine B was achieved by the epoxidation of the isomer of decarestrictine K, which was obtained by RCM of the diastereomeric mixture of diene **1**.

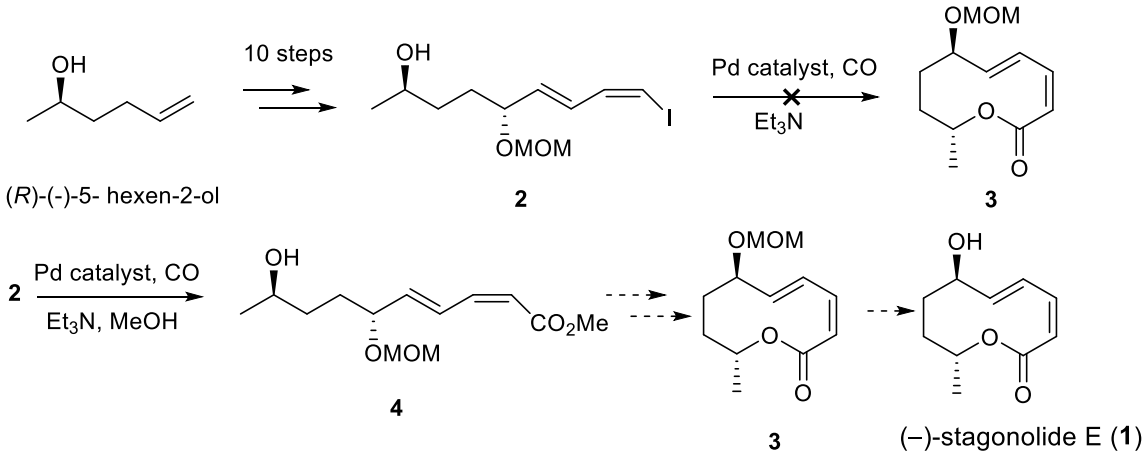
参考文献
1) Wink, J. et al. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 56.
2) Zeeck, A. et al. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1172.
3) 鈴木隆之介ら, Decarestrictine K の合成研究, 日本農芸化学会 2022 年度大会, 4F02-08.
4) 上羽隼平ら, (−)-Decarestrictine K の合成研究, 日本農芸化学会関東支部 2023 年度大会, P-9.

lactone, synthesis

講演番号：4C4a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 C4 会場

アシルパラデーションを用いた(-)-stagonolide E の合成研究
Synthesis of (-)-stagonolide E using acylpalladation
○日野 瑞希[1]、河村 篤[2]、真壁 秀文[2] ([1]信大院総合理工農、[2]信大バイオメディカル研)
○Mizuki HINO[1], Atsushi KAWAMURA[2], Hidefumi MAKABE[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Inst. for Biomed. Sci.)

アシルパラデーションは，CO 雰囲気下でハロゲン化アルケニルに対して Pd 触媒を用いて分子内にカルボニル基を導入できる反応である．これまでに本反応を用いた大環状ラクトンの合成は報告されていない．そこで，天然物合成への応用のために，10 員環ラクトンである (-)-stagonolide E (**1**) の合成研究に着手した．(*R*)-(-)-5-Hexen-2-ol を出発物質とし，10 段階で環化前駆体 **2** を合成した．得られた **2** をアシルパラデーションに供したところ，マクロラクトン化は進行しなかった．そこでメチルエステル **4** を合成した．今後は，エステルの加水分解および椎名マクロラクトン化によって **3** を合成し，MOM 基の脱保護を経て **1** を合成する予定である．



Over the past decade, acylpalladation of alkenyl halide has been developed as a useful method for preparing cyclic carbonyl compounds. However, synthetic examples of macrolactone using cyclic acylpalladation has not been reported yet. Therefore, we tried to apply this reaction to the synthesis of 10-membered ring lactone, (-)-stagonolide E (**1**). The cyclization precursor **2** was synthesized from (*R*)-(-)-5-Hexen-2-ol in 10 steps. However, macrolactonization using cyclic acylpalladation did not proceed. Thus, we switched to synthesize methyl ester **4** using acylpalladation. (-)-Stagonolide E (**1**) will be synthesized in 3 steps by hydrolysis of methyl ester **4** followed by Shiina macrolactonization and deprotection of the MOM group.

total synthesis, natural products, acylpalladation

発表責任者：真壁秀文（makabeh@shinshu-u.ac.jp）

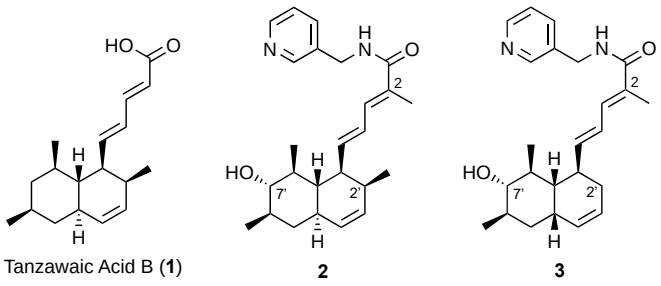
講演番号：4C4a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 C4 会場

2'-デメチル-7'-ヒドロキシ-2-メチルタンザワ酸 B アミド縮環部異性体の全合成

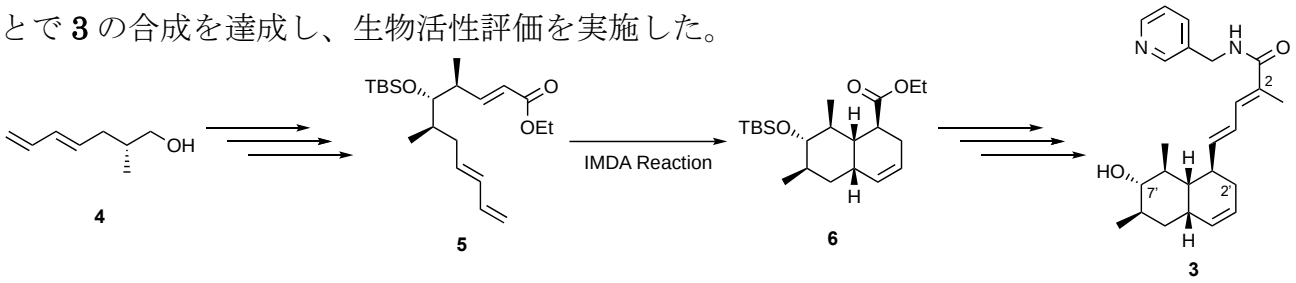
Synthesis of a Stereoisomer of 2'-Demethyl-7'-hydroxy-2-methyltanzawaic Acid B Amide at Fused Positions

○臼倉 大輝、村田 貴嗣、筒井 久澄、渡部 史也、平田 諒、岡野 宙輝、金井 大和、塩釜 龍之介、夏目 美祐希、市川 翔、陸 穎佳、岡本 卓真、下仲 基之、椎名 勇 (東理大理)
○Daiki Usukura, Takatsugu Murata, hisazumi Tsutsui, Fumiya Watabe, Ryo Hirata, Hiroki Okano, Yamato Kanai, Ryunosuke Shiogama, Miyuki Natsume, Syo Ichikawa, Eika Riku, Takuma Okamoto, Motoyuki Shimonaka, Isamu Shiina (Tokyo University of Science)

タンザワ酸 B(**1**)は真菌ペニシリウム・シトリヌムより単離された化合物であり、抗菌活性を有することが報告されている [1]。**1** の類縁体である 7'-ヒドロキシ-2-メチルタンザワ酸Bアミド(**2**)は当研究室で全合成が報告されており [2]、新規作用機序を有する抗がん剤のリード化合物として注目されている。今回我々は、**2** の 2'位のメチル基が欠損し、オクタリン骨格の縮環様式が異なる 2'-デメチル-7'-ヒドロキシ-2-メチルタンザワ酸 B アミド縮環部異性体(**3**)を合成した。また、**3** の生物活性評価を実施し、オクタリン骨格の立体配置および立体配座の違いが生物活性に及ぼす影響を調査した。



予め調製した **4** を数工程の変換により環化前駆体 **5** へと導いた後、分子内 Diels–Alder 反応を行い、望みの立体配置を有する二環性化合物 **6** を主生成物として入手した。その後、側鎖部を伸長することで **3** の合成を達成し、生物活性評価を実施した。



Tanzawaic acid B (**1**) is a compound isolated from the fungus *Penicillium citrinum* and has been reported that **1** has an antibacterial activity. 7'-Hydroxy-2-methyltanzawaic acid B amide (**2**) is an analog of **1**. A total synthesis of **2** has been reported in our laboratory and **2** is used as a lead compound for the development of anticancer drugs with a novel mode of action. In this study, we synthesized **3** which is missing a methyl group at C2' position of **2** and has *cis*–fused octalin skeleton. We also performed a bioactivity assessment of **3** to investigate the effects of conformational differences on its biological activity.

1) H. Arimoto, D. Uemura, *et al.*, *Chem. Lett.*, **1997**, *26*, 885–886.
2) I. Shiina, Y. Umezaki, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 150–159.

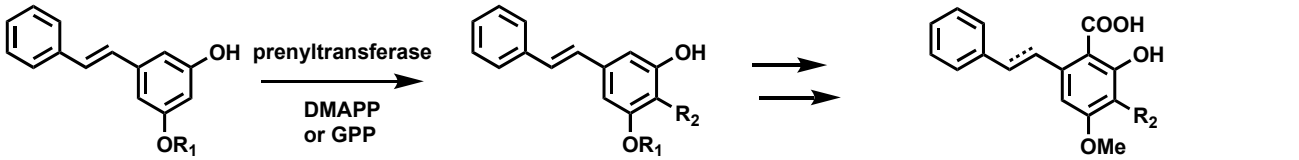
Tanzawaic Acid, octalin, IMDA reaction

講演番号：4C4a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 C4 会場

多様な生物活性を有する Amorfrutin 類の化学酵素合成研究
Studies on Chemoenzymatic Synthesis of Amorfrutin Natural Products
○QIU JIHAN、福田 夢月、白石 太郎、葛山 智久、滝川 浩郷、小倉 由資（東大院農生科）
○JIHAN QIU, YUZUKI FUKUDA, TARO SHIRAISHI, TOMOHISA KUZUYAMA, HIROSATO TAKIKAWA, YUSUKE OGURA (The Univ. of Tokyo)

Amorfrutin 類は主に甘草類から単離された天然物であり、抗菌活性、抗糖尿病作用など多種多様な生物活性を示す。Amorfrutin 類の化学合成はこれまでに数多く報告されているが、多くの場合において多置換芳香環骨格への側鎖の導入工程は常に課題となっている。また、本天然物群の化学酵素合成は報告されていない。そこで我々は、ABBA ファミリープレニル基転移酵素(ABBA PTase)を利用すれば、簡便に側鎖を導入できるのではないかと期待し、本酵素を用いた amorfrutin 類の合成研究に着手した。その結果、本酵素が **4a** と **4b** を基質として受け入れ、プレニル化もしくはゲラニル化された **5a** と **5b** を与えることを見出した。続いて官能基変換を行い、４工程で cajaninstilbene acid (**1**)、５工程で amorfrutin A (**2**)、および６工程で amorfrutin B (**3**)の化学酵素合成を達成した。

本講演では、合成研究の詳細について紹介する。



4a R_1 = methyl
4b R_1 = H

5a R_1 = methyl, R_2 = prenyl
5b R_1 = H, R_2 = geranyl

unsaturated: Cajaninstilbene acid (**1**) R_2 = prenyl
saturated: Amorfrutin A (**2**) R_2 = prenyl
saturated: Amorfrutin B (**3**) R_2 = geranyl

Amorfrutins are natural products mainly isolated from *Glycyrrhiza* plants and exhibit diverse biological activities. While chemical synthesis of amorfrutins has been extensively reported, the introduction of side chains into multi-substituted aromatic ring scaffolds has remained a challenging task. Furthermore, chemoenzymatic synthesis of amorfrutins has not been reported yet. We expected that using ABBA prenyltransferases (PTases) from microorganisms could simplify the introduction of side chains. Consequently, we initiated a study on the chemoenzymatic synthesis of amorfrutins using PTases. As a result, we found that these PTases accept **4a** and **4b** as the substrates to yield the prenylated or geranylated compounds **5a** and **5b**. Further functional group transformations enabled the chemoenzymatic synthesis of cajaninstilbene acid (**1**) in four steps, amorfrutin A (**2**) in five steps, and amorfrutin B (**3**) in six steps.

amorfrutins, chemoenzymatic synthesis, ABBA prenyltransferases

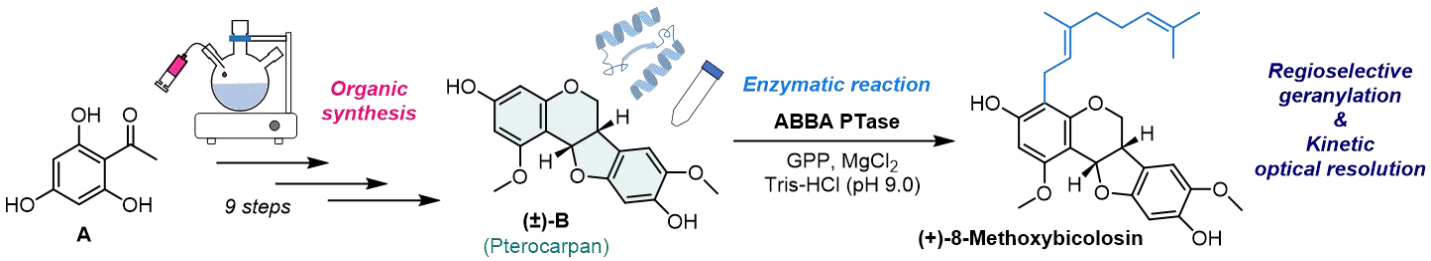
講演番号：4C4a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 C4 会場

プレニル基転移酵素を用いたプテロカルパン型天然物の化学酵素合成

Chemoenzymatic synthesis of pterocarpan-type natural products using prenyltransferases

○三浦 勇輝、福田 夢月、白石 太郎、葛山 智久、滝川 浩郷、小倉 由資（東大院農生科）
○ Yuki MIURA, Yuzuki FUKUDA, Taro SHIRAISHI, Tomohisa KUZUYAMA, Takikawa HIROSATO, Yusuke OGURA (The Univ. of Tokyo)

(–)-8-Methoxybicolosin はマメ科植物 *Lespedeza bicolor* の根より単離されたプテロカルパン骨格を有する特異なフラボノイドである。本天然物の全合成は未だ達成されておらず、そのためには効率的なプテロカルパン骨格の構築と位置選択的なゲラニル側鎖の導入が必要不可欠である。そこで本研究では、8-Methoxybicolosin の効率的な量的供給ルートを確立することを目的に、多様な芳香族基質に対してプレニル基ないしはゲラニル基を導入できる ABBA ファミリープレニル基転移酵素（ABBA PTase）を活用した化学酵素合成研究に着手した。



初めに、有機合成により市販のアセトフェノン誘導体(A)からプテロカルパン骨格を持つ基質(±)- B を 9 工程で調製した。続いて(±)-B に対し、ゲラニル二リン酸（GPP）存在下で ABBA PTase を作用させたところ、興味深いことに速度論的光学分割に続く位置選択的なゲラニル化が進行し、(+)- 8-Methoxybicolosin の化学酵素合成を達成した。

(-)-8-Methoxybicolosin is a unique flavonoid with a pterocarpan skeleton isolated from the roots of *Lespedeza bicolor*. Efficient construction of the pterocarpan skeleton and regioselective introduction of geranyl side chains are essential for the total synthesis of this natural product. We undertook a chemoenzymatic synthetic study utilizing ABBA family prenyltransferase (ABBA PTase) to establish an efficient quantitative supply route of 8-methoxybicolosin.

First, the substrate (±)-**B**, which possesses a pterocarpane skeleton, was prepared from a commercially available acetophenone derivative (**A**) via organic synthesis in 9 steps. Interestingly, the subsequent treatment of (±)-**B** with ABBA PTase in the presence of geranyl diphosphate (GPP) affected not only kinetic optical resolution of (±)-**B** but also regioselective geranylation at C1 position, leading to an achievement of the chemoenzymatic synthesis of (+)- 8-Methoxybicolosin.

Naturalproducts, Chemoenzymaticsynthesis, Pterocarpan

講演番号：4C4a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 C4 会場

ユニークな多環式ベンゾキセピン骨格を有する新規リグナン 2',9-epoxylyoniresinol の合成

Synthesis of new lignan with unique polycyclic benzoxepin skeletone

○橋爪 玲那、河地 貴利、須戸 雅弘、山田 真希人、倍 詩織、奥田 和真、奥野 祥治（和歌山高専）
○ REINA HASHIZUME, TAKATOSHI KAWAJI, MASAHIRO SUDO, MAKITO YAMADA, SHIORI KASA, KAZUMA OKUDA, YOSHIHARU OKUNO (Nat. Inst. Technol., Wakayama College)

【目的】2',9-Epoxylyoniresinol (**1**) は梅から単離、構造決定された新規リグナンであり、抗酸化活性およびインフルエンザウイルス増殖抑制効果を示すことを報告している。化合物 **1** は benzoxepin と aryl tetralin が架橋結合したユニークな構造を持つリグナンであり、植物からこの骨格を有するリグナンは数種類しか報告されていない。化合物 **1** も梅 10 kg に数 mg しか含まれていない希少成分であり、機能性等の研究を行うのは困難である。そこで、本研究では化合物 **1** の新たな機能性研究を行うために全合成を目的とした。

【方法・結果】化合物 **1** の合成は桂皮酸の一種である sinapinic acid (**2**) を出発原料として行った。まず、化合物 **2** から 3 ステップで化合物 **1** の前駆体となり得る lyoniresinol (**5**)を合成した。次いで、化合物 **5** から化合物 **1** の合成は、臭素により化合物 **5** の 2'位をブロモ化し、環化する経路を検討した。臭素によるブロモ化を行ったところ、TLC においてブロモ化が進行したと思われる複数個のスポットが確認されたため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。得られた化合物を ^{1}H NMR、ESI-MS により解析した結果、生成物の 1 つは化合物 **5** の 6 位がブロモ化したものであった。現在、2'位へのブロモ化の条件と環化について検討を進めている。

2',9-Epoxylyoniresinol (**1**) is a new lignan from Japanese apricot (*Prunus mume*) and it has antioxidant activity and growth inhibitory activity against influenza virus. Compound **1** has unique bridged structure containing a tetracyclic benzoxepin and an aryl tetralin. Compound **1** is also a rare component, containing only a few mg per 10 kg of Japanese apricot. Therefore, in this study, the total syntheses of compound **1** was investigated in order to conduct new functional research.

First, lyoniresinol (**5**), a precursor of compound **1**, was synthesized by three steps from sinapinic acid (**2**). The cyclization of compound **5** to compound **1** was planned the bromination of the 2' position of compound **5** by bromine followed by cyclization with copper oxide. In the result of the bromination of compound **5**, Several spots thought to be brominated compounds were detected by TLC, and the products were purified by silica gel column chromatography. The structure of one of the isolated compound was identified the brominated compound at 6 position by ^{1}H NMR and ESI-MS, but did not isolate the brominated compound at 2' position.

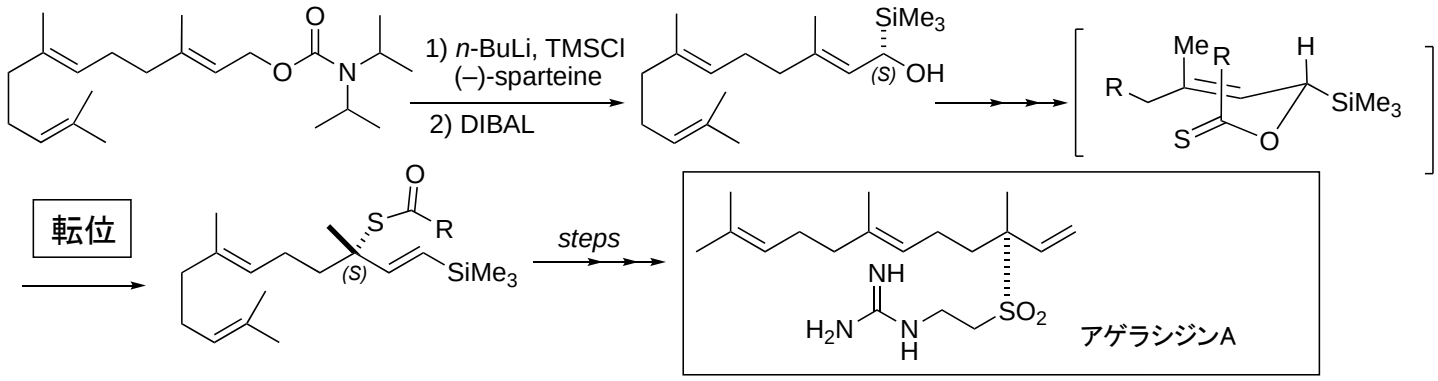
2',9-Epoxylyoniresinol, unique polycyclic benzoxepin skeletone, cyclization

講演番号：4C4a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 C4 会場

海洋生物由来のテルペン合成
synthesis of terpenes isolated from marine organisms

○市川 善康[1]、越智 里香[1]、増田 俊哉[2] ([1]高知大理工、[2]大阪公立大学大学院生活科学研究科)
○Yoshiyasu ICHIKAWA[1], RIKA OCHI[1], Toshiya Masuda[2] ([1]Kochi Univ., [2]Osaka Metropolitan University)

アゲラシジン A は，1983 年に沖縄産海綿より故中村英士により単離された海洋天然物である。ファルネソールを出発原料として，Hoppe によって開発されたスパルテインを用いた不斉合成によって，光学活性なアリルアルコールを調製した。そしてアリルキサンテートの転位反応により，硫黄原子が結合した四級不斉炭素を構築して光学活性なアゲラシジン A の合成に成功した。合成品と天然物の旋光度を比較して，未解明であったアゲラシジン A の絶対配置を決定した。



Enantioselective synthesis of the marine natural product (+)-agelasidine A has been achieved by taking advantage of [1,3]-chirality transfer from enantiomerically enriched α-silyl farnesol through a key thio-Claisen rearrangement. The optical rotation of the hydrochloride salt of the synthetic substance confirmed that natural (+)-agelasidine A has the S-configuration at its C-10 stereogenic center.

natural products, organic synthesis, sigmatropic reaciton

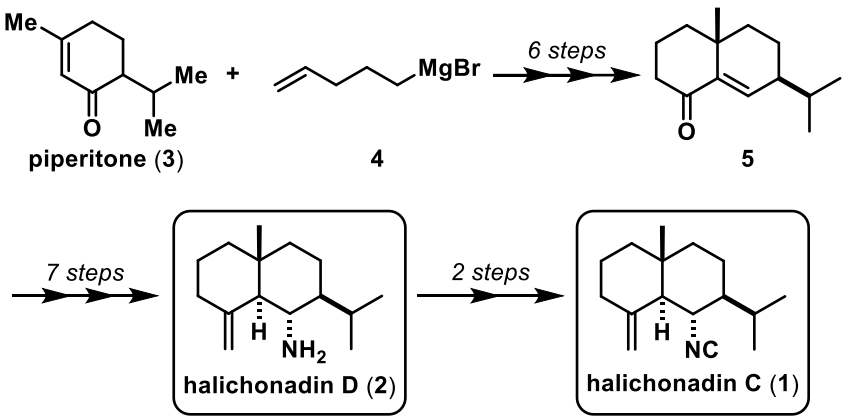
講演番号：4C4a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 C4 会場

Halichonadin 類の合成研究

synthetic studies on halichonadins

○藤田 遼平[1]、大岡 海斗[1]、市川 善康[2]、細川 誠二郎[1] ([1]早大理工、[2]高知大理工)
○Ryohei FUJITA[1], Kaito OOKA[1], Yoshiyasu ICHIKAWA[2], Seijiro HOSOKAWA[1] ([1]Waseda Univ., [2]Kochi Univ.)

海洋生物由来のテルペン halichonadin 類は、沖縄に生息する海綿 *Halichondria* 属より、北海道大学の小林によって単離・構造決定された。現在までに 17 種類が同海綿より単離されており、halichonadin C (**1**) 由来の骨格を有している。このことは **1** が生合成中間体であることを示唆しており、これらを合成することで他の類縁体を生合成仮説に基づいて合成できると考えた。そこで、未だ合成例が報告されていない **1** の合成ルートの確立を目指し、研究に着手した。



市販のラセミ体の piperitone (**3**) とグリニャール試薬 **4** から 6 工程で *α*,*β*-不飽和ケトン **5** とした。続いて、**5** から 7 工程で halichonadin D (**2**) を合成し、さらに 2 工程で halichonadin C (**1**) へと導いた。これにより、**1** および **2** の初の全合成を達成した。

本発表では上記の合成研究とともに、類縁体である halichonadin A および B の合成について、生合成仮説に基づく合成研究についても発表する。

Halichonadins were isolated from a marine sponge *Halichondria* sp. 17 types of halichonadins have been isolated from the same sponge so far, and most of them have skeletons derived from halichonadin C (**1**). We suggest that **1** is a biosynthetic intermediate, and it is speculated that other members of halichonadins can be synthesized based on the biosynthetic hypotheses. Therefore, we began synthetic studies on **1**.

The *α*,*β*-unsaturated ketone **5** was obtained in 6 steps from commercially available (±)-piperitone (**3**). Enone **5** was converted to halichonadin D (**2**) in 7 steps, which was transformed to halichonadin C (**1**) in 2 steps. Therefore, the first total synthesis of **1** and **2** was achieved.

In addition to the above synthetic studies, the synthesis of halichonadins A and B based on the biosynthetic hypothesis will be also disclosed in this presentation.

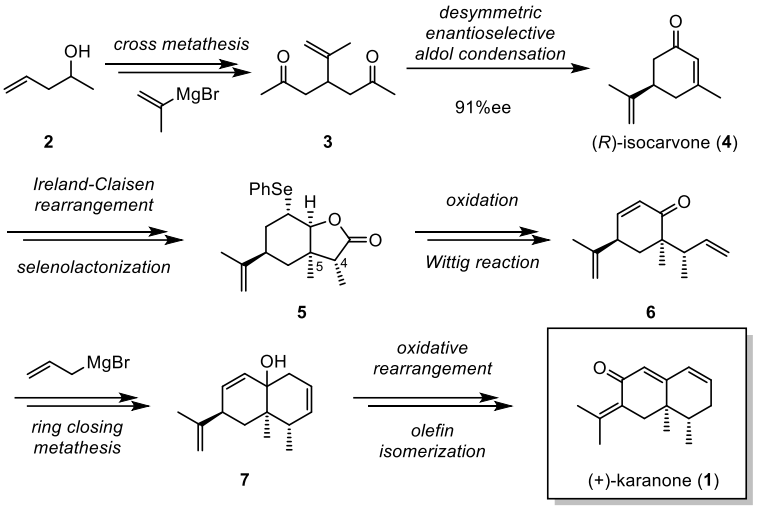
natural products, organic synthesis, biosynthetic hypotheses

講演番号：4C4a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 C4 会場

(+)-Karanone の不斉全合成

Asymmetric Total Synthesis of (+)-Karanone

○祷 雄太、滝川 浩郷、小倉 由資（東大院農）
○Yuta INORI, Hirosato TAKIKAWA, Yusuke OGURA (The Univ. of Tokyo)



キャラノン(**1**)はエレモフィラン骨格を持つセスキテルペノイドで、東洋古来の天然香料である沈香(*Aquillaria agallocha*)の抽出物から得られる香気成分である。本研究では(+)-キャラノン(**1**)の初の不斉全合成を達成した。

市販の **2** をメチルビニルケトンとのクロスメタセシスとイソプロペニル基の付加を含む 4 工程の反応に付し、対称でアキラルなジケトン **3** を調製した。続いてエナンチオ選択的な分子内アルドール反応にて非対称化を行い(*R*)-isocarvone (**4**)を得た。**4** を立体選択的な還元と Ireland-Claisen 転位に付し連続不斉中心(C4,5 位)を構築したのち、セレノラクトン **5** へと導いた。**5** に対し官能基変換と Wittig 反応による増炭によりケトン **6** を得、アリル基の付加に続く閉環メタセシス反応により二環性骨格の構築を完了した。最後にアリルアルコールの酸化的転位と二重結合の異性化を行うことで、原料の **2** から 17 工程で **1** の初の不斉全合成を達成した。

Karanone (**1**) is a sesquiterpenoid with an eremophilane skeleton and is the aroma component of an extract of agarwood (*Aquillaria agallocha*), an ancient natural perfume.
First, commercially available **2** was subjected to a four-step process involving cross-metathesis with methyl vinyl ketone and addition of an isopropenyl group to prepare the symmetrical and achiral **3**, followed by intramolecular asymmetric aldol reaction to afford (*R*)-isocarvone (**4**). **4** was subjected to stereoselective reduction followed by Ireland-Claisen rearrangement to construct a continuous asymmetric center (C4,5), leading to selenolactone **5**. The construction of the bicyclic framework was completed by the addition of an allyl group followed by ring-closing metathesis reaction. Finally, oxidative rearrangement of the allyl alcohol and isomerization of the double bond led to the first asymmetric total synthesis of **1** in 17 steps from **2**.

total synthesis, terpene, eremophilane

発表責任者：小倉由資（ayskogura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

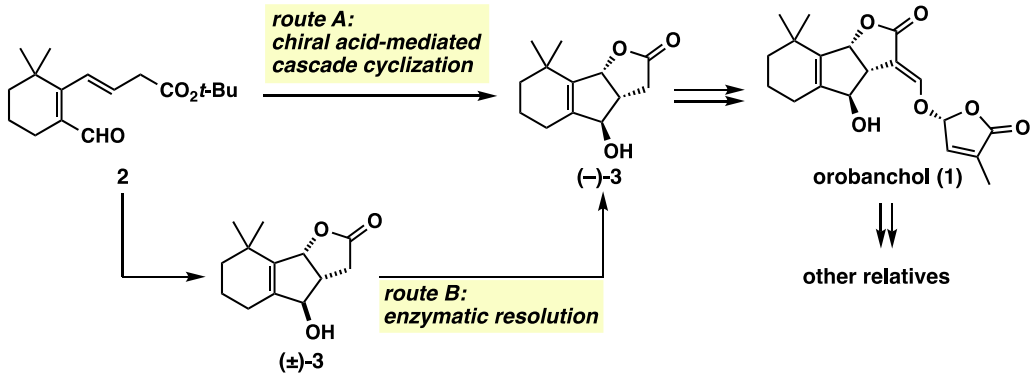
講演番号：4C4a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 C4 会場

電子環状反応を基盤とした orobanchol 類の合成

Synthesis of orobanchols based on electrocyclic reaction

○内田 聖乃、小倉 由資、岡村 仁則、滝川 浩郷（東大院農生科）
○Kiyono UCHIDA, Yusuke OGURA, Hironori OKAMURA, Hirosato TAKIKAWA (The Univ. of Tokyo)

Strigolactone は植物が産生するアポカロテノイドであり、根寄生雑草の発芽刺激物質である。我々はこれまでに報告されている合成例と比較して、より効率的かつジアステレオ選択的に(±)-orobanchol (**1**)を合成することに成功した。そこで我々は、本手法を拡張し、**1** の光学活性体合成に以下に示す 2 つの方法を用いて着手した。1 つ目は、(*E*)-オレフィン **2** に対してキラル酸を作用させて連続環化反応を不斉化する方法（経路 A）であり、2 つ目は、連続環化反応により得られたラセミ体の *trans*-アルコール **3** に対して酵素を用いた速度論的光学分割を行う方法（経路 B）である。これらにより得られた(–)-**3** を既知の反応条件に付すことにより **1** の不斉合成を達成した。また、**1** の類縁天然物の不斉合成も進めている。本大会ではその研究の詳細について発表する。



Strigolactones, which are apocarotenoids isolated from plants, have been known as germination stimulants for seeds of root parasitic weeds. We have already achieved more efficient and stereoselective synthesis of orobanchol (**1**) than previous syntheses. Herein, we have extended this method to synthesize the optically active **1** using two methods described below. The first is the asymmetric cascade cyclization of (*E*)-olefin **2** using chiral acid (route A), and the second is the enzymatic kinetic resolution of (±)-*trans*-alcohol **3** obtained by cascade cyclization (route B). The asymmetric synthesis of **1** was achieved by subjecting (–)-**3** to known reaction conditions. In addition, the asymmetric synthesis of natural relatives of **1** is also in progress. In this presentation, we would like to present the details of this study.

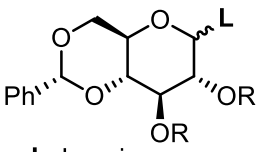
strigolactone, asymmetric synthesis, enzymatic kinetic resolution

講演番号：4C4a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 C4 会場

ベンジリデングルコシドの合成とその光学分割剤としての可能性

Preparation of benzylidene glucoside and its application scope for an optical resolution agent.

○齋藤 さら、小林 萌、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Sara Saito, Moe Kobayashi, Ken-ichi Nihei (School of Agriculture, Utsunomiya University)



L: Leaving group

光学分割剤の導入によるジアステレオマー化は，光学純度の高い化合物を得るための重要な手法の 1 つである．当研究室では，近年，ベンジリデングルコシドのエピマーが，シリカゲルクロマトグラフィーにより容易に分割できることを確認した．そこで，水酸基に直接導入できるベンジリデン型糖供与体を化学合成し，さらにその光学分割剤の適用範囲を探ることを目的に本研究を行った．

アセタール化などを経由し，D-グルコースから 4 段階，収率 31%で光学分割剤であるイミデートを合成した．初めに，芳香族アルコールに対し，Lewis 酸存在下，イミデートを用いたグリコシル化を行い，収率 49%でグルコシドを得た．このグルコシドのアセチル基を除去し，ジオールに導き，シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行うことで，エピマーをそれぞれ収率 25%と 32%で単離した．一方，脂肪族アルコールに対しても，この光学分割剤を導入し，エピマーであるジオールをそれぞれ収率 24%と 29%で単離できた．このように，芳香族アルコールおよび脂肪族アルコールの光学分割に，このイミデートが利用できることを明らかにした．

The diastereomerization by the introduction of the optical resolution agent is one of the significant methods to obtain the highly enantiopure compound. Recently, we found that the epimers of the benzylidene glucoside could be easily separated by a silica gel chromatography. Thus, the preparation of a benzylidene glucose donor for the direct introduction on the hydroxyl group and the investigation of its application scope as the optical resolution agent were demonstrated in this study.

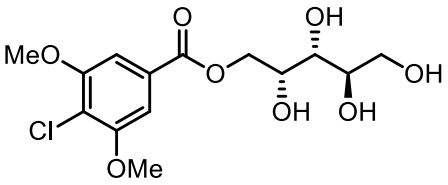
An optical resolution agent, the imidate was synthesized from D-glucose in 31% yield over 4 steps including the acetalization. Firstly, the agent was introduced to an aromatic alcohol in the presence of a Lewis acid to give the desired glucosides in 49% yield. The removal of the acetyl groups followed by the separation by a silica gel chromatography obtained each epimer in 25% or 32% yield, respectively. On the other hand, each diol epimer derived from an aliphatic alcohol modified by the agent was isolated in 25% or 32% yield, respectively. Therefore, we confirmed that the imidate can be used by an optical resolution for aromatic and aliphatic alcohols.

benzylidene glucose donor, optical resolution, glycosylation

発表責任者：齋藤 さら（mc226676@s.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4C4a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 C4 会場

ヤマブシタケの fruiting liquid 由来のアラビトール誘導体の化学合成
Chemical synthesis of arabitol derivatives isolated from the fruiting liquid of *Hericium erinaceus*
○上野 真澄[1]、石井 瑞樹[1]、呉 静[2,3]、河岸 洋和[2,3]、二瓶 賢一[1]([1]宇都宮大農、[2]静大・農、[3]静大・キノコ科研)
○Masumi Ueno[1], Mizuki Ishii[1], Jing Wu[2,3], Hirokazu Kawagishi[2,3], Ken-ichi Nihei[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Mushroom Sci., Shizuoka Univ.)



キノコの菌糸体は，子実体を発生する前に液体を分泌する．我々はこの液体を「fruiting liquid (FL)」と命名した．ヤマブシタケの FL に含まれるアラビトール誘導体は，タマバリタケ科のエノキタケの子実体形成を促進する．当研究グループでは，選択的な脱保護とエステル化を経由し，それらアラビトール誘導体の全合成を行った．

安息香酸誘導体をメチル化した後，得られたエステルをけん化し，クロモフォア部分を合成した．一方，D-マンニトールのアセトニド化やグリコール酸化開裂などを行い，アラビトール部分を得た．クロモフォア部分とアラビトール部分の脱水縮合を行った後，全ての保護基の除去し，天然物を全合成した(4 段階，収率 56%)．また，アラビトール部分の合成中間体をジオールへと導き，クロモフォア部分との選択的なエステル化の後，保護基を除去することで，天然異性体の全合成を達成した(4 段階，収率 33%)．

Before developing the fruiting body of the fungus, a liquid is secreted by the mycelium, which was named fruiting liquid (FL). Arabitol derivatives, the ingredients of FL from *Hericium erinaceus* (Hericiaceae), promote the fruiting body formation of *Flammulina velutipes* (Physalacriaceae). In our research team, total synthesis of arabitol derivatives was demonstrated through selective deprotection and esterification.

The permethylation of the benzoic acid derivative followed by saponification of the ester moiety gave the chromophore part. On the other hand, D-mannitol was converted into the arabitol part *via* several steps such as acetonidation and glycol oxidative cleavage. After the dehydration condensation between the chromophore and the arabitol, the removal of all the protective groups afforded the natural product for the first time (56% yield over four steps). Next, the diol derived from a synthetic intermediate of the arabitol, was esterified with the chromophore. Finally, by the removal of all the protective groups in the ester, total synthesis of a natural isomer was achieved for the first time (33% yield over four steps).

【Ref.】Wu, J., Kawagishi, H. *et al. J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 13338−13345.

arabitol derivatives, chromophore part, glycol oxidative cleavage

発表責任者：上野真澄（mc226697@s.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4C5a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 C5 会場

ラガービール酵母 *Saccharomyces pastorianus* の長期継代培養時におけるゲノム不安定性の解析
Analysis of genomic instability in lager beer yeast *Saccharomyces pastorianus* during long-term passaging culture.

○石井 優人[1]、宮澤 紘輔[1]、高橋 朋子[2]、岩間 亮[1,3]、福田 良一[1,3]、堀内 裕之[1,3]、野田 陽一[1,3] ([1]東大院・農生科、[2]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ（株）、[3]東大・微生物連携機構)
○Yuto ISHII[1], Kosuke MIYAZAWA[1], Tomoko TAKAHASHI[2], Ryo IWAMA[1,3], Ryoichi FUKUDA[1,3], Hiroyuki HORIUCHI[1,3], Yoichi NODA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agri. And Life Sci., UTokyo, [2]Asahi Quality & Innovations, Ltd., [3]CRIIM, UTokyo)

ラガービール酵母 *Saccharomyces pastorianus* は *Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* の異種間交雑によって発生したと考えられている。ビール醸造において *S. pastorianus* は何度か繰り返し使用されるが、その過程でゲノム構造が変化することがある。本研究では、*S. pastorianus* のゲノム不安定性のメカニズムや不安定なゲノムの領域を明らかにすることを目的として、*S. pastorianus* のゲノムの安定性をモニターできる株を作製して解析を行った。まず *S. eubayanus* のそれぞれの染色体両末端に *URA 3* と *TRP1* マーカー遺伝子を組み込んだ 16 種の一倍体株を作製し、これらを、マーカー遺伝子を持たない *S. eubayanus* 一倍体と掛け合わせて二倍体を作製した。さらに、それらの株を *S. cerevisiae* の二倍体と掛け合わせて *S. pastorianus* の四倍体モデル株 16 種を作製した。これらの四倍体モデル株をストレス環境下で約 100 世代継代培養し、マーカー遺伝子の有無を調べることでモデル株における *S. eubayanus* のサブゲノムの不安定性を解析した。その結果、特定の染色体においてマーカー遺伝子の欠失と推測される事象が起こりやすい傾向があることを見出した。

Saccharomyces pastorianus, a yeast used to brew lager beer, is believed to have resulted from interspecific hybridization between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus*. *S. pastorianus* is used several times repeatedly in beer brewing, and its genome structure can be changed in the process of brewing. To elucidate the mechanism for genome instability in *S. pastorianus* and to identify the instable regions of the genome, we first created 16 haploid strains of *S. eubayanus* with *URA3* and *TRP1* markers at both ends of each chromosome. These strains were crossed with haploid strains of *S. eubayanus* without markers to create diploid strains. Then, we crossed them with diploid strains of *S. cerevisiae* to create the 16 tetraploid model strains of *S. pastorianus*. These model strains were cultured for about 100 generations under stress conditions, and the instability of the *S. eubayanus* subgenome in them were analyzed by examining the presence or absence of markers. The results suggested that markers on certain chromosomes are lost at relatively high frequency.

genome instability, hybrid, yeast

発表責任者：野田陽一（anoday@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C5a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 C5 会場

Saccharomyces pastorianus のモデル株を用いたミトコンドリアと低温増殖性の関連
Association between mitochondria and low temperature growth ability using model strains of *Saccharomyces pastorianus*.
○福西 鈴穂[1,2]、高橋 朋子[5]、岩間 亮[3,4]、福田 良一[3,4]、堀内 裕之[3,4]、鎌倉 高志[2]、野田 陽一[3,4]
([1]東大・農、[2]東理大・理工、[3]東大院・農生科、[4]東大・微生物連携機構、[5]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ（株））
○Suzuho FUKUNISHI[1,2], Tomoko TAKAHASHI[5], Ryo IWAMA[3,4], Ryouichi FUKUDA[3,4], Hiroyuki HORIUCHI[3,4], Takashi KAMAKURA[2], Yoichi NODA[3,4] ([1]Fac. of Agri., U Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Sci., [3]Grad. Sch. Agri. And Life Sci., UTokyo, [4]CRIIM, UTokyo, [5]Asahi Quality & Innovations, Ltd.)

ラガービールの醸造に用いられる *Saccharomyces pastorianus* は、*Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* の異種間交雑によって発生したハイブリッド株であると考えられている。一般的にハイブリッド株ではどちらか一方の親株由来のミトコンドリアを受け継ぐことが知られている。*S. pastorianus* は低温での優れた増殖性を有するが、これは低温増殖性の *S. eubayanus* のミトコンドリアを受け継いでいるためであることを示唆する報告がなされている。しかし、*S. pastorianus* が有する低温増殖性は、どのような機構により獲得されたものか、また低温増殖性がミトコンドリアのみに由来するのかは不明である。本研究では親株より受け継がれるミトコンドリアが低温での増殖性にもたらす影響を明らかにするため、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* を接合させ由来の異なるミトコンドリアを持つ二倍体、四倍体の *S. pastorianus* モデル株を作製し解析を行った。これらの株を様々な温度 (4, 10, 25℃) で培養したところ、異なる由来のミトコンドリアを持つことが温度による生育の差をもたらさないケースを見出した。さらに、モデル株を作製した際に、ミトコンドリアの由来と親株の倍数性に関連性がある可能性を見出したので、今回併せて報告する。

Saccharomyces pastorianus, a yeast used to brew lager beer, is thought to be a hybrid that has resulted from interspecific hybridization between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus*. It is generally known that hybrid strains inherit mitochondria derived from either parental strain. Some reports suggest that *S. pastorianus* grows well at low temperatures because it has mitochondria derived from *S. eubayanus*, which is a cryotolerant yeast. However, it is not clear how the low temperature growth ability of *S. pastorianus* was acquired, and whether it is only derived from the inherited mitochondria. In this study, we generated diploid, tetraploid *S. pastorianus* model strains with the mitochondria of different origins by mating *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* and investigated whether the origin of mitochondria affects the growth ability at low temperatures. The model strains were cultured at various temperatures (4, 10, 25°C), and their growth rates were measured. The result showed that, the origin of mitochondria did not always correspond to the growth potentials at these temperatures. Furthermore, it is suggested that there is a relationship between the origin of the inherited mitochondria and their host strain ploidy.

yeast, mitochondria, cryotolerant

発表責任者：野田陽一（anoday@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C5a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 C5 会場

Cas9 ニッケースの複数遺伝子座への同時誘導による高度な遺伝子増幅系の構築
Parallel BiTREx to generate a population of cells diversified in copy number ratios between target genes
○武居 宏明、岡田 悟、伊藤 隆司（九大院医）
○Hiroaki TAKESUE, Satoshi OKADA, Takashi Ito (Med. Sci. Kyushu Univ.)

Expanding tandem gene arrays has played a critical role in creating multigene families and will likely contribute to constructing stable gene overexpression systems. We have developed BiTREx, a novel method for expanding tandem gene arrays. By targeting Cas9 nickase to a tandem repeat-flanking site, BiTREx collapses the replication fork that has just replicated the repeat to form a one-ended double-stranded break, from which end resection generates single-stranded DNA (ssDNA). Because there is no repeat unit downstream of the break, the ssDNA often invades upstream units to initiate break-induced replication that expands the tandem repeat.

BiTREx successfully expanded an array consisting of two or more *CUP1* repeat units and an artificial two-unit array of a gene cassette encoding the fluorescent protein *mNeonGreen* (*ymNG*) integrated at the *CUP1* locus to replace the *CUP1* array completely. It also expanded the two-unit *CUP1* array and the two-unit *ymNG* array integrated at the *HO* locus, although less effectively than at the *CUP1* locus. These results clarified two properties of BiTREx: 1) it can expand arrays regardless of gene loci or repeat units, and 2) it has different amplification efficiencies depending on gene loci and repeat units.

These properties led us to investigate the possibility of parallel BiTREx that simultaneously expands tandem gene arrays integrated at two or more different loci. If the *CUP1* and *HO* loci carry an identical gene array, parallel BiTREx will exert a dosage effect by achieving a higher gene copy number than the conventional single-locus BiTREx. If the *CUP1* and *HO* loci carry arrays for genes A and B, parallel BiTREx will generate a population of cells with different copy number ratios between A and B. Such a population of cells would help identify an optimal A/B ratio for the desired trait if an appropriate selection method is available.

Thus, we generated two strains, one carrying the two-unit *CUP1* and *ymNG* arrays at the *CUP1* and *HO* loci, respectively, and the other *vice versa*. In both strains, parallel BiTREx expanded the two gene arrays with different efficiencies, proving the principle of generating cellular diversity by parallel BiTREx. We are currently applying parallel BiTREx to gene circuits to try to generate an optimum population of cells with different gene copy number ratios.

Cas9 nickase, Parallel BiTREx, Gene overexpression system

発表責任者：武居 宏明（takesue.hiroaki.479@m.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4C5a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 C5 会場

枯草菌ゲノムベクターを用いたヒト TCR 遺伝子座の再構築

Reconstruction of human T cell receptor gene locus using the *Bacillus subtilis* genome vector.

○諸角 光祐[1]、岩田 哲郎[1]、山崎 憲政[2]、神沼 修[3]、廣田 順二[1]([1]東工大院生命理工学院、[2]広島大技術センター、[3]広島大原爆放射線医科学研究所)
○Kosuke Morozumi[1], Tetsuo Iwata[1], Norimasa Yamasaki[2], Osamu Kaminuma[3], jyunji Hirota[1] ([1]Tokyo Inst. of Tech, [2]The University of Hirosima, [3]The Univ. of Hirosima)

ゲノム編集技術は生命科学の発展において非常に大きく貢献をしている。しかし、編集が可能なゲノムにはサイズ制限があり、標的特異的な遺伝子の挿入（ノックイン)では、200kbp の挿入までしか報告されていない。そのため、より巨大な DNA 断片を取り扱う技術を開発し、導入可能な DNA サイズを大きくする必要がある。枯草菌ゲノムベクターは、枯草菌の環状ゲノム DNA 自体をベクターとして用いるシステムであり、約 3.5 Mbp の DNA クローニング実績がある。このシステムを用いてノックインができれば、ゲノム編集におけるサイズ制限を克服することができると考えた。

本研究では、将来的に免疫系ヒト化モデルマウスへの応用を目指し、全長約 920kbp と 500kbp の 2 つの巨大な遺伝子クラスターによって構成されているヒト T 細胞受容体（TCR)遺伝子を標的配列とした。本発表では、ヒト BAC ライブラリーを活用した枯草菌ゲノムベクターでの TCR 遺伝子領域再構成と、再構築した TCR 断片の枯草菌ベクターからの分離・回収法について報告する。今後、回収した TCR 断片を用いてノックインマウス作出へと発展させる。

Genome editing technology has contributed enormously to the development of life sciences. However, the editable size is limited. In particular, the targeted gene insertion (knock-in) has only been reported up to around 200 kbp. Therefore, developing technologies to handle huge DNA fragments is necessary to increase the capacity of DNA can be introduced. The *Bacillus subtilis* genome vector is a cloning system that uses the 4.2 Mb circular genome of *B. subtilis* as a vector, and has a DNA cloning record around of 3.5 Mbp. Application of this system to knock-in could overcome the size limitation in genome editing.

In this study, we focused the human T cell receptor (TCR) gene, which is composed of two huge gene clusters of approximately 920 kbp and 500 kbp in length, aiming for future application to humanized mouse models of the immune system. Here, we report the reconstruction of the TCR cluster region utilizing the human BAC library, and the insert recovery of the reconstructed TCR fragment from the *Bacillus subtilis* genome vector. In the future, the recovered TCR fragments will be used to generate knock-in mice.

Bacillus subtilis genome vector, Genome editing, T cell receptor

講演番号：4C5a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 C5 会場

セルロース分解性放線菌のキシランによるグリオキシル酸回路の誘導
Induction of glyoxylate shunt by xylan in cellulolytic Streptomyces
○長野 竜也[1]、大橋 慧介[1]、林 直希[2]、クマール ビジェイ[2]、高須賀 太一[2] ([1]北大院国際食資源、[2]北大院農)
○ Tatsuya NAGANO[1], Keisuke Ohashi[1], Naoki Hayashi[2], Vijay Kumar[2], Taichi Takasuka[2] ([1]Hokkaido University GFR, [2]Hokkaido University Agr.)

近年植物バイオマスは化石資源に代替する資源の１つとして効率的な利用方法の確立が期待されている。したがって、植物バイオマス分解性細菌の植物細胞壁成分に対する遺伝子発現応答の解明を通し、効率の良い新たな植物バイオマスの分解法の確立が期待される。

森林食害性昆虫であるキバチの共生細菌である *Streptomyces* sp. SirexAA-E（SirexAA-E）は植物細胞壁に含まれる高分子多糖であるセルロース、マンナン、キシランを分解することが知られており、先行研究から、セルラーゼやマンナナーゼの転写制御因子が明らかになっている（Ohashi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2021）。本研究ではキシランに対する応答を明らかにするために、私たちは本菌をキシロース、キシロビオース、キシランを炭素源としてそれぞれ培養した後、細胞内定量プロテオミクス（TMT）を行った。プロテオミクスと過去研究のマイクロアレイを基にしたキシラン代謝関連酵素の遺伝子発現解析の結果、グリオキシル酸回路に関わる酵素が誘導されていることを確認した。本講演では、上記のプロテオミクス解析結果に加え、プロテオミクス解析結果を裏付ける生化学的手法による解析結果についても論じたい。

Plant biomass can be one of the sustainable energy sources. Thus, studying the specific gene expression response of cellulolytic bacteria would let us realize the novel effective plant biomass decomposition method.

Wood devastating insect-associated microbes can efficiently depolymerize the major polysaccharides in the plant cell wall, including cellulose, mannan, and xylan, into simple sugars. We have focused on the woodwasp symbiotic bacterium, *Streptomyces* sp. SirexAA-E (SirexAA-E). Previously, we showed cellulose and mannan-specific responses of SirexAA-E by determining two LacI-like transcriptional repressors (Ohashi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2021). In this study, we sought to determine xylan-specific responses of this bacterium. To this end, the intracellular proteomic analysis was carried out using the TMT labeled proteomes from the cells grown on glucose, xylose, xylobiose or xylan. We found that when cells were grown on xylose, xylobiose, and xylan, specific sets of the glyoxylate pathway-involved enzymes were induced in both mRNA and protein levels. Furthermore, biochemical studies also support this finding.

proteomics, xylan, metabolic pathway

発表責任者：高須賀太一（takasuka@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4C5a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 C5 会場

微生物有害情報データベース Microbial Risk Information Database: M-RINDA

Tool and database to support appropriate and safety use of microorganisms

○木村 明音、黄地 祥子、宮澤 せいは、藤田 真澄、魚原 文、山本 美佳、中谷 諒介、市川 夏子（NITE・NBRC）
○Akane KIMURA, Shoko OHJI, Seiha MIYAZAWA, Masumi FUJITA, Aya UOHARA, Mika YAMAMOTO, Ryosuke NAKATANI, Natsuko ICHIKAWA (NITE・NBRC)

微生物を安全に取り扱うには、利用する微生物の危険度を予め把握しておく必要がある。一方、次世代シーケンス技術の急速な発展に伴い微生物の全ゲノム配列の分類への応用が進み、日々分類体系の再編成や学名の変更が進展しているため、それらに対応した微生物の安全性判断が求められている。

NITE は、微生物の安全かつ適切な利用を支援するために、細菌や真菌の危険度分類や取扱に関する情報（リスク情報）を一元化したデータベース「微生物有害情報リスト」を公開している。微生物有害情報リストは、バイオセーフティレベル（BSL）分類リストや法令文書等から収集したリスク情報とそれらにおける掲載学名と共に、その正名や異名等の情報も掲載しており、様々な学名から情報の確認が可能である。また、学名はラテン語的な間違いからスペル修正されることがあり、2023 年度はスペル修正された学名の修正前後の名前を追加して、両方からそのリスク情報を検索可能とした。

また我々は、細菌のゲノム配列から毒素等の有害性機能に関わる遺伝子を検出し有害性を推定するツール「MiFuP Safety」も公開している。微生物有害情報リストと MiFuP Safety は、関連する情報が対応づけられ、相互にリンクしている。これらのデータベース・ツールは、微生物有害情報データベース「M-RINDA」（https://www.nite.go.jp/nbrc/mrinda/）から利用することができる。本発表ではこれらのデータベース・ツールの概要や使い方と最近の更新情報を紹介する。

To handle microorganisms safely, it is necessary to know in advance the risk of the microorganisms to be used. In recent years, with the rapid development of next-generation DNA sequencing technology, the application of whole genome sequences to microbial classification is progressing, and microbial taxa are being reclassified and scientific names are being changed.

To support the safe and appropriate use of microorganisms, NITE provide the database "the Microorganism Risk Information List", that organizes the latest scientific names, information on biosafety levels and domestic regulations related to handling of microorganisms. Since 2023, spelling correction of scientific names has been considered so that both of the accurate/inaccurate spelling can be searched. We also provide "MiFuP Safety", a tool for detecting potential genes involved in toxins and other functions with risks from genome sequences. In this presentation, we will introduce the contents with the latest information about of the above tool and database.

Biosafety Level, Bacterial Toxins, Genome Sequence

発表責任者：木村 明音（kimura-akane@nite.go.jp）

講演番号：4C5a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 C5 会場

QTL 解析を用いたシイタケの収量性に関わる因子の探索

Search for genes involved in the yielding ability of the mushrooms Lentinula edodes by QTL analysis.

○木津川 結奈[1]、張 吉麗[1]、佐藤 匠[1]、三ッ國 佳祐[1]、柳田 かりん[2]、田中 祐生[2]、田村 孝史[2]、小野 晶子[1]、鈴木 智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ、[2]森産業株式会社）
○Yuina KITSUKAWA[1], Jili ZHANG[1], Takumi SATO[1], Keisuke MITSUKUNI[1], Karin YANAGITA[2], Yuki TANAKA[2], Takafumi TAMURA[2], Akiko ONO[1], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Mori Sangyo Co., Ltd.)

シイタケ（*Lentinula edodes*）は、日本国内で年間約 8 万トンが生産され、日本人にとってなじみ深いキノコの一つである。シイタケには品種が存在し、優良な品種の条件として、収量性が高いこと、子実体の形質が良いこと、栽培が容易にできること等が挙げられる。その中でも高収量性は経営に直結する重要な要素である。

本研究ではシイタケの収量性に関わる量的形質遺伝子座（Quantitative trait loci: QTL）を特定するために下記の研究を行った。森産業保有菌株である L1052 株の複数の胞子由来の一核菌糸と、テスター親として JMS KV-92 株の単一の胞子由来の一核菌糸用いて交配を行った。次いで、得られた F1 世代 300 株を栽培後、その収量性の評価を行い高収量株・低収量株各 48 株の選抜を行った。選抜した菌株の交配に用いた L1052 株由来の一核菌糸 96 株より、ゲノム DNA を抽出し、TruSeq Nano DNA High Throughput Library Prep Kit を用いてライブラリ調製を行った。得られたライブラリは次世代シーケンサー（Hiseq X）を用いた全ゲノム解読を行い、QTL 解析を行った。現在、詳細に解析中である。

The mushroom *Lentinula edodes* is one of the most familiar mushrooms in Japan and produces about 80,000 tons annually in Japan. There are several varieties of this mushroom, and the traits of good variety include high-yielding, good shapes of the fruiting bodies, and easier cultivation. Among these, high-yielding ability is an important trait directly related to business management.

To identify quantitative trait loci (QTL) involved in the yielding ability of *L. edodes*, some monokaryotic mycelia derived from strain L1052 were crossed with the monokaryotic mycelium derived from single spore of the tester parent, JMS KV-92, to obtain F1 generation. The resulting F1 generations were used to evaluate those yield potentials, and 48 high-yielding and 48 low-yielding strains each were screened. Genomic DNA was extracted from these 96 monokaryotic mycelia derived from L1052 and QTL analysis was performed using a next-generation sequencer (Hiseq X). To identify genes involved in the yielding ability of this mushroom, more detailed analysis is still in progress.

Lentinula edodes, QTL analysis, yielding ability

発表責任者：鈴木　智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4C5a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 C5 会場

皮膚常在細菌叢と肌状態との関連性

Relationship between the skin microbiome and skin condition

○門屋 亨介、近藤 彩乃、松川 彩花（椙山女大）
○Ryosuke KADOYA, Ayano KONDO, Sayaka MATSUKAWA (Sugiyama Jogakuen Univ.)

皮膚は体重の約 16%を占める人体最大の臓器であり、腸内と同様に細菌叢を形成している。細菌叢が皮膚の健康維持に重要な役割を担っていることが最近の研究で明らかにされている。*Staphylococcus epidermidis* は皮膚の健康維持に重要な働きを行っていると考えられている。*S. epidermidis* が皮膚に及ぼす直接的なメカニズムは明らかにさているが、皮膚細菌叢がどのような役割を果たしているかは明らかではない。本研究では皮膚常在細菌群衆を解析することで、皮膚健康と細菌群衆との関わり合いを明らかにすることを目的とする。

22 才女性 34 人を対象に肌健康状態測定と鼻筋から細菌を収集し 16SrDNA 配列を用いた細菌叢解析を行った。肌状態は「普通肌」、「脂性肌」、「乾燥肌」、「混合肌」に分類されるが、全ての肌質で *S. epidermidis* は表皮細菌叢中 50%程度存在しており肌質間で有意差は無かった。メタゲノム解析では、普通肌とその他肌質間の細菌叢に有意差があり、普通肌は特異的な細菌叢を形成する可能性が示された。LEfSe 解析では普通肌には 8 種類の細菌属が有意に存在することが明らかになった。表皮細菌叢解析の結果、肌の健康状態を保つには *S. epidermidis* 以外の細菌も関与している可能性が示された。

The skin is the largest organ in the human body, accounting for about 16% of the body weight, and has microbiome. This microbiome plays an important role in maintaining skin health. *Staphylococcus epidermidis* is thought to be a beneficial bacterium that plays an important role in maintaining skin health. Although the direct mechanisms by which *S. epidermidis* affects the skin are known, it is not clear what role the skin microbiome may play. The aim of this study is to clarify the relationship between skin health and bacteria by analyzing the skin bacterial community.

Skin health measurements and microbiome analysis using 16SrDNA sequencing were performed on 22-year-old women by collecting bacteria from their nose. Skin conditions were categorized as "normal", "oily", "dry" or "combination skin" and S. epidermidis was present in 30% to 50% of the skin microbiome in all skin types, with no significant differences among skin types. Metagenomic analysis of skin microbiome showed significant differences in microbiome between "normal" and other skin types, indicating that "normal" may form a specific microbiome. Results of skin microbiome analysis indicated that bacteria other than *S. epidermidis* may be involved in maintaining skin health.

skin microbiome, skin condition, Staphylococcus epidermidis

発表責任者：門屋　亨介（rkadoya@sugiyama-u.ac.jp）

講演番号：4C5a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 C5 会場

後発酵茶由来 *Lactiplantibacillus plantarum* のゲノム解析とその遊牧民的性質

Nomadic Traits of *Lactiplantibacillus plantarum* in Japanese Post-Fermented Tea

○佐藤 杏香[1]、五十川 祐一郎[1]、丹羽 諒[2]、西岡 浩貴[3]、堀江 祐範[4]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大院自、[2]京大院医、[3]徳島工技セ、[4]産総研)
○ Kyoka Sato[1], Yuichiro Ikagawa[1], Ryo Niwa[2], Hiroki Nishioka[3], Masanori Horie[4], Hitoshi Iwahashi[1] ([1]Gifu Univ., [2]Kyoto Univ., [3]ITC, [4]AIST)

茶はその製造方法の違いにより、不発酵茶、半発酵茶、発酵茶、後発酵茶の大きく 4 種に分類される。烏龍茶や紅茶に代表される半発酵茶および発酵茶は、酵素反応における発酵により製造されており、微生物を介した発酵は行われていない。一方、後発酵茶は微生物を用いた発酵を行うことにより製造されている茶である。世界の中でも後発酵茶の生産地域は珍しく、中国や東南アジア、日本の一部地域に限定されている。徳島県三好市の阿波晩茶と愛媛県の石鎚黒茶の嫌気発酵後の茶葉からは *Lactiplantibacillus plantarum* が優占種として報告されている。日本で生産されている後発酵茶由来 *L. plantarum* のゲノムはドラフトゲノムが 1 件報告されているのみであり、その遺伝的多様性についてはさらなる探索が必要である。本研究では四国地方の後発酵茶から分離された 4 株の *L. plantarum* について、ナノポアシーケンスを用いて全ゲノム配列を決定した。その結果、後発酵茶から分離された *L. plantarum* は、糖代謝および糖輸送に関連するいくつかの変動性の高い遺伝子領域を含んでいた。また、アクセサリー遺伝子領域では分離源に特異的な遺伝子やクラスターは確認されなかった。本研究により *L. plantarum* は高い遺伝的多様性を有しており、後発酵茶という特殊な環境が *L. plantarum* の生育に選択圧を及ぼしていない可能性が示唆された。

Post-fermented tea production involving microbial fermentation is limited to a few regions, such as Southeast Asia and Japan, with Japan's Shikoku island being particularly prominent. *Lactiplantibacillus plantarum* was the dominant species found in tea leaves after anaerobic fermentation of Awa-bancha in Miyoshi City, Tokushima, and Ishizuchi-kurocha in Ehime. Although the draft genome of *L. plantarum* from Japanese post-fermented tea has been previously reported, its genetic diversity requires further exploration. In this study, whole-genome sequencing was conducted on four *L. plantarum* strains isolated from Japanese post-fermented tea using nanopore sequencing. These isolates were then compared with other sources to examine their genetic diversity revealing that *L. plantarum* isolated from Japanese post-fermented tea contained several highly variable gene regions associated with sugar metabolism and transportation. However, no source-specific genes or clusters were identified within accessory or core gene regions. This study indicates that *L. plantarum* possesses high genetic diversity and that the unique environment of Japanese post-fermented tea does not appear to exert selective pressure on *L. plantarum* growth.

Lactiplantibacillus plantarum, post-fermented tea, whole genome sequencing

講演番号：4C5a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 C5 会場

腸内細菌を対象とした生菌微生物の検出方法の開発
Development of a live bacteria detection targeting intestinal bacteria
○土田 咲絵[1]、西山 依里[1]、相原 浩揮[1]、生井 楓[2,3]、西山 啓太[2,3]、北澤 春樹[2,3]（[1]株式会社ファスマック、[2]東北大院農、[3]CFAI）
○Sae Tsuchida[1], Eri Nishiyama[1], Hiroki Aihara[1], Fu Namai[2,3], Keita Nishiyama[2,3], Haruki Kitazawa[2,3] ([1]Fasmac Co., Ltd., [2]Tohoku Univ, [3]CFAI)

各分野で微生物叢を明らかにするために 16S rRNA アンプリコン解析が利用されているが、これらの解析では生菌および死菌を区別することが出来ない。我々はこれまで生菌のみを対象とした微生物叢を明らかにする方法として、選択的膜透過性色素（EMA : ethidium monoazide）による手法と、RNA からの逆転写 cDNA 調製法の 2 つのアプローチによる解析手法を確立している。本大会ではヒト腸内細菌群に焦点をあて、5 種の腸内細菌混合培養液を用いて、本手法の有効性を検証することを目的とした。
まず、混合培養液中の菌種に応じた EMA の感受性および膜透過性の検証をするために、5 種の単離菌の EMA-qPCR を実施したところ、生菌のみ増幅される良好な結果が得られた。しかしながら、複合培養液中の生菌叢解析では一部菌種の存在比率について偏りが見られた。一方で RNA からの逆転写 cDNA 調製法では菌種偏りのない群集構造が反映された。これらの結果を踏まえて、我々は腸内細菌をターゲットとした 2 手法の利用可能性について提案する。

Although 16S rRNA amplicon analysis has been used in various fields to reveal the microbiome, the analysis cannot distinguish between live and dead bacteria. Thus, we have established two approaches: one based on selective membrane-permeable dye (EMA: ethidium monoazide) for live bacteria, and the other based on cDNA preparation from RNA. In this study, we focused on human intestinal microbiota and aimed to verify the effectiveness of these approaches using a mixed culture of five species intestinal bacteria.
To investigate the sensitivity and membrane permeability of EMA according to the bacterial species in the mixed culture, we performed EMA-qPCR on each of the five bacteria. These results indicated that only live bacteria were amplified. Additionally, the microbiome in the mixed culture was biased toward several bacterial species. On the other hand, with the method cDNA preparation from RNA, the microbiome reflected a community structure without bacterial species bias. Based on these results, we propose the possibility of employing two potential methods targeting intestinal bacteria.

16S rRNA amplicon analysis, viable bacteria detection, human intestinal microbiota

発表責任者：土田　咲絵（ngs@fasmac.co.jp）

講演番号：4C5a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 C5 会場

コンパニオン植物栽培土壌における土壌生物相解析
Taxonomic analysis of soil organisms under cultivation of companion plants
○鈴木 美緒[1]、村上 純哉[1]、近藤 侑希[1]、森本 早貴[1]、飯沼 辰也[1]、広瀬 侑[1,2]、山内 高広[2]、熊崎 忠[2]、園原 詩野[3]、岡田 知之[3]、継国 孝司[3]、浴 俊彦[1,2] ([1]豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系、[2]豊橋技術科学大学 先端農業・バイオリサーチセンター、[3]武蔵精密工業株式会社 植物バイオ事業部)
○MIO SUZUKI[1], JYUNYA MURAKAMI[1], ATSUKI KONDO[1], SAKI MORIMOTO[1], TATSUYA IINUMA[1], YU HIROSE[1,2], TAKAHIRO YAMAUCHI[2], TADASHI KUMASAKI[2], SHINO SONOHARA[3], TOMOYUKI OKADA[3], TAKASHI TSUGUKUNI[3], TOSHIHIKO EKI[1,2] ([1]Toyohashi Tech Dept.Chemistry/Biotechnology, [2]Toyohashi Tech Advanced Agriculture/Bio Research Center, [3]Musashi Seimitsu Industry Co., Ltd.)

土壌には細菌、糸状菌、線虫、小型動物など多様な生物が生息しており、これらの働きによって有機物の分解や物質循環が起こっている。作物栽培では、作物それぞれに特有の害虫が存在し、感染しやすい病気なども異なっている。また、特定の作物の近傍に植えると生育を促進する、病害虫を防ぐなどよい影響を及ぼすコンパニオン植物が用いられることがあり、抗線虫作用を示すマリーゴールドなどがよく知られている。本研究では、4 種のコンパニオン（候補）植物を圃場で栽培し、全土壌生物相を分析することで、これらの植物による土壌生物への影響を調査することを目指した。2022 年 7 月から 9 月に本学構内の試験農場の 2 区画にてマリーゴールド、ヘアリーベッチ、青シソ、赤シソを栽培し、4 回の土壌採集を行った。植物近傍土壌の DNA を精製し、16S, 18S リボソーム RNA 遺伝子配列による DNA メタバーコード法を用いた生物相解析を行った。供試土壌中の生物組成や生物多様性、土壌化学性を解析し、栽培区画や植物ごとの特徴を検証した。現在、マリーゴールドの共栽培土壌における生物相解析も進めている。

Soil is the environmental media where a variety of organisms such as bacteria, fungi, nematodes, and small animals are alive, and they are deeply involved in decomposition and recycle of organic matters. Particular pests and plant diseases often damage the crops and “companion plants” are co-cultivated with the crops for suppressing these issues in agricultural fields. This study aimed to clarify influences of four companion (candidate) plants in soil organisms by analyzing soil biota using DNA metabarcoding with 16S and 18S ribosomal RNA gene sequences. Sample soils close to plants were isolated from 2 areas of the experimental field where marigold, hairy vetch, green perilla, and red perilla were cultivated at four different growth stages from July to September in 2022. We investigated taxonomic compositions and beta diversities in the samples as well as chemical parameters in the sample soils to elucidate the characteristics of soil biota in each area and cultivated plants. DNA metabarcoding using the field soils co-cultivated with marigold and crops is also in progress.

companion plants, companion plants, plant-soil biological interactions

講演番号：4C5a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 C5 会場

Deterministic Shaping of Soil Bacterial Communities: Interplay of Rare Species and Environmental Selection

○Leonardo Stari, Hiromi Kato, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (Tohoku University)

Understanding the formation of microbial populations is essential for decoding the complex dynamics of the environment. Our study investigates the factors guiding the assembly of bacterial communities by examining the succession and interactions among species in soil bacteria populations under varying conditions. Soil bacterial populations were cultured with five carbon sources: glucose, phenanthrene, succinate, lindane (γ-HCH), and naphthalene. We utilized next-generation sequencing (NGS) to monitor community evolution, Shotgun Metagenome analysis to characterize the overall gene pool, and Biolog plates to validate community function. Our findings highlight that while most bacterial consortia led a decrease in substrate levels over time (except γ-HCH), bacterial abundance decreased by three orders of magnitude for naphthalene and lindane. Remarkable consistency in community structure was noted among biological replicates, implying minimal stochastic influences on population dynamics. Main bacteria (abundance >1%) showed clear differences only in glucose and phenanthrene, whereas rare bacteria (abundance <0.1%) displayed unique profiles across all conditions. The observed diversity within the rare bacterial community for each carbon source suggests that these bacteria are subject to different selective forces from those affecting more abundant species. The divergence within the gene pools of communities grown with glucose and phenanthrene supports this, revealing the adaptability of the bacterial populations to specific conditions. The study confirms that despite variations in substrate utilization, bacterial communities show predictable patterns across replicates, indicating deterministic processes predominate. The marked distinctions between the rare bacterial communities and the specific divergence in glucose and phenanthrene conditions reflect the nuanced interactions within these populations. Distinct gene pool patterns identified in the metagenome data further reinforce these differences. These results lend credence to Beijerinck's hypothesis that "Everything is everywhere, but the environment selects," demonstrating that the presence and selection of genes are pivotal to microbial community formation under favorable conditions. This work advances our understanding of bacterial ecology and emphasizes the importance of rare species in shaping ecological networks, providing valuable insights into the principles that dictate bacterial population dynamics.

Microbial Ecology, Community Assembly, Environmental Selection

発表責任者：Leonardo Stari（lstari@tohoku.ac.jp）

講演番号：4C5a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 C5 会場

植物生育促進細菌の機能解明に向けたダイズ根内生菌のゲノム解析

Genome analysis of root endophytic bacteria in soybean for elucidating the function of plant growth promoting bacteria

○大西 雄貴[1]、西川 洋平[2,3]、木伏 真子[1,2]、細川 正人[1,2,3,4]、松本 厚子[3]、柏木 康熙[1]、穴井 豊昭[5]、竹山 春子[1,2,3,4] ([1]早大院・先進理工、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大・ナノライフ創新研、[4]早大・生命動態研、[5]九大院・農)

○ Yuki Onishi[1], Yohei Nishikawa[2,3], Masako Kifushi[1,2], Masahito Hosokawa[1,2,3,4], Atsuko Matsumoto[3], Khoki Kashiwagi[1], Toyoaki Anai[5], Haruko Takeyama[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [5]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

植物の根内部には様々な系統の細菌が生息しており、一部の細菌は植物の生育を促進する機能を有している。また特定の作物においては、異なる環境や品種をまたいで宿主に定着する細菌(コア細菌)の存在が知られている。本研究では、作物生産において重要な位置を占めるダイズに着目し、異なる環境で栽培された複数品種のダイズの根内生菌を対象としたゲノム解析を実施した。

秋田県、佐賀県、京都府の 3 つの圃場で栽培された異なる品種のダイズを、成長の 3 段階（根粒形成期、開花期、登熟期）で採取した。合計 116 株に対して根内部の細菌叢を解析した結果、3365 個の ASV(Amplicon sequence variant)が検出され、成長段階にともなって検出される ASV 数が多くなる様子が確認された。各圃場の根内部と根表面の細菌叢を比較した結果、環境や品種が異なる条件においても、根内部の細菌叢は高い類似性を示すことが明らかになった。さらに、登熟期において 3 つの圃場に共通して検出される *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Streptomyces* 属の細菌を含むコア細菌の ASV を 11 個同定することができた。今後は、これらのコア細菌の植物に対する生育促進機能について考察を進める予定である。

本研究は内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（JPJ009237、管理法人:生研支援センター）によって実施されました。

Some root endophytic bacteria are known to have the functions for plant growth-promotion. In recent years, researchers revealed existence of “core” bacteria which inhabit host plants across different environments and varieties. In this study, we focused on soybean, which occupies an important position in crop production, and conducted genome analysis of root endophytic bacteria. Different soybean varieties grown at three sites in Akita, Saga and Kyoto prefectures were sampled at three growth stages. Microbial composition in the roots were analyzed for a total of 116 soybeans, and 3365 ASVs (amplicon sequence variants) were detected. In particular, the number of species in the ripening period was the highest. In addition, microbial composition of the roots showed higher similarity than that of rhizoplane, across different environments and varieties. We have identified 11 ASVs for core bacteria at the ripening period, including the genus *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, and *Streptomyces*. We plan to investigate the growth-promoting function of these microbes.

soybean, endophyte, microbiome

講演番号：4C5a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 C5 会場

多様な環境微生物に存在する機能未知呼吸酵素複合体 Ehr のバイオインフォマティクス解析

Bioinformatics analysis of functionally unknown respiratory enzyme complex Ehr in diverse environmental microorganisms

○高野 将光[1]、井上 真男[1,2]、青野 陸[1]、三原 久明[1]（[1]立命大・生命、[2]立命大・R-GIRO）
○Masamitsu TAKANO[1], Masao INOUE[1,2], Riku AONO[1], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., Coll. Life Sci., [2]Ritsumeikan Univ., R-GIRO)

進化的祖先を共にする呼吸鎖複合体 I と呼吸型 [NiFe] ヒドロゲナーゼは、酸化還元反応に共役したプロトン勾配の形成を行うことで、ATP 合成に寄与する。これらの酵素は呼吸の根幹に関わるため、多様性を持ちつつ幅広い生物に分布する。近年見出された Ehr (Energy-conserving Hydrogenase Related complex) は呼吸型 [NiFe] ヒドロゲナーゼに配列相同性を示し、類似するサブユニット構成を持つ。しかし、[NiFe] 活性中心を持たないことから、Ehr はヒドロゲナーゼ活性を有さない呼吸酵素であると予想されている。現在、Ehr はどのようなゲノムに分布しているのかは明らかにされていない。そこで本研究では、ゲノム・メタゲノム情報を用いた大規模なアミノ酸配列解析を行った。

相同性検索の結果、全 20 万の原核生物ゲノムの内、Ehr は陸圏・水圏・ヒト腸内などの様々な環境から得られた約 3 万ゲノムに存在し、バクテリアでは 70%、アーキアでは 60%と、幅広い生物門が保有していた。触媒サブユニット EhrL の分子系統は、呼吸鎖複合体 I および呼吸型 [NiFe] ヒドロゲナーゼの両者とも異なるが、同等の広がりを見せる系統群を形成していた。Ehr の 2 つ触媒サブユニットと 4 つのプロトン輸送サブユニットは Ehr の系統群内で保存されており、触媒サブユニットの鉄硫黄クラスターの数に顕著な多様性が見られた。また、ゲノム比較の結果、Ehr 遺伝子クラスターのみが共起性を持つため、機能する代謝経路が 1 つではないことが分かった。以上のことから、Ehr は幅広い環境に適応するため配列を多様化させながら様々な微生物に分布する第 3 の呼吸鎖複合体 I 型酵素ファミリーであることが示唆された。

The respiratory complex I and the respiratory [NiFe] hydrogenase share a common ancestor. These enzymes contribute to ATP synthesis by generating a proton gradient coupled to redox reactions. Recently discovered Ehr exhibits sequence homology to the [NiFe] hydrogenase; however, it lacks the [NiFe] active center. Currently, the genomic distribution of Ehr remains unclear. Here, we performed a large-scale amino acid sequence analysis using genomic and metagenomic information. As a result, Ehr was present in 30,000 of 200,000 prokaryotic genomes, which were distributed among 60% of phyla from various environments. Ehr exhibited a different phylogeny of both complex I and [NiFe] hydrogenase. From these findings, it is suggested that Ehr represents the third family of the respiratory complex I superfamily, distributed among various microorganisms.

bioinformatics, respiratory complex I, [NiFe] hydrogenase

発表責任者：三原　久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4C6a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 C6 会場

フラクトオリゴ糖摂取が腸管の樹状細胞と抗体産生に与える影響
Effect of fructooligosaccharide supplementation on intestinal dendritic cells and antibody production
○森 清彰、古川 凱斗、津田 真人、細野 朗（日本大学生物資源科学部）
○ KIYOAKI MORI, KAITO FURUKAWA, MASATO TSUDA, AKIRA HOSONO（College of Bioresource Sciences, Nihon University）

フラクトオリゴ糖（FOS）はいくつかの腸内細菌の選択的な基質となり、それらの増殖促進を介して、腸内細菌叢を改変し、宿主の腸管免疫を改善し健康に寄与する。先行研究では FOS 摂取した通常環境下の BALB/c マウスでは、腸管粘膜中と血中における免疫グロブリン（Ig）A 量の増加が見られた。樹状細胞（DC）は腸管免疫におけるリンパ節で T 細胞、B 細胞を活性化し、抗体産生に寄与する。DC の中でも標準型樹状細胞 2（cDC2）は固有のレチノイン酸合成酵素（RALDH）の活性を有している。レチノイン酸（RA）は、免疫グロブリン IgA 産生経路において T 細胞分化、B 細胞クラススイッチに寄与することが報告されている。本研究では FOS による腸管のリンパ節における抗体産生について cDC2 の機能に着目して検討を行った。

BALB/c マウスに 2 週間 Control 食または 7.5%FOS 配合食を与えた後、腸管関連リンパ組織および腸間膜リンパ節における遺伝子発現と cDC2 の割合を解析した。その結果、腸管関連リンパ節においてクラススイッチ関連遺伝子発現の増加、腸間膜リンパ節において cDC2 の割合と RALDH 遺伝子の発現の増加傾向が観察された。現在、cDC2 の RALDH 活性についても検討を行っている。

Fructooligosaccharides (FOS) are selective substrates for several intestinal bacteria and, through promotion of their growth, modify the intestinal microbiota to improve host gut immunity and health. Previous studies have shown that conventional BALB/c mice fed FOS showed increased immunoglobulin (Ig)A production in the intestinal mucosa and in the blood. Dendritic cells (DCs) activate T and B cells in lymph nodes in intestinal immunity and contribute to antibody production. Among DCs, conventional dendritic cell 2 (cDC2) has unique Retinal aldehyde dehydrogenase (RALDH) activity. Retinoic acid (RA) has been reported to contribute to T cell differentiation and IgA class-switching of B cells. In this study, we analyzed effect of FOS supplementation on cDC2 activity and cellular responses of IgA production in the intestinal immune systems. Conventional BALB/c mice were fed a Control diet or a 7.5% FOS formula diet for 2 weeks. The results showed increased expression of class switch-related genes in gut-associated lymphoid tissue and tended to be increased RALDH gene expression and the proportion of cDC2 in mesenteric lymph nodes. We are trying to analyze effect of FOS supplementation on RALDH activity of intestinal cDC2.

Fructooligosaccharides, IgA, Dendritic cells

講演番号：4C6a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 C6 会場

酪酸は IgE 非依存的マスト細胞活性化を抑制する

Butyrate suppresses IgE-independent mast cell activation

○森田 莉加[1]、長田 和樹[1]、谷萩 祐太[1]、岡村 穂丘[1]、山崎 憲政[2]、三浦 健人[2]、神沼 修[2]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]広大・原医研)
○ Rika MORITA[1], Kazuki NAGATA[1], Yuta YAHAGI[1], Hotaka OKAMURA[1], Norimasa YAMASAKI[2], Kento MIURA[2], Osamu KAMINUMA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]Res. Inst. Rad. Biol. Med., Hiroshima Univ.)

腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は免疫細胞の機能や遺伝子発現を調節し、炎症性疾患や自己免疫疾患を予防･改善する。私達は短鎖脂肪酸、特に酪酸が I 型アレルギー反応の鍵細胞であるマスト細胞(MC)の IgE 依存的活性化を抑制し抗アレルギー効果を発揮することを報告してきた。一方、MC は病原体成分や alarmin によっても活性化されることから、今回これら刺激に対する酪酸の作用を解析した。MC を酪酸で処理したところ、LPS 刺激誘導性に MC から産生される IL-6、TNF-α、IL-13 のタンパク質量が顕著に減少した。酪酸の作用機序として、細胞表面に発現する Gi 型 GPCR のリガンド活性とヒストン脱アセチル化酵素阻害活性の２通りがよく知られる。私達の先行研究では MC に酪酸受容体 GPR109A/*Hcar2* が発現し、IgE 依存的活性化抑制に寄与することが判明している。そこで、Gi 型 GPCR を阻害する百日咳毒素、*Hcar2* siRNA、*Hcar2* 欠損マウス由来 MC を用いた解析を行ったところ、いずれの実験系においても酪酸による LPS 依存的活性化抑制効果に変化は見られなかった。一方、HDAC 阻害剤トリコスタチン A は酪酸と同様に LPS 刺激 MC の IL-6 分泌を抑制した。以上、酪酸は主に HDAC 阻害活性を介して LPS 誘導性 MC 活性化を抑制することが示唆された。

Short-chain fatty acids (SCFAs) are well known to modulate the development and functions of immune related cells, resulting in prevention of inflammatory diseases and autoimmune diseases. We have previously reported that SCFAs, particularly butyrate, inhibit IgE-dependent activation of mast cells (MCs), which play key roles in type I allergy. Although MC is also activated by PAMPs and DAMPs, the effects of SCFAs on the molecular pattern-induced activation of MCs are not fully understood. In the present study, we showed that butyrate treatment suppressed LPS-induced release of IL-6, TNF-α and IL-13 from MCs. To reveal the molecular mechanisms by which butyrate inhibits the LPS-induced activation of MCs, we examined the roles of GPR109a/Hcar2 and HDACi activity, both of which were involved in the suppressive effects of SCFAs on IgE-dependent activation of MCs in our previous study. The experiments using pertussis toxin (an inhibitor of Gi-GPCR), Hcar2 siRNA, or MCs generated from Hcar2 knockout mice showed that the suppressive effects of butyrate were not affected by inhibition and deficiency of GPR109A. In contrast, we found trichostatin A suppressed LPS-induced IL-6 release. Taken together we conclude butyrate inhibits LPS-induced activation of MCs with its HDACi activity mainly.

Mast cell, Short-chain fatty acid

講演番号：4C6a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 C6 会場

複数の食品因子の組み合わせに着目した抗炎症作用の相乗効果

Synergistic action of multiple food factors focusing on anti-inflammatory activity

○吉岡 正樹、平出水 貴子、大塚 桃佳、服部 誠、好田 正（東農工大院・応生化）
○Masaki YOSHIOKA, Takako HIRAIZUMI, Momoka OTSUKA, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

世界的な社会問題である生活習慣病の発症には局所的な慢性炎症が深く関わっていると考えられており、安全で簡便な予防策として食品因子が有する抗炎症作用に期待が寄せられている。しかし、単独の食品因子に着目した研究は多いものの、それらを組み合わせた場合の相互作用についてはよく知られていない。そこで本研究では、既に多くの健康増進作用が報告されている乳酸菌とコーヒーを例に取り、ヨーグルト製造に関わる乳酸菌株である *Streptococcus thermophilus* (LAB-S)と、コーヒーポリフェノールの一つであるカフェ酸を併用した場合の抗炎症作用への影響を検証した。

まず、乳酸菌とカフェ酸の存在下で抗原刺激した DO11.10 マウスの腸間膜リンパ節細胞を 3 日間培養した後、フローサイトメトリーに供した。続いて、抗炎症性サイトカインである IL-10 について、ELISA 法を用いて培養上清中の濃度を測定した。その結果、乳酸菌とカフェ酸を共存させた群では、それぞれ単独で添加した場合と比較して活性化 T 細胞の割合および IL-10 の産生量が増加した。

以上のことから、乳酸菌とカフェ酸の組み合わせにより強く活性化された T 細胞自身、もしくは他細胞からの IL-10 産生が亢進されることで抗炎症作用を高める可能性が示唆された。

It is suggested that local chronic inflammation is deeply involved in the development of lifestyle-related diseases, and the anti-inflammatory effect of food factors is highly expected as a safe and simple preventive measure. In this study, we focused on the synergy of Lactic acid bacteria (LAB) and coffee, and examined whether the combination of *Streptococcus thermophilus* (LAB-S) used in yogurt production and caffeic acid, one of the major polyphenols in coffee would exhibit enhanced anti-inflammatory effects.

Mesenteric lymph node cells from DO11.10 mice were stimulated with antigen in the presence of LAB-S and caffeic acid, then subjected to flow cytometry. Subsequently, the concentration of IL-10 in the culture supernatant was measured using ELISA. As a result, the percentage of activated T cells and IL-10 concentration were highest in the group coadministered with LAB-S and caffeic acid compared to the groups stimulated with them separately.

In conclusion, the combination of LAB-S and caffeic acid may synergistically enhance the anti-inflammatory effect by increasing IL-10 production from activated T cells or other cells.

anti-inflammatory activity, interleukin-10, food factor

講演番号：4C6a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 C6 会場

腸上皮において誘導される GABA シグナルの解析
Analysis of GABAergic signaling induced in intestinal epithelium
○池上 美音[1]、山下 未夢[1]、富永 帆南[1]、原田 岳[2]、依田 一豊[2]、宮澤 賢司[2]、中西 祐輔[1]、高橋 恭子[1] ([1]日大生物資源、[2]タカナシ乳業・商品研究所)
○Mion IKEGAMI[1], Miyu YAMASHITA[1], Honami TOMINAGA[1], Gaku HARATA[2], Kazutoyo YODA[2], Kenji MIYAZAWA[2], Yusuke NAKANISHI[1], Kyoko TAKAHASHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Takanashi Milk Products Co., Ltd.)

γ-アミノ酪酸(GABA) は、哺乳類における主要な抑制性神経伝達物質であり、多彩な生理作用を示す。これまでにマウスへの *Bifidobacterium bifidum* TMC 3115（TMC3115）の投与によって腸管 GABA 濃度が上昇し、宿主の行動特性に影響を及ぼすことを報告した。本研究では、腸管 GABA の作用機序を明らかにするために、*in vivo* の腸管上皮における GABA シグナル伝達の可能性を検証することを目的とした。マウスの小腸および結腸より調製した上皮細胞(それぞれ SIEC, CIEC)、マウス腸管オルガノイドを用いて、GABA レセプター（GABAR）各サブユニットの発現量をリアルタイム PCR により解析した。また、TMC3115 投与マウスの SIEC および CIEC、GABA で刺激したマウス腸管オルガノイドにおける MAPK のリン酸化をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、腸管上皮で GABAR が発現し、特に $GABA_{B2}R$ の発現が SIEC、CIEC、腸管オルガノイドのいずれにおいても脳より高いことが示された。さらに、TMC3115 投与マウスの CIEC では、対照群と比較して Erk のリン酸化の促進が観察された。また、腸管オルガノイドにおいても GABA 刺激により Erk の活性化が誘導された。これらの結果より、腸管内 GABA が腸管上皮に対して GABAR を介して MAPK シグナル伝達を誘導する可能性が示唆された。

γ-Aminobutyric acid (GABA), a major inhibitory neurotransmitter in mammals, is known to show various physiological effects. We have previously reported that administration of *Bifidobacterium bifidum* TMC 3115 (TMC3115) increases intestinal GABA concentration and affects anxiety behavior in mice. This study was aimed to identify the novel mechanisms of action of intestinal GABA, focusing on GABAergic signaling in intestinal epithelial cells (IECs) *in vivo*. We analyzed the expression level of GABA receptor (GABAR) subunits by real-time PCR using IECs prepared from mouse small intestine and colon (SIECs and CIECs, respectively) and mouse intestinal organoids. MAPK phosphorylation was analyzed by western blotting using SIECs and CIECs of TMC3115-administered mice and mouse intestinal organoids stimulated with GABA. The results showed that IECs expressed GABAR, and $GABA_{B2}R$ expression level was higher in SIECs, CIECs, and organoids than in the brain. Accelerated phosphorylation of Erk was observed in CIECs of TMC3115-treated mice compared to controls. Activation of Erk was also induced in organoids by GABA stimulation. These results suggest that intestinal GABA may induce MAPK signaling in IECs via GABAR expressed on them.

GABA, intestinal epithelial cell, gut-brain-axis

発表責任者：高橋 恭子（takahashi.kyoko@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4C6a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 C6 会場

樹状細胞の分化およびインテグリン遺伝子発現に対する短鎖脂肪酸の影響

Effects of short-chain fatty acids on dendritic cell differentiation and integrin gene expression

○趙 維霆、長田 和樹、伊藤 直人、西山 千春（東理大院先進工生命システム）
○Weiting ZHAO, Kazuki NAGATA, Naoto ITO, Chiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

樹状細胞（DC）における特徴的な接着分子である CD103（integrin αEβ7）および LPAM-1(integrin α4β7)の発現に対する SCFA の影響について検討した。その結果、酪酸が cDC の分化を促進し、CD103 と LPAM-1 の発現レベルを上昇させることを見出した。また、阻害剤を用いた解析により、cDC の分化促進と LPAM-1 の発現誘導には HDAC 阻害剤活性、CD103 の発現促進には Gi 型 GPCR が寄与することを明らかにした。また、SCFA によるインテグリン発現上昇の分子機構を解析した結果、*Itga4* と *Itgae* の mRNA 量は酪酸によって著しく上昇したが *Itgb7* には変化がなく、細胞表面のインテグリン発現上昇は α サブユニットの発現増加に起因することが判明した。一方クロマチン免疫沈降法による解析では、BMDC の *Itga4* プロモーターのヒストンアセチル化が酪酸処理によって変動しないことが明らかになった。次に、脾臓 DC における SCFA の影響を検証するため、マウスの脾臓 DC を酪酸で処理し、酪酸処理の有無で比較した結果、 酪酸で処理した細胞では CD103、LPAM-1、いずれも発現上昇する傾向が見られた。さらに、生体 DC における SCFA の影響を検証するため、マウスに酪酸を摂取させ、腸管膜リンパ節における DC サブセットの解析を行った。その結果、酪酸摂取したマウスでは $CD103^+$DC、$LPAM\text{-}1^+$DC ともに増加する傾向が見られた。

we investigated the impact of short-chain fatty acids (SCFAs) on the expression of specific adhesion molecules, CD103 (integrin αEβ7), and LPAM-1 (integrin α4β7) in dendritic cells (DCs). The results revealed that butyrate promotes the differentiation of conventional DCs(cDCs) and increases the expression of CD103 and LPAM-1. Furthermore, inhibitor analyses demonstrated that the promotion of cDC differentiation and induction of LPAM-1 expression involve histone deacetylase inhibitor activity, while the enhancement of CD103 expression is mediated by the Gi-type G protein-coupled receptor. Analysis of the molecular mechanism of the SCFA-induced increase in integrin expression revealed that *Itga4* and *Itgae* mRNA levels were significantly increased by butyrate treatment. Subsequently, to verify the effect of SCFAs on splenic DCs, mouse splenic DCs were treated with butyrate, and the comparison between treated and untreated cells showed a tendency of increased expression of CD103 and LPAM-1. Moreover, the analysis of dendritic cell subsets in the mesenteric lymph nodes revealed an increase in $CD103^+$DCs and $LPAM\text{-}1^+$DCs in the butyrate-treated mice.

dendritic cell, butyrate, Cd103

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4C6a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 C6 会場

腸間膜リンパ節及びパイエル板における *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 による樹状細胞を介した IgA 抗体産生増強作用

Enhancement of dendritic cell-mediated IgA antibody production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches.

○小寺 修平[1]、溝渕 響子[1]、曽我 皓平[1]、藤岡 郁美[2]、内田 健治[2]、薩 秀夫[3]、足立（中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1]（[1]東大院農生科・食の安全研究セ、[2]よつ葉乳業株式会社、[3]前橋工科大・生物工）

○Shuhei KODERA[1], Hibine MIZOBUCHI[1], Kohei SOGA[1], Ikumi FUJIOKA[2], Kenji UCHIDA[2], Hideo SATSU[3], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Yotsuba Milk Products, [3]Dept. Biotechnol, Maebashi Inst. Technol.)

【目的】発酵乳ケフィア由来乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 株は抗アレルギー作用が期待される乳酸菌であり、シラカバ花粉症における二重盲検試験において症状緩和効果が示されている。我々はさらに、本株がマウス腸間膜リンパ節(MLN)樹状細胞(DC)へ作用し、IgA 産生に関わる RALDH2、インテグリン αvβ8 等の遺伝子発現を増強させること、またパイエル板(PP)細胞と腸間膜リンパ節(MLN)細胞において IgA 抗体産生を増強する効果があることを明らかにしている。そこで本研究では細胞培養系を用いて *L. cremoris* YRC3780 株が DC を介して IgA 抗体産生を増強する作用機構を検討した。【方法】BALB/cA マウスの MLN、PP より DC として $CD11c^+$細胞を、B 細胞として $B220^+$細胞を、T 細胞として T 細胞レセプタートランスジェニックマウスである RAG2-/-DO11.10 マウスの脾臓より $CD4^+$細胞を MACS 法により調製し、①B 細胞、②B 細胞＋DC、③B 細胞＋DC＋T 細胞、④B 細胞＋DC＋T 細胞＋抗原ペプチド、それぞれの培養系に *L. cremoris* YRC3780 加熱死菌体を添加した。1 週間後の上清中 IgA 抗体量を ELISA にて、$B220^+$細胞中の IgA^+細胞の割合をフローサイトメトリーによって測定した。【結果】MLN では③、PP では、②③④において菌体添加により IgA 抗体産生が促進され、MLN、PP とも④において菌体添加により IgA^+B220^+細胞が増加した。この結果から本株が PP、MLN いずれにおいても DC 存在下で T 細胞依存的に IgA^+B 細胞を誘導する一方で、PP では T 細胞非依存的に IgA 分泌を促進できることが示唆された。

[Background] We have shown that *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780, derived from fermented milk kefir, enhances the genes which is known to be involved in IgA production in mesenteric lymph node (MLN) dendritic cells (DCs) and that this strain enhances IgA antibody production in cultures of Peyer's patches (PP) and MLN cells. In this study, we investigated the mechanism by which this strain enhances IgA production via DCs. [Methods] *L. cremoris* was added to four cell culture systems using $CD11c^+$ DCs and $B220^+$ B cells from PP or MLN of BALB/c mice and $CD4^+$ T cells from RAG2-/-DO11.10 TCR transgenic mice: ①B, ②B+DC, ③B+DC+T, ④B+DC+T+antigenic peptide. After 7 days of culture, the percentage of IgA^+ cells in $B220^+$ cells and IgA antibody in supernatant was measured. [Results]The addition of *L.cremoris* YRC3780 significantly increased IgA^+ $B220^+$ cells in MLN, PP ④, and the amount of IgA in MLN ③, PP ②③④. The results suggest that this strain enhances IgA^+ B cells in presence of DCs in a T cell-dependent manner, while in PP, was capable of enhancing IgA production without T cells.

IgA, Dendritic cell, Lactic acid bacteria

発表責任者：八村　敏志（ahachi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C6a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 C6 会場

藻類由来多糖によるアレルギー抑制効果の検証とその作用機序の解明

Verification of Allergy Suppression Effects by Polysaccharides from Algae and Elucidation of Their Mechanisms of Action

○安井 悠人[1]、白井 康仁[1]、水野 雅史[2] ([1]神大院農学研究科、[2]大阪青山大健康科学部)
○YUTO YASUI[1], YASUHITO SHIRAI[1], MASASHI MIZUNO[2] ([1]Kobe Univ., [2]Osaka Aoyama Univ.)

【目的】I 型アレルギーは、先進国で患者数が増加傾向にあるものの、その根本的な治療法は確立していない。我々の研究室では、コンブやノリに含まれる多糖類の抗アレルギー活性を明らかにしてきた。今回注目した藻類由来の多糖類についても、アレルギー症状の抑制が期待されるが、その効果は明らかにされていない。よって本研究では、藻類由来多糖のアレルギー抑制効果を受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応モデルマウスを用いて検証し、その作用機序を解明することを目的とした。
【方法】PCA 反応試験では、雌性 5 週齢 BALB/c マウスに藻類由来多糖を 4 日間経口投与、または腹腔内投与した。最終投与日の翌日に抗 TNP-IgE と、抗原としてピクリルクロライドを用いてアレルギーを惹起し、アレルギー重症度の指標として、抗原塗布前後の耳介厚の測定を行った。さらに、実験後に採取した回腸組織から total RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。
【結果】藻類由来多糖は、経口投与でのみ PCA 反応モデルマウスにおける浮腫形成を抑制した。よって、検討した藻類由来多糖は、腸管を介した作用によりアレルギー反応を抑制することが示唆された。また回腸組織の遺伝子発現解析では、藻類由来多糖の投与による、脂質代謝関連遺伝子の発現量変化が見られた。従って、藻類由来多糖は、小腸での脂質代謝を介して、アレルギーを抑制する可能性が示唆された。

Although the number of patients with type I allergy is increasing in developed countries, a fundamental treatment for this disease has not been established. Polysaccharides derived from algae, the focus of this study, are also expected to suppress allergic symptoms, but their effects have not been clarified. Therefore, the purpose of this study was to verify the allergic suppressive effect of polysaccharides derived from algae and to elucidate their mechanism of action.
Algae-derived polysaccharides inhibited edema formation in a mouse model of PCA reaction only when administered orally. Therefore, it is suggested that polysaccharides derived from algae inhibit allergic reaction through intestinal tract-mediated action. Microarray analysis showed that administration of algae-derived polysaccharides changed the expression level of genes related to lipid metabolism in the ileum. These results suggested that polysaccharides derived from algae inhibit allergic reaction through lipid metabolism in intestine.

Allergy, Algae, Lipid metabolism

講演番号：4C6a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 C6 会場

免疫細胞のフェロトーシスにおけるアクロレインの関与

Involvement of acrolein in immune cell's ferroptosis

○川尻 海斗、糸井 海星、内田 浩二（東大院農）
○Kaito KAWAJIRI, Kaisei ITOI, Koji UCHIDA (The Univ. of Tokyo)

フェロトーシスは過酸化脂質の蓄積により生じる細胞死である。近年、免疫系との関連が研究されており、例えば、腫瘍環境中では CD8 陽性 T 細胞がフェロトーシスを生じやすいことが示唆されている。しかし、フェロトーシスが免疫系に及ぼす影響については未解明な部分が多い。そこで本研究では、まず免疫細胞のフェロトーシスに対する感受性を評価した。マウスの脾臓細胞に、GPX4 阻害剤である RSL3 を処置してフェロトーシスを誘導し、細胞生存率を評価した。その結果、特に T 細胞でフェロトーシスへの感受性が高いことがわかった。また、抗アルデヒド修飾タンパク質抗体を用いた染色から、T 細胞におけるアクロレイン修飾タンパク質の顕著な産生が示唆された。一方、免疫系は異物を認識し、排除する機構であることから、フェロトーシス細胞が異物として抗原性を示すかについて検討を行った。ここでは、自己抗体の産生及び脂質過酸化の亢進を特徴とする全身性エリテマトーデス（SLE）に着目した。SLE モデルマウスの血中抗体のフェロトーシス細胞への結合を評価したところ、抗体のフェロトーシス細胞への結合が見られた。今後は、フェロトーシス誘導及びアクロレイン修飾タンパク質の蓄積により生じる T 細胞の機能の損傷や、生体への悪影響について解析するとともに、SLE モデルマウスよりフェロトーシス細胞を認識するモノクローナル抗体を獲得し、抗原の解析を行う予定である。

Ferroptosis is a form of cell death characterized by accumulation of lipid peroxides to lethal levels. Recently, its relation to immune system has been studied, but the effects of ferroptosis on immune system are largely unknown. To assess immune cells' sensitivity to ferroptosis, we treated mouse splenocytes with RSL3, an inhibitor of GPX4 and observed high sensitivity of T cell to ferroptosis. In addition, staining with anti-aldehyde modified protein antibodies showed a prominent production of acrolein modified protein. On the other hand, the immune system is the mechanism against foreign substance. Hence, we examined whether ferroptotic cells show antigenicity. To this end, we assessed the recognition of ferroptotic cells by serum from systemic lupus erythematosus (SLE) mice and observed significant binding of SLE serum to ferroptotic cells. We are currently working on how acrolein-modified proteins generated through ferroptosis on the function of T cell. Furthermore, we will also challenge to establish ferroptotic cells-specific monoclonal antibodies.

ferroptosis, immune system, systemic lupus erythematosus

講演番号：4C6a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 C6 会場

食事バランスが腸管抗体特異性に及ぼす影響の解析

Analysis of the effect of dietary balance on the specificity of intestinal antibody

○近澤 未歩、湊 健一郎（名城大農）
○Miho CHIKAZAWA, Ken-ichiro MINATO (Meijo Univ.)

生体には多様な特異性を持つ抗体を産生する B 細胞が存在しており、多様性を持った集団（抗体レパトア）を構成している。抗体レパトアは食事や腸内細菌など様々な要因による影響を受けることから、健康状態や疾患の発症などとも関連が大きいと考えられる。そこで今回、生活習慣病の発症に抗体レパトアが関与する可能性について明らかにするべく、生活習慣病モデルマウスにおける抗体レパトアや免疫細胞の変化について検討を行った。

これまでに、生活習慣病の発症を誘導すると考えられる高スクロース食（HS 食、70kcal% sucrose）、高脂肪食（HF 食、45kcal% fat）を与えたマウスにおいて、腸管 IgA 抗体の抗体レパトアが大きく変化することを確認し、食事の変化が腸管の IgA 特異性に影響を及ぼしていることが予想された。抗体レパトアの変化は 2 週間と比較的短期間の摂食により起こっていたことから、この時点での腸管免疫細胞の変化を解析した。パイエル板、腸管膜リンパ節、粘膜固有層より細胞を採取し、フローサイトメトリーにより樹状細胞、T 細胞、B 細胞の割合や活性化について解析したところ、HS 食、HF 食群においてコントロール群との変化が複数確認された。今後は免疫細胞の変化が起こるメカニズム、関連する因子についてさらに詳細に解析を行う予定である。

Antibodies produced by B cells with diverse specificities, constitute a diverse population known as the antibody repertoire. Given that the specificity of antibodies is influenced by various factors, including diet and intestinal microbiota, alterations in the antibody repertoire are considered highly relevant to health and diseases. In this study, we examined the potential contribution of antibody repertoire to the development of lifestyle-related disease.

We have confirmed the intestinal IgA repertoire in mice subjected to a high-sucrose diet (HS diet, 70 kcal% sucrose) and a high-fat diet (HF diet, 45 kcal% fat) underwent significant alterations. It was anticipated that changes in diet would impact the IgA specificity within the intestinal tract. Next, we analyzed the alterations in intestinal immune cells at 2-week feedings. Cells were collected from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and lamina propria and analyzed by flow cytometry. The percentage of the dendritic cells, T cells, and B cells were changed in the HS and HF diet groups compared to the control group.

IgA, Antibody repertoire, Lifestyle disease

講演番号：4C6a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 C6 会場

小腸パイエル板細胞が誘導する IgA 抗体産生応答におけるクルクミン・短鎖脂肪酸・腸内細菌による協調作用

Cooperative action of curcumin bacteria, short-chain fatty acids, and intestinal bacteria on IgA antibody production response induced of small intestinal Peyer's patches cells.

○大鐘 大士[1]、舘岡 楓[1]、柴崎 涼太[1]、津田 真人[1]、小寺 修平[2]、吉田 有佐[2]、WANG YIMEI[2]、戸塚 護[3]、足立（中嶋） はるよ[2]、八村 敏志[2]、細野 朗[1]([1]日大生資科、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]東京農大生命科学・分子微生物)

○DAISHI OGANE[1], KAEDE TATEOKA[1], RYOUTA SHIBASAKI[1], MASATO TSUDA[1], SYUHEI KODERA[2], ARISA YOSHIDA[2], YIMEI WANG[2], MAMORU TOTUKA[3], HARUYO NAKAZIMA - ADATI[2], SATOSI HATIMURA[2], AKIRA HOSONO[1] ([1]nihon univ., [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Dept. Molecular Microbiology, Tokyo Univ. Agriculture)

【背景・目的】食品成分を摂取することにより、免疫グロブリン A（IgA）産生等の腸管免疫応答における調節作用が認められる。この際、腸管においては、腸内細菌やその代謝産物も存在し、この三者が協調して腸管免疫細胞に作用することが考えられる。そこで本研究では、食品成分の免疫調節機能を評価する際に、これら成分以外の腸内環境因子についても検討することが重要であることに注目し、食品成分としてクルクミン（CU）、腸内細菌としてマウスの常在菌由来の *Bacteroides acidifaciens* type A43(BA)、その代謝産物の短鎖脂肪酸としてプロピオン酸（PA）を用いて、小腸パイエル板細胞の IgA 産生応答に対する協調作用について検討することを目的とした。

【方法・結果】BALB/c マウスのパイエル板細胞を CU, BA, PA あるいはこれらを組わせて添加して培養し、IgA 産生を ELISA にて測定した。その結果、CU 単独では CU10 μMにて IgA 産生が抑制された。一方、CU+BA（10 μg/ml）の場合は CU 2.5 μMにおいて IgA 産生が促進され、CU の濃度依存性について異なる結果が得られた。以上の結果から、食品成分の作用を検討する際は、腸管免疫細胞+食品成分だけの評価系では不十分で、実際に経口摂取された場合に腸内に同時に存在する、腸内細菌やその代謝物もあわせて評価することが重要であることが示唆された。

【Background and Purpose】Ingestion of food components has been shown to modulate intestinal immune responses such as immunoglobulin A (IgA) production. In this study, we focused on the importance of examining the effects of intestinal bacteria and their metabolites when evaluating the immunomodulatory functions of food components. We investigated the cooperative effects of curcumin (CU) as a food component, *Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA) from murine commensal bacteria, and propionic acid (PA) as its short-chain fatty acid metabolite on the IgA production response of small intestinal Peyer's patches.

【Methods and Results】Peyer's patch cells of BALB/c mice were cultured with CU, BA, PA, or a combination of the three, and IgA production was measured by ELISA. CU alone suppressed IgA production at 10 μM of CU while in the case of CU+BA (10 μg/ml), IgA production was enhanced at 2.5 μM of CU. These results suggest that the evaluation system of intestinal immune cells plus food components alone is not sufficient when examining the effects of food components, and that it is important to evaluate together the effects of intestinal bacteria and their metabolites.

IgA, curcumin, Bacteroides

講演番号：4C6a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 C6 会場

酪酸は T 細胞機能調節を介して皮膚疾患乾癬を改善する

Butyrate ameliorates psoriasis via modulation of T cell function

○時田 隆世、廣木 郁美、鈴木 勝大、長田 和樹、西山 千春（東理大院先進工生命システム）
○Ryusei TOKITA, Ikumi HIROKI, Shoudai SUZUKI, Kazuki NAGATA, Chiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

腸内細菌が食物繊維を分解する際に産生される短鎖脂肪酸は、腸管内はもとより全身にわたって炎症抑制や恒常性維持に貢献し、その細胞調節作用は、G タンパク質共役型受容体 GPR41、43、109A の活性化や HDAC 阻害活性を介して発揮される。我々は、皮膚疾患である乾癬に対し、酪酸の経口投与が病態を改善することを、マウスモデルを用いて示し報告してきた。乾癬誘導剤であるイミキモドは TLR7 を介して樹状細胞(DC)やマクロファージを活性化するが、我々の先行研究では、TLR7 リガンド刺激による DC の炎症性サイトカイン分泌が酪酸によって阻害されること、このような酪酸の作用は主に GPR109A 経路に依存しつつ、HDAC 阻害活性も部分的に関与することなどが示唆されている。このように DC の自然免疫応答に対する酪酸の効果が確認された一方、DC の適応免疫誘導能、すなわち T 細胞活性化制御能については不明な点が多く残されている。そこで今回、DC-T 細胞相互作用に重要なチェックポイント分子について解析を行った。イミキモド誘導性乾癬モデルマウスにおいて、酪酸の経口投与による皮膚肥厚の有意な緩和を確認した上で、所属リンパ節の細胞をフローサイトメトリー法で解析した。その結果、$TIGIT^+/CD4^+$細胞の割合が増加しており、これは $Foxp3^+/CD4^+$細胞のみならず、$Foxp3^-/CD4^+$細胞においても確認されたことから、酪酸の効果が制御性 T 細胞に限定されず、他の $CD4^+$T 細胞にも及ぶことが示唆された。マウス脾臓細胞を調製し、酪酸で処理したところ $CD4^+$T 細胞上の TIGIT 発現レベルが上昇し、同時に TIGIT と相互作用する DC 上の CD155 の発現量も増加した。トリコスタチン A 処理は、DC 上の CD155 発現を増強させた一方、TIGIT 発現には影響を及ぼさなかった。以上のことから、酪酸が抗原提示細胞と T 細胞のチェックポイント分子発現を制御すること、その機序は異なる経路を介していることが示唆された。

We have previously reported that oral administration of butyrate ameliorated imiquimod-induced psoriasis in mice. In addition, we found that butyrate treatment suppressed the release of inflammatory cytokine release from R848-stimulated dendritic cells (DCs). In the present study, we examined the effects of butyrate on checkpoint molecules, which are involved in antigen-presenting cell-mediated regulation of T cells. Flow cytometric analysis of whole cells in the cutaneous lymph node of psoriasis mice revealed that frequency of $TIGIT^+$ cells was increased both in $Foxp3^+/CD4^+$ T cells and $Foxp3^-/CD4^+$ T cells by butyrate administration. When whole splenic cells were treated with butyrate, expression levels of TIGIT on CD4+ T cells and its binding partner CD155 on DCs were increased. Taken together, we conclude that butyrate upregulates the expression of TIGIT and CD155

Butyrate, Proriasis, TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4C6a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 C6 会場

フラクトオリゴ糖の構成糖がマウス腸内細菌叢と IgA 産生に与える影響
Effects of different suger components in fructooligosaccharides on intestinal microbiota and IgA production
○大村 蓮、津田 真人、京井 大輔、細野 朗（日大生資科）
○Ren OMURA, Masato TSUDA, Daisuke KYOUI, Akira HOSONO (Nihon Univ.)

フラクトオリゴ糖（FOS）は主にケストース（GF2）及びニストース（GF3）で構成されている難消化性糖類であり、これまでにマウスが FOS を経口摂取すると腸内の総 IgA 量が増加することが明らかになっている。しかし、GF2・GF3 それぞれが宿主の腸内環境に対しどのような影響を及ぼすのか、腸内環境因子による免疫応答への作用機序は十分に明らかになっていない。そこで本研究では、GF2 と GF3 が腸内細菌叢と腸管免疫系応答に与える影響を解析した。6 週齢の雌性 BALB/c マウスをスクロース（対照）、GF2、GF3、FOS をそれぞれ 7%配合する 4 群に分けて 2 週間給餌した。その後、16S rRNA メタゲノム解析を次世代シークエンスにより腸内容物中の細菌叢を解析し、腸管組織の IgA 抗体量を ELISA 法により測定した。その結果、大腸内ではオリゴ糖摂取群において腸内優勢菌の *Bacteroides* 属が対照群と比べて増加しているだけでなく、Bacteroides 目の *Alistipes* 属、*Alloprevotella* 属の菌種が増加していた。さらに、大腸の腸管粘膜組織中の総 IgA 量はオリゴ糖摂取群（GF2、GF3、FOS 群）が対照群に比べて有意に高かった。よって、オリゴ糖摂取によって大腸内で増加した *Bacteroides* 属、*Alistipe*s 属、Alloprevotella 属の細菌が大腸での総 IgA 産生に関わっている可能性が示唆された。
Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotics mainly composed of kestose (GF2) and nistose (GF3). It has been shown that dietary FOS increased immunoglobulin (Ig)A level of the intestinal contents in mice. However, it is not fully clear whether GF2 and GF3 have different effects on the intestinal environment and immune responses. In this study, we analyze the effects of dietary GF2 and GF3 on the composition of microbiota and IgA production in the intestine. BALB/c mice were fed a diet containing either FOS, GF2, GF3 or sucrose as a control for two weeks. The composition of intestinal microbiota was analyzed by 16S rRNA next-generation sequencing. The amount of IgA in the intestinal tissue was measured by enzyme immunoassay. The group administered any oligosaccharides showed an increase in the proportion of genus *Bacteroides*, *Alistipes*, and *Alloprevotella* in the order Bacteroides in the cecum and colon compared to the control group. The group administered any oligosaccharides increased IgA level in the cecal and colonic tissues compared to the control. These results suggested that these intestinal bacteria modulated by FOS supplementation might have a role in the production of IgA at the large intestine.

fructooligosaccharides, microbiota, IgA

発表責任者：細野　朗（hosono.akira@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4C6a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 C6 会場

漬物由来乳酸菌 SSL-1 による IL-10 発現亢進の解析
Induction of IL-10 expression by pickles-derived lactic acid bacteria
○藤原 唯信[1]、柴田 奈那[1]、村田 美樹[2]、浅見 進也[2]、薩 秀夫[3] ([1]前工大院工、[2]株式会社新進、[3]前工大工)
○Yuishin Fujihara[1], Nana Shibata[1], Miki Murata[2], Shinya Asami[2], Hideo Satsu[3] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol, [2]Shin-Shin Foods Co.,Ltd., [3]Maebashi Inst. Technol)

【目的】抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10（IL-10）は、ある種の乳酸菌などを認識したマクロファージなどから分泌され、過剰な免疫応答を制御しアレルギーや自己免疫疾患などを改善することが報告されている。本研究グループではこれまでに、漬物由来乳酸菌である SSL-1 株がマクロファージモデル細胞において免疫賦活能を有するサイトカインであるインターロイキン 12（IL-12）の発現・分泌を亢進することを報告してきた。本研究では、SSL-1 株が IL-12 に加えて IL-10 の発現に及ぼす影響を検討した。
【方法・結果】マクロファージモデル J774.1 細胞に SSL-1 株を添加し、3 時間インキュベート後、細胞より RNA を抽出し real-time PCR 法を用いて IL-10 の mRNA 発現量を測定した。その結果、SSL-1 株の菌数依存的に IL-10 の mRNA 発現が亢進した。そこで IL-10 の発現亢進に関与する菌体成分の検討をおこなった結果、菌体の RNA が IL-10 発現亢進に関与することが示唆された。さらに RNA を認識することが知られる TLR を中心に細胞内シグナル分子の関与について RNA 干渉法や各種阻害剤を用いて解析した。その結果、IL-10 誘導には Toll 様受容体の下流アダプターである MyD88、MAP キナーゼファミリーである p38 MAPK、JNK が関与することが示された。一方で、IL-12 発現誘導に関与する TLR8 や NF-κB は IL-10 亢進には関与しないことが示唆された。

【Objectives】Interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine, is secreted by macrophages that recognize certain lactic acid bacteria, and is reported to regulate excessive immune responses , further preventing allergies and autoimmune diseases. We previously reported that SSL-1, a lactic acid bacteria derived from pickles, enhanced the expression and secretion of interleukin-12 (IL-12), an inflammatory cytokine, in macrophage-like cells. In this study, we examined the effect of the SSL-1 on the expression of IL-10 in addition to IL-12.
【Methods and Results】IL-10 mRNA level was measured after 3 hours of incubation of macrophage-like J774.1 cells with SSL-1. The results showed that IL-10 mRNA expression increased with the number of SSL-1. RNase treatment suppressed SSL-1-induced IL-10 increase, suggesting that RNA from SSL-1 is involved in this regulation. Further, we revealed that SSL-1 induced IL-10 expression via MyD88, and also via p38 and JNK MAP kinase family.

Lactic acid bacteria, Interleukin-10, Macrophage

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4C6a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 C6 会場

食品アレルギーモデルマウスにおける FTY720 の影響

The effect of FTY720 on food allergy model mice

○齊木 理央、服部 誠、好田 正（東農工大院・応生化）
○Rio SAIKI, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

食品アレルギーが誘導される部位は明らかにされていない。そこで本研究では、リンパ球が全身と２次リンパ組織を循環するホーミングに着目し誘導部位の同定を目指した。

DO11.10 マウスに OVA 含有飼料を摂食させ食品アレルギーを誘導した。OVA を与えてから 1 週間ごとの血中 OVA 特異的 IgE 抗体価を測定した。また OVA を 4 日間摂食させ、脾臓中の Treg と活性化 T 細胞の割合を調べた。FTY720 は二次リンパ組織にリンパ球を蓄積させホーミングを阻害する薬剤である。上記の実験に OVA の摂食を始める前から FTY720 を投与した群を設け、ホーミングの阻害が食品アレルギーの誘導と T 細胞の応答に与える影響を調べた。

OVA 特異的 IgE 抗体価は、FTY720 投与群において有意に増加した。この結果から、ホーミングは食品アレルギーの誘導に必須でなくむしろ抑制的に働くことが示された。OVA の摂食を始めて４日目の脾臓において、FTY720 の投与は Treg の割合を有意に減少させた。しかし予想に反し活性化 T 細胞は大きく増加しなかった。食品アレルギーの誘導部位は脾臓である可能性があるが、他の部位で誘導された Treg が T 細胞以外に働きかけてアレルギーを抑制している可能性がある。

The site where food allergy is induced has not been clarified. We aimed to identify the induction site by focusing on the lymphocyte homing.

In this study, DO11.10 mice were fed with an OVA-containing diet to induce food allergy. OVA-specific IgE antibody titer in the sera was measured every week. We also analyzed the percentage of Tregs and activated T cells in the spleen after 4 days of OVA feeding. We examined the effects of FTY720, a homing inhibitor, on the allergy induction and T cell response.

OVA-specific IgE antibody titer increased significantly in the FTY720-administered group. The result showed that lymphocyte homing would not be essential for the induction of food allergy, and rather attenuated it. Administration of FTY720 significantly reduced Tregs in the spleen on day 4 after starting OVA feeding. Contrary to expectations, activated T cells did not apparently increase. The spleen might be the site of food allergy induction, and Tregs induced by food allergen at another site could suppress food allergy working on the cells other than T cells.

food allergy, lymphocyte homing, T cell response

講演番号：4C7a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 C7 会場

マレイマイシン生合成におけるマレイミド環形成機構

Mechanism of maleimide-ring formation in maleimycin biosynthesis

○原田 陽道[1]、曽根 祐輔[1]、吉田 彩子[1,2]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2]([1]東大院農、[2]東大・微生物連携機構)
○ Takayuki HARADA[1], Yusuke SONE[1], Ayako YOSHIDA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

我々はアミノ基キャリアタンパク質(Amino-group carrier protein, AmCP)をコードする遺伝子を幅広い放線菌で見出し、azinomycin B や ficellomycin などの生合成に利用される共通の新奇アミノ酸中間体の生合成に関与することを明らかにしてきた。マレイマイシンは showdomycin と同様にマレイミド環を有する低分子化合物であり、チオール基と特異的に結合する抗生物質として知られている。我々は以前の大会で *Streptomyces* sp. SpE090715-01 株において見出された *amcp* を含むクラスタ(*mmy* クラスター）が、マレイマイシン類の生合成に関わること、そしてその生合成においては AmCP にロードされたグルタミン酸が AmCP 上で新奇アミノ酸 7-amino-4-hydroxy-2-oxooctanedioic acid (AHXO)へと変換された後に、切り離され、以降の反応の中間体となることを報告した。今大会では AHXO 以降の生合成経路について解析した結果を報告する。AHXO に加えて、生合成遺伝子の破壊株から単離された生合成中間体と考えられる化合物を基質とした *in vitro* 反応を行い、Mmy6, Mmy13, Mmy14, Mmy15, Mmy16 の 5 つのタンパク質が AHXO からマレイマイシンへの変換に関わることが明らかになった。本発表では、個々の生合成反応の詳細について発表する。

Amino-group carrier proteins (AmCPs) are found in a wide range of actinomycetes and have been shown to be involved in the biosynthesis of an unprecedented amino acid, a common intermediate of azinomycin B and ficellomycin. Maleimycin has a maleimide ring-containing antibiotic that binds specifically to thiol groups like showdomycin. In previous annual meetings, we reported that the *amcp*-containing gene cluster in *Streptomyces* sp. SpE090715-01 is involved in the biosynthesis of maleimycins and glutamate loaded on AmCP is converted to 7-amino-4-hydroxy-2-oxooctanedioic acid (AHXO), which is used as an intermediate for maleimycins after release from AmCP. In this presentation, we will analyze and propose the meleimycin biosynthetic pathway from AHXO *in vitro*. We performed *in vitro* reactions using AHXO or compounds isolated from disruptants of biosynthetic genes as substrates and found that five proteins, Mmy6, Mmy13, Mmy14, Mmy15, and Mmy16, are involved in the conversion of AXHO to maleimycin. We will report the details of each biosynthetic reaction in this presentation.

biosynthesis, Maleimide, AmCP

発表責任者：原田陽道（harad1102@gail.com）

講演番号：4C7a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 C7 会場

放線菌 *Streptomyces lydicus* ATCC 25470 におけるアミノ基キャリアタンパク質を介して生産される新規二次代謝産物の生合成に関する研究

Studies on biosynthesis of novel secondary metabolites produced by amino group-carrier protein in *Streptomyces lydicus* ATCC 25470

○林 勇太[1]、曽根 祐輔[1]、吉田 彩子[1,2]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大院農、[2]東大・微生物連携機構)
○ Yuta HAYASHI[1], Yusuke SONE[1], Ayako YOSHIDA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo,, [2]CRIIM, UTokyo)

アミノ基キャリアタンパク質(Amino-group carrier protein: AmCP)は幅広い放線菌に見いだされており、*Streptomyces* sp. SANK 60404 においては、非タンパク質性アミノ酸 DADH の生合成に関わる。*amcp* 遺伝子を指標としたゲノムマイニングにより、*Streptomyces lydicus* ATCC 25470 において DADH 生合成遺伝子群に類似した遺伝子群を見出した。DADH 生合成遺伝子群の下流には amino acid ligase、PKS、NRPS など、修飾に関与すると予想される遺伝子群がコードされていた。本研究は、*S. lydicus* ATCC 25470 において AmCP を介して生合成される新規の二次代謝産物の同定およびその生合成機構の解明を目的としている。昨年度は、本遺伝子領域依存的に生産される *m/z* 253 の化合物 **1** の構造を報告した。本年度は、同じく同遺伝子領域依存的に生産される *m/z* 436 の化合物 **2** の構造を新たに決定した。**1** は、AmCP から切り出された C7 化合物と valine が脱水縮合して生成したジペプチドが環化・修飾したものと推定していたが、**2** は同ジペプチドにマイコチオール由来のアセチルシステインが付加した構造であり、**1** の予想生合成経路を支持するものであった。現在、*in vitro* 反応による生合成の再構築を試みており、その結果から推定される生合成機構についても報告する予定である。

Amino group-carrier proteins (AmCP) were found in various Actinomycetes strains and shown to be involved in the biosynthesis of a novel non-proteinogenic amino acid, DADH, in *Streptomyces* sp. SANK 60404. We found putative DADH biosynthetic gene cluster in *Streptomyces lydicus* ATCC 25470 by genome mining. Amino acid ligase, PKS, and NRPS are also encoded in this gene cluster. In this study, we aim to identify novel secondary metabolites synthesized using AmCP and elucidate the biosynthetic mechanism. In the last annual meeting, we reported the structure of compound (**1**) with *m/z* 253, produced by this gene cluster. In this presentation, we will report the planar structure of compound (**2**) with *m/z* 436, which was also produced by this gene cluster. Considering the structure of **1**, **1** was expected to be the cyclized product of a dipeptide after dehydrative condensation of valine with a C7 compound released from AmCP. The structural determination of **2**, which is composed of the C7 compound, valine, and *N*-acetyl cysteine derived from mycothiol, supported the validity of the proposed biosynthetic pathway of **1**. We are trying *in vitro* reconstitution of the biosynthesis and will report the whole biosynthetic pathway of **1**.

AmCP, biosynthesis, secondary metabolite

発表責任者：林　勇太（yutahys@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C7a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 C7 会場

グラム陰性菌に効く新規抗生物質の探索

Search for new antibiotics against Gram-Negative bacteria

○河野 裕太、鶴貝 龍聖、大土 光経、秦田 勇二 (埼玉工大工)
○YUUTA KOUNO, RYUUSEI TSURUGAI, HIRONOBU OOTSUCHI, YUUJI HATADA (Saitama Inst. of Tech.)

抗生物質とは微生物によって生産される多種の微生物の育成を阻害する物質である。感染症の治療には抗生物質は欠かせない。近年、医療現場では、既存の抗生物質では抑えられない薬剤耐性菌の出現が問題視されており、薬剤耐性菌にも抗菌性を発揮できる新規な抗生物質の発見が求められている。大腸菌はグラム陰性菌であり、この大腸菌に抗菌活性を示すということは、例えば同じグラム陰性菌である MDRP（多剤耐性緑膿菌）に対しても有効である可能性がある。しかし、固体培地で培養したとき抗菌活性を示しても、液体培地で培養したとき抗菌活性を示さない事例は多い。私どもの研究室では、新規抗生物質生産菌の探索を行っており、大腸菌にも抗菌活性を示す微生物株を多く保有している。本研究は、大腸菌に抗菌力を示す微生物株２株(いずれも *Streptomyces* 属)に対して、抗菌活性物質を高生産する培養の検討を行った。具体的には、液体培地の炭素源や窒素源、エキス類などを検討することで、どの条件で最も抗菌活性を示すのか調べた。その結果、2 株の内 1 株で Yeast Extract と金属のみを含む液体培地で培養した際に抗菌活性物質の生産が大きく向上することが確認された。

Antibiotics are substances that inhibit the growth of the various types of microorganisms produced by microorganisms. Antibiotics are essential for treating infections. In recent years, the emergence of drug-resistant bacteria that cannot be suppressed by existing antibiotics has become a problem in medical field, and there is a need to discover new antibiotics that can exhibit antibacterial activity even against drug-resistant bacteria. *E.coli* is a Gram-negative bacteria, and the substances which can exhibit antibacterial activity against *E.coli* may also be effective against MDRP (multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa), which is also a Gram-negative bacteria. However, there are many cases in which a substance exhibits antibacterial activity when cultured on solid medium but not when cultured liquid medium. Our laboratory is searching for new antibiotic-producing bacteria, and we have many strains that exhibit antibacterial activity, including *E.coli.* In this study, we investigated culturing for two strains (both of the genus *Streptomyces*) that exhibit antibacterial activity against *E.coli* to produce strongly antibacterial substances. Specifically, examining the Carbon source, Nitrogen source, Extract, etc. of the liquid medium, we found that one of the two strains significantly improved the production of antibiotics when cultured in a medium only containing Yeast Extract and metals.

Streptomyces, Antibiotics, Productivity

発表責任者：河野裕太（c1022fwh@sit.ac.jp）

講演番号：4C7a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 C7 会場

Streptomyces sp. TSO12 株の生産する抗菌活性物質の解析
Analysis of antibacterial substances produced by *Streptomyces* sp. TSO12 strain
○鶴貝 龍聖、大土 光経、中島 美咲、河野 裕太、石川 正英、岩崎 政和、秦田 勇二 (埼玉工大工)
○RYUSEI TSURUGAI, Hironobu OTSUCHI, Misaki NAKAJIMA, Yuta KOUNO, Masahide ISHIKAWA, Masakazu IWASAKI, Yuji HATADA (Saitama Inst. of Tech.)

新しい抗生物質の発見のための有望な供給源として、放線菌が知られている。発表者らが、土壌サンプルから分離した放線菌 *Streptomyces* sp. TSO12 株の分泌生産する抗菌活性物質の解析を試みた。TSO12 株の培養上清を酢酸エチルと 1：1 で混和し、得られた親水性及び疎水性抗菌活性物質の各被検菌に対する抗菌活性評価を実施した。続いて、疎水性抗菌活性物質の TLC 解析を実施した。16SrRNA 遺伝子配列から判断すると TSO12 株の近縁種は *Kitasatospora indigofera* であった。また、TSO12 株が生産する抗菌活性物質の抗菌活性評価を実施した結果、親水性の抗菌活性物質は、グラム陽性菌に対して抗菌力を示し、疎水性の抗菌活性物質は、グラム陽性菌並びにグラム陰性菌、真菌に対しても抗菌力を示した。このことから、TSO12 株は少なくとも親水性及び疎水性の 2 種類以上の抗菌活性物質を生産していると考えられる。さらに、疎水性抗菌活性物質の TLC 解析を実施した結果、365nm の UV を照射することでスポットの検出ができた。ニンヒドリン及び糖用発色剤では検出されなかった。

Actinomycetes are known as promising sources for the discovery of new antibiotics. We attempted to analyze the antibacterial substances produced by *Streptomyces* sp. TSO12 strain isolated from soil samples. The culture supernatant of TSO12 strain is mixed with ethyl acetate 1:1 and the obtained hydrophilic and hydrophobic antibacterial substances were performed antibacterial activity test against each test bacteria. Subsequently, TLC analysis of hydrophobic antibacterial substances were performed. Judging from the 16SrRNA gene sequence, TSO12 strain is a closely related species of *Kitasatospora indigofera*. Also, as a result of performing the antibacterial activity test of antibacterial substances produced by TSO12 strains, the hydrophilic antimicrobial substances showed antibacterial activity against gram-positive bacteria, and the hydrophobic antibacterial substances showed antibacterial activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi. From this, it is thought that TSO12 strain produces at least two or more types of antibacterial substances, hydrophilic and hydrophobic. Furthermore, as a result of TLC analysis of the hydrophobic antibacterial substances, spot was detected by irradiating 365 nm of UV. It was not detected by ninhydrin reagent and coloring agent for sugar.

Streptomyces sp., antibacterial substance, fungi

発表責任者：鶴貝龍聖（a2001lpa@sit.ac.jp）

講演番号：4C7a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 C7 会場

新規抗菌活性物質生産菌を対象とした量産化の検討
Investigation of mass production for antimicrobial active substances using novel bacteria
○大土 光経、中島 美咲、鶴貝 龍聖、河野 裕太、秦田 勇二 (埼玉工大工)
○Hironobu OTSUCHI, Misaki NAKAJIMA, Ryuusei TSURUGAI, Yuta KONO, Yuji HATADA (Saitama Inst. of Tech.)

［背景・目的］近年の医療現場では、薬剤耐性菌の出現が問題視されており薬剤耐性菌にも抗菌性を示す新規の抗生物質の発見が求められている。土壌微生物・放線菌・*Bacillus* 属細菌は多くの二次代謝産物合成クラスターを有し、既知抗生物質の 7 割以上の分離源として世界的に研究が行われている。前研究で土壌サンプルより分離した新規性のある *Bacillus* sp.(5 種)・*Streptomyces* sp.(3 種)の適正生育環境の検討・抗菌活性を示した二次代謝産物の性質を調べることを目的とした。
［結果］特に高い活性の見られた株、*Bacillus luti* (データベースを用いた比較で相同率 99.8%)で *Bacillus subtilis* に対してアンピシリン:テトラサイクリン換算 316: 361 μg/mℓ相当の活性を示した。*Escherichia coli* に対しては同換算 884: 116 μg/mℓの活性を示した。近縁種で類似の性質を持つ抗生物質の報告例は挙げられていないため、新規性のある抗菌活性物質である可能性が高い。

［Background・Purpose］：In recent years, the emergence of drug-resistant bacteria has been regarded as a problem in the medical field, and the discovery of new antibiotics that exhibit antibacterial properties against drug-resistant bacteria is required. Soil microorganisms, Actinomycetes, and bacteria of the genus *Bacillus* have many secondary metabolite synthesis clusters and are studied worldwide as isolate sources of more than 70% of known antibiotics. The purpose of this study was to investigate the appropriate growing conditions of *Bacillus* sp. (5 species) and *Streptomyces* sp. (3 species) isolated from soil samples in previous studies, and to investigate the properties of secondary metabolites that exhibit antimicrobial activity.
［Results］：*Bacillus luti* (homology: 99.8%) had the highest antimicrobial activity. It showed this activity against *Bacillus subtilis* was 316:361 μg/ml at Amp:TC equivalent. In addition, the activity against *Escherichia coli* was 884:116 μg/ml in Amp:TC equivalent. Since there are no reported examples of antibiotics with similar properties in closely related species, it is likely that they are new antimicrobial active substances.

Antibacterial active substance, Bacillus, Actinomycetes

発表責任者：大土光経（o2001eba@sit.ac.jp）

講演番号：4C7a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 C7 会場

八丈島産高塩濃度「くさや汁」からの放線菌分離による「くさや汁」中の微生物由来抗生物質の解明
Elucidation of microorganism-derived antibiotics in kusaya gravy by isolating of Actinomycetes from high-salinity fermented kusaya gravy in Hachijojima

○真崎 祥子[1]、長田 隆弘[2]、平田 朝陽[3]、野木村 さくら[1]、海野 良輔[1]、石川 森夫[1]、荒川 賢治[3]、鈴木 敏弘[1]（[1]東農大院・醸造、[2]長田商店、[3]広大院・統合生命）
○Sachiko MASAKI[1], Takahiro OSADA[2], Asahi HIRATA[3], Sakura NOGIMURA[1], Ryosuke UNNO[1], Morio ISHIKAWA[1], Kenji ARAKAWA[3], Toshihiro SUZUKI[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Osada Shouten, [3]Integ. Sci. life., Hiroshima Univ.)

伊豆諸島伝統水産発酵食品「くさや」製造に重要な「くさや汁」には微生物由来抗生物質が含まれているため保存性が高いとされるが、その生産微生物と抗生物質の関係は解明されていない。

本研究では、「くさや汁」の抗菌活性を担う微生物として放線菌に着目し、分離した放線菌の生産する抗生物質と「くさや汁」中の抗生物質について関連性を調べた。生の「くさや汁」および有機溶媒による「くさや汁」抽出物を用いて抗菌活性試験を行ったところ、「くさや汁」中には強力な抗真菌活性物質が含まれていることが分かった。そこで、抗真菌活性を指標に放線菌分離を試みたところ、*Streptomyces* sp. TUA-HK1GM 株の分離に成功した。ISP2 液体培地の培養物から二次代謝産物を抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにて精製後、ESI-MS および NMR により解析を行った。解析の結果、本菌は強力な真菌活性物質である Oligomycin A, B を生産していることが明らかとなった。また、PacBio Sequel IIによるゲノム解析から、本菌の染色体上に Oligomycin の生合成遺伝子クラスターがコードされていることが分かった。現在、「くさや汁」からの抗真菌活性物質の単離を進めると共に、「くさや汁」中の抗菌活性物質と本菌との関連性について解析を進めている。

Kusaya gravy, which plays an important role in the manufacturing of kusaya, contains microorganism-derived antibiotics; however, the relationship between the microbes and antibiotics has not been elucidated. In this study, we focused on Actinomycetes as microorganisms responsible for the antibacterial activity of kusaya gravy and investigated the relationship between the antibiotics produced by the isolated Actinomycetes and those in kusaya gravy. Antimicrobial activity tests performed using kusaya gravy showed that the gravy comprised a compound with high antifungal potency. We isolated *Streptomyces* sp. strain TUA-HK1GM from kusaya gravy, and ESI-MS and NMR were used to analyze purified-active compounds extracted from the culture broth. The results revealed that this strain produced the potent fungal active substances oligomycin A and B, known as inhibitors of mitochondrial F1Fo-ATP synthase. In addition, the sequencing analysis by PacBio Sequel II revealed that the oligomycin biosynthetic gene cluster was encoded on the chromosome in the strain TUA-HK1GM. Currently, isolation of antifungal compound from kusaya gravy and the relationship between the antibiotics produced by strain TUA-HK1GM and those in kusaya gravy.

Kusaya gravy, *Streptomyces*, Antibiotics

発表責任者：鈴木敏弘（ts206188@nodai.ac.jp）

講演番号：4C7a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 C7 会場

放線菌 *S. incarnatus* の *rpoB* 変異によるシネフンギン増産効果の検討

Effect of rpoB mutation on sinefungin production by *S. incarnatus*

長谷川 広夢、根本 理子、金尾 忠芳、○田村 隆（岡山大院）
Hiromu Hasegawa, Michiko Nemoto, Tadayoshi Kanao, ○Takashi Tamura (Okayama Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces incarnatus* が生産する核酸系抗生物質シネフンギンは，S-アデノシル-L-メチオニンのアナログとして人獣感染ウイルスの mGppp キャッピングを強く阻害する機構により SARS2 コロナウイルスなどに対する増殖抑制活性を示す。本研究では，*S. incarnatus* よるシネフンギン生産の増産を図るために，転写の活性化をもたらす RNA ポリメラーゼの rif 領域への変異効果を検討した。さらに rpoB 変異による増産効果を学習して，ビックデータ AAIndex に参照して高い相関を持つアミノ酸残基の物理化学パラメータを選定する Sparse 解析を導入してさらなる *rpoB* 変異設計の指針とした。
【方法と結果】*S. incarnatus* の *rpoB* 遺伝子のトランケート断片を接合伝達ベクターpK18mob に連結した。次に rif 領域の 4 残基から H457 に対する部位特異的変異を導入した。*E. coli* 17S-1 による異種間接合伝達とそれに続く相同組換えにより rif-1 領域に任意の変異導入を行った。参照ビックデータはアミノ酸残基の諸性質を網羅した 553 枚の AAIndex を用い，Lasso/Ridge を按分する ElasticNet をペナルティ関数とした。増産効果をもたらす H457X 変異効果に対して高い相関性をもつ疎水性パラメータが選定された 。選定される AAIndex が提案する未検討の有望な変異をさらに作成して増産効果を検討した。ゲノム上の *rpoB* 改変による実験と機械学習 Sparse 解析を重ねることにより，省力的に rif 領域の多重変異効果を検討する Design(設計)–Build(改変)–Learn(学習)サイクルを構築できた。

[Objectives] Synefungin is a nucleic acid antibiotic produced by the actinomycete *Streptomyces incarnatus*, exhibits propagation inhibition against SARS2 coronavirus and others. To increase the production of sinefungin by *S. incarnatus*, the effect of mutations on the *rif* region of RNA polymerase was explored. Furthermore, sparse analysis statistically selects physicochemical parameters of amino acid residues with high correlation by referring to AAIndex big data and used this as a guideline for further *rpoB* mutation design.

[Methods and Results] The site-directed mutations were introduced in the truncated fragment of rpoB gene on the conjugative transfer vector pK18mob, then transferred via conjugation using *E. coli* 17S-1 followed by homologous recombination. The reference big data AAIndexes covering various properties of amino acid residues. We further created unexamined mutations suggested by the selected AAIndex and examined their effects on increasing production. The experimental and theoretical approach enabled the design-build-learn cycle for studying the effects of multiple mutations in the *rif* region in a labor-saving manner.

Nucleoside Antibiotic, rpoB mutation, Machine Learning

発表責任者：田村　隆（tktamura@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4C7a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 C7 会場

機能性改善を目指した非天然型 goadsporin の作製とその生物活性評価

Preparation and bioactivity evaluation of unnatural goadsporin for functional enhancement

○星野 千優、星野 翔太郎、尾仲 宏康（学習院大理）
○Chihiro HOSHINO, Shotaro HOSHINO, Hiroyasu ONAKA (Dept. of Life Sci., Gakushuin Univ.)

リボソーム翻訳後修飾ペプチド(RiPPs)は、リボソームによって翻訳された前駆体ペプチドが翻訳後修飾を受けて生成するペプチド系天然物である。そのため前駆体ペプチドをコードする構造遺伝子の塩基配列を書き換えることで、様々なアミノ酸配列を有するアナログを容易に作製できる利点があり、様々な構造展開が可能である。*Streptomyces* sp. TP-A0584 が生産する goadsporin(GS)は RiPPs の一種であり、放線菌に対する色素生産誘導活性や抗菌活性を示す[1]。一方で放線菌以外には抗菌活性を示さず、その原因の１つとして膜透過性が低いことが考えられる。そのため GS に化学修飾が容易な第一級アミンを側鎖に持つ Lys 残基を導入することで機能性改善を目指した。最初に、ゲノム組み込み型ベクターに野生型の GS 構造遺伝子 *godA* を導入し、それを鋳型とした overlap PCR を行い、コアペプチド部分に Lys 残基を導入した構造遺伝子発現用のベクターを各種作製した。それらを GS 構造遺伝子破壊株である *Streptmyces* sp. TP-A0584 Δ*godA* に相補的に導入し、培養抽出物の LC-MS に基づいて GS アナログ生産を確認した結果、GS の C 末端に Lys 残基を付加した 20K、10 番目の Gly 残基を Lys 残基に置換した G10K、及び 19 番目の Val 残基を Lys 残基に置換した V19K の３種のアナログ生産に成功した。このうち、20K は精製を行い生成物の NMR 及び MS/MS 解析により、構造確認をした。G10K、V19K は各種クロマトグラフィーを用いた精製を実施中である。今後各アナログを用いて、膜透過性ポリマーの付与などの機能性向上を行い、生物活性評価を行う予定である。

RiPPs: Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, can easily create various analogs with amino acid substitutions. The antimicrobial activity of goadsporin (GS) is limited to actinomycetes. The reason may be the lack of membrane permeability. Therefore, we aim to improve the functionality of GS by introducing Lys, a highly reactive primary amine side chain. In this study, we constructed plasmid expressing precursor gene cording GS Lys additives and checked this production in Streptomyces sp. TP-A0584ΔgodA by LC-MS. As a result, we successfully produced three GS analogs, 20K, G10K, and V19K, and purified the 20K analog, adding Lys residue in the 20K analog. The addition and substitution of Lys to GS was confirmed by MS/MS analysis. In the future, we plan to improve the functionality of each analog by adding membrane-permeable polymers and evaluating their biological activity.

[1] H. Onaka *et al. J. Antibiot.* (2001)

RiPPs, Bioengineerig, heterologous expression

講演番号：4C7a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 C7 会場

コリネ型細菌を用いたハイドロキノン高生産技術の開発

Development of high production technology for hydroquinone using *Corynebacterium glutamicum*

○澁谷 信司[1]、橋本 龍馬[2]、須田 雅子[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Shinji Shibuya[1], Ryoma Hashimoto[2], Masako Suda[2], Masayuki Inui[1,2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

【目的】近年、ものづくり分野では石油由来化合物のバイオ化が着目されている。この一環として、本研究ではバイオ法によるハイドロキノン生産について検討した。ハイドロキノンは酸化防止剤や化粧品原料等として広く用いられている有用化合物であるが、細胞毒性が極めて強く、バイオ法での生産には高いハードルがある。本研究では、溶媒耐性に優れた *Corynebacterium glutamicum* を利用し、グルコースを炭素源としたハイドロキノン高生産技術の開発を目指した。
【方法と結果】ハイドロキノンについてはアルブチン合成経路上の中間体として生合成されることが知られているが、本研究ではゲンチジン酸を経由する人工代謝経路の可能性に着目した。まず、グルコースからシキミ酸経路を経てゲンチジン酸を生産する *C. glutamicum* を構築した。次に、ゲンチジン酸の脱炭酸反応を触媒し、ハイドロキノンを生成する酵素の探索を行った。結果、目的活性を有する酵素をいくつか見出した。これら酵素をゲンチジン酸生産株に導入することでハイドロキノン生産株の構築に成功した。さらにはジャーファーメンターを利用した生産プロセス検討を行い、*C. glutamicum* によるハイドロキノン生産に適した条件を見出した。

[Purpose] In recent years, there has been growing attention in the field of manufacturing towards the bioconversion of petroleum-derived compounds. This study focused on the investigation of hydroquinone production using a bioprocess approach. Hydroquinone is a valuable compound widely used as an antioxidant and raw material in cosmetics. However, its extremely strong cytotoxicity poses a significant challenge for its bioprocess production. In this research, we aimed to develop a high-yield hydroquinone production technology using *Corynebacterium glutamicum*, known for its solvent tolerance, utilizing glucose as a carbon source.

[Method and results] Although hydroquinone biosynthesis is known to be generated as an intermediate in the arbutin synthesis pathway, this study focused on the possibility of an artificial metabolic pathway via gentisic acid. First, a *C. glutamicum* strain capable of producing gentisic acid via the shikimic acid pathway starting from glucose was constructed. Then, we screened for enzymes that catalyze the decarboxylation of gentisic acid to produce hydroquinone. As a result, several enzymes with the desired activity were identified. By introducing these enzymes into a gentisic acid producing strain, we succeeded in constructing a hydroquinone producing strain. Furthermore, we conducted a production process study using a jar fermentor and found suitable conditions for hydroquinone production by *C. glutamicum.*

Hydroquinone, *Corynebacterium glutamicum*, biorefinery

講演番号：4C7a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 C7 会場

コリネ型細菌におけるイソプレン発酵生産
Investigation on isoprene production by *Corynebacterium glutamicum*
○天川 薫[1]、横野 里佳[1]、Theresia Natalia Maria[2]、猿谷 直紀[2]、須田 雅子[2]、平賀 和三[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Kahoru AMAKAWA[1], Rika YOKONO[1], Natalia Maria THERESIA[2], Naoki SARUYA[2], Masako SUDA[2], Kazuimi HIRAGA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST・BIO, [2]RITE)

【目的】 イソプレンはゴムや医薬品の原料として広く使用されている揮発性の化学物質であり、近年、バイオ由来の生産が注目されている。グラム陽性細菌の *Corynebacterium glutamicum* は、野生株ではイソプレンを生成しないものの、イソプレン前駆体であるジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) を合成する。本研究では、*Populus alba* 由来イソプレン合成酵素遺伝子 (*ispS*) の発現ベクターや周辺代謝経路を改変することで、*C. glutamicum* のイソプレン生産量の向上を検討した。
【方法と結果】 数種類の *ispS* 発現プラスミドを構築し、SDS-PAGE と Western Blot 解析を用いてタンパク質の発現を確認した。さらに、密閉バイアル培養とガスクロマトグラフィー解析を使用してイソプレン生産量を確認した。また、イソプレン前駆体 DMAPP の下流代謝経路の改変により、イソプレン生産量の向上を検討した。

[Purpose] Isoprene is a volatile chemical used in rubber and other polymers which bioproduction is gaining attention in recent years. Although the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* does not naturally manufacture isoprene, it is able to synthesize dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), the last intermediate prior to isoprene biosynthesis. In this report, we optimized *C. glutamicum*- based isoprene production through *Populus alba* isoprene synthase (*ispS*), which is the last-step enzyme responsible for isoprene biosynthesis, expression vector modification and metabolic engineering of the surrounding metabolic pathway.
[Methods and results] We constructed several *ispS* expression plasmid variations and confirmed each protein's expression with SDS-PAGE and Western Blot. Sealed-vial cultures and gas chromatography analysis were used to examine their isoprene production. We also examined modification of DMAPP downstream metabolic pathway aiming to improve isoprene production.

Corynebacterium glutamicum, Isoprene, fermentation

講演番号：4C7a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 C7 会場

コリネ型細菌を用いたエルゴチオネインの発酵生産に対する浸透圧の影響

Effect of osmotic pressure on the fermentative production of ergothioneine by *Corynebacterium glutamicum*

○高橋 優乃、平沢 敬（東工大院生命理工）
○Yuno TAKAHASHI, Takashi HIRASAWA (Tokyo Tech)

エルゴチオネイン（以下 EGT）は、優れた抗酸化作用を持つアミノ酸であり、ベタインの一種として知られている。ヒトは EGT 特異的な取り込みトランスポーターである OCTN1 により食物から EGT を吸収しており、取り込んだ EGT は細胞に蓄積される。EGT の生理学的役割の解明にともなって、健康食品などへの応用に向けた EGT の需要は高まりつつある。そのような背景の下、EGT の安定供給をめざし、微生物を用いた EGT の発酵生産に期待が集まっている。我々はこれまで、コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* による EGT 生産株の構築を行ってきた。*C. glutamicum* は EGT の生合成代謝経路を持たないが、他の微生物に由来する EGT 合成酵素の遺伝子を導入することで EGT を生合成し、細胞外に分泌することを明らかにした（Hirasawa et al., J. Biosci. Bioeng., 2023)。

C. glutamicum を含む多くの細菌では、細胞外の浸透圧上昇に対する応答としてベタインを取り込む。ベタインの取り込みに関与する輸送体は Betaine-Carnitine-Choline Transporters (BCCTs)と呼ばれ、細菌やアーキアでは 140 種以上が知られている。我々は、*C. glutamicum* の EGT 生産株が高浸透圧ストレス環境下では細胞内に多量の EGT を蓄積すること、また *C. glutamicum* が持つ 4 つの BCCT のうち BetP を欠損することで有意に EGT の生産が向上することを見いだした。

Ergothioneine (EGT) is a betaine amino acid with high antioxidant property. Human cells incorporate EGT from foods through the OCTN1 transporter and EGT is accumulated in the cells. From increasing demand of EGT for its application to health foods, fermentative production of EGT is highly desired for its sustainable supply. We have conducted fermentative production of EGT using recombinant strains of *Corynebacterium glutamicum* which harbor heterologous EGT biosynthetic pathway (Hirasawa et al., J. Biosci. Bioeng., 2023).

Most bacteria including *C. glutamicum* use betaine as a compatible solute to adapt to high osmotic pressure environments. At present, more than 140 betaine transporters called Betaine-Carnitine-Choline Transporters (BCCTs) are found in bacteria and archaea. We found that the EGT-producing recombinant strain of *C. glutamicum* highly accumulated EGT in the cells under high osmotic pressure conditions and that deletion of *betP*, which encodes one of the BCCTs, resulted in increased EGT production.

Ergothioneine, osmotic pressure, *Corynebacterium glutamicum*

発表責任者：平沢敬（thirasawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4D1a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 D1 会場

糞便培養系を用いたエクオール代謝における食物繊維の影響

The effect of dietary fiber on equol production using a fecal culture system

○小寺 美有紀[1,2]、中村 浩平[2]、横山 慎一郎[1] ([1]岐阜食科研、[2]岐阜大学)
○Miyuki KODERA[1,2], Kohei NAKAMURA[2], Shin-ichiro YOKOYAMA[1] ([1]GRIFS, [2]Gifu Univ.)

更年期症状の緩和作用等が期待されるエクオールは、主にダイゼインを基質として腸内細菌の変換を受けることで産生される。我々は以前の研究でエクオール産生者は 4log10 copy/g-糞便 以上のエクオール産生菌を保有することを示した。本研究ではエクオール産生を向上させる食品成分の探索のため、ヒト糞便培養検体を用いた *ex vivo* による培養試験を行った。

GAM 培地に食物繊維を 1%添加し、嫌気バイアル瓶へ入れ N_2/CO_2 混合ガスで培地を脱気し，気相を置換後に滅菌した。ヒト糞便培養液を注入し、経時的に培養液を採取した。採取した培養液は遠心分離し、上清の pH とダイゼイン・エクオール濃度を、沈殿物からエクオール産生菌数を測定した。

培養試験の結果、ペクチンとレジスタントスターチの添加系では培養液の pH が低下し、対照群となる非添加系と比較してエクオール産生菌数とエクオール変換率が低下した。キチン添加系では pH 低下は観察されず、GAM に比べてエクオール変換率も増加した。更にキチン添加系ではエクオール産生菌数の比率も GAM と比較して有意に増加していた（p =0.01）。現在，食物繊維の添加がヒト糞便細菌叢のエクオール産生能に及ぼす影響について、細菌叢の観点から解析を進めているところである。

Equol is expected as health benefit against menopausal syndrome and converted from daidzein. Equol producers has more than 4log10 copy/g feces in our experiments. This *ex-vivo* study aimed to investigate component which improve the conversion rate about equol.

Gifu Anaerobic Medium and 1%Dietary fiber was added in vial and filled in CO_2/N_2 gas. After sterilization treatment, fecal suspension was added and cultivated at 37℃. The broth was collected at 0, 1, 2 and 3 day in the microtube. After centrifuged, supernatant were used to analysis about pH, daidzein and equol. DNA were extracted from the slurry and used to quantify the equol producing bacteria.

The pH and equol conversion rate were decreased in the pectin group and the resistant starch group compared to the control group. By contrast, the pH was not decreased and enhanced equol conversion rate in the chitin group. Additionally, a t-test was conducted and significantly increased in the rate of equol producing bacteria in the chitin group against the control group. This study is on going.

equol, chitin, microbiota

講演番号：4D1a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D1 会場

カルノシンによるエクソソームを介した脳機能改善
Carnosine Improves Memory Function via Exosomes

○里 桃花[1]、宮園 素直[1]、鵜殿 美弥子[2]、片倉 喜範[2] ([1]九大院生資環、[2]九大院農院)
○MOMOKA SATO[1], Sunao Miyazono[1], Miyako Udono[2], Yoshinori Katakura[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

カルノシンは、β-アラニンと L-ヒスチジンからなるイミダゾールジペプチドの一種であり、二重盲検ランダム化ヒト試験およびヒト疫学研究の結果から、脳機能改善効果を有することが明らかになっている。本研究では、細胞外分泌小胞として知られるエクソソームに着目し、エクソソームを介した認知機能改善効果について検証した。これまでの細胞実験では、カルノシン処理した腸管上皮細胞由来エクソソームが、ヒト神経細胞における突起伸長、ミトコンドリアの活性化などを誘導することが明らかとなり、神経細胞を活性化することが明らかとなった。当該エクソソーム中の miRNA の解析を行った結果、その標的遺伝子が神経細胞の活性化に関わる Pathway を制御していることが明らかとなった。現在、老化マウスを用いた検証により、カルノシンによる認知機能回復とその作用に対するエクソソームの寄与について明らかにする予定である。

Carnosine is a type of imidazole dipeptide composed of ß-alanine and L-histidine, which has been shown to improve brain function based on the results of double-blind randomized human trials and human epidemiological studies. In this study, we focused on exosomes, known as extracellular secretory vesicles, and examined the exosome-mediated effect on cognitive function improvement. In previous cell experiments, carnosine-treated intestinal epithelial cell-derived exosomes were found to induce projection elongation and mitochondrial activation in human neurons, indicating that they activate neurons. Analysis of miRNAs in the exosomes revealed that their target genes regulate pathways involved in neuronal activation. We are now planning to examine the contribution of exosomes to the recovery of cognitive function and its effects by carnosine in aging mice.、

Carnosine, Brain-gut interaction, Exosome

発表責任者：片倉 喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D1a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D1 会場

福島県産の発酵物から分離された乳酸菌のγアミノ酪酸生成と食品への応用
Production of γ-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from fermented products from Fukushima Prefecture and its application to food
○熊谷 武久、中山 未菜、芦澤 翔、鈴木 皓介（福島大食農）
○Takehisa KUMAGAI, NINA NAKAYAMA, KAKERU ASIZAWA, KOSUKE SUZUKI (Fukushima Univ.)

我々は福島県産の発酵物・農産物から乳酸菌を分離して、その有効性を検討している。今回当研究室で分離された乳酸菌を用い、γ-アミノ酪酸（GABA)生産乳酸菌の選抜及び食品へ応用を検討した。

グルタミン酸ナトリウム(MSG)を添加した MRS 培地に乳酸菌を接種し、培養後 MSG と生成した GABA 量をキットで測定した。その後、TLC、アミノ酸アナライザーで GABA 生成を再確認し、候補株として *Levilactobacillus brevis* K11-2 が選抜された。次に食品と食品添加物のみを用いたスターターを作成して、食品に対する発酵性、GABA 生成能を検討した。甘酒で良好な発酵、GABA 生成が見られた。発酵前後の甘酒の官能評価を行い、酸味に有意な差が見られたが、総合評価では有意な差が見られなかった。

以上の結果より、本株が有する GABA 生成及び食品発酵性は機能性表示食品としての可能性が見られた。

We have isolated lactic acid bacteria from fermented products and agricultural products produced in Fukushima Prefecture and are investigating their effectiveness. Using lactic acid bacteria isolated in our laboratory, we investigated the selection of γ-Aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria and their application to foods.

Lactic acid bacteria were inoculated into MRS medium supplemented with monosodium glutamate (MSG), and after culturing, the amount of MSG and GABA produced was measured using a kit. GABA production was then reconfirmed using TLC and an amino acid analyzer, and *Levilactobacillus brevis* K11-2 was selected as a candidate strain. Next, we produced a starter using only food and food additives, and examined its fermentability for food and GABA production ability. Good fermentation and GABA production were observed in amazake. Sensory evaluation of amazake before and after fermentation revealed a significant difference in sourness, but no significant difference was found in the overall evaluation.

From the above results, the GABA production and food fermentation properties of this strain were found to have potential as a food with functional claims.

lactic acid bacteria, GABA, food fermentation

発表責任者：熊谷武久（t_kumagai@agri.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：4D1a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D1 会場

ペプチドによる GLP-1 分泌促進作用における Trp-Tyr 配列の重要性について
Importance of Trp-Tyr sequence in peptide-induced GLP-1 secretion
○船橋 周倖[1]、田口 颯[2]、比良 徹[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Chikayuki FUNABASHI[1], Hayate TAGUCHI[2], Thoru HIRA[2] ([1]Hokkaidi Univ., [2]Hokkaidi Univ. Grad. Sch.)

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、消化管下部に多く分布する L 細胞より分泌される消化管ホルモンで、インスリン分泌促進による血糖値上昇の抑制などの作用がある。当研究室での培養細胞を用いた試験により Lys-Ala (KA), Gly-Trp (GW), Trp-Tyr (WY)などの複数のジペプチドが GLP-1 分泌を促進する事を見出した。本研究では、マウス大腸由来 GLP-1 産生細胞株(GLUTag)を用いて、これらジペプチドによる GLP-1 分泌促進における、構成アミノ酸の寄与や、構造活性相関について検討した。KA, GW を構成するアミノ酸のうち、A と G はそれぞれ単独で、KA, GW と同程度の GLP-1 分泌を誘導した。この事から、KA, GW の作用には、分解されて生じた遊離アミノ酸が寄与している可能性も示唆された。一方で、WY は構成アミノ酸である W や Y では分泌が誘導されず、ペプチドとして作用することが示唆された。また、β ラクトグロブリンに含まれ、WY 配列を有する Gly-Thr-Trp-Tyr (GTWY)は分泌を促進したが、環状ペプチドである cyclo(-Trp-Tyr)では GLP-1 分泌を促進しなかった。本研究により、GLP-1 分泌促進作用において、KA と GW については、構成アミノ酸が単独で寄与する可能性、WY については、WY という配列が重要であることが明らかになった。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a gut hormone secreted by L cells mainly in the intestine, whose major role is lowering glycemic response via promoting insulin secretion. We previously found dipeptides such as Lys-Ala (KA), Gly-Trp (GW), Trp-Tyr (WY) potently promote GLP-1 secretion in vitro. In this study, we examined the contribution of constituent amino acids and the structure-activity relationship in the GLP-1 secretion promoted by these dipeptides, in a murine GLP-1-producing cell line (GLUTag). A and G each induced GLP-1 secretion to the same extent respectively as KA and GW, suggesting that the effects of KA and GW may involve the free amino acids liberated from the parent peptides. GLP-1 secretion was not induced by either W or Y, the constituent amino acids of WY, suggesting that WY acts as the peptide. Furthermore, a WY-containing tetrapeptide, Gly-Thr-Trp-Tyr (GTWY), promoted GLP-1 secretion, but cyclo(-Trp-Tyr), a cyclic peptide, did not. These results revealed the possibility that the free amino acids such as A and G has GLP-1-releasing activity, while that the sequence WY is a potent structure to promote GLP-1 secretion.

GLP-1, dipeptide, Trp-Tyr

講演番号：4D1a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D1 会場

抹茶の新たな機能性食品因子の探索に向けたマイクロ RNA 解析

Analysis of MicroRNAs to Discover New Functional Food Factors in Matcha

○黄 苡嵐[1]、一瀬 智美[1]、渡邉 凌矢[1]、辰己 由華[2]、一谷 正己[2]、衣笠 仁[2]、瀧原 孝宣[2]、春尾 守一[3]、熊添 基文[1]、立花 宏文[1]、藤村 由紀[1]([1]九大院農院・生機科、[2](株)伊藤園・中央研究所、[3](株)あいや)

○Yi-Lan Huang[1], Tomomi Ichinose[1], Ryoya Watanabe[1], Yuka Tatsumi[2], Masaki Ichitani[2], Hitoshi Kinugasa[2], Takanobu Takihara[2], Shuichi Haruo[3], Motofumi Kumazoe[1], Hirofumi Tachibana[1], Yoshinori Fujimura[1] ([1]Faculty of Agriculture, Kyushu University, [2]Central Research Institute, ITO EN,LTD., [3]AIYA CO., LTD.)

近年、植物由来の機能性 RNA の一種で約 20 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA であるマイクロ RNA（miRNA）が動物体内でも生理作用を発揮する可能性が示され、植物–動物間の界を超えた miRNA の機能が注目されている。緑茶（*Camellia sinensis* L.）の一種である抹茶の様々な生理作用が知られているが、カテキンやテアニン等の主要成分以外の研究事例は少なく、抹茶の miRNA に関する情報も皆無である。そこで本研究では、抹茶中の新たな機能性食品因子を探索するために、抹茶中の miRNA を調査するとともに、miRNA 発現レベルに及ぼす品種や茶期の影響を検討した。

次世代シーケンス解析により、異なる 3 種類の抹茶（ブレンド型 1 つと単一品種 2 つ）における包括的な miRNA 発現プロファイルの取得を試みた結果、いずれの品種においても複数の miRNA が検出された。また、品種や茶期の異なる 10 種類以上の抹茶における代表的な miRNA の発現レベルをリアルタイム PCR にて検討したところ、当該 miRNA は全ての抹茶で検出され、品種や茶期の違いによってそれらの発現レベルに違いが認められた。さらに、これらの miRNA 発現について抹茶の加工プロセスの影響を検討した結果、抹茶およびその原料となる碾茶間で miRNA 発現レベルの明らかな差異は観察されなかった。

以上により、抹茶中には新たな機能性食品因子として期待される miRNA が複数存在し、その発現レベルは加工プロセスの影響を受けずに品種や茶期に大きく影響を受けることが明らかとなった。

Recently, plant-derived microRNA (miRNA), single-strand non-cording RNA with approximately 20 bp, has received considerable attention for exerting bioactivities in animals. Matcha, one of green tea (*Camellia sinensis* L.), possesses diverse bioactivities, but the studies of food functional factors except for the major components, such as catechins and theanine, are still limited, and little is known about the existence of miRNAs in matcha. Here we aimed to investigate the presence of miRNAs to explore new functional food factors in matcha.

Next-generation sequencing analysis showed the existence and expression profiles of miRNAs detected in three different types of matcha. The expression of several representative miRNAs was observed in more than 10 different types of matcha by using a real-time PCR method. We found that miRNA levels differed depending on cultivars and harvesting seasons. Furthermore, significant difference in miRNA levels was not observed between matcha and tencha, raw material of matcha. These results indicate that matcha possesses multiple miRNAs and their expressions don’t depend on the processing from tencha, but cultivars and harvesting seasons.

Matcha, microRNA, Food Factor

発表責任者：藤村由紀（fujimu@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D1a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D1 会場

高食物繊維小麦粉による腸内環境改善効果の検証

Verification of the Improvement Effect of High Amylose Wheat Flour on the Intestinal Environment

○大友 雄登[1]、野間 聡[1]、貴島 聡[2]、菊池 洋介[1]、青江 誠一郎[3] ([1](株)日清製粉グループ本社、[2]日清製粉(株)、[3]大妻女子大家政)
○Yuto Otomo[1], Satoshi Noma[1], Satoshi Kijima[2], Yosuke Kikuchi[1], Seiichiro Aoe[3] ([1]Nisshin Seifun Group Inc., [2]Nisshin Flour Milling Inc., [3]Otsuma Women's University)

【背景・目的】近年、食物繊維の腸内環境改善に関する研究が注目されている。これまでに、難消化性澱粉（RS）の内臓脂肪低減・腸内環境改善効果が明らかになっている。高食物繊維小麦粉（HAW）は含有される食物繊維の多くが RS であるため、本研究では、HAW の経口摂取によりこれらが改善するか検証するパイロットスタディを行った。その中で、腸内環境に及ぼす影響の結果を報告する。【方法】軽度肥満（BMI23 以上 30 未満）である 20 歳以上 60 歳未満の健常な被験者 60 名を無作為に 3 群（HAW 高配合パン摂取群、HAW 低配合パン摂取群、プラセボ群）に分け、HAW 高配合パン（RS7.6g／2 個）、HAW 低配合パン（RS4.4g／2 個）または RS を含有しないパン（プラセボ）を 12 週間 1 日 2 個摂取させた。そして、糞便中の腸内細菌の存在比率や短鎖脂肪酸量を測定した。【結果・考察】短鎖脂肪酸産生菌を含む *Bifidobacterium* 属の存在比率が、HAW 高配合パン摂取群内において有意に増加し、HAW 低配合パン摂取群内においては増加傾向であった。層別解析の結果、試験開始時に糞便中短鎖脂肪酸が少ない被験者について、HAW 高配合パン摂取群で酪酸量が有意に増加した。HAW は短鎖脂肪酸が少ない被験者における糞便中酪酸量の増加という腸内環境改善効果がある可能性を示した。当該効果が HAW 由来 RS によるものであるか検証するため、ヒト糞便細菌叢を用いた *in vitro* 試験を実施中である。今後は、本パイロットスタディの結果を踏まえ、健常者の中で、腸内環境を気にしている方を被験者として検証を進める。

The effects of resistant starch (RS) on improving the intestinal environment and reducing visceral fat have been demonstrated, so far. Since RS is most of the dietary fiber contained in high amylose wheat (HAW), this study was conducted to verify whether intake of HAW improves these effects. Sixty healthy subjects with BMI between 23 and 30 were randomly divided into three groups (high HAW bread group, low HAW bread group, and placebo group). The abundance ratio of intestinal bacteria and short chain fatty acid content in the feces were measured. The proportions of *Bifidobacterium* spp. and were increased in the high HAW bread group. Stratified analysis showed that butyric acid secretion was significantly increased in the high HAW bread group for those with low levels of short-chain fatty acids. We are currently conducting an *in vitro* fermentation of HAW-derived RS by human fecal microbiata. In the future, the examination will be advanced using subjects who are concerned about the intestinal environment as subjects.

high amylose wheat, intestinal environment, short chain fatty acid

講演番号：4D1a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D1 会場

溶解度分別法を利用したグリチルリチン精製法の開発

Development of a glycyrrhizin purification method using solubility-based separation.

○本夛 峻資、西野 蛍汰、福田 悠作、片野 肇、高橋 正和（福井県大院生物資源）
○ Ryosuke HONDA, Keita NISHINO, Yusaku FUKUDA, Hajime KATANO, Masakazu TAKAHASHI (Fukui Pref. Univ.)

グリチルリチン（GL）は甘草（*Glycyrrhiza glabra* など）の根にふくまれ，甘味料として有用なだけでなく， 抗炎症作用や抗ウイルス作用など多様な生理活性を示し， 漢方薬成分としても利用価値が高い．また本化合物はトリテルペノイドサポニンであり，アグリコンにグルクロン酸残基が 2 分子結合した配糖体となっている．我々はこれまでにホウ砂水溶液を用いて大豆全粒粉末のメタノール抽出物から簡便かつ選択的に B 型大豆サポニン分子種を濃縮単離する手法を開発している（*Anal. Sci.*, 2019）．この方法は，ソヤサポニンの糖鎖部分に含まれる cis-diol 構造を利用した手法であり，類似構造を有する天然物配糖体の簡易濃縮法に利用できると期待された．

GL は水への溶解性は低いが， ホウ砂水溶液には容易に溶解し，さらに酸性にすると再沈殿する．この性質を利用して甘草粉末メタノール抽出物（画分 A ; GL 純度 8.5%）をホウ砂水溶液と塩酸で処理したところ， 極性の高い不純物が除かれて画分 B（GL 純度 19%）が得られた．次に Sep-Pak C_{18} 固相抽出カラムにて低極性不純物を除去して画分 C（GL 純度 64%）を得たのち，逆相 ODS カラムによる HPLC 分画によって,純度 90%以上に精製することに成功した．

Glycyrrhizin (GL), which is contained in the root of licorice or *Glycyrrhiza glabra*, is useful not only as an edible natural sweetener but also as an active pharmaceutical ingredient in *Kampo* products because of the various pharmacological activities such as anti-inflammatory and anti-virus effects. It is a saponin compound with a pentacyclic triterpenic structure bound to two glucuronic acid moieties. We have developed an efficient solubility-based method to separate group B soyasaponins selectively from the whole soybean flour (*Anal. Sci.* 2015, 2019). This method is based on the solubility differences among the soyasaponins and other ingredient components in MeOH mixed with aqueous borax solution. In this study, we investigated this method to separate GL from the licorice extract. Although the water solubility of glycyrrhizin is very low, the compound is dissolved in borax solution, and is precipitated by addition of dil. HCl. When the MeOH extract of licorice root powder (Fr. A; 8.5% purity) was treated with aqueous borax solution and dil. HCl, high-polar compounds were removed resulting in Fr. B (19% purity). After Fr.B was treated with a Sep-Pak C_{18} cartridge for removal of low-polar compounds to obtain Fr. C (64% purity of GL), the fraction was further purified on reversed-phase HPLC with an ODS column to obtain the purified GL sample (>90% purity).

Glycyrrhiza sp., glycyrrhizin, solubility-based separation

発表責任者：本夛峻資（s2373012@g.fpu.ac.jp）

講演番号：4D1a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D1 会場

ピセアタンノール摂取による皮膚粘弾性へ及ぼす影響―ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験―

Effects of Oral Intake of Piceatannol on Skin Viscoelasticity -A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group Comparison Study-

○吉原 瑞樹（森永製菓株式会社）
○Mizuki YOSHIHARA (Morinaga & Co., Ltd)

＜目的＞
ピセアタンノールは、レスベラトロールに似た構造のポリフェノールであり、パッションフルーツ種子中に多く含まれている。本研究は、10mg のピセアタンノールを含む食品が、健康な方の皮膚粘弾性に及ぼす影響を検証する目的で行った。
＜方法＞
ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を 66 人の健康な女性（30-59 歳）を対象に実施した。被験者をランダムに 2 グループに分け、ピセアタンノール 10mg を含む被験食品またはプラセボのどちらかを 8 週間毎日摂取させて、腕の皮膚粘弾性を評価した。
＜結果・結論＞
8 週間後、ピセアタンノールを含む被験食品を摂取した群では、プラセボ群と比較して有意に皮膚粘弾性が向上した。この結果により、ピセアタンノールの日常的摂取は皮膚粘弾性に有効であることが示唆された。

(Objectives)
Piceatannol is a polyphenol abundant in passion fruit seed and is an analog of resveratrol. The aim of this study was to investigate the effect of a dietary intake of piceatannol on skin viscoelasticity in healthy subjects.
(Methods)
A randomized, double blind, placebo-controlled parallel-group comparison study was conducted in 66 healthy female subjects (30-59 years old). Subjects were randomly divided into two groups and ingested either the test product containing 10mg piceatannol, or placebo product every day for 8 weeks. Viscoelasticity of arms was evaluated.
(Results and Conclusions)
The skin viscoelasticity was significantly improved after 8 weeks in the test product group containing piceatannol compared to the placebo group. The result suggested that the daily intake of piceatannol is effective for skin viscoelasticity.

Piceatannol, skin viscoelasticity, polyphenol

講演番号：4D1a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D1 会場

ペンタガロイルグルコースは miR-191-5p を介して脳機能調節作用を発揮する
pentagalloylglucose improves brain function via regulation of miR-191-5p expression
〇李 寛雨、松井 優樹、麻生 菜帆、高木 基光、岸 洸聖、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文 (九州大学)
〇Kwanwoo Lee, Yuki Matsui, Naho Asou, Motomitsu Takaki, Kousei Kishi, Motofumi Kumazoe, Yoshinori Fujimura, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

我々は加水分解型タンニンの一種であるペンタガロイルグルコース(PGG)の脳機能調節作用を見出したが、難吸収性の PGG の脳機能調節作用のメカニズムは不明であった。一方、miRNA は生理活性因子として細胞間コミュニケーションに関与することが知られているが、頂端側で PGG を作用させた腸上皮様細胞の基底膜側で唯一発現量が変化した miR-191-5p が神経細胞の活性化に関与することを見出した。そこで、PGG による脳機能調節作用における miR-191-5p の関与を検討するため、C57BL/6J マウスに PGG (10 mg/kg b.w.) を 1 週間毎日経口投与し、miR-191-5p mimic を投与した。その後、行動試験（Y 字迷路試験, T 字迷路試験, 新規物体認識試験)により認知機能(空間記憶、認知記憶)を評価するとともに海馬における神経可塑性関連因子または神経新生関連マーカータンパク質を検討した。その結果、PGG による神経可塑性・神経新生関連タンパク質の発現増強作用ならびに認知機能の向上は miR-191-5p mimic の投与によりキャンセルされた。以上より、PGG は miR-191-5p を介して脳機能調節作用を発揮する可能性が示された。

While we previously discovered the neuroregulatory effects of Pentagalloyl glucose (PGG), a hydrolyzable tannin, the mechanism underlying the brain function of the poorly absorbable PGG remained unclear. Notably, among miRNAs, endogenous short noncoding RNAs that play crucial roles in cell-cell communication by repressing target genes, miR-191-5p was the only one whose expression changed at the basolateral chamber of intestinal epithelial-like cells upon PGG treatment at the apical side. To investigate the PGG-induced brain function via regulation of miR-191-5p, we orally administered PGG (10 mg/kg b.w.) to C57BL/6J mice daily for one week with intraperitoneal (IP) injection of miR-191-5p mimic. Subsequently, behavioral experiments (T-maze, Y-maze, and novel object recognition test) were conducted, and hippocampus, a region related to cognitive processing, was collected for assessment of neuroplasticity and neurogenesis-related proteins. The results revealed that the PGG-induced hippocampal neuroplasticity, neurogenesis, and cognitive function improvement were counteracted by the administration of miR-191-5p mimic. This suggests that PGG exert its neuroregulatory effects through miR-191-5p. The findings highlight that PGG improves brain function via regulation of miR-191-5p expression.

pentagalloyl glucose, miRNA, brain function

発表責任者：李寛雨（dlrhksdn92@naver.com）

講演番号：4D1a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D1 会場

細胞内における新型コロナウイルス酵素 Main protease への茶成分の結合
Adduction of tea catechin to SARS-CoV-2 main protease expressed in cells
○鈴木 咲子[1]、赤川 貢[2]、西川 美宇[3]、生城 真一[3]、金子 一郎[1,4]、加藤 陽二[1,4] ([1]兵庫県大環境人間、[2]徳島大学院医歯薬、[3]富山県大工、[4]兵庫県大先端食セ)
○Sakiko SUZUKI[1], Mitsugu AKAGAWA[2], Miyu NISHIKAWA[3], Shinichi IKUSHIRO[3], Ichiro KANEKO[1,4], Yoji KATO[1,4] ([1]Univ. of Hyogo, SHSE, [2]Tokushima Univ. Grad. Sch., Inst. Biomed. Sci., [3]Toyama Pref. Univ., [4]Univ. of Hyogo, RIFNS)

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による感染症（COVID-19）が世界中に蔓延し、次なるパンデミックの発生も危惧されている。コロナウイルス由来の酵素メインプロテアーゼ（Main protease, M^{pro}）はウイルスの増殖に必須の酵素であり、変異が少なく類似酵素がヒトに存在しないことから、ウイルス制御を狙うための有効なターゲットとなる。当研究室では食によるウイルス制御を目指し、ミリセチンや茶カテキン Epigallocatechin gallate（EGCG）などの食品成分が組換酵素 M^{pro} 活性を阻害すること、及び、酵素活性部位に付加結合する機構を明らかにしてきた。本研究では食品成分がウイルス感染細胞内でも酵素 M^{pro} と反応するか検討した。ウイルス酵素 M^{pro} 遺伝子を含むプラスミドを培養細胞に導入することで M^{pro} を過剰発現させ、ウイルス感染モデル細胞とした。細胞内での M^{pro} 遺伝子発現は PCR により確認した。また、特異抗体を用いたウエスタンブロットにより酵素の細胞内発現を確認した。このモデル細胞に EGCG を細胞外から 1 時間作用させた後、m-Aminophenylboronic acid-agarose を用いて細胞内から EGCG とタンパク質の結合体を単離し、ウエスタンブロットにて EGCG 結合体における M^{pro} の存在を確認した。
Infectious diseases (COVID-19) caused by a new coronavirus (SARS-CoV-2) have spread worldwide, and the next pandemic is worrying. The virus-derived enzyme main protease (M^{pro}) is an effective target for viral control because it is an essential enzyme for viral replication, is less mutable, and similar enzymes do not exist in humans. In our laboratory, we have been working on the inhibitory mechanism of the viral recombinant enzyme by food chemicals like myricetin and epigallocatechin gallate (EGCG). We have found that some food chemicals inhibit the activity of the recombinant M^{pro} and bind to the enzyme's active site. This study examined whether food chemicals could react with M^{pro} even in virus-infected cells. To prepare model cells infected with the virus, M^{pro} was overexpressed by introducing a plasmid containing the M^{pro} gene into cultured cells. M^{pro} gene expression in the cells was confirmed by PCR. Intracellular expression of the enzyme was also confirmed by Western blotting using specific antibodies to M^{pro}. EGCG was extracellularly applied to the cells, and kept for 1 hour; EGCG–protein conjugates were then isolated from the cells using m-aminophenylboronic acid-agarose, and the EGCG-modified M^{pro} in the conjugates was confirmed by Western blotting.

SARS-CoV-2 main protease, tea catechin, Epigallocatechin gallate

発表責任者：鈴木咲子（nd23y007@guh.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：4D1a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D1 会場

機械学習とビッグデータを用いた食品の機能性および微生物を介した作用メ カニズムの推定
Inference of food functions and microbiome-mediated mechanisms of action through machine learning and big data

○三枝 奈々子[1]、柴田 友和[1]、澤田 隆介[2]、関谷 拓海[1]、山西 芳裕[3] ([1]九州工業大学、[2]岡山大学、[3]名古屋大学)
○Nanako MIEDA[1], Tomokazu SHIBATA[1], Ryusuke SAWADA[2], Takumi SEKIYA[1], Yoshihiro YAMANISHI[3] ([1]Kyushu Institute of Technology, [2]Okayama University, [3]Nagoya University)

生体中の微生物が産生する代謝産物には、疾患に機能性を示すものがある。このような代謝産物は通常、食品が微生物に分解されることによって産生され、ヒトの体に影響を及ぼす。本研究では、食品の成分化合物の作用メカニズムおよび、微生物による成分化合物の代謝メカニズムを推定し、食品の機能性および疾患への効果を予測する機械学習手法を開発する。膨大な食品や成分化合物、微生物代謝物に関するデータを提案手法で解析し、食品が及ぼす疾患・健康への作用を明確化を目指す。微生物代謝物質の作用する標的タンパク質（オフターゲットを含める）は多くが未知であるため、数百万の化合物・タンパク質相互作用データを学習して構築した機械学習モデルで推定した。微生物代謝物質が作用する標的タンパク質の機能的な連動性を考慮し、微生物代謝物質の新規適応疾患を予測した。さらに、疾患の発症や増悪に関わるパスウェイを基に、食品による制御手法を開発した。

提案手法を 941 食品、24,255 代謝物質、92 疾患に適用し、解析結果の妥当性を検証した。続いて、ネットワーク解析を用いて予測された食品と疾患の機能的関連性の作用機序の推測を試みた。その結果、各食品成分化合物が疾患治療標的タンパク質に対し、直接作用するもしくは微生物により代謝物質へと変換され標的タンパク質に作用することによって、食品の機能性が示されると推定することができた。これは、化合物（代謝産物）・タンパク質・疾患ネットワーク上に反映することで、作用機序解明の一助となる可能性を示す。本提案手法は、疾患に対して適当なプレバイオティクス食品を選択、提案することに繋がり、健康寿命の延長への貢献が期待できると考える。

Foods have various unexplored functionalities; however, experimental identification of food functions is very difficult. In this study, we have proposed a computational approach to infer the potential functions of foods, the mechanisms of action of constituent compounds in foods, and the mechanisms of metabolites of the microbiome. We achieved this goal by using machine learning based on biological and chemical big data. We focused on the utilization of disease-related protein pathways and evaluate functional relationships of target proteins of constituent compounds and microbiome metabolites on pathways. We applied our proposed method to about one thousand foods and more than ten thouzands microbiome metabolites for about one hundred diseases, and demonstrated the usefulness of the proposed method.

Machine learning, Food functionalities, Microbiome metabolites

発表責任者：三枝奈々子（mieda.nanako836@mail.kyutech.jp）

講演番号：4D1a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D1 会場

愛知県幸田町産・筆柿の葉に含まれる機能性成分アストラガリンに関する検討

Study on Astragalin, a Functional Component Found in Leaves of Fudegaki Persimmons from Kota Town, Aichi Prefectur

○保田 倫子[1]、田中 美帆[1]、小野 綾巳[1]、村瀬 晴香[1]、矢田 友和[2]([1]椙山大生活、[2]JA あいち三河)
○Michiko YASUDA[1], Miho Tanaka[1], Ayami Ono[1], Haruka Murase[1], Tomokazu Yada[2] ([1]Sugiyama Jogakuen Univ., [2]JA Aichi-Mikawa)

不完全甘ガキ、筆柿は愛知県幸田町が主な生産地である。柿の葉と果実の研究例は多いが、筆柿についてはほとんどない。本研究では筆柿葉茶の DPPH ラジカル消去活性とポリフェノールの中でも特に kaempferol 配糖体に注目した。葉は 5 月初旬に収穫し蒸して乾燥させ茶葉とし、100℃の熱水で浸出し葉茶試料溶液とした。総ポリフェノール量は Folin-Ciocalteu 法で、kaempferol 配糖体量は ODS カラムを用いた HPLC により検討した。葉茶は 52.6%の DPPH ラジカル消去活性を示し、総ポリフェノールはカテキン等量で 67.1 μg/mL 含まれていた。抗酸化性を示すアスコルビン酸は葉茶中に 4.1 μg/mL 含まれるが、この濃度では DPPH ラジカル消去活性をほとんど示さなかった。葉茶中には、kaempferol 3-*O*-glucoside (astragalin)が他品種の柿の葉茶と同様に含まれていた(8.0 μg/mL)。一方、kaempferol 7-*O*-glucoside (populnin)が葉茶には含まれないこと、果肉中には astragalin が含まれないことを確認した。唾液アミラーゼを *in vitro* で処理したところ、標準品も葉茶中の astragalin も変化は見られなかった。これらのことから、他のフラボノイドと同様、筆柿葉茶中の kaempferol 配糖体も消化吸収過程において腸管内に届いた後にアグリコンに分解され機能性を発揮する可能性があり、今後これらを考慮した上で機能性を検討していく予定である。“The Fudegaki persimmon”, a type of PVNA, is cultivated in Kota-cho, Aichi pref. While the leaves and fruits of other persimmon varieties have been well studied, those of Fudegaki have not received much attention. In our investigation, we examined the DPPH scavenging activity, polyphenol, and kaempferol glycoside content. The leaves were harvested in May, steamed and dried. Subsequently, tea leaves were extracted with hot water. The tea exhibited 52.6% DPPH free racical scavenging activity. Total polyphenols were measured at 67.1 μg/mL equivalent to catechin content, while the ascorbic acid content was 4.15 μg/mL. Notably, at that concentration, ascorbic acid showed little DPPH radical scavenging activity. In the tea sample, kaempferol 3-*O*-glucoside, astragalin, was detected. However, kaempferol 7-*O*-glucoside (populnin) was not found in the leaves, and astragalin was absent in the fruit. Astragalin in the tea was not digested by α-amylase from human saliva *in vitro*. Based on these findings, like other flavonoids, it is possible that kaempferol glycosides in Fudegaki persimmon leaves were converted into aglycones in the intestines and the conjugates or their aglycone forms exhibit the functional properties. Further research will explore this possibility.

persimmon, kaempferol, astragalin

発表責任者：保田倫子（yasuda@sugiyama-u.ac.jp）

講演番号：4D1a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 D1 会場

習慣的な紅茶の飲用が腸内細菌叢に与える影響

The effects of habitual black tea consumption on intestinal microflora

○冨岡 玲乃[1]、田中 裕子[1]、鈴木 壯幸[1]、海老原 淑子[2]([1]三井農林株式会社、[2]チヨダパラメディカルケアクリニック)
○Reno TOMIOKA[1], Yuko TANAKA[1], Masayuki SUZUKI[1], Shukuko EBIHARA[2] ([1]Mitsui Norin Co., Ltd., [2]Chiyoda Paramedical Care Clinic)

我々は以前、臨床試験により、習慣的な紅茶の飲用は急性上気道炎症の発症リスク等を低減させ、特に粘膜免疫指標である唾液 SIgA 濃度が低い人では SIgA 分泌能が改善されることを示した。体内への病原体侵入を防ぐ粘膜免疫は、腸内細菌叢と密接に関わっている。そこで本研究では、上記臨床試験にて採取した糞便試料を解析し、紅茶の継続的な飲用が腸内細菌叢に与える効果を評価した。

20 歳~60 歳の健常な男女 72 人を対象に、紅茶またはプラセボ（麦茶）を 1 日 3 杯、12 週間継続して摂取させるランダム化プラセボ対照単盲検並行群間比較試験を実施した。紅茶 3 杯には高分子紅茶ポリフェノール（テアフラビンとして）が 76.2 mg 含まれていた。摂取期間の前後に採取した糞便中の各腸内細菌量をリアルタイム PCR 法にて評価した。

全被験者を対象とした解析では、紅茶摂取により酢酸産生菌である *Prevotella* 属菌の増加が確認された。唾液 SIgA 濃度が低い被験者では、紅茶の飲用により *Prevotella* 属菌に加え、複数種類の酪酸産生菌の増加が認められた。酪酸は、腸管上皮細胞のエネルギー源としての利用や IgA 抗体産生促進作用等を介して粘膜免疫機能維持に寄与することが知られている。

以上より、紅茶の習慣的な飲用は免疫有益菌である酪酸産生菌を腸内で増加させることで、粘膜免疫機能の維持に役立つ可能性が示された。

We previously reported that habitual black tea consumption reduced the risk of acute upper respiratory tract inflammation, and improved SIgA secretion capacity in those with low salivary SIgA levels. Therefore, in this study we evaluated the effect of black tea intake on gut microbiota, which is involved in mucosal immunity, by analyzing the feces collected during the first clinical study. The clinical design was a randomized, single-blind, parallel-group, placebo-controlled study with 72 healthy Japanese adult males and females, who consumed three cups of black tea (Black Tea Polymerized Polyphenols 76.2 mg per day) or placebo per day for 12 weeks. In all subjects, intake of black tea significantly increased abundance of *Prevotella*. In subjects with low salivary SIgA levels, the change over time of butyrate-producing bacteria, which are involved in normalizing immune function, were higher in the black tea group than in the placebo group.

In conclusion, our results suggest that habitual black tea consumption may help maintain mucosal immune function by increasing butyrate-producing bacteria in the gut.

black tea, intestinal microflora, mucosal immunity

発表責任者：冨岡玲乃（reno.t@mitsui-norin.co.jp）

講演番号：4D1a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 D1 会場

分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に及ぼす影響: バリン欠乏が腸管幹細胞を減少させるメカニズムの解明

Effect of branched-chain amino acids on intestinal epithelial cells: Elucidation of the mechanism by which valine deficiency decreases intestinal stem cells

○香西 歩[1]、岩槻 健[1]、隈本 宗一郎[2,3]、清水 誠[4]、小西 良子[1]、只石 幹[1]、服部 一夫[1] ([1]東農大・応生、[2]早大・院先進・化学生命化学、[3]金沢大・がん研・がん・老化生物学、[4]東農大)
○ Ayumi KOZAI[1], Ken IWATSUKI[1], Soichiro KUMAMOTO[2,3], Makoto SHIMIZU[4], Yoshiko SUGITA-KONISHI[1], Miki TADAISHI[1], Kazuo KOBAYASHI-HATTORI[1] ([1]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dept. of Chem. and Biochem., Grad. Sch. of Adv. Sci. and Eng., Univ. of Waseda, [3]CRI, Kanazawa Univ., [4]Tokyo Univ. of Agriculture)

我々は、マウス空腸オルガノイド（エンテロイド）を用いて、分岐鎖アミノ酸（BCAA）の中でバリン（Val）欠乏のみが、自己複製抑制とアポトーシス亢進により腸管幹細胞（ISC）数を減少させることを見出した（2022 年度日本農芸化学会大会)。そこで本研究では、Val 欠乏が ISC に及ぼす影響のメカニズムをロイシン（Leu）欠乏、イソロイシン（Ile）欠乏と比較し、解明することを目的とした。24 時間の各 BCAA 欠乏条件下のエンテロイドを用いた RNA-seq に基づく Gene Ontology 解析の結果、Val 欠乏による ISC へのダメージは、小胞体ストレス（ERS）の亢進と Wnt/β-カテニンシグナルの不活性化に起因すると仮説を立てた。この仮説に基づき解析した結果、BCAA の中でも Val 欠乏は、エンテロイドのクリプトを顕著に消失させること、幹細胞の割合を減少すること、TA 細胞の割合を変化させないことが明らかとなった。これは、ERS を受けた ISC が TA 細胞へ分化することで消失することを示した先行研究（Heijmans et al., *Cell Rep.*, 2013）結果と類似していたことから、ERS の関与が示唆された。しかし、各 ERS 応答関連因子のmRNA 量は、ERS 依存的なアポトーシスを誘導する CHOP で有意に増加した以外は減少あるいは減少傾向を示し、ERS の亢進は示されなかった。一方、Wnt シグナル関連因子の mRNA 発現量は Leu と Ile 欠乏では対照群よりも有意に低下もしくは変化なしであったのに対し、Val 欠乏では多くの因子において Leu や Ile 欠乏よりもさらに減少していた。このことから、Val 欠乏による ISC 数の減少は Wnt シグナルの不活性化が関与している可能性が示唆された。

In this study, we aimed to elucidate the mechanism that 24 h of Val deprivation decreased the number of intestinal stem cells (ISCs) in small intestinal organoids (enteroids) by comparing with leucine (Leu) or isoleucine (Ile) deprivations. We hypothesized that the ISCs damage induced by the Val deprivation results from the decrease of energy production by Val metabolism and thereby leads to the increase of endoplasmic reticulum stress (ERS) and the inactivation of Wnt/β-catenin signaling in ISCs based on gene ontology analysis of RNA-seq data. The analyses of ERS and Wnt signaling showed that the deprivation of Val markedly deleted crypts, decreased the ratio of ISCs, but did not change the ratio of TA cells. Although these results were similar to the previous study (Heijmans et al., Cell Rep., 2013) showing that ISCs subjected to ERS disappeared by differentiating into TA cells, the mRNA level of ERS response-related factors were decreased except CHOP, indicating no enhancement of ERS. In contrast, the Val deprivation significantly decreased the mRNA levels of Wnt signaling-related factors, compared with the Leu and Ile deprivations. These results suggest that the reduced number of ISCs caused by the Val deprivation may be due to Wnt signaling inactivation.

Enteroids, Branched-chain amino acids, Stem cells

講演番号：4D2a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 D2 会場

高静水圧酵素処理で作成したシカ肉の超短期仕込肉醤の安全性と機能性
Safety and Functionality of Very Short-Term Prepared Meat Sauce of Deer Meat Prepared by High Hydrostatic Enzymatic Treatment

○小木曽 加奈[1,2]、中嶌 岳郎[3]、山崎 慎也[4]、古田 一匡[5]（[1]長野県立大健康発達、[2]長野県立大院健康栄養科学、[3]信大医、[4]長野県工技センター、[5]富士通株式会社）
○Kana KOGISO[1,2], Takero NAKAJIMA[3], Shinya YAMAZAKI[4], Kazumasa FURUTA[5] ([1]The Univ. of Nagano, [2]The Univ. of Nagano, Grad. Sch. of Health and Nut. Sci., [3]Shinshu Univ. Sch. of Med., [4]Nagano Pref. Gen. Ind. Tech. Cent, [5]Fujitsu Ltd.)

今回はシカ肉で作成した超短期肉醤の安全性と機能性の検討を行い、いくつかの知見が得られたので報告する。肉エキスは、200MPa の高静水圧 24 時間 50℃でプロチン SD－NY10 （天野エンザイム株式会社）を肉重量当たり 0.75%添加、水を肉重量当たり 10%添加後、100℃で加熱して作製した。作製したエキスについて、食品の安全性として一般生菌と乳酸菌の菌数を測定したほか、ヒト胎児腎細胞 HEK293 を用いた細胞毒性試験を行った。機能性については、血圧降下作用として ACE 阻害活性について検討した。さらにその成分を LC-MS にて検討した。

今回の結果、一般生菌と乳酸菌の菌数は 0 であった。また細胞毒性としての IC_{50} 値は 3.1%(v/v)であった。実食において醤油と同等に使用されると想定される濃度 0.70%(v/v)を考慮するとその付近では細胞への影響はみられなかった。ACE 阻害活性は 201 μg/mL で濃口醤油の値（1620 μg/mL）より小さかった。以上のことからシカ肉で作成した超短期肉醤は、食品としても安全性を確保でき、また血圧降下作用という機能性を有する肉醤として利活用が可能になったと考えられた。なお、本研究は科研費（20K02345）の助成を受けた。

In this report, we examined the safety and functionality of a very short-term meat sauce prepared from deer meat, and some findings were obtained. Meat extract was prepared by adding 0.75% of protin SD-NY10 (Amano Enzyme Co., Ltd.) per weight of meat and 10% of water per weight of meat at 50°C for 24 h under a high hydrostatic pressure of 200 MPa, followed by heating at 100°C. The prepared extract was tested for general viable bacteria and lactic acid bacteria counts as food safety, and for cytotoxicity using HEK293 (human embryonic kidney) cells. Regarding the functional properties, ACE inhibitory activity was examined as a blood pressure-lowering effect. Furthermore, its components were examined by LC-MS.

As a result, the number of general viable bacteria and lactic acid bacteria was 0. The IC_{50} value for cytotoxicity was 3.1% (v/v). The ACE inhibitory activity was 201 μg/mL, which was lower than that of dark soy sauce (1620 μg/mL). These results suggest that the ultra-short-term meat sauce made from deer meat is safe as a food and can be used as a functional meat sauce with blood pressure-lowering effects. This research was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (20K02345).

deer, venison, functionality

発表責任者：小木曽加奈（kogiso.kana@u-nagano.ac.jp）

講演番号：4D2a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D2 会場

ドライ熟成中の湿度条件が牛肉の微生物学的品質に与える影響
The effect of humidity on the microbiological quality of dry-aged beef.
○鳥丸 碧里[1]、豊留 孝仁[2,3]、田村 健一[4]、三上 奈々[1] ([1]帯畜大・畜産、[2]帯畜大・獣医、[3]千葉大・真菌セ、[4]北一ミート(株))
○Midori TORIMARU[1], Takahito TOYOTOME[2,3], Kenichi TAMURA[4], Nana MIKAMI[1] ([1]Obihiro Univ, Agriculture, [2]Obihiro Univ, Vet. Med., [3]Chiba Univ. MMRC, [4]Kitaichi Meat Co.)

ドライ熟成は、食肉を真空包装せずに一定期間保存する伝統的な加工方法である。熟成庫内の空気に直接さらされるため、肉の表面にはクラストと呼ばれる外皮が形成されており、そこには様々な微生物が生育する。これらの微生物はドライ熟成肉（Dry-aged beef: DAB）の特徴的な香気や呈味性に寄与するとされる。その一方で、熟成条件によっては腐敗を引き起こす可能性もあるため、微生物制御に関する知見は DAB の品質を管理する上でも重要である。そこで本研究では、DAB 製造において主要な環境因子となる湿度に着目し、その条件がドライ熟成肉の微生物負荷に与える影響を調査した。

ホルスタイン去勢牛ロース肉（約 1.1kg/ブロック×3）に北一ミート(株)の熟成庫由来菌を噴霧し、タッパーに入れて熟成庫内で 5 週間ドライ熟成した。タッパー側面に各々直径 1、2、3cm の穴を 20 カ所開けることでタッパー内の湿度を変化させ、低・中・高湿度群とした。熟成終了後、DAB のクラストと内部において水分量の変化や真菌・細菌数、遊離アミノ酸や揮発性塩基性窒素量を評価した。

湿度が高いほどクラスト上の微生物がよく生育し、高湿度群では肉表面全体を接合菌が覆い、総細菌数も増加した。さらに、高湿度群では遊離アミノ酸量や揮発性塩基態窒素量が高く、微生物数が多いクラストではより顕著に増加していた。これらの結果から、高湿度での熟成は DAB 上の微生物の活動を活発にし、肉質に影響を与えることが示唆された。

Dry aging is a traditional method to preserve meat blocks without vacuum-packaging. Dry-aged beef (DAB) is exposed to air flow, and forms a hard crust on the surface, which is comprised of microbes including fungi and bacteria. Microbes produce various metabolites which affect the unique flavor and spoilage. Therefore, we investigated the effect of humidity to control the microbes on DAB. Three Holstein beef loin blocks (1.1kg /block) were sprayed with microbes and aged for 5 weeks in the plastic containers which have 20 holes (1 or 2 or 3 cm in diameter, assigned as low (L), middle (M) and high (H) humidity groups, respectively) on side in the aging equipment.

The higher humidity, the more mold grew on the crust and total number of bacteria also increased. Furthermore, the amounts of amino acid and VBN were highest in the H group, among three groups, especially in the crust which is higher microbial counts. These results suggest that the aging at high humidity increases the activity of microorganisms and affects meat quality on the DAB.

dry-aged beef, food safety, microorganisms

発表責任者：三上　奈々（nanam@obihiro.ac.jp）

講演番号：4D2a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D2 会場

糖添加カッテージチーズにおけるリステリアの挙動
Influence of glucose addition to cattage cheese on listerial growth
○林崎 菜月[1]、佐藤 朱嶺[2]、津田 治敏[1,2] ([1]弘大院・地域共創、[2]弘大・農生)
○Natsuki HAYASHIZAKI[1], Akane SATO[2], Harutoshi TSUDA[1,2] ([1]Grad School Hirosaki Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【背景・目的】近年，酪農の 6 次産業化の振興によって日本各地の酪農家が様々なチーズを製造しており，ナチュラルチーズに糖を添加したものも見られる。糖の添加は食中毒細菌を含む従属栄養細菌の増殖を促進することが予想されるが，その影響については調べられていない。そこで，種々の pH におけるチーズへの糖の添加が食中毒細菌におよぼす影響について調べた。すなわち，種々の pH のカッテージチーズを製造し，糖と食中毒細菌であるリステリア（*Listeria monocytogenes* SCOTT A および VTU206）をそれぞれ添加し，冷蔵条件で保存したときの菌数を調べた。
【方法・結果】直接酸添加法によって pH6.0，5.5，5.0 および 4.5 のカッテージチーズを製造し，グルコースを 10％量添加した。これにリステリアをチーズ 1 g あたり 4.5 log cfu/g となるように添加し，10℃で保存した。対照にはグルコースを添加しないものを用いた。継時的に菌数を測定した結果， SCOTT A 株および VTU206 株において，pH に関わらず，グルコースの添加による菌数の有意な増加は見られなかった。また，グルコースの有無に関わらず，pH を 4.5 まで低くすることで増殖の抑制が見られた。

[Purpose] The purpose of this study was to investigate the influence of a glucose addition on listerial growth in cottage cheese under refrigerated conditions.
[Methods and Results] Cottage cheeses with pH values of 6.0, 5.5, 5.0, and 4.5 were produced by the direct acid addition method, and then glucose was added to the cheese. The cheese was inoculated with *Listeria monocytogenes* SCOTT A and VTU 206 (approximately 4.5 log cfu/g), respectively. The cheese without glucose was use as control. The cheese was stored at 10℃ and the listerial number was measured. There was no significant increase of the number of *Listeria* in the cheese with glucose. Inhibition of growth was observed when the pH was lowered to 4.5, regardless of the presence or absence of glucose.

Listeria, cattage cheese, glucose

発表責任者：林崎　菜月（h23gc210@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：4D2a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D2 会場

Antimicrobial properties of active compounds derived from natural food extracts for preventing beverage non-alcoholic beverage spoilage microorganisms

○Chang LIU[1], Jiale TANG[1], Satoka TAKABAYASHI[1], Saki TOYOTA[2], Hidenori MATSUKURA[2], Masaki SHIMOKAWA[2], Suguru OKUDA[1], Hideaki ITOH[1], Peng LU[1], Koji SUZUKI[3], Koji NAGATA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Asahi Breweries, Ltd., [3]Asahi Quality and Innovations,Ltd.)

Spoilage microorganisms in alcoholic and non-alcoholic beverages can cause turbidity, abnormal off-flavors and undesirable sensory changes in alcoholic and non-alcoholic beverages. In addition to affecting the quality of the final product, these changes can lead to the formation of various metabolites that may be toxic. Food ingredients have been used as antimicrobial agents because of their medicinal properties. In recent years, there has been much research on the use of natural antimicrobial agents in beverages instead of chemical preservatives. However, few studies have focused on the antimicrobial potential of hot water extracts of natural foods against spoilage microorganisms of alcoholic and non-alcoholic beverages. Therefore, this study aims to investigate and identify antimicrobial compounds extracted from natural products, explore their antimicrobial mechanisms, prevent spoilage microorganisms, and enhance microbial stability in alcoholic and non-alcoholic beverages.

Each sample was taken in 80 mL of distilled water and kept in a hot water bath at 95°C for 10 minutes. The hot water extract was lyophilized and redissolved to 7.5 mg/mL. The inhibition rate of the crude extracts was determined using the broth microdilution method and viable bacterial counts. The microbial inhibition rates of 160 samples were determined, and only the hot water extract of clove effectively inhibited the growth of four major beverage spoilage microorganisms: *Lactobacillus brevis* (a Gram-positive bacterium), *Pectinatus frisingensis* (a Gram-negative bacterium), *Saccharomyces cerevisiae* (a yeast), and *Sporolactobacillus vineae* (a Gram-positive bacterium). We have identified the potential of gallic acid and eugenol from hot water extract of clove to effectively inhibit the growth of these four spoilage microorganisms. In addition, the antioxidant compound propyl gallate also showed significant antimicrobial activity. Scanning electron microscopy and fluorescence leakage assay data showed that the active compounds, with the exception of gallic acid on *P. frisingensis* and *S. cerevisiae* (no effect initially), had some effects on the cell walls and/or cell membranes of the target microorganisms. These results suggest that clove extracts have the potential to serve as natural preservatives to prevent beverage spoilage and reduce the incidence of beverage spoilage incidents.

spoilage microorganisms, natural food extracts, antimicrobial properties

講演番号：4D2a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D2 会場

アクアポニックスで栽培されたリーフレタスの栄養・機能性成分含量とその季節変動評価

Nutritional Components of Leaf Lettuce Grown in Aquaponics and Evaluation of Its Seasonal Variation

○榎 康明[1]、筒浦 さとみ[2]、大竹 憲邦[2]、三亀 啓吾[2]、淺倉 瑠奈[3]、毒嶌 成美[2]、山口 智子[3]([1]株式会社プラントフォーム、[2]新潟大・農、[3]新潟大・教育)
○ Yasuaki ENOKI[1], Satomi TSUTSUURA[2], Norikuni OHTAKE[2], keigo MIKAME[2], Runa ASAKURA[3], Narumi BUSUJIMA[2], Tomoko YAMAGUCHI[3] ([1]Plant form Inc., [2]Fac. Agr., Niigata Univ., [3]Fac. Edu., Niigata Univ.)

アクアポニックスは水産養殖と水耕栽培を組み合わせた食料生産システムで、魚の排泄物を栽培植物の主要な栄養素として使用することを原則としている。施設型のアクアポニックスでは化学肥料や農薬を使用しない有機栽培を実践することができるが、国内では水耕栽培野菜の有機認証が認められていないため、アクアポニックスの普及に向けた付加価値の創出が求められている。アクアポニックス野菜については生産性等に関する報告は多いものの、栄養・機能性成分に関する報告は限られているため、本研究ではアクアポニックス野菜の栄養・機能性成分に着目し、機能性野菜としての高付加価値化の可能性について検討した。試験対象は太陽光併用型のアクアポニックス施設で栽培されたリーフレタス 6 品種とし、栄養成分（多量、微量）および機能性成分（硝酸イオン、抗酸化成分）について、季節変動（2022 年夏～2023 年春）を含めて評価を行った。微量栄養成分のうち、葉酸とビタミン K はすべての品種・季節において、栄養機能食品の基準を満たす含有量を示していた。また、機能性成分では正常な血圧の維持に寄与する硝酸イオンがすべての品種において有効量（68.2 mg）を超えており、抗酸化成分として知られるアントシアニンやクロロゲン酸についても、赤系リーフレタスにおいて多く含有していることが明らかとなった。以上のことから、アクアポニックスで栽培されたリーフレタスは機能性野菜としての高付加価値化が可能であることが示された。

Aquaponics is a sustainable food production system that combines aquaculture and hydroponics, and is based on the principle of using the wastes produced by fish as the main nutrient source for the plants. We evaluated the nutritional and functional components of 6 varieties of leaf lettuce grown in aquaponics, considering seasonal variations, with the aim of adding value to aquaponics vegetables. Among the micronutrients, folic acid and vitamin K content met the criteria for food with nutrient function claims in all varieties and seasons. As for the functional components, nitrate ion, which is effective in maintaining normal blood pressure, was found to be high in all varieties, and anthocyanin and chlorogenic acid, known as antioxidant components, were found to be highly contained in red leaf lettuce. These results suggest that leaf lettuce cultivated in aquaponics can attain high value as a functional vegetable.

Aquaponics, Functional food, Leaf lettuce

発表責任者：榎 康明（enoki@plantform.co.jp）

講演番号：4D2a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D2 会場

スクシニル CoA 合成酵素欠損線虫(*Caenorhabditis.elegans*)の寿命の短縮または MMA の増加は認められなかった。
No reduction in life span or increase in MMA was observed in succinyl CoA synthase-deficient nematodes (*Caenorhabditis.elegans*).
○橋本 航、美藤 友博、渡邉 文雄、藪田 行哲 (鳥取大院持続)
○Wataru HASHIMOTO, Tomohiro BITO, Fumio WATANABE, Yukinori YABUTA (Tottori Univ.)

スクシニル CoA 合成酵素(SUCL)は TCA 回路を構成し、スクシニル CoA からコハク酸への変換に機能する。この酵素の欠損は、もう一段階前の中間体であるメチルマロニル CoA とその加水分解物であるメチルマロン酸(MMA)を蓄積させる。またその欠損はミトコンドリアの機能不全を引き起こす。一方、メチルマロニル CoA からスクシニル CoA への変換に機能するメチルマロニル CoA ムターゼ(MCM)はビタミン B_{12}(B_{12})を要求し、B_{12} の欠乏により SUCL 欠損同様に MMA が蓄積する。また最近我々は B_{12} 欠乏線虫でミトコンドリアの機能不全が起こる事を見出した。しかしその分子メカニズムは不明である。そこで SUCL 遺伝子欠損と MCM 欠損によるミトコンドリアへの影響を比較することで、B_{12} 欠乏によるミトコンドリア異常のメカニズムを明らかにすることができるのではないかと考えた。そこでまず、SUCL を構成する遺伝子(*sucl-1*, *-2*, *sucg-1*, *suca-1*)それぞれの欠損線虫を用いて寿命、MMA の測定を行い SUCL 遺伝子欠損の影響を調べた。その結果、寿命は野生株と比較して有意な差は認められず、MMA レベルの上昇も認められ無かった。この原因として、線虫はグリオキシル酸回路持つため、SUCL の欠損を相補している可能性が示唆された。この可能性を検証するために、グリオキシル酸回路破壊線虫と掛け合わせを行っている。

Succinyl CoA synthetase (SUCL) constitutes TCA cycle and functions for conversion from succinyl CoA to succinate. The lack of this enzyme causes the accumulation of methylmalonic acid (MMA) and the mitochondrial dysfunction. On the other hand, methylmalonyl CoA mutase (MCM) requires vitamin B_{12} (B_{12}) to catalyze the conversion of methylmalonyl CoA to succinyl CoA. The deficient of B_{12} also causes the MMA accumulates. Recently, we found that the deficient of B_{12} in nematode (*C. elegans*) causes a mitochondrial dysfunction. However, the molecular mechanism has been still unknown.
We thought that we compare the mitochondrial effects of SUCL gene dysfunction and MCM dysfunction to examine the mechanism of mitochondrial defects caused by B_{12} deficiency. Therefore, I first examined the effect of SUCL gene deficiency by measuring life span and MMA using *C.elegans* deficient in each of the genes that comprise SUCL (*sucl-1*, *-2*, *sucg-1*, and *suca-1*).

Vitamin B_{12}, Succinyl CoA synthetase, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：橋本航（m23j7039k@edu.tottori-u.ac.jp）

講演番号：4D2a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D2 会場

パーキンソン病モデル線虫（*Caenorhabditis elegans*）におけるビタミン B_{12} 不足の影響

Effects of vitamin B_{12} deficiency in model worms (*Caenorhabditis elegans*) with Parkinson's disease.

○山﨑 大幹、美藤 友博、渡邉 文雄、藪田 行哲（鳥取大院持続）
○Taiki YAMASAKI, Tomohiro BITO, Fumio WATANABE, Yukinori YABUTA (Tottori Univ.)

ビタミン B_{12} を補酵素とするメチルマロニル CoA ムターゼの活性低下は、メチルマロン酸の蓄積に伴う TCA 回路の阻害により、ミトコンドリアに酸化ストレスを引き起こすと考えられている。当研究室では、これまでに線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いて B_{12} の機能について研究を行っており、線虫もまた生育に B_{12} を要求することから、線虫は B_{12} 研究の優れたモデルである事を報告してきた。ところで、パーキンソン病（PD）患者において血漿中の B_{12} レベルが低いことが報告されているが、低 B_{12} レベルと PD の因果関係は不明である。そこで本研究では、PD の発症・進展に及ぼす B_{12} 不足の影響について調べるため、ヒトαシヌクレインを発現する PD モデル線虫を用いて解析した。また野生株を用いて B_{12} 不足によるミトコンドリアへの影響について調べた。B_{12} 不足により、アダルト初期でαシヌクレインの凝集の促進が認められた。さらに、B_{12} 不足により、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアの巨大化が観察された。これまでに、マウス神経芽腫細胞において PINK1/Parkin の異常によるマイトファジーの抑制が、機能低下したミトコンドリアを蓄積させることが報告されており（Li et. al. 2022）、B_{12} 不足はマイトファジーを抑制する可能性が示唆された。

Decreased activity of methylmalonyl CoA mutase, which uses vitamin B_{12} as a cofactor, is thought to cause oxidative stress in mitochondria due to inhibition of the TCA cycle associated with methylmalonic acid accumulation. We have studied the function of B_{12} using *Caenorhabditis elegans* and have reported that worms are an excellent model for B_{12} research because it also requires B_{12} for its growth. On the other hand, it has been reported that plasma B_{12} levels are low in patients with Parkinson's disease (PD), but the causal relationship between low B_{12} levels and PD is unknown. To explore the effects of B_{12} deficiency on the onset and progression of PD, we analyzed the model worms which are expressing human α-synuclein. We also examined the effects of B_{12} deficiency on mitochondria using the wild-type worms. We found that B_{12} deficiency promoted α-synuclein aggregation in the early stages of adulthood. Furthermore, a decrease in mitochondrial membrane potential and mitochondrial enlargement were observed upon B_{12} deficiency. Previously, it has been reported that the inhibition of mitophagy by the decreased PINK1/Parkin function in mouse neuroblastoma cells leads to the accumulation of dysfunctional mitochondria (Li et. al. 2022), suggesting the possibility that B_{12} deficiency suppresses mitophagy.

Vitamin B_{12}, Parkinson's disease, mitochondria

講演番号：4D2a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D2 会場

麹菌を使った発酵食品に含まれるビタミン B_{12} 化合物の特徴
Characteristics of vitamin $_{12}$ compounds in fermented foods made with koji mold
○小関 喬平[1]、渡邉 文雄[2] ([1]石川県大・生資環、[2]鳥取大・農)
○Kyohei Koseki[1], Fumio Watanabe[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Tottori Univ.)

ビタミン B_{12} (B_{12}) は水溶性 B 群ビタミンの一種であり, B_{12} 欠乏は巨赤芽球性貧血や神経鎖障害などを引き起こす. B_{12} は植物性食品に含まれない稀有なビタミンであり, 厳格な菜食主義者（ビーガン）は欠乏のハイリスク群である. これまでにテンペ（大豆の発酵食品）などの一部の植物性食品の発酵品には少量の B_{12} が含有されることや, ザワークラウト（キャベツの発酵食品）は B_{12} 活性のない疑似ビタミン B_{12} を含むことが報告されている. そのため, これらの発酵食品は B_{12} の主要な供給源にならない. しかし, 日本食品標準成分表（八訂）において, 大根の麹漬けである”べったら漬け”には高容量の B_{12} (12 µg/100 g)が含まれると記載されている. そこで本研究では, 麹菌を用いた植物性食品の発酵品である”べったら漬け”および”米麹”に含まれる B_{12} 化合物を特異的に精製し, HPLC による定量および LC-MS/MS による同定を行い, その特徴を検討することとした.

LC-MS/MS 分析の結果, べったら漬けと米麹の両サンプルで B_{12} が検出された. しかし, HPLC 分析の結果, 米麹の B_{12} 含量は 0.10 ± 0.07 µg/100 g (n=5) と微量であった. また, べったら漬けの B_{12} 含量は 0.58 ± 0.29 µg/100 g (n=4) であったが, B_{12} が含まれない製品も存在したため, B_{12} 供給源として摂取する場合には注意が必要であることが明らかとなった.

Vitamin B_{12} is a water-soluble vitamin, and its deficiency results in megaloblastic anemia and neurological disorders. B_{12} is not found in plant foods, and vegans are at high risk for deficiency. It has been reported that the level of B_{12} is low in certain fermented plant foods, such as tempeh (a fermented soy food). In addition, sauerkraut (a fermented cabbage dish) contains pseudovitamin B_{12}, which is not active B_{12}. Therefore, these fermented foods are not major sources of B_{12}. However, according to the Japanese Standard Table of Food Composition (8th edition), "Bettarazuke", a radish pickled in koji, contains a high amount of B_{12} (12 µg/100 g). Therefore, we purified the B_{12} compound found in "Bettarazuke" and "Kome koji", We conducted a quantitative and identification using HPLC and LC-MS/MS.

LC-MS/MS analysis showed that B_{12} was detected in both the rice malt and bettara-zuke. However, the rice malt had a low B_{12} content of 0.10 ± 0.07 µg/100 g (n=5), as determined by HPLC analysis. On the other hand, the B_{12} content in betara-zuke was 0.58 ± 0.29 µg/100 g (n=4). Additinary, some products of rice malt and bettara-zuke do not include B_{12}, it is important to exercise caution when consuming them as a B_{12} source, respectively.

Vitamin B_{12}, Fermented foods, Bettara-zuke

講演番号：4D2a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D2 会場

ビタミン B6 サプリメント が筋再生及び筋衛星細胞に与える影響

Effects of vitamin B6 supplementation on muscle regeneration and satellite cell functions

○小牟田 陽香[1]、矢中 規之[2]、カムランシー タナッチャポーン[2]([1]広島大・生生、[2]広島大院・統合生命)
○ Haruka KOMUTA[1], Noriyuki YANAKA[2], Thanutchaporn KUMRUNGSEE[2] ([1]The Univ. of Hiroshima, [2]The Univ. of Hiroshima Graduate School of Integrated Sciences for Life)

[目的]近年の研究では、欧州諸国と日本のサルコペニア患者において、ビタミン B6 の摂取量および血中濃度が低いことが報告され、ビタミン B6 の摂取不足とサルコペニアには関係性があることが示唆された。そこで本研究の目的は、ビタミン B6 サプリメントが骨格筋再生及び筋衛星細胞(SC)の機能に及ぼす影響を検討することである。
[方法] ICR マウスを異なるビタミン B6 の摂取量(7、14、21、28、35 pyridoxine (PN) HCl mg/kg 食餌)によって 4 週間飼育を行い、前脛骨筋に cardiotoxin を投与することで筋損傷を誘導させ、損傷後 10 日の前脛骨筋を摘出し、重量比較し、筋断面積測定を行った。SC の機能に対するビタミン B6 サプリメントの影響を調べるため、長指伸筋から単一筋線維を分離し、外因性ビタミン B6 添加の有無共に培地で 48 時間培養し、Pax7 (SC マーカー)及び MyoD(筋分化マーカー)に対する免疫蛍光染色を行うことで SC の活性を評価した。
[結果] 標準食(7mg)と比較してすべてのビタミン B6 サプリメント群で筋再生が遅延し、35 mg 群で最も高い抑制効果が観察された。また、単一筋線維培養実験において、ビタミン B6 サプリメントは MyoD$^+$ SC の数を減少させることで、ビタミン B6 サプリメントは SC の分化を抑制することが示唆された。ビタミン B6 サプリメントにより筋再生能力が低下し、SC の分化能が阻害されたことから、本研究は、筋肉の健康維持には最適なビタミン B6 レベルが重要であることを示唆した。
[Objective] Recent human studies have suggested a link between vitamin B6 (B6) deficiency and sarcopenia. However, very little is known regarding its underlying mechanisms. In this study, we examined effects of B6 supplementation on muscle regeneration and satellite cell (SC) functions.
[Methods] In *in vivo* experiment, ICR mice were divided into five groups receiving a basal diet containing different B6 levels (7, 14, 21, 28, 35 mg PN HCl/kg diet) for 4 weeks. After 10 days of cardiotoxin-induced muscle injury, regenerating muscle mass and fiber size were analyzed. In *in vitro* experiment, single fibers were isolated from EDL muscles of ICR mice and cultured in a medium with or without exogenous B6 addition (100 μM PN HCl) at 37°C for 48 hr. Then, fixed fibers were co-immunofluorescent stained for Pax7 (a SC marker) and MyoD (a differentiation marker).
[Results&Discussion] As compared to a B6-recommended level diet (7 mg), all B6-supplemented levels retarded muscle regeneration, and the 35 mg diet exhibited the highest inhibitory effect. In *in vitro* experiment, the number of MyoD$^+$ nuclei on single fibers in the culture with B6 addition (100 μM) was significantly lower than that without B6 addition, indicating that B6 supplementation suppressed SC differentiation. This study suggests that optimal B6 levels is important for maintaining muscle health.

Vitamin B6, Satellite cell, Muscle regeneration

発表責任者：小牟田陽香（b206929@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4D2a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D2 会場

1,25(OH)2D3 を含む VD 代謝物の同時定量法の検討

Development of a simultaneous quantitative method for Vitamin D metabolites involved 1,25(OH)2D3 in a single pretreatment

○高橋 康司[1]、滝脇 正貴[1]、福沢 世傑[1]、堤 遊[1]、菊谷 善国[1]、永田 亜希子[2]、飯島 一翔[2]、坂本 良太[2]、長澤 和夫[2] ([1]日本電子、[2]東農工大院工)

○Koji TAKAHAASHI[1], Masaki TAKIWAKI[1], Seketsu FUKUZAWA[1], Yu TSUTSUMI[1], Yoshikuni KIKUTANI[1], Akiko NAGATA[2], Kazuto IIJIMA[2], Ryota SAKAMOTO[2], Kazuo NAGASAWA[2] ([1]JEOL Ltd., [2]Tokyo Univ Agr & Technol)

ビタミン D は骨代謝の恒常性に加え、近年の疫学研究により様々な疾患の予防効果が注目されている。その代謝物の $1,25(OH)_2D_3$ が骨代謝マーカーとして、25(OH)D が栄養学的指標としてイムノアッセイでそれぞれ測定されている。

近年 LC-MS/MS を用いたビタミン D 代謝物の定量法が多数報告されており、血清中 $1,25(OH)_2D_3$ の測定にも活用されているが、抗体を使用した抽出法が使われており、$1,25(OH)_2D_3$ に加えて他のビタミン D 代謝物を同時に測定することが難しい。既報において抗体を使わずに $1,25(OH)_2D_3$ の測定をしている例もあるが、内因性の $4,25(OH)_2D_3$ を分離定量まで実施している報告は無い。

本研究では、一度の前処理で $1,25(OH)_2D_3$, $4,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_3$, $25(OH)D_2$, 3-*epi*-$25(OH)D_3$, $24,25(OH)_2D_3$ を同時に定量する手法を開発した。

Vitamin D (VD) is not only involved in bone metabolism homeostasis but also epidemiological studies in recent years have drawn attention to preventive effects of various diseases. An active VD metabolite, $1,25(OH)_2D_3$ as a bone metabolism marker and 25(OH)D as a nutritional indicator are measured by immunoassay, respectively. Although a number of quantification methods of VD metabolites using LC-MS/MS have been developed, immune extraction is needed for quantification of $1,25(OH)_2D_3$ in serum. More recently, a simultaneous VD metabolites measurement method including $1,25(OH)_2D_3$ without immune extraction was reported. However, quantification of $4,25(OH)_2D_3$ still has not been done.

In this study, we report a simultaneous quantitative method for $1,25(OH)_2D_3$, $4,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_3$, $25(OH)D_2$, 3-*epi*-$25(OH)D_3$ and $24,25(OH)_2D_3$ in a single pretreatment.

VitaminD, LC-MS/MS, Derivatization

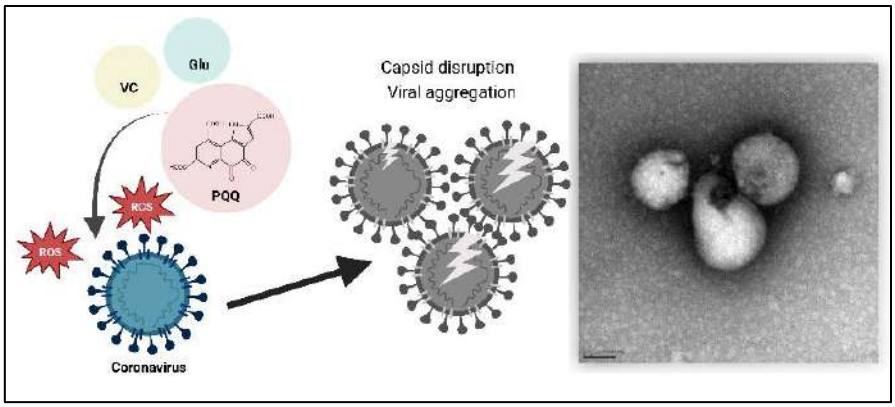
講演番号：4D2a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D2 会場

PQQ によるコロナウイルスの破壊と凝集による感染抑制

PQQ-Mediated Degradation and Aggregation of Coronavirus to Inhibit Infection

○池本 一人、辻 シャフィカ、沼口 友恵（三菱ガス化学　新潟研）
○ Kazuto IKEMOTO, Nur Syafiqah Mohamad Ishak, Tomoe Numaguchi (Mitsubishi Gas Chemical Co. Inc.)

ピロロキノリンキノン（PQQ）は野菜や発酵食品等多くの食品に含まれる天然物である。発酵と高純度精製により生産されたピロロキノリンキノンジナトリウム三水和物はミトコンドリア新生や脳機能改善の機能性食品として使用されている。PQQ はキノン構造を有し、酸化還元を行うことができる。PQQ の抗ウイルス機能について調べるため、ネココロナウイルスとネコ培養細胞（CRFK 細胞）を使って感染抑制試験を行った。その結果、PQQ は抗ウイルス機能を有していた。PQQ の酸化還元による ROS の発生が抗ウイルス効果を生じさせると予想した。そこで、酸化還元を活性化するアスコルビン酸とアミノ酸を組み合わせた結果、抗ウイルス効果を高めることに成功した。PCR、プラークアッセイ、顕微鏡観察の結果から PQQ はウイルスを破壊し、凝集させ、感染力を消失させることが明らかとなった。



Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a natural product found in many foods, including vegetables and fermented foods. Pyrroloquinoline quinone disodium trihydrate (PQQ), which is produced by fermentation and purified to a high purity, is used as a functional food for mitochondrial generation and brain function improvement. PQQ has a quinone structure and can perform redox cycle. We conducted an infection inhibition test using feline coronavirus (FCoV) and feline cultured cells (CRFK cells) to investigate the antiviral function of PQQ. We found that PQQ had antiviral function. We predicted that the generation of reactive oxygen species (ROS) by the oxidation-reduction of PQQ would cause antiviral activity. Therefore, we succeeded in enhancing the antiviral effect by combining ascorbic acid and amino acids, which activate oxidation-reduction. PCR, plaque assay, and microscopic observation showed that PQQ caused antiviral action by the destruction and aggregation of viruses, resulting in the loss of infectivity.

PQQ, Antivirus, redox

発表責任者：池本一人（kazuto-ikemoto@mgc.co.jp）

講演番号：4D2a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D2 会場

必須微量栄養素セレンの恒常性維持における腸内細菌叢の関与
Effects of gut microflora on selenium homeostasis in rats
○髙橋 一聡[1]、小椋 康光[2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大院薬)
○Kazuaki TAKAHASHI[1], Yasumitsu OGRA[2] ([1]Grad. Sch. Hort., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

[目的]セレンは生体必須微量元素である一方、毒性の高い元素でもあり、動物は欠乏にも過剰にもならない適正体内濃度となるよう調節する必要がある。これまで我々は、動物体内でのセレン代謝要因として腸内細菌叢がセレンの化学形態を変化させていることを報告してきた。そこで本研究では、腸内細菌叢が宿主動物のセレン代謝に及ぼす影響評価を目的とした。

[方法] Wistar 系雄性ラットに対し抗生物質カクテルの投与有無により、腸内細菌叢減弱モデルと通常モデルラットを作製した。作製したモデルラットに対し、同位体濃縮された ^{82}Se－亜セレン酸を経口投与し、24 時間後血清を採取して血清中セレンを測定した。

[結果及び考察]血清中セレンを分析したところ、どちらのモデルラット群においても経口投与した外因性の ^{82}Se 濃縮セレンを利用した血清セレンタンパク質の産生が観察された。しかし、その産生量を比較したところ、通常モデルと比較して腸内細菌叢減弱モデルでは有意に上昇していた。すなわち、腸内細菌叢が働くことで外因性セレンの利用効率が低下したといえる。従って、モデルラットのセレン栄養状態は適正であったことを踏まえると、余剰に投与したセレンへの応答として宿主動物の血中セレン濃度の上昇を抑えるよう腸内細菌叢が防御的に働き、その緩衝機能から宿主におけるセレン恒常性維持の一部を担っていることが示唆された。

Selenium (Se) is one of the essential micronutrients but exhibits high toxicity. Hence, animals must keep an adequate concentration of Se in their animal bodies. We have reported that gut microflora plays a role in Se metabolism in a host animal, transforming selenocompounds into other chemical forms. In this study, we attempted to elucidate the effects of Se metabolism by gut microflora on Se metabolism in a host animal. Healthy rats and gut microflora-suppressed rats were orally administered ^{82}Se-selenite, and their serum was collected 24 h after the administration. Quantification of ^{82}Se in collected serum showed exo-^{82}Se was utilized as a Se source in both groups. However, the efficiency of exo-^{82}Se incorporation in healthy rats was lower than in gut microflora-suppressed rats. These results suggested that gut microflora involved in Se metabolism in a host as a protective regulator to excess ingestion of Se.

selenium, gut microflora, metabolism

発表責任者：高橋一聡（k.takahashi@chiba-u.jp）

講演番号：4D2a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 D2 会場

食塩の過剰摂取による腸管炎症が耐糖能、動脈硬化に及ぼす影響

The effect of intestinal inflammation induced by excessive salt intake on glucose tolerance and atherosclerosis

○毛利 瑠那[1]、増澤(尾﨑) 依[2]、細野 崇[2,3]、関 泰一郎[2,3] ([1]日大・生資科・生命化、[2]日大・生資科・バイオ、[3]日大院・生資科・応生科)

○Runa Mori[1], Yori Ozaki-Masuzawa[2], Takashi Hosono[2,3], Taiichiro Seki[2,3] ([1]Nihon Univ., Dept. Chem. Life Sci., [2]Nihon Univ., Dept. Biosci., [3]Nihon Univ. Grad. School)

【目的】食塩は高血圧症、心血管疾患などの生活習慣病の重症化予防の観点から摂取量の減少が推奨されている。また、食塩は肝臓や腸管、内臓脂肪組織の炎症を誘発し、耐糖能異常や動脈硬化を進展させることが示唆されている。本研究では、食塩の過剰摂取が腸管での炎症を介して耐糖能異常や動脈硬化を促進すると仮定し、食塩摂取がこれらの病態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】(**実験 1**) 2 型糖尿病モデルマウス (C57BL/KsJ-lepr^{db}/lepr^{db}) に 4%食塩添加食 (10 kcal% fat) と 1%食塩水を自由に摂取させ、食塩負荷が耐糖能に及ぼす影響および腸間膜脂肪組織における炎症に及ぼす影響について網羅的に解析した。その結果、食塩負荷群では対照群と比較して耐糖能が悪化する傾向がみられた。また、腸間膜脂肪組織において IL-6, *Spp1*, 補体系遺伝子の発現が上昇していた。(**実験 2**) 動脈硬化自然発症モデルマウス (B6.KOR/StmSlc-*Apoe*^{shl}) に 4%食塩添加食 (10 kcal% fat) と 1%食塩水を自由に摂取させ、大動脈弁周囲の脂質を Oil red O 染色し、食塩負荷がプラーク形成に及ぼす影響を検討した。また、小腸粘膜固有層および腸間膜リンパ節における Th17 細胞をフローサイトメトリーにより解析し炎症反応を評価した。その結果、食塩負荷は大動脈弁周囲の動脈硬化病変には影響を及ぼさず、Th17 細胞を指標とした炎症反応にも影響を及ぼさなかった。【結語】4%食塩添加食、1%食塩水の摂取により耐糖能は悪化傾向を示したが、動脈硬化病変にはほとんど影響を及ぼさなかった。現在、食塩添加高脂肪食が腸管炎症に及ぼす影響について検討を行っている。

The excessive salt intake is known to induce the inflammation in liver, intestine, and visceral adipose tissue. This study was aimed to reveal the effect of excessive salt intake on glucose tolerance and atherosclerosis. Exp. 1 C57BL/KsJ-lepr^{db}/lepr^{db} mice were fed 4% NaCl diet (10 kcal% fat) and given 1% NaCl water *ad libitum*. The excessive salt intake exacerbated glucose tolerance and upregulated the gene expressions encoding IL-6, Spp1 and complements at mesenteric adipose tissue. Exp. 2 B6.KOR/StmSlc-*Apoe*^{shl} mice were fed 4% NaCl diet (10 kcal% fat) and given 1% NaCl water *ad libitum*. We evaluated the atherosclerotic lesion as well as the population of Th17 cells in lamina propria of small intestine, but no significant differences were observed in both the atherosclerotic lesions area and the population of Th17 cells. Currently, we are evaluating whether high fat diet containing high salt induce the inflammation in the intestine.

salt, glucose tolerance, atherosclerosis

発表責任者：関 泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4D2a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 D2 会場

油脂によるミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性の増強と抗肥満作用に関する研究
Potentiation of enzyme activities in mitochondrial respiratory chain complex by dietary fats leads to anti-obesity effects.
○吉田 実由[1]、森田 華[1]、増澤（尾﨑） 依[2]、細野 崇[2,3]、関 泰一郎[2,3] ([1]日大・生資科・生命化、[2]日大・生資科・バイオ、[3]日大院・生資科・応生科)
○Miu YOSHIDA[1], Hana MORITA[1], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Takashi HOSONO[2,3], Taiichiro SEKI[2,3] ([1]Nihon Univ., Dept. Chem. Life Sci., [2]Nihon Univ., Dept. Biosci., [3]Nihon Univ. Grad. School)

【目的】ミトコンドリアによるエネルギー消費の増加は、抗肥満作用メカニズムの一端を担っていると考えられる。これまでに我々は、魚油、MCT オイル、クリルオイルなどを添加した高脂肪食給餌マウスでは、ラード添加高脂肪食給餌マウスと比較して体重増加が抑制されることを見出してきた。本研究では、ミトコンドリアでのエネルギー消費に着目し、抗肥満作用を示す油脂がミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性に及ぼす影響について検討した。【方法と結果】C57BL/6J オスマウスに、魚油、MCT オイル、クリルオイル、ラードを 40 kcal%添加した高脂肪食を 4 週間給餌して飼育した。実験終了時に肝臓を摘出後、分析まで-80℃で保存した。凍結肝臓からミトコンドリアを単離し、各種呼吸鎖複合体酵素活性（複合体 I ~V、Citrate Synthase）を測定した。その結果、抗肥満作用を示す油脂添加食を給餌したマウスの呼吸鎖複合体活性はラード添加食群の活性と比較して高値を示した。特に魚油とクリルオイルを給餌したマウスの複合体Ⅳ活性は高値を示した。【結語】魚油やクリルオイルは、電子伝達系酵素の活性化によるエネルギー代謝の促進により抗肥満作用を示す可能性が明らかになった。

Increased energy expenditure by mitochondria is thought to be involved in the anti-obesity mechanism. We previously found that mice fed a high-fat diet containing fish oil (FD), MCT oil (MD), or krill oil (KD) had reduced body weight gain in comparison with the mice fed a high-fat diet containing lard (LD). In this study, we focused on energy expenditure in mitochondria and examined the effect of oils with anti-obesity effect on mitochondrial respiratory chain complex enzyme activity. C57BL/6J male mice were fed 40 kcal% FD, MD, KD, or LD for 4 weeks. Mitochondria were isolated from the frozen liver and the respiratory chain complex enzyme activities including complex I-V, and citrate synthase were measured. The results showed that the activity of respiratory chain complexes in mice fed the anti-obesity-fat diets was totally higher than that given LD. In particular, the complex IV activity was remarkably higher in mice fed FD and KD than that in LD. Anti-obesity oils, such as fish oil and krill oil, may exhibit their anti-obesity effect through the upregulation of energy metabolism via the activation of electron transfer system enzymes.

obesity, fish oil, mitochondria

発表責任者：関泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4D3a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 D3 会場

ローマカミツレの花に存在し、アピゲニン配糖体に作用する酵素の同定
Identification of an enzyme in the flower of *Chamaemelum nobile*, that acts on apigenin glucoside
○鎌田 成栄[1]、山澤 由佳[2]、土居 陽彦[2]、滝田 禎亮[1]、保川 清[1]([1]京大院・農、[2]花王)
○Seiei KAMATA[1], Yuka Yamazawa[2], Haruhiko Doi[2], Teisuke Takita[1], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.,, [2]Kao)

【目的】ローマンカミツレ（学名：*Chamaemelum nobile*）はキク科の植物である。その花のエキスは、抗炎症作用をはじめとした様々な作用をもつことが知られており、化粧品成分として注目されている。アピゲニンは植物に含まれるフラボンの一種であり、天然に生成する多くの配糖体のアグリコンである。本研究では、ローマカミツレの花に存在し、アピゲニン配糖体に作用する酵素の同定を試みた。
【方法】1. ローマカミツレの花の抽出液の調製：花に 50 mM HEPES 緩衝液（pH 7.0）を加え、ミキサーで破砕した。破砕液をガーゼでろ過し、4℃で 2 時間攪拌した後、遠心にかけた。上清を集め、50 mM HEPES 緩衝液（pH 7.0）に対して透析した。2. 酵素活性の測定：花の抽出液にアピゲニン-7-グルコシド（AP7G）を混合し、40℃で反応させた。終了後、サンプルを逆相 HPLC（カラム：Inertsil ODS-3 5μm 3.0 ×150 mm（GL Sciences)にかけ、溶出液を 340 nm の吸光度で解析した。
【結果と考察】100℃10 分間の熱処理を行った抽出液を加えた反応液では、逆相 HPLC で AP7G のピークが残存した。熱処理を行っていない抽出液ではこのピークが消失した。このことから、花には AP7G に作用しアピゲニンを生成する酵素が存在すると考えられた。現在、本酵素の精製を行っている。

[Purpose] *Chamaemelum nobile* is a plant that belongs to genus *Artemisia*. Its flower extract has various activities such as anti-inflammatory activity. It attracts attention as a cosmetic. Apigenin is a flavonoid compound found in a wide variety of plants. In this study, we attempted to identify an enzyme in the flower, that acts on apigenin glucoside.
[Methods] 1. Preparation of flower extract. Flowers from *Chamaemelum nobile* were homogenized in 50 mM HEPES buffer (pH 7.0) followed by filtration, centrifugation, and dialysis. 2. Measurement of enzyme activity. The reaction was carried out with apigenin 7-glucoside (AP7G) at 40℃. The reaction solution was applied to the reverse-phased HPLC.
[Results and Discussion] In the HPLC, the peak corresponding to AP7G remained for the reaction solution with the extract that had received the heat treatment at 100℃ for 10 min, while it did not appear for the solution with the extract without the treatment. This suggested that the flower contains an enzyme that acts on apigenin glucoside.

Apigenin, *Chamaemelum nobile*, Apigenin glucoside

発表責任者：鎌田　成栄（kamata.seiei.67x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D3a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D3 会場

紅藻類オゴノリ科オゴノリ由来のヘマグルチニンの季節変動
Seasonal variation in hemagglutinin derived from the red alga, Gracilaria vermiculophylla
○垣田 浩孝[1]、岸野 愛[1]、柳岡 直樹[1]、小比賀 秀樹[2] ([1]日大院総合基、[2]産総研健康工学)
○Hirotaka KAKITA[1], Chika Kishino[1], Naoki Yanaoka[1], Hideki Obika[2] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [2]AIST, Health Research Institute)

海藻の世界的利用は数十億ドル規模であるが、その多くは食用とハイドロコロイド産業である。さらなる海藻産業の発展には有用物質の新規発見が必要である。一方、植物由来生理活性物質には季節により量的、質的変動があることも報告されている。そこで本研究では季節による紅藻類オゴノリ科オゴノリ由来のヘマグルチニンの量的、質的変動を明らかにすることを目的とした。瀬戸内海産オゴノリについて１月から８月までその生育状況を調査した。採取したオゴノリから５種類の抽出方法で海藻抽出液を得た。回収した海藻抽出液についての糖含有量、タンパク質量、ヘマグルチニン活性、比活性を調べた。糖含有量はフェノール硫酸法で、タンパク質含有量はブラッドフォード法でそれぞれ測定した。糖含有量及びタンパク質含有量は５月採取海藻で最高値となった。ヘマグルチニン活性は６月採取海藻で最高値となった。一方ヘマグルチニン活性の比活性は６月採取海藻が最高値であった。以上のことからオゴノリのヘマグルチニンは季節変動があり、活性最高値の海藻を得るには６月採取海藻が最も好ましいことが示唆された。

The global use of seaweed is worth billions of dollars, much of it in the edible seaweed and hydrocolloid industries. Further development of the seaweed industry requires the discovery of new useful substances. On the other hand, it has also been reported that there are quantitative and qualitative changes in their bioactive substances depending on the season. Therefore, the purpose of this study was to clarify the quantitative and qualitative changes in hemagglutinin from the red alga, Gracilaria vermiculophylla depending on the season. We investigated the growth status of G. vermiculophylla from the Seto Inland Sea from January to August. Algal extracts were obtained using five different extraction methods. The sugar content, protein content, hemagglutinin activity, and specific activity of the collected seaweed extracts were examined. The sugar content and protein content were the highest in seaweed collected in May. On the other hand, the specific activity of hemagglutinin was the highest in seaweed collected in June. The above results suggest that there is a seasonal variation in hemagglutinin in G. vermiculophylla, and that seaweed collected in June is most preferable to obtain seaweed with the highest activity value.

Seaweed, Hemagglutinin, variation

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4D3a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D3 会場

イネのシリカ形成を促進する有機マトリックスの探索と機能解析
Functional analysis of organic matrices from rice plants that promotes silica precipitation *in vitro*

○風見 菜月[1]、片山 秀和[2]、尾崎 紀昭[1]([1]秋田県大生物資源、[2]東海大工)
○Natsuki KAZAMI[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Noriaki OZAKI[1] ([1]Akita Prefect. Univ., [2]Tokai Univ.)

イネは様々な環境ストレスから植物体を防御するために、根から吸収したケイ酸を地上部（葉身・籾殻など）へと輸送し、セルロースと非晶質シリカを主成分とするケイ酸体を形成する。生物によるシリカ形成にはケイ酸重合（シリカ沈殿）活性を持つタンパク質や長鎖ポリアミン等の有機マトリックスが関与することが知られているが、高等植物では未解明の部分が多い。これまで高等植物では唯一、ソルガムからシリカ沈殿を促進するタンパク質 Siliplant1（Slp1）が報告されている。ホモロジー検索を用いて、イネにおける Slp1 様タンパク質の探索を行った結果、5 個の遺伝子が Slp1 の活性部位と類似の配列を持つタンパク質(OsSlp1 と呼称)をコードしていることが分かった。Slp1 と OsSlp1 の活性部位と考えられる配列をペプチド合成し、シリカ沈殿試験を行った。さらに、ポリアミンの一種であるスペルミンを用いて同試験を行い、両ペプチドとの活性を比較した。反応溶液の pH、添加した各有機分子の終濃度の違いにより、シリカ沈殿形成量に変化が見られることが明らかとなった。

Rice plants transport silicic acid absorbed from the roots to the leaf and rice husk. They form amorphous silica to protect the plant body from various environmental stresses. Biological silica formation has been shown to involve organic matrices such as specific proteins and long chain polyamines. However, information on the molecular mechanisms involved in the silica formation is very limited in higher plants. Siliplant1 (Slp1), the only protein that promotes silica precipitation in higher plants has been found in sorghum. We performed a homology search to find Slp1-like proteins in *Oryza sativa* and found that five genes encode proteins (OsSlp1) with sequences like the active site of Slp1. Peptide synthesis of the putative active site sequences of Slp1 and OsSlp1 was performed. *In vitro* silica precipitation studies were tested using these synthetic peptides and the spermine. The results showed that the amount of silica precipitation produced varies significantly depending on the pH of the reaction solution and the organic molecules added.

silica, *Oryza sativa*, organic matrix

発表責任者：尾崎紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4D3a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D3 会場

紅藻類オゴノリ科ユミガタオゴノリ由来のヘマグルチニンの抽出
Extraction of a hemagglutinin derived from the red alga, *Gracilaria arcuata*
○小池 航平[1]、黒須 泰行[2]、本間 悠里[2]、須藤 裕介[3]、垣田 浩孝[2] ([1]日大文理、[2]日大院総合基、[3]沖縄県水産海洋技術センター)
○Kohei Koike[1], Yasuyuki Kurosu[2], Yuri Homma[2], Yusuke Sudo[3], Hirotaka Kakita[2] ([1]College of Humanities & Sciences, Nihon Univ., [2]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [3]Okinawa Prefectural Fisheries Research and Extension Center)

紅藻類オゴノリ科海藻 *Gracilaria arcuata*（ユミガタオゴノリ）は鹿児島県南部と沖縄県で自生する海藻で *Gracilaria blodgettii*（クビレオゴノリ）などと同様に当該地域の伝統料理の食材である。需要が高いため、水揚げ量のほとんどが地域内で消費される。しかし近年生育数が激減し、養殖技術が検討されている。当該研究室の先行研究で紅藻類オゴノリ科海藻が高いヘマグルチニン活性を有すること、クビレオゴノリにもヘマグルチニン活性が存在することが明らかになっているが、ユミガタオゴノリ由来のヘマグルチニンに関してはいまだ不明であった。そこで本研究ではユミガタオゴノリ由来のヘマグルチニンを抽出し、その糖鎖特異性や癌細胞との相互作用といった特徴づけを行い、既知のオゴノリ科海藻由来のヘマグルチニンとの比較することを目的とする。ユミガタオゴノリ 125 g を緩衝液で抽出して粗抽出液を得た。粗抽出液の硫安沈殿（35%飽和―70%飽和）を緩衝液に対して透析して硫酸アンモニウムを除去し、海藻の硫安沈殿再溶解液を得た。硫安沈殿再溶解液がウサギ赤血球に対して赤血球凝集活性を有することが確認できた。現在ヘマグルチニンの精製を続けている。
Gracilaria arcuata, a red alga belonging to the family Gracilariaceae, is a seaweed that grows wild in southern Kagoshima and Okinawa Prefecture, and is an ingredient in traditional cuisine in the region, like *G. blodgettii*. Due to high demand, most of the catch is consumed within the region. However, in recent years, their population has decreased dramatically, and aquaculture techniques are being considered. Previous research conducted by this laboratory has revealed that red algae, the family Gracilariaceae, has high hemagglutinin activity, and that the hemagglutinin activity also exists in *G. blodgettii*, but it is still unclear about the hemagglutinin derived from *G. arcuate*. Therefore, the purpose of this study is to extract hemagglutinin derived from *G. arcuata*, characterize its carbohydrate specificity and interaction with cancer cells, and compare it with *G. blodgettii* hemagglutinin. A crude extract was obtained by extracting *G. arcuata* with a buffer solution. The ammonium sulfate precipitate of the crude extract (35% saturation - 70% saturation) was dialyzed against a buffer solution to remove ammonium sulfate to obtain an ammonium sulfate precipitate redissolved solution (70PRD) of *G. arcuata*. *Gracilaria arcuate* 70PRD showed hemagglutination activity against rabbit red blood cells. Separation and purification of *G. arcuate* hemagglutinin are currently being conducted.

Seaweed, Hemagglutinin, Extraction

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4D3a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D3 会場

イネにおけるプロゲステロン生合成酵素の機能解析

Functional analysis of progesterone biosynthesis enzyme in rice

○桑田 佳明、佐々木 康幸、矢嶋 俊介、伊藤 晋作（東農大院バイオ）
○Yoshiaki KUWATA, Yasuyuki SASAKI, Shunsuke YAZIMA, Shinsaku ITO (The Tokyo Univ. of Agric)

プロゲステロンは哺乳動物において黄体ホルモンとして妊娠維持などの生理作用を示すステロイドホルモンである。植物もプロゲステロンを合成していることが知られているが、その生合成や生理作用は明らかになっていない。本研究ではプロゲステロン生合成酵素の探索と機能解析を行った。*Digitalis* でプレグネノロンをプロゲステロンへ変換することが知られている 3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3βHSD）の配列を参考にイネで相同性の高い遺伝子を選択し、大腸菌へ形質転換させタンパク質を発現させ、酵素活性を確認した。その結果プロゲステロン合成活性の強い 2 種類の酵素（OsHSD1、OsHSD2）を見出した。続いて、*OsHSD1* と *OsHSD2* の過剰発現イネを作製し、植物へ与える影響について解析を行った。さらに、3βHSD よりも上流の遺伝子の探索を行うためにプロゲステロン合成量を制御する因子の選抜を行ったので、それについても報告する。

Progesterone is a steroid hormone that exhibits physiological effects such as the maintenance of pregnancy as a progestin in mammals. Plants synthesize progesterone, although its biosynthesis and physiological effects have not been clarified. In this study, we explored progesterone biosynthesis enzymes and analyzed their functions. *Digitalis* 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3βHSD), which converts pregnenolone to progesterone, was used as a reference sequence to select homologous genes in rice. After 3βHSD activity was confirmed using recombinant protein produced by *E. coli*, we identified two 3βHSD genes named *OsHSD1* and *OsHSD2*. *OsHSD1* or *OsHSD2* overexpressing lines in rice were generated, and their phenotypes were evaluated. In addition, we will report the result of screening for which chemicals regulate progesterone biosynthesis to identify the genes upstream of 3βHSD.

progesterone, plant, functional analysis of enzyme

講演番号：4D3a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D3 会場

紅藻類クビレオゴノリの水溶性画分中の赤血球凝集活性

Hemagglutinating activity in the water-soluble fractions derived from the red alga *Gracilaria blodgettii*

○齋藤 俊介[1]、緑川 英里香[2]、黒須 泰行[2]、本間 悠里[2]、垣田 浩孝[2] ([1]日大文理、[2]日大院総合基)
○Shunsuke SAITO[1], Erika MIDORIKAWA[2], Yasuyuki KUROSU[2], Yuri HOMMA[2], Hirotaka KAKITA[2] ([1]College of Humanities & Sciences, Nihon Univ., [2]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ.)

南西諸島や沖縄で自生する紅藻類オゴノリ科クビレオゴノリ（*Gracilaria blodgettii*）は古くから沖縄伝統料理の食材として利用されてきた。沖縄伝統料理は沖縄県が長寿日本一である原因の一つといわれており、その食材由来の機能性物質に興味が持たれている。当該研究室の先行研究でクビレオゴノリの海藻粗抽出液に赤血球凝集活性があることを見出しているが、その詳細は不明である。そこで本研究ではクビレオゴノリの水溶性画分中の赤血球凝集活性をオゴノリ科海藻の他種由来の水溶性画分中の赤血球凝集活性と比較することを目的とした。クビレオゴノリの粗抽出液の硫安沈殿を緩衝液に対して透析し、硫安沈殿再溶解液（70PRD）を得た。クビレオゴノリは他のオゴノリ科海藻よりも 2 倍水分を多く含んでいた。クビレオゴノリの赤血球凝集成分は他のオゴノリ科由来の成分と最適硫安沈殿範囲、イオン交換での活性画分の挙動がちがっていた。以上のことからクビレオゴノリの水溶性画分の赤血球凝集活性は他のオゴノリ科の海藻由来の赤血球凝集活性と異なることが示唆された。

The red alga *Gracilaria blodgettii*, which grows naturally in the Nansei Islands and Okinawa, has been used as an ingredient in traditional Okinawan cuisine since ancient times. Traditional Okinawan cuisine has been pointed out as one of the reasons why Okinawa Prefecture has the longest lifespan in Japan, and there is interest in the functional substances derived from its ingredients. Previous research by this laboratory has found that the crude extract derived from *G. blodgettii* has hemagglutinating activity, but the details are unknown. Therefore, the purpose of this study was to compare the hemagglutinating activity in the water-soluble fraction derived from *G. blodgettii* with those in the water-soluble fractions derived from other species of algal family Gracilariaceae. The ammonium sulfate precipitate obtained from the crude extract derived from *G. blodgettii* was dialyzed to obtain a sulfate precipitate redissolution solution (70PRD). The water content in *G. blodgettii* was about twice that of other species of the family Gracilariaceae. The hemagglutinating component derived from *G. blodgettii* differed from that of other components derived from other species of the family Gracilariaceae. These results suggested that the hemagglutinating activity in the water-soluble fraction derived from *G. blodgettii* is different from that of other species of the family Gracilariaceae.

Seaweed, Water-soluble fraction, Hemagglutinating activity

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4D3a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D3 会場

イネ葉身のファン型ケイ酸体に含まれるタンパク質の機能解析
Functional analysis of proteins within fan-shaped silica bodies from the leaf blades of Oryza sativa.

○千葉 優吏、村口 元、尾﨑 紀昭（秋田県大生物資源）
○Yuri CHIBA, Hajime MURAGUCHI, Noriaki OZAKI (Akita Pref. Univ.)

イネは様々な環境ストレスから植物体を防御するために、根から吸収したケイ酸を地上部（葉・籾殻など）の表層へと輸送し、非晶質シリカを主成分とするケイ酸体を形成する。生物のシリカ形成には有機マトリックスが関与することが知られているが、珪藻や海綿動物、細菌と比べて高等植物では未解明の部分が多い。ファン型ケイ酸体内に脂質輸送タンパク質（LTP）が存在することを既に報告しているが、シリカ形成への関与は不明である。ファン型ケイ酸体の機能として、外敵からの物理防御、光合成能を向上させるレンズ、倒伏を防ぐためのガラス骨格としての役割などが考えられている。イネ品種である台中の葉身からファン型ケイ酸体を単離し、精製処理後にフッ化アンモニウムで溶解した。この可溶性画分について SDS-PAGE と LC-MS/MS 分析を行った結果、これまで報告してきた LTP に分類されるタンパク質が候補として選出され、本品種におけるファン型ケイ酸体の可溶性有機マトリックスの主成分は LTPL12 であることが明らかになった。また、免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察によって、ファン型ケイ酸体における LTPL12 の局在を明らかにした。このタンパク質がファン型ケイ酸体形成にどのように関与しているかを明らかにするため、大腸菌や出芽酵母による組換えタンパク質の作製やケイ酸重合活性の評価について検討した。

To protect the plant body from various environmental stresses, rice plants transport silicic acid absorbed from the roots to the surface layers of leaves and rice husks to form silica bodies composed mainly of amorphous silica. Although silicas deposited in rice plants play various important roles, such as enhancing mechanical strength, improving disease resistance and photosynthetic activity, information on the molecular mechanisms involved in the biosilica formation is very limited. Organic matrices are known to be involved in the formation of silica, but this is still largely uncleared in higher plants. We have already reported the presence of lipid transport proteins (LTPs) embedded in fan-shaped silica bodies, but their involvement in silica formation is unknown. Fan-shaped silica bodies were isolated from the leaf blade and dissolved in ammonium fluoride after purification. SDS-PAGE and LC-MS/MS analysis of the soluble fraction revealed that proteins classified as LTPs, which have been reported previously, and that its main component is LTPL12. After immunostaining, the localization of LTPL12 in the fan-shaped silica bodies was revealed by observation using confocal laser microscopy. To clarify how this protein is involved in the formation of fan-shaped silica bodies, we examined the production of recombinant proteins in E. coli and budding yeast and the evaluation of silica precipitation.

Biomineralization, silica, Oryza sativa

発表責任者：尾崎紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4D3a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D3 会場

トマト固定品種を用いた二種のイソレクチンの性質の解析

Analysis of two isolectin genes using inbred tomato lines

○小栗 秀、八十 悠樹、石原 彰子、坂本 光 (東農大生物産業)
○Suguru OGURI, Yuuki Yaso, Akiko Ishihara, Hikaru Sakamoto (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】レクチンは糖または糖鎖に結合するタンパク質である。トマト果実房室組織には 4 個の糖結合ドメイン（CBD）で構成されるキチン結合性レクチン（TL-F）が含まれる。一方で 3 個の CBD で構成され、アミノ酸レベルで TL-F と 87%の配列の一致を示すイソレクチン TL-L をトマトにおいて同定している。TL-L は傷害とメチルジャスモン酸処理により小葉において発現が誘導される性質において TL-F と異なっている。これまでの研究から栽培トマト品種間で、TL-F 遺伝子（*F* 遺伝子）と TL-L 遺伝子（*L* 遺伝子）の分布が異なることがわかってきた。本研究では、レクチン遺伝子型についてそれぞれのホモ 2 品種を選び、レクチン活性を比較し、両品種の交配による自殖 F_2 世代の遺伝様式を調べた。【方法】NBRP から分与された固定栽培種 7 品種を材料とした。レクチンの遺伝子型はゲノム PCR により判定した。【結果】(1)トマト（2n = 24）固定 7 品種のうち 5 品種はレクチン遺伝子型において *F/F* であり、2 品種が *L/L* であった。ヘテロ型は検出されなかった。(2) 品種マイクロトム（MT ; 遺伝子型 *F/F*）と、マネーメーカー（MM ; 遺伝子型 *L/L*）のレクチン活性を比較した。MT 果実においてレクチン活性は緑熟期以降に上昇し、開花後 40 日で水平に達した。MM では開花 10 日の未熟果で比活性はピークに達し以降は低下した。MT 小葉は傷害処理の有無にかかわらずレクチン活性が検出されなかったが、MM 小葉のレクチン活性は傷害処理 24 時間後に健常時の 8 倍に上昇した。(3) MT と MM の交配により得られた F_1（*F/L*）の自殖 F_2 世代 133 個体の遺伝子型は分離の法則に従い *F/L*、*F/F*、*L/L* に分離した。全ゲノム解読された品種 Heinz1706 は *F/F* であり、TL-F 遺伝子は 3 番染色体の遺伝子座 Solyc03g116200 に座乗する。以上の結果から TL-F と TL-L 遺伝子は対立遺伝子の関係にあると考えられた。

[Objective] Lectins are carbohydrate-binding proteins that agglutinate red blood cells. Our group has identified two lectin genes (*TL-F* and *TL-L*) encoding chitin-binding lectins that share similar molecular features but exhibit different expression profiles. We investigated the distribution and genetic relationships of both genes among inbred tomato lines. [Results] Of the 7 inbred tomato lines, 5 lines were homozygotes of *TL-F* (*F/F*) and 2 lines were homozygotes of *TL-L* (*L/L*). No heterozygotes (*F/L*) were found. The genotypes of F_2 generations derived from the hybrid F_1 (F/L) lines were separated following the law of segregation. These results suggest that *TL-F* and *TL-L* genes are alleles from the same locus.

Tomato, lectin, chitin-binding

発表責任者：小栗　秀（s-oguri@nodai.ac.jp）

講演番号：4D3a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D3 会場

ホップ（*Humulus lupulus* L.）ルプリンに発現する LTP1 の同定と機能
Characterization of LTP1 expressed in Hop lupulin gland
○八十 悠樹、小栗 秀、坂本 光 (東農大院生物産業学研究科)
○YUKI YASO, Suguru Oguri, Hikaru Sakamoto (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】分泌腺毛（Glandular trichome: GT）は揮発性成分等の二次代謝産物を生産・蓄積する植物表皮の一形態である。産物は GT 内のクチクラ層と細胞壁に囲まれた細胞外領域に貯蔵され、その細胞外輸送に脂質結合能を有すタンパク質 Lipid transfer protein (LTP)が関与すると考えられている。ビールに芳香をもたらすビールホップ（*Humulus lupulus* L.）の精油成分は、球果苞葉の GT であるルプリンで生産される。ルプリンにおける精油成分の蓄積解明の一助としてホップ LTP の性質について調べた。【結果】(1) ルプリンの RNAseq を実施し、既知の non-specific LTP1 遺伝子と配列の類似性を示す複数の塩基配列情報を得た。(2) 推定アミノ酸配列情報をもとに作製した抗ペプチド抗体との交差反応性を指標にルプリン抽出液から LTP 分子種を精製し、N 末端アミノ酸配列との一致から 3 種類のホップ LTP アイソフォームを同定した (HlLTP1.1～1.3)。アイソフォームの主要成分である HlLTP1.1 は、ルプリン基部の分泌細胞の細胞壁に局在した。(3) 組換 HlLTP1.1 はモノ- セスキテルペン結合活性を示した。また、異なるホップ品種間において HlLTP1.1 遺伝子の発現量は精油成分量と正に相関した。以上の結果から、ホップルプリンにおける精油成分の輸送と蓄積に LTP が関与することが示唆された。

【Objective】Plant glandular trichomes (GT) are specialized epidermal tissues with subcuticular storage space that accumulate volatile organic compounds (VOCs). The small lipid transfer protein (LTP) is thought to be involved in the transport of VOCs from the secretory cells across the cell wall to the storage space of GTs. The GTs of hop (*Humulus lupulus L.*) cones, termed lupulin glands, accumulate in a high content of essential oil that imparts flavor to beer. To understand the molecular basis for terpene accumulation in lupulin glands, we analyzed the role of LTP expressed in hop lupulin. 【Results】 (1) Transcriptome analysis by RNAseq showed several non-specific LTP1 genes were expressed in hop lupulin, and their deduced sequences were obtained. (2) Three LTP1 proteins were purified from the extract of lupulin. Among them, the content of HlLTP1.1 was the highest. Histochemical analysis showed that HlLTP1.1 localizes in the cell walls of secretory cells of lupulin glands. (3) The gene expression level of HlLTP 1.1 was correlated with the essential oil content among several hop cultivars. These results suggest that LTP plays a role in transporting terpenes to the storage space of the lupulin gland.

Lipid transfer protein, Hop, lupulin

発表責任者：小栗　秀（s-oguri@nodai.ac.jp）

講演番号：4D3a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D3 会場

ドラゴンフルーツ *Hylocereus undatus* 果皮の植物由来キチナーゼの精製
Purification of plant-derived chitinase from dragon fruit *Hylocereus undatus* peel
○新里 守礼、田邊 俊朗（沖縄高専）
○Shurei SHINZATO, Toshiaki TANABE (NIT,Okinawa College)

本研究では，ドラゴンフルーツ(*Hylocereus undatus*)果皮由来キチナーゼ(EC3.2.1.14)の精製を目的とした．ドラゴンフルーツの果皮をホモジナイズし，0.05 M リン酸緩衝液 pH 6.8 で希釈後，4 ℃で遠心分離(12,000 g×10 min）した上清を粗酵素液とした．これに CTAB (Cetyltrimethyl ammonium Bromide)処理を行い，90％飽和硫安で沈殿物を回収し透析した．これを DEAE Sepharose FF (Cytiva) による陰イオン交換クロマトグラフィーに供し，0 ~ 0.5 M NaCl 直線濃度勾配により溶出した． 純度検定として SDS-PAGE を行った．精製過程を通したキチナーゼの活性測定は Imoto と Yagishita の方法に従った．0 .05%グライコールキチンを基質とし， 37 ℃で 10 分間の反応を行い，遊離された還元糖を Schales 変法で測定した． 1 分間に 1μmol の GlcNAc に相当する還元糖を遊離する酵素量を 1unit と定義した．ドラゴンフルーツ果皮のキチナーゼ活性は，他の植物キチナーゼの資料より比較的高いことから，ドラゴンフルーツの高い生体防御においてキチナーゼが強く関連していることが示唆される．

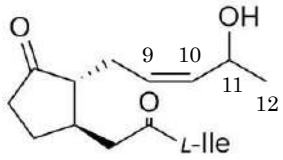
The objective of this study is to purify chitinase (EC3.2.1.14) extracted from dragon fruit(*Hylocereus undatus*). To begin, homogenized dragon fruit peels were diluted in 0.05 M phosphate buffer at pH 6.8 and centrifuged for ten minutes at 12,000 g at 4 °C. The resulting supernatant was employed as the crude enzyme solution. Afterward, we performed CTAB (Cetyltrimethyl ammonium Bromide) treatment on the solution and collected the precipitate with 90% saturated ammonium sulfate, which was later dialyzed. The precipitate was applied to anion exchange chromatography with Cytiva's DEAE Sepharose FF and were subsequently separated via a linear concentration gradient of 0 to 0.5 M NaCl. A purity assay was conducted using SDS-PAGE. Chitinase activity was assessed during the purification procedure via Imoto and Yagishita's approach. To determine the amount of reducing sugars released, 0.05% glycol chitin was utilized as a substrate, and the reaction was performed at a temperature of 37°C for 10 minutes using the modified Schales method. One unit was defined as the quantity of enzyme that releases reducing sugar equivalent to 1 μmol of GlcNAc per minute. The chitinase activity of the dragon fruit rind exceeded that of other plant chitinases, implying a strong link between chitinase and the high biological defense of dragon fruit.

Dragon fruit, Chitinase, Purification

発表責任者：新里　守礼（ac234802@edu.okinawa-ct.ac.jp）

講演番号：4D3a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D3 会場

MeJA 空気伝播による新たな代謝産物の探索
Exploration of a novel metabolite by airborne MeJA
○鵜飼 夕菜[1]、榎 亜加音[2]、北岡 直樹[3]、松浦 英幸[3] ([1]北大農、[2]北大院農、[3]北大農学研究院)
○Yuna UKAI[1], Akane ENOKI[2], Naoki KITAOKA[3], Hideyuki MATSUURA[3] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ. Graduate School, [3]Hokkaido Univ. Research Faculty of Agriculture)



11-OH-JA-Ile

ジャスモン酸（JA）は植物ホルモンの一種であり、傷害や食害への応答、病害抵抗性、形態形成などにおける情報伝達を担う。植物体内ではリノレン酸から生合成されており、その主な類縁体として 12 位にヒドロキシ基が結合した 12-ヒドロキシ JA（12-OH-JA）や L-イソロイシンが縮合した JA-Ile が知られている。一方、松浦らにより、バレイショに JA やその生合成中間体である OPC 8:0 を与えた際に、12-OH-JA グルコシドと共に 11-OH-JA グルコシドが合成されることが報告されている。シロイヌナズナにメチル JA（MeJA）を空気伝播で与える試験において MeJA 濃度を上昇させると、UPLC スペクトル上で 12-OH-JA-Ile のピーク付近に未知のピークが出現することが確認されている。バレイショの結果をもとに、未知ピークが 11-OH-JA-Ile に由来するものと仮説を立て、その検証に用いるための本化合物の全合成経路を設計した。ラセミ体の JA を光学分割し、炭素二重結合におけるルテニウムを用いたアルデヒドへの変換とその後の Wittig 反応を用いて 11 位にヒドロキシ基を導入することにより右図の化合物の合成に成功した。現在、植物体内での本化合物の代謝を検証中である。

Jasmonic acid (JA) is a type of plant hormone. It plays an important role in the regulation of response to wounding, resistance to pathogens, and morphological development. In plants, this compound is produced from linolenic acid and converted to 12-hydroxy JA (12-OH-JA) and JA-isoleucine (JA-Ile), the major analogs of JA. Matsuura *et al.* reported that, when JA or OPC 8:0, which is an intermediate of JA biosynthesis, was added to potatoes (*Solanum tuberosum* L.), they produced 11-OH-JA glucoside in addition to 12-OH-JA glucoside. For *Arabidopsis thaliana*, the emergence of an unknown peak around that of 12-OH-JA-Ile on the UPLC spectrum was observed under the increased concentration of airborne MeJA. Considering the production of 11-OH-JA glucoside in potatoes, we hypothesized that this unknown peak was derived from 11-OH-JA-Ile and established its total synthesis pathway for identification. We synthesized the compound of interest through optical resolution of a racemic mixture of JA, and conversion of 9,10-double bond into aldehyde using ruthenium(III) chloride and subsequent Wittig reaction. We are now investigating the metabolism of this compound.

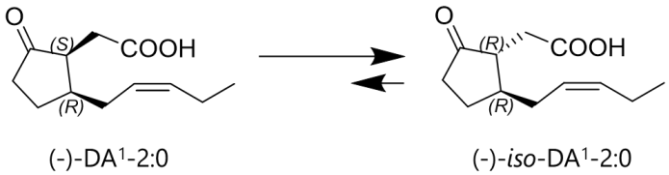
Jasmonic acid, Methyl jasmonate, airborne propagation

発表責任者：松浦　英幸（matsuura@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D3a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D3 会場

9-LOX 依存で生合成される death acid の生物活性に関する生物有機化学的研究
Bioorganic study on the bioactivity of death acid biosynthesised in a 9-LOX-dependent manner
○草野 春香[1]、宮脇 寛治[2]、北岡 直樹[3]、松浦 英幸[3]([1]北大農、[2]北大院農、[3]北大農学研究員)
○Haruka KUSANO[1], Kanji MIYAWAKI[2], Naoki KITAOKA[3], Hideyuki MATSUURA[3] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ. Graduate School, [3]Hokkaido Univ. Research Faculty)

ジャスモン酸(JA)類は、病傷害への防御応答において鍵となる植物ホルモンであり、植物体内ではリノレン酸が 13-LOX によって酸化される反応によって生合成が開始される。一方、9-LOX が作用すると、デスアシッド類(DA)が生合成され、植物の防御応答を引き起こす[1]。JA と DA は構造の類似した化合物であるにもかかわらず、別個の機能を持つ可能性も示唆されているが、旋光度等 DA に関する知見は少ない。



(-)-DA[1]-2:0　　(-)-*iso*-DA[1]-2:0

本研究では、光学分割によって得た(-)および(+)-JA それぞれから、7 工程で天然型の(-)-*iso*-DA[1]-2:0 と非天然型の(+)-*iso*-DA[1]-2:0 の初の全合成を達成し、それぞれの旋光度を初めて発表した。さらに DA の生理活性についての知見を得るために、抗菌活性・根の伸長阻害活性についても試験を行った。その結果、抗菌活性については JA と同様に認められなかったが、根の伸長阻害活性については JA では認められた一方、DA では認められなかった。

Jasmonic acids (JAs) are key phytohormones in the defense response to disease and wound, and their biosynthesis in plants is initiated by the oxidation of linolenic acid by 13-LOX, whereas the biosynthesis of death acids (DAs) is triggered by the action of 9-LOX [1]. Although it has been suggested that JA and DA may have distinct functions despite their structural similarity, the chemical properties of DA, such as its optical rotation, have not been fully elucidated.

In this study, we achieved the first total synthesis of the natural-structure (-)-*iso*-DA[1]-2:0 and the unnatural-structure (+)-*iso*-DA[1]-2:0 in seven steps from (-)- and (+)-JA obtained by optical resolution, respectively, and reported their respective melting points for the first time. To gain further insight into the bioactivity of DA, we also tested its antimicrobial and root elongation inhibitory activities. The results showed that antimicrobial activity was not observed for either JA or DA, while root elongation inhibition activity was observed for JA, but not for DA.

[1]Shawn A. Christensen, et al., *PNAS* **112**, 11407-11412 (2015)

phytohormone, death acid, total synthesis

発表責任者：松浦　英幸（matsuura@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D3a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 D3 会場

ナショナルバイオリソースプロジェクト・トマトの病徴様表現型解析への利用
Phenotyping of tomato mutant collections in disease-like symptoms
○杉本 貢一、藤森 陽子、江面 浩（筑波大 T-PIRC）
○Koichi SUGIMOTO, YOKO FUJIMORO, HIROSHI EZURA (Univ. of Tsukuba)

トマトは世界で最も多く栽培されている果菜類であり、病害虫への対応を怠ると 30-40%もの収量低下を招くことが報告されている。我々のグループが運営するナショナルバイオリソースプロジェクト・トマトでは世界最大規模のトマト変異体集団の整備を進めており、この変異体リソースを利用することで病害虫応答に関わる遺伝子の単離ができる考えた。データベース上の写真およびコメントから萎凋・褐色化・黄化スポットの発生など病徴とみられる表現型を示す系統を選抜した。これらのうち種子ストックが存在する系統を播種したところ、多くの系統で表現型の再現性が確認できた。野生型と F1 系統は野生型と同じ表現型であったことから、病徴様表現型は劣性変異に由来すると考えられた。野生株と変異体の葉内抽出液のコロニー形成能が同程度であったことから、lesion mimic 変異体であると予測された。これら変異体系統は TOMATOMA データベース（https://tomatoma.nbrp.jp/）から公開・配布を行っている。またご質問・ご意見も共通メールアドレス（requestomato@t-pirc.tsukuba.ac.jp）から随時受け付けている。

Tomato is the widely cultivated fruit vegetable in the world, and it has been reported that diseases can result in yield loss of 30-40%. The National BioResource Project-Tomato, organized by our group, developed the world's largest tomato mutant population, and this resource could be useful to isolate genes for disease responses. Based on the database, we selected lines that showed phenotypes such as wilting, browning, and yellowing spot development that were considered to be disease symptoms. Most of the selected lines showed the reproduced phenotypes in 2023. Since the wild type and F1 lines had the same phenotype, the disease symptom-like phenotype was considered to be due to a recessive mutation. The colony forming test of endophytic bacteria showed comparable result between a mutant and wild type, implied that that mutant has lesion mimic phenotype. These mutant lines are available through the TOMATOMA database (https://tomatoma.nbrp.jp/). Questions and comments are also welcome at any time via our email address (requestomato@t-pirc.tsukuba.ac.jp).

Bioresource, Tomato, Phenotyping

発表責任者：杉本貢一（sugimoto.koichi.gu@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4D3a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 D3 会場

葉緑体ゲノム情報に基づくムラサキ在来種の母系の理解

Maternal lineage study of Japanese purple gromwells based on their chloroplast genome information

○岡田 貴裕[1]、矢崎 一史[2]、佐々木 健郎[3]、渡邉 啓一[4] ([1]佐賀大医、[2]京都大生存研、[3]東北医科薬科大、[4]九州栄養福祉大)
○Takahiro OKADA[1], Kazufumi YAZAKI[2], Kenro SASAKI[3], Keiichi WATANABE[4] ([1]Saga Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Tohoku Med and Pharm Univ., [4]Kyushu Nut Welf Univ.)

薬用植物ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）は、かつて日本各地の山地草原に広く自生し、生薬や染料として利用されてきた。しかしながら、環境変化や乱獲の影響で個体数が激減し、近年では環境省レッドブックで絶滅危惧種 IB に指定されるまでとなっている。また、1970 年頃に中国から輸入されたセイヨウムラサキ（*L. officinale*）との交雑も懸念されており、純粋な在来種の保護・維持に向けたプロジェクトが各地で進められている。

ムラサキの保存活動を進めるにあたり、在来種の判別や系統解析に適した遺伝子マーカーの開発は欠かすことのできない研究課題である。これまでに、私たちは長野県原産の個体と中国品種の比較解析を通じてこれらの識別に利用可能な核／葉緑体ゲノムの構造バリエーションを多数見いだしてきた。本演題では、現存する日本各地の個体を対象とし、次世代シークエンシング解析で得た葉緑体ゲノムのバリアント情報をもとに在来種の母系を分類した結果を紹介する。

Lithospermum erythrorhizon (purple gromwell) is a medicinal plant distributed in East Asian countries and has been utilized for medicinal and dyeing purposes in Japan. However, the population of this plant has drastically decreased due to environmental changes and overharvesting. In addition, the widespread cultivation of related species, such as *L. officinale*, imported from China around 1970, has raised concerns about crossbreeding with pure native species. Currently, the Ministry of the Environment has designated purple gromwell as a threatened species (category IB).

In a previous study, we conducted an *in silico* bioinformatic analysis, revealing structural variations in nuclear/chloroplast genomes that can be used for identification of purple gromwells originating from Nagano Prefecture and China. In this presentation, we share the results of a comparative analysis on various varieties conserved throughout Japan, carried out by employing next-generation sequencing technology. We present maternal information based on the structural variations identified in their chloroplast genomes.

Lithospermum erythtorhizon, chloroplast genome, molecular phylogenetics

発表責任者：岡田 貴裕（e7316@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：4D4a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D4 会場

小麦グルテン加水分解物の高齢者に対する運動機能改善効果の検証

Verification of the Improvement Effect of Wheat Gluten Hydrolysate on Motor Function in the Elderly

○野出 純一[1]、浅田 憲一[2]、高橋 絵里歌[1]、菊池 洋介[1] ([1]株式会社日清製粉グループ本社、[2]日清ファルマ株式会社)
○Junichi NODE[1], Kenichi ASADA[2], Erika TAKAHASHI[1], Yosuke KIKUCHI[1] ([1]Nisshin Seifun Group INC., [2]Nisshin Pharma INC.)

【背景・目的】高齢者は、加齢による運動機能の低下により、骨折リスクの増加など更なる QOL の低下を招くため、運動機能を維持することは極めて重要である。小麦に含まれるタンパク質の一種である小麦グルテンの加水分解物（GP)（日清ファルマ㈱製）は、ペプチドやアミノ酸を多く含むことを特徴とし、これまでに健康なスポーツ選手において運動後の筋損傷抑制作用などが報告されている。そこで本研究では、GP を経口摂取することで、運動機能を改善するかヒト試験により検証を行った。
【方法】無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験にて、GP 摂取による運動機能改善効果を検討した。運動機能に問題のない 65 歳以上の健常な日本人男女 21 名を選抜し、無作為に 3 群に分けた。GP を 0 g、3 g または 6 g/日を 12 週間摂取させた。摂取期間中、被験者は 30 分以上のウォーキングを週 2 回以上行った。主要評価項目として運動機能を評価する SPPB、副次評価項目として脚筋力、握力等を評価した。
【結果・考察】解析対象者は 21 名であった。SPPB は群間差が認められなかった。一方で、GP 6 g/日摂取群で握力において経時的な増加が認められた。本発表では、その他の項目についても併せて報告する。

[Background/Purpose] The hydrolysate of wheat gluten (GP) (manufactured by Nisshin Pharma Co., Ltd.), a kind of protein contained in wheat, is characterized by a high content of peptides and amino acids, and has been reported to inhibit muscle injury after exercise by healthy athletes. Therefore, it was considered that the effect of improving motor function was expected, and this study was examined. [Method]Twenty-one healthy subjects, aged 65 years or older, with no motor dysfunction, were randomly divided into three groups and consumed GP on 0, 3, or 6g/ days for 12 weeks. During the ingestion period, subjects received at least 30 minutes of walking twice a week. As a SPPB of evaluating motor function as a primary endpoint, leg muscle strength, grip strength, etc. were evaluated as secondary endpoints. [Results and Discussion] Twenty-one subjects were analyzed. SPPB did not differ between the groups. On the other hand, grip strength increased with time in GP 6 g/ daily intake group. Other items are also reported in this presentation.

Wheat, Motor function, Elderly

発表責任者：野出　純一（node.junichi@nisshin.com）

講演番号：4D4a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D4 会場

ポリアミンがキイロショウジョウバエの生育段階・活動量に及ぼす影響
Effects of polyamine on growth stages and activity of *Drosophila melanogaster*.
○藤田 剛士[1]、下川 ひろみ[1]、堀 亜紀[2]、門口 響[2]、倉石 貴透[2]、栗原 新[1] ([1]近畿大・生物理工、[2]金沢大・医薬保健)
○ Tsuyoshi FUJITA[1], Hiromi SHIMOKAWA[1], Aki HORI[2], Hibiki KADOGUCHI[2], Takayuki KURAISHI[2], Shin KURIHARA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Kanazawa Univ.)

ポリアミンの経口摂取が動物の寿命の延伸などの健康増進に大きく寄与していることが報告されている。しかし、ポリアミンの摂取が動物の生育段階や活動量に及ぼす影響は解明されていない。本研究では、繁殖が容易で、飼育にスペースを要さないことから多数の個体を用いて研究が可能なキイロショウジョウバエを使用し、ポリアミンが動物の生育段階・活動量に及ぼす影響を解析した。ポリアミン（15 mM のプトレッシンまたは 10 mM のスペルミジン）を添加した飼料あるいはポリアミンを含まない飼料を自由摂取させたハエの成虫が産卵した卵から孵化した幼虫の数を計測した。その結果、ポリアミンを経口摂取した群の幼虫数は、ポリアミンを摂取しない群と比較して統計学的に有意に 1.2 倍に増加した。また、同様の方法で飼育したキイロショウジョウバエの活動を動画で撮影し、Fly Tracker および MATLAB を用いて解析したところ、プトレッシンあるいはスペルミジンを経口摂取した群の活動量は、ポリアミンを摂取しない群と比較してそれぞれ 1.2 倍あるいは 1.5 倍に統計学的に有意に増加した。以上の結果から、ポリアミンの経口摂取が動物の生育段階および活動量の増加に寄与している可能性が示唆される。

It has been reported that oral intake of polyamines contributes significantly to health benefits such as increased longevity in animals. However, the effects of polyamine intake on the growth stages and activity levels of animals have not been elucidated. In this study, we analyzed the effects of polyamines on the growth stages and activity levels of animals using *Drosophila melanogaster*, which can be studied using a large number of individuals because it is easy to breed due to its short-life span and space-saving. The number of larvae hatched from eggs laid by adult flies fed *ad libitum* on diets supplemented with polyamines (15 mM putrescine or 10 mM spermidine) or diets containing no polyamines was measured. The results showed a statistically significant 1.2-fold increase in the number of larvae in polyamine-supplemented group compared to polyamine-free group. The activity of *Drosophila* larvae reared in a similar manner was captured on video and analyzed using a Fly Tracker and MATLAB software, and the activity in the putrescine- or spermidine treated group was 1.2-fold or 1.5-fold higher, respectively, than that in the polyamine free group, respectively, which was statistically significant. These results suggest that oral intake of polyamines may increase the growth stage and activity level of animals.

Polyamine, spermidine, *Drosophila melanogaster*

発表責任者：栗原　新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4D4a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D4 会場

Roles of hepatic GABA transaminase in food intake suppression
○Thanutchaporn KUMRUNGSEE, Tomoka NAGAO, Noriyuki YANAKA (Hiroshima Univ., Graduate School of Integrated Sciences for Life)

[Objective] Previously, we found that a combination of dietary GABA with inhibition of GABA transaminase (GABA-T) by vigabatrin (Vig) strongly suppressed food intake in obese mice. We hypothesized that the appetite regulating effect of dietary GABA with the Vig injection is mainly attributed to elevated blood GABA levels through the hepatic GABA-T inhibition. However, we cannot rule out the brain GABA-T inhibition, since Vig can cross the blood-brain barrier and acts on the brain to control appetite with some extent. Therefore, the objective of this study was to determine if the solely hepatic GABA-T inhibition with dietary GABA can decrease food intake.
[Methods] Male C57BL/6J mice (8 weeks old, n = 10/group) was fed a high fat diet (60% fat) for 9 weeks to induce obesity. In order to specifically inhibit only hepatic GABA-T enzyme, antisense oligonucleotides (ASO) approach was applied to inhibit mRNA responsible for the production of GABA-T enzyme in the liver. Vig was used as a positive control. Mice were divided into six groups receiving twice-weekly intraperitoneal injections of GABA-T targeted ASO (12.5 mg/kg), daily Vig injection, or daily PBS injection with the control high fat or 2% GABA mixed high fat diet for 2 weeks. Food intake and body weight were measured daily. Blood GABA levels were measured by LC-MS/MS method.
[Results&Discussion] As a results, ASO significantly inhibited hepatic GABA-T mRNA expression and activity, but had no such effects on brain GABA-T. In the GABA diet fed mice, ASO injection significantly reduced food intake, while ASO injection in mice fed the control diet (without GABA) had no effects on food intake. The positive control Vig also exhibited the similar food intake suppressant effect. Moreover, ASO injection significantly induced an increase in plasma GABA levels in the GABA diet fed mice, similar to Vig injection, but had no effects on mice fed the control diet. The results suggest that the elevated plasma GABA due to hepatic GABA-T inhibition in a combination with dietary GABA is a key factor contribute to food intake suppression. This study suggests that hepatic GABA-T is a new target for obesity research.

dietary GABA, hepatic GABA transaminase, food intake

発表責任者：Thanutchaporn Kumrungsee（kumrung@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4D4a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D4 会場

大腸上皮における Cyp2c55 発現と腸内細菌との相互作用

The interaction between Cyp2c55 expression and gut bacteria in the colonic epithelium

○藤村 颯[1]、佐藤 哲[1]、松井 伸祐[2]、山本 祥也[1]、岩槻 健[2]、鈴木 卓弥[1]([1]広大院統合生命、[2]東農大応生)
○So Fujimura[1], Tetsu Sato[1], Shinsuke Matsui[2], Yoshinari Yamamoto[1], Ken Iwatsuki[2], Takuya Suzuki[1] ([1]The Univ. of Hiroshima, [2]Tokyo Univ. of Agirculture)

ヒトの腸管には 1000 種類、100 兆個もの細菌が共生し、腸管組織ではこの共生関係を支えるために、細菌の存在に応じて遺伝子発現を変化させている。我々はこれまでに、大腸上皮に高く発現する Cytochrome P450 2C55（Cyp2c55）が無菌マウスや抗生物質を投与したマウスにおいて大きく低下することを見出し、Cyp2c55 がヒト―腸内細菌の共生関係を支える分子の 1 つであることを提案している（日本農芸化学会 2023 年度大会)。Cyp2c55 の生理学的役割はほとんどわかっていないものの、酸化還元酵素に属する Cyp ファミリーは、解毒や薬物代謝、生理活性物質の産生など、生体機能の調節に深く関わる。そこで本研究では、大腸上皮における Cyp2c55 の発現調節における腸内細菌の役割を、特に胆汁酸に着目して探索した。まず、抗生物質を投与したマウスの糞便中の胆汁酸を LC/MS/MS 法にて解析したところ、通常マウスと比較して、一次および二次胆汁酸の濃度が低下していた。このとき一次胆汁酸に比べて、腸内細菌が産生する二次胆汁酸は、大腸の Cyp2c55 の遺伝子発現とより強い正の相関を示した。これらの結果から、腸内細菌の代謝物である二次胆汁酸が Cyp2c55 の発現に関与している可能性が考えられた。現在、マウスの大腸オルガノイドを用いて、Cyp2c55 の発現調節における二次胆汁酸の役割を検証している。

The human gut harbors 1000 species and 100 trillion bacteria that regulates intestinal gene expression. We have previously found that cytochrome P450 2C55 (Cyp2c55), which is highly expressed in the colonic epithelium, was greatly reduced in germ-free and antibiotic-treated mice. These results suggest that Cyp2c55 plays an important role in the symbiotic relationship between humans and gut bacteria. Although the physiological role of Cyp2c55 is largely unknown, the Cyp family is widely known to be involved in the regulation of biological functions. This study investigated the role of gut bacteria in the regulation of Cyp2c55 expression in the colonic epithelium. The LC/MS/MS analysis revealed that the fecal concentrations of primary and secondary bile acids were lower in antibiotic-treated mice compared to control mice. Compared to primary bile acids, secondary bile acids produced by intestinal bacteria showed a stronger positive correlation with Cyp2c55 gene expression. These results suggest that secondary bile acids may be involved in the regulation of Cyp2c55 expression. The regulation of Cyp2c55 by secondary bile acids is currently being investigated using mouse colon organoids.

Cytochrome P450, Gut microbiota, Mouse intestinal organoid

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4D4a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D4 会場

がん細胞の上皮間葉転換（EMT）におけるニンニク由来硫黄化合物の役割

The role of garlic-derived sulfur compounds in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells.

○西塚 誠、佐々木 歩海（弘前大農生）
○Makoto NISHIZUKA, Ayumi Sasaki (Hirosaki Univ.)

【背景・目的】がん細胞の浸潤や転移には、上皮間葉転換 epithelial to mesenchymal transition (EMT) というプロセスが大きく関わっている。そのため、EMT を抑制する化合物の発見はがんに対する新たな創薬候補となりうる。ニンニクには様々な有機硫黄化合物が含まれており、その中にはがん細胞の増殖抑制効果が報告されている DADS や S-allyl-L-cysteine 等が含まれている。Cycloalliin もニンニクに含まれる有機硫黄化合物の一つであるが、がんとの関連性の報告はされていない。そこで本研究では、ニンニクに含まれる含硫化合物 cycloalliin が非小細胞肺がんの EMT に及ぼす影響を検討した。
【方法・結果】まず、細胞毒性を示さない cycloalliin の濃度を、WST-8 を用いた生細胞数測定によって決定した。次に、ヒト非小細胞肺がん由来細胞株 A549 に、TGF-βと cycloalliin を添加し、TGF-β誘導性 EMT に cycloalliin が及ぼす影響を検討した。ウエスタンブロットを行った結果、cycloalliin の添加によって、間葉系マーカーN-cadherin と EMT を促進する転写因子 snail のタンパク質発現が減少することが明らかになった。さらに、TGF-β刺激により活性化される smad 3 のリン酸化も cycloalliin 添加により抑制された。これらに加え、トランズウェルを用いた検討により、cycloalliin が非小細胞肺がんの浸潤能を抑制することも明らかにした。これらの結果から、cycloalliin が A549 細胞の TGF-β誘導性 EMT を阻害し、浸潤能を抑制することが示唆された。

The process of epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a key step in cancer cell invasion and metastasis. Garlic contains various organosulfur compounds. However, the role of cycloalliin, a sulfur-containing compound in garlic, has not been reported. In this study, we investigated the effect of cycloalliin on EMT of non-small cell lung cancer.
We added TGF-β and cycloalliin to A549, a human non-small cell lung cancer cell line, and examined the effect of cycloalliin on TGF-β-induced EMT. Western blotting revealed that the addition of cycloalliin decreased protein expression of the mesenchymal marker N-cadherin and the transcription factor snail, which promotes EMT. Furthermore, phosphorylation of Smad 3, which is activated by TGF-β stimulation, was also suppressed by cycloalliin addition. Furthermore, transwells assay revealed that cycloalliin suppressed the invasive potential of A549. These results suggest that cycloalliin inhibits TGF-β-induced EMT of A549 cells and suppresses invasive ability.

EMT, cycloalliin, cancer

発表責任者：西塚　誠（nishizuka@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：4D4a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D4 会場

ニンニク臭気前駆体が誘導するメラノーマの細胞死の形態
Morphology of cell death in melanoma cells induced by garlic odor precursor
○望月 創一朗、矢嵜 友章、山口 勇将、熊谷 日登美（日本大学 生物資源科学部）
○ Soichiro Mochizuki, Tomoaki Yazaki, Yusuke Yamaguchi, Hitomi Kumagai (College of Bioresource Sciences, Nihon University)

ニンニクの薬理効果は、従来は、ニンニクに高含有される *S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (ACSO) から酵素により生成する臭気成分であるスルフィド類とされてきたが、当研究室では、無味・無臭の ACSO が、血小板凝集抑制作用、肝障害抑制作用、メラノーマ細胞増殖抑制作用など、様々な生理活性を有することを明らかにした。しかし、ACSO のメラノーマ細胞増殖抑制メカニズムについては未解明である。細胞死は形態学的にアポトーシスとネクローシスに大別される。本研究では、ACSO がこの 2 つの細胞死のどちらに関与しているか検討を行った。アポトーシス実行経路に関しては、メラノーマ細胞に ACSO を添加後、caspase 活性に関与する Bcl-2、Bcl-xL、Bax、アポトーシス誘導型 caspase である procaspase-8、9、12 の発現量を測定した。一方、ネクローシスの 1 つであるフェロトーシス実行経路に関しては、ACSO 添加後、細胞外グルタミン酸濃度および細胞内シスチン濃度を測定し、フェロトーシスを誘導するシスチン/グルタミン酸トランスポーター (xCT) 阻害に対する ACSO の影響を検討した。その結果、ACSO はメラノーマ細胞の Bax と procaspase-9、12 の発現量を上昇させ、Bcl-2 と Bcl-xL の発現量を減少させたことから、ミトコンドリアおよび小胞体を介したアポトーシスを誘導することが示唆された。また、ACSO は、メラノーマ細胞の細胞外グルタミン酸濃度および細胞内シスチン濃度を減少させたことから、xCT を阻害することも示唆された。以上のことから、ACSO は、メラノーマ細胞のアポトーシスとフェロトーシスの両方に関与していると考えられる。

The physiologically active components of garlic have been considered to be sulfides, odor components, enzymatically produced from *S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (ACSO). However, we found that odorless ACSO has various physiological activities, including inhibiting platelet aggregation, liver damage, and melanoma-cell proliferation. Since the mechanism of inhibitory activity of ACSO against melanoma cell proliferation remains unknown, we investigated whether ACSO is involved in apoptosis or necrosis. As a result, ACSO increased the expression levels of Bax and procaspase-9 and 12, and decreased the expression levels of Bcl-2 and Bcl-xL in melanoma cells suggesting that it induces mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. Furthermore, ACSO decreased the extracellular glutamate concentration and intracellular cystine concentration in melanoma cells suggesting the inhibition of cystine/glutamate transporter. Therefore, ACSO would be involved in both apoptosis and ferroptosis (a type of necrosis) of melanoma cells.

S-allyl-L-cysteine sulfoxide, melanoma, apoptosis and ferroptosis

発表責任者：熊谷　日登美（kumagai.hitomi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4D4a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D4 会場

中国産食用茸ツブイボタケ含有 vialininA 及び DMT の HCT116 細胞におけるアポトーシス誘導効果の検討

Investigation of the apoptosis-inducing effect of vialininA and DMT in HCT116 cells containing Chinese edible mushrooms

○鈴木 健斗、紙谷 昌妙、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東京農業大学大学院）
○Kento Suzuki, Masumi Kamitani, Kouichi Sugaya, Jun-ichi Onose, Naoki Abe (Tokyo University of Agriculture)

当研究室において中国産ツブイボタケから精製された新規化合物 vialinin A 及びその合成アナログ DMT は、TNF-α産生阻害活性の細胞内標的分子として USP5 を制御していることを明らかにしている。一方、近年、USP5 を制御することにより、癌抑制タンパク質 p53 が安定化するという知見が報告された。そこで、vialinin A 処理により、USP5 の活性を抑制することで、p53 が安定活性化して細胞周期を止め、アポトーシスによる細胞死を誘導することを想定した。本研究では野生型 p53 を発現しているヒト大腸がん細胞株 HCT116 を用いて vialinin A 及び DMT のアポトーシス誘導効果について評価することを目的とした。MTT 法により vialinin A 及び DMT 処理した HCT116 細胞の生存率を測定した結果、いずれにおいても 50 μM では生存率約 60%、100 μM では約 45%まで低下した。ウエスタンブロッティングを用いたタンパク質評価した結果、DMT 処理細胞においてアポトーシス関連タンパク質である p53, p21, BAX の増加が確認された。また、アポトーシス抑制に関与するタンパク質である Bcl-2 の減少が確認された。このことから vialinin A 及び DMT はアポトーシス誘導をしていることが示唆された。今後はアポトーシス誘導における重要なメディエータータンパクである cleaved カスパーゼ-3 の発現、また、フローサイトメーターを用いた検討を行っていく。

Vialinin A, a novel compound isolated from a Chinese edible mushroom, *Thelphora vialis* and Its synthetic analog DMT show TNF α production and secretion inhibitory activity. Furthermore, ubiquitin specific peptidase 5 (USP5), an intracellular target molecule of vialinin A is suggested to be a key molecule of TNF production. On the other hand, it was reported that the tumor suppressor protein is stabilized by regulating USP5. Based on these findings the following hypothesis is assumed. Treating cancer cells with vialinin A or DMT allows the induction of apoptosis in cancer cells by stabilizing and activating p53 through the inhibition of USP5 enzyme activity. In this study, we aimed to evaluate the apoptosis-inducing effect of vialinin A and DMT treatment on p53 activation in HCT116, a human colon cancer cell expressing wild-type p53.
As a result, of MTT assay, vinlinin A and DMT showed about 45% cell viability at 100 μM.
Protein evaluation using Western blotting, confirmed an increase in apoptosis-related proteins p53, p21, and BAX in cells treated with vialinin A and DMT. Additionally, a decrease in Bcl-2, a protein involved in apoptosis inhibition, was confirmed. This suggested that DMT induce apoptosis. Furthermore, evaluation of the expression of cleaved caspase-3, an important mediator of apoptosis induction, and studies using flow cytometry are currently underway.

p53, Vialinin A, USP5

講演番号：4D4a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D4 会場

Arctigenin、Nobiretin の併用によるヒト肺腺がん細胞（A549）の代謝変化に関する研究

Study on metabolism changes in human lung adenocarcinoma cells (A549) induced by the combination of Arctigenin and Nobiretin.

○岩崎 公典 (琉大熱生研)
○Hironori Iwasaki (The Univ. of Ryukyus)

食品機能性の相互作用による抗腫瘍効果は未解明な点が多いが、発がんリスクと食習慣の関連を理解する上で重要な視点である。これまで Arctigenin (ARC)と Nobiretin (NOB)の併用による相乗的な抗腫瘍活性が示されているが、両分子のどのような機能性が相互作用するかについては明らかになっていない。本研究では腫瘍細胞の経時的な（1-3 日）代謝変化の測定と、阻害剤を用いた実験により両分子がどのように協働するのかを明らかにすることを目的とした。実験の結果、NOB はすみやかな細胞内総還元能の抑制と、脂肪酸合成の促進を誘導しており、がん細胞に早期の代謝変動をもたらすことを明らかにした。一方 ARC は脂肪酸合成や細胞増殖を抑制した一方で、大量のエネルギーを消費しつつも総還元能は維持する傾向があり、ストレス応答を強く示した。しかし両分子を併用した場合では単なる相加効果では説明できない総還元能の減少を認めた。阻害剤による実験からも同様に複雑な相互作用の存在が示唆された。

これらの結果は、食品機能性の併用では様々な相互作用を多面的に評価することが重要であることを示しており、今後はメタボローム解析などを用いた総合的な代謝変化の評価が重要であると考えられる。

The interaction of functional molecules is an important point of view in understanding the relationship between cancer risk and dietary habits. The mechanism of synergistic antitumor activity of Arctigenin (ARC) and Nobiretin (NOB) in combination has not been elucidated in detail. In this study, we studied the metabolic changes in tumor cells and experiments using inhibitors to clarify the roles of both molecules. The experimental results showed that NOB induced inhibition of reducing ability and promotion of fatty acid synthesis, resulting in early metabolic changes in cancer cells. ARC inhibited fatty acid synthesis and cell proliferation, but maintained reducing capacity though consuming large amounts of energy, indicating a strong stress response. In combination, there was a reduction in reducing capacity that could not be explained by a simple additive effect. The experiments using inhibitors also showed the presence of a similarly complex interaction. These results suggest that metabolome analysis, which can evaluate various interactions overall, will be important for the combination of food functionalities.

food functionality, antitumor, Synergistic effect

発表責任者：岩崎公典（hiwasaki@comb.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：4D4a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D4 会場

ラズベリー花弁に含まれるフラバン-3-オール誘導体の細胞内ターゲットの検討と花弁抽出液の活性評価

Investigation of Intracellular Targets of Flavan-3-ol Derivatives in Raspberry Petals and Evaluation of the Activity of Petal Extracts

○青木 環[1]、堀口 諒太[1]、井本 風馬[2]、宮前 友人[2]、道下 僚[1]、小堀 亮[1]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工、[2]大阪電通大工)
○Atoru AOKI[1], Ryota HORIGUCHI[1], Huuma IMOTO[2], Yuto MIYAMAE[2], Ryo DOGE[1], Ryo KOBORI[1], Akiko SAITO[1,2] ([1]Graduate school of Engineering, OECU, [2]Faculty of Engineering, OECU)

我々は，有機合成で獲得したポリフェノール化合物ライブラリーを用い，ガン細胞の増殖抑制活性を指標に構造-活性相関(SAR)研究を行ってきた。その中から，ガン細胞に細胞周期を停止することでアポトーシスを誘導するフラバン-3-オール誘導体(Figure 1 参照)を見出した[1]。同時に,この化合物を含む植物体の探索研究を実施した結果，レッドラズベリーの花弁に含まれていることがわかった[2]。 本発表では，この化合物の細胞内ターゲットの探索検討と，ラズベリー花弁抽出液や蕾に注目して行った検討について報告する。

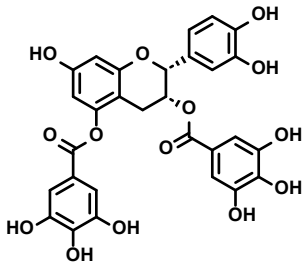


Figure 1. Structure of compound

まず合成した化合物を子宮頸ガン細胞 HeLa および肺胞ガン細胞 A549 に添加して表現型を，類似の化合物や予想される細胞内ターゲットを与えたときに示す表現型を比較した。その結果，お茶カテキン EGCG とはターゲットが異なることが示唆された。また，露地で栽培したレッドラズベリーの花弁を採取しメタノールで抽出し濃縮乾固した後 DMSO 溶液とした。採取時期が異なっても Figure 1 に示した化合物は再現性良く含まれていたがケルセチン系化合物やエラジタンニン系化合物も同時に含まれていた。この抽出液のガン細胞への影響を MTT 法にて測定したところ,濃度依存的にガン細胞の増殖を抑制した。現在は抽出液の中のどの化合物がより細胞増殖を抑制するのか検討を進めている。

Using a library of polyphenol compounds obtained through organic synthesis, we conducted structure-activity relationship (SAR) studies using growth inhibition activity of cancer cells as an indicator, and found compounds that induce apoptosis in cancer cells by arresting the cell cycle.[1] At the same time, we conducted a search study of plant materials containing the compound, and found that it is contained in the petals of red raspberry.[2] In this presentation, we will report on our investigation into the intracellular targets of this compound, as well as our investigation focusing on raspberry petal extract and buds. First, the synthesized compound was added to HeLa cells and A549 cells to confirm the phenotype, and the phenotypes exhibited when similar compounds or expected intracellular targets were given were compared. In addition, the raspberry petal extract containing the compounds shown in Figure 1 exhibited dose-dependent cell proliferation inhibitory activity. Currently, we are investigating which compounds in the extract are more effective at suppressing cell proliferation.

[1] R. Doge *et al*., *BioChem*, **3**, 61-77, 2023. [2] R. Kobori *et al*., *Nutraceuticals*, **3**, 196-209, 2023.

Flavan-3-ol derivatives, Inhibition of cancer cell proliferation, Functionality of polyphenols

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：4D4a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D4 会場

ケルセチンのがん抑制性マイクロ RNA 発現調節作用
Quercetin increases the expression of tumor-suppressive microRNAs
○村田 希[1]、丸亀 裕貴[2]、藤村 由紀[2]、立花 宏文[2] ([1]愛媛大・ADRES、[2]九大院農院・生機科)
○ Motoki MURATA[1], Yuki MARUGAME[2], Yoshinori FUJIMURA[2], Hirofumi TACHIBANA[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kyushu Univ.)

マイクロ RNA（miRNA）は約 20 塩基からなる一本鎖ノンコーディング RNA であり、標的 mRNA に結合することでタンパク質の産生を抑制し、様々な生命現象や疾患の発症に関与することが報告されている。近年、血液や唾液といった体液中に安定して存在する miRNA のバイオマーカーとしての利用に注目が集まっており、我々はこれまでに植物フラボノイドの一種であるケルセチンの投与によりマウスの血漿中 miRNA 発現が変化することを見出している。本研究は、血漿中で発現が変動した miRNA に着目し、ケルセチンの抗がん作用に関与する miRNA を明らかにすることを目的とした。
マウスに移植したヒト子宮頸がん細胞株 HeLa の腫瘍ならびに培養 HeLa 細胞においてケルセチンが miRNA の発現に与える影響を検討したところ、ケルセチンは腫瘍組織および培養細胞中においてがん抑制性 miRNA（miR-26b, 126, 320a）の発現量を増加させることを見出した。次に、miR-320a の標的となりうるがん関連遺伝子 *CTNNB1* によってコードされる β-catenin のタンパク質発現に対するケルセチンの影響を検討した結果、HeLa 細胞においてケルセチンは β-catenin のタンパク質発現を抑制したが、miR-320a inhibitor の処理によりその作用が消失した。以上より、ケルセチンは miRNA の発現を調節することで、抗がん作用を発揮する可能性が示された。

Quercetin, a flavonoid found in vegetables and fruits, has a variety of biological activities, including antioxidant, anticancer and anti-inflammation effects. MicroRNAs (miRNAs), small noncoding RNAs, have been reported to play important roles in many biological processes by regulating their target gene expression. miRNAs can also be detected in the blood and these circulating miRNAs can be potential biomarkers of various diseases. Our previous study showed that quercetin altered miRNA expression in mouse plasma. In this study, we investigated the effects of quercetin on the expression of tumor-suppressive miRNAs in cervical cancer. Quercetin up-regulated the expression of tumor-suppressive miRNAs (miR-26b, miR-126, and miR-320a) *in vivo* and *in vitro*. Quercetin decreased the protein level of β-catenin, encoded by catenin beta 1 (*CTNNB1*), whereas miR-320a inhibition attenuated the effect of quercetin. These results suggest that quercetin has the potential to prevent cervical cancer by regulating the expression of tumor-suppressive miRNAs.

Quercetin, microRNA, cervical cancer

講演番号：4D4a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D4 会場

野沢菜漬け由来乳酸菌株による抗腫瘍効果メカニズムの解析

Lactic acid bacteria from fermented Nozawana promote anti-tumor immunity mediated by the activation of dendritic cells and killer T cells

○阿蘇 晴香[1]、新妻 史絵[1]、柾 明弘[1]、遠藤 勝紀[1]、北村 秀光[2,3]、田中 沙智[1]（[1]信州大院、[2]東洋大・理工、[3]北大・遺制研）
○Haruka Aso[1], Fumie Niitsuma[1], Akihiro Masaki[1], Katsunori Endo[1], Hidemitsu Kitamura[2,3], Sachi Tanaka[1] ([1]Shinshu university, [2]Toyo university, [3]Hokkaido university)

がんに対する免疫応答において、抗原提示細胞からのシグナルによって活性化されたキラーT 細胞は、Granzyme B や IFN-γなどの細胞傷害性顆粒やサイトカインを産生し、がん細胞をアポトーシスへ誘導する。所属研究室では先行研究において、野沢菜漬けから IFN-γの産生誘導能をもつ乳酸菌株、*Lactiplantibacillus plantarum* K4-9（以下 K4-9）株が単離された。また、K4-9 株を転移性肝がんモデルマウスに経口摂取させたところ、肝転移巣の形成能低下を確認した。そこで本研究では、K4-9 株の投与による抗腫瘍免疫増強メカニズムを明らかにすることを目的とした。マウスに K4-9 株を 2 週間経口投与させたところ、脾臓細胞中における樹状細胞の割合が増加し、活性化マーカーの発現が増加した。また、キラーT 細胞の Granzyme B と IFN-γの発現は、遺伝子、タンパク質レベルともに K4-9 株の経口投与で増加した。加えて、B16F10 細胞に対する細胞傷害活性を解析したところ、K4-9 株の経口投与によって B16F10 細胞における死細胞割合が増加した。以上の結果から、K4-9 株は樹状細胞の活性化とキラーT 細胞における細胞傷害活性の増強によって抗腫瘍免疫を増強することが示唆された。

Antigen-presenting cells take up cancer antigens, process them into peptides, and then activate T cells in anti-tumor immunity. Killer T cells produce Granzyme B and IFN-γ and play a pivotal role as effector cells for the induction of apoptosis to tumor cells. We have previously reported that a lactic acid bacterial, *Lactiplantibacillus plantarum* K4-9 (K4-9), which has the ability to induce the production of IFN-γ, was selected from fermented Nozawana. In addition, oral administration of the K4-9 strain suppressed liver metastasis of tumor cells in B16F10 experimental metastatic colonization model. In the present study, we evaluated the anti-tumor immunity effect of K4-9 strain by analyzing the immune cells from mice orally administered K4-9 strain. When mice were administered with K4-9 strain for 2 weeks, the percentages of activated dendritic cells in the spleen were significantly increased by K4-9 strain administration. In addition, expression of Granzyme B and IFN-γ in killer T cells was increased at both gene and protein levels by administration with K4-9 strain. Furthermore, spleen cells from mice administrated with K4-9 significantly increased cytotoxic activity against B16F10 cells. These results suggest that the K4-9 strain enhances anti-tumor immunity by activating dendritic cells and enhancing cytotoxic activity of killer T cells.

Lactic acid bacteria, anti-tumor immunity, T cell

発表責任者：田中沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4D4a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 D4 会場

Inhibitory effect of colostrum-derived Lacticaseibacillus rhamnosus Probio-M9 on colitis-related carcinogenesis

○Lin Kurahara[1], Feiyan Zhao[2], Xiaodong Li[1], Zhihong Sun[2], Heping Zhang[2], Katsuya Hirano[1] ([1]Department of Cardiovascular Physiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa 761-0793, Japan, [2]Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering; Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Background: Intestinal bacteria play important roles in the progression of colitis-associated carcinogenesis. The longer the breastfeeding period, the lower is the risk of inflammatory bowel disease. Here, we investigated preventive effects of the Breast Milk-Derived probiotic ***Lacticaseibacillus rhamnosus*** M9 (Probio-M9) on colitis-associated tumorigenesis.

Methods: CAC model was prepared by a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM), followed by 3 sets of 1-week administration of drinking water containing 2% dextran sulfate sodium (DSS) at week 2, 4 and 6. On week 8, 10 and 12, mice were treated with Probio-M9 (2×10^9 cells/day/mouse) for 7 days each. Feces were obtained at 4 time points (day 0, the end of week 6, 12 and 21) for evaluation of gut microbiota. Histopathological analysis of colon tissues was performed. The effect of Probio-M9 on the thigh junction protein expression was evaluated in co-cultured Caco-2 cells.

Results: Probio-M9 treatment decreased the number of tumours and also decreased stool consistency score, spleen weight, inflammatory score, and the IL-6 and TNF-α expression in CAC model. Probio-M9 accelerates the recovery of the structure, composition and function of intestinal microbiota destroyed by AOM/DSS as normal by regulating the key bacteria (such as *Lactobacillus murinus*, *Muribaculaceae bacterium* DSM 103720, *Muribaculum intestinale* and *Lachnospiraceae bacterium* A4) and pathways from immediately after administration until the end of the experiment at week 21. Probio-M9 co-culture protected from lipopolysaccharide-induced impairment of integrity of tight junction protein in Caco-2 cells.

Conclusions: Probio-M9 improve the inflammation and tumorigenesis associated with modulation the structure and composition of intestinal flora over a long period.

breast milk, colitis-associated carcinogenesis, probiotics

発表責任者：倉原　琳（kurahara.rin@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：4D5a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 D5 会場

微生物由来α-(1→3)-glucan の資化に関与する糖質加水分解酵素の機能解析

Characterization of glycoside hydrolases involved in the utilization of microbial α-(1→3)-glucans

○岡 希望[1]、木村 聡[2]、岩田 忠久[2]、宮崎 剛亜[1,3]([1]静大院・総科技・農、[2]東大院・農、[3]静大・グリーン研)
○Nozomi Oka[1], Satoshi Kimura[2], Tadahisa Iwata[2], Takatsugu Miyazaki[1,3] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo, [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

Bacteroidota 門の細菌は starch utilization system (Sus) のような、複数の分解酵素や糖結合タンパク質、輸送体タンパク質が共働して多糖を資化する機構を有している。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、多糖資化遺伝子座 (PUL) としてオペロンを形成している。我々は以前、土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* から乳酸菌の菌体外多糖である多分岐デキストランの資化に関わるタンパク質群の構造と機能を明らかにした (Nakamura et al., J. Biol. Chem. 2023)。本研究では、同細菌から見出した別の α-glucan 資化に関わると予想される PUL に着目し、そこにコードされている糖質加水分解酵素ファミリー (GH)97 および GH99 に属するタンパク質 (FjGH97B と FjGH99) の機能を明らかにすることを目的とした。目的タンパク質は大腸菌発現系で発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。多糖とオリゴ糖に対する分解活性を、薄層クロマログラフィーによる反応産物の分析や bicinchoninic acid 法による還元糖の定量により調査した。FjGH99 は mutan (α-(1→3): α-(1→6)=7:3)や直鎖 α-(1→3)-glucan のような α-(1→3)-グルコシド結合を多く含む α-glucan に対して加水分解活性を示すエンド型の酵素であることが分かった。一方、FjGH97B はトレハロース以外の α-グルコ二糖や α-glucan からグルコースを生成するエキソ型の酵素であることが分かった。現在、FjGH97B の基質特異性に関する詳細な実験を行っており、合わせて報告する予定である。

Bacteroidota bacteria possess polysaccharides utilization system which is composed of carbohydrate-active enzymes, sugar-binding proteins, and transporters; e.g., starch utilization system (Sus). Genes encoding these proteins form operons called polysaccharide utilization loci (PULs). We previously revealed the structures and function of the proteins from the soil Bacteroidota bacterium *Flavobacterium johnsoniae* that are involved in the utilization of branched dextran produced by lactic acid bacteria (Nakamura et al., J. Biol. Chem. 2023). In this study, we focused on a PUL which was predicted to be involved in another α-glucan utilization. This PUL contains two genes encoding enzymes belonging to the glycoside hydrolase family (GH) 97 and GH99 (named FjGH97B and FjGH99, respectively). Recombinant FjGH99 was found to be an endo-type enzyme which showed activity against polysaccharides and oligosaccharides containing α-(1→3)-glucosidic linkages such as mutan (α-(1→3): α-(1→6)=7:3) and linear α-(1→3)-glucan. On the other hand, recombinant FjGH97B was found to be an exo-type enzyme that produced glucose from polysaccharides and disaccharides containing α-(1→2)-, α-(1→3), α-(1→4), and α-(1→6)-glucosidic linkages.

mutan, exopolysaccharide, polysaccharide utilization locus

発表責任者：宮崎　剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4D5a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D5 会場

Bacteroidota 門細菌由来 GH13_38 酵素のX線結晶構造解析
X-ray crystallographic analysis of GH13_38 enzymes from Bacteroidota bacteria
○中村 駿太郎[1]、宮崎 剛亜[1,2] ([1]静大・創造院・バイオサイエンス、[2]静大・グリーン研)
○Shuntaro NAKAMURA[1], Takatsugu MIYAZAKI[1,2] ([1]Dept. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ.)

[目的] 糖質加水分解酵素ファミリー13 (GH13) は α-アミラーゼやイソアミラーゼなどの澱粉分解酵素が属しているファミリーであり、47 個のサブファミリー (GH13_1 から GH13_47) に分類されている。我々はこれまでに土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* 由来の GH13_38 酵素 (FjGH13_38) がイソパノースや 6-*O*-α-マルトシル-β-シクロデキストリンの 6-*O*-α-マルトシル基を厳密に認識し、α-(1→6)-グルコシド結合を加水分解する新規酵素であることを明らかにした。本研究では GH13_38 酵素の構造機能相関を明らかにすることを目的として FjGH13_38 と腸内細菌 *Bacteroides salyersiae* 由来の GH13_38 酵素 (BsGH13_38) の X 線結晶構造解析を行った。
[方法・結果] FjGH13_38 と BsGH13_38 の結晶を用いて X 線回析強度測定を行った。位相の決定は各酵素の AlphaFold2 モデルを鋳型に用いた分子置換法により行い、FjGH13_38 と BsGH13_38 の構造をそれぞれ 1.45 および 3.00 Å 分解能で決定した。FjGH13_38 と BsGH13_38 の全体構造は GH13 酵素に共通している$(\beta/\alpha)_8$バレル構造の触媒ドメインを含む 3 つのドメイン A、B、C から構成されていたが、既報の GH13 酵素と比べてドメイン B が長く、基質特異性に影響を及ぼすと考えられた。また、FjGH13_38 に結合しているグルコースは活性部位のサブサイト−2 に相当する部位に結合しており、O4 と O6 の先には糖残基が入りうるスペースは存在しなかった。

Glycoside hydrolase family 13 (GH13) contains starch-active enzymes such as α-amylases and is divided into 47 subfamilies. Previously, we demonstrated that the GH13_38 enzyme (FjGH13_38) from *Flavobacterium johnsoniae* is a novel enzyme with strict recognition for the 6-*O*-α-maltosyl residue and hydrolyzes the α-(1→6)-glucosidic linkage of isopanose and 6-*O*-α-maltosyl-β-cyclodextrin. In this study, we analyzed the crystal structures of FjGH13_38 and its ortholog from *Bacteroides salyersiae* (BsGH13_38) to elucidate the structure-function relationship of GH13_38 enzymes. X-ray diffraction intensity measurements were performed on crystals of FjGH13_38 and BsGH13_38. Phase determinations were performed by molecular replacement method using the AlphaFold2 models, and FjGH13_38 and BsGH13_38 structures were determined at 1.45 and 3.00 Å resolution, respectively. The monomers of FjGH13_38 and BsGH13_38 contain three domains: a $(\beta/\alpha)_8$ barrel catalytic domain A; domain B; domain C. Domain B in these structures was longer than that of the previously reported GH13 enzymes, which may affect substrate specificity. The glucose bound to FjGH13_38 was bound to subsite −2 of the active site and there was no space beyond O4 and O6 where sugar residues could enter.

Starch, glycoside hydrolase family 13, crystal structure

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4D5a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D5 会場

β-1,2-グルカン代謝に関連する Glycoside hydrolase family 1 β-グルコシダーゼの機能と構造
Structure and function of β-1,2-glucan associated Glycoside hydrolase family 1 β-glucosidase
熊倉 悠人[1]、元内 省[1]、中井 博之[2]、○中島 将博[1] ([1]東京理科大・創域理工、[2]新潟大農)
Haruto KUMAKURA[1], Sei MOTOUCHI[1], Hiroyuki NAKAI[2], ○Masahiro NAKAJIMA[1] ([1]TUS, [2]Niigata Univ.)

【背景】β-1,2-グルカンは天然の希少な糖鎖であるが、浸透圧調整、病原因子や共生因子といった重要な役割を担う糖鎖である。近年、配列系統的に新規な β-1,2-グルカンに作用するエンド型酵素が 4 種類発表され、β-1,2-グルカン代謝関連酵素群は自然界に広く分布することが分かりつつある。Glycoside hydrolase family 1 (GH1)は、β-グルコシダーゼを含む最も主要な糖質加水分解酵素のファミリーの一つである。しかし、β-1,2-グルカン関連とされる酵素は報告されていない。本研究では、放線菌由来 GH1 β-グルコシダーゼが β-1,2-グルコオリゴ糖特異的な酵素であることを機能と構造の面から示した。
【方法・結果】大腸菌を宿主として目的の組換え酵素を生産し、精製した酵素を用いた。本酵素の β-結合のグルコ二糖に対する活性を調べたところ、ソホロース (β-1,2)に対して最も高い活性を示し、ラミナリビオースにも(β-1,3)活性を示した。しかし、3 糖以上では β-1,2-グルコオリゴ糖のみに活性を示したことから、本酵素は β-1,2-グルコオリゴ糖を本来の基質とすると考えられる。また、X 線結晶構造解析によりソホロースとの複合体構造の取得に成功した。アミノ酸配列の相同性の点で近縁の酵素との構造比較から、本酵素の基質特異性に重要な構造的要因を明らかにすることができた。

(Objective) β-1,2-Glucans are glucan polymers important for osmo-regulation, pathogenic and/or symbiotic factors and so on. Recently, four phylogenetically new endolytic enzymes acting on β-1,2-glucans have been published, leading to understanding wide distribution of β-1,2-glucan-associated enzymes. Glycoside hydrolase family 1 (GH1) is one of the most major families including β-glucosidases. However, no β-1,2-glucan-associated β-glucosidase has not been reported. In this study, we revealed that a GH1 β-glucosidase from Actinomycetes was specific to β-1,2-glucooligosaccharides biochemically and structurally.
(Results) The target recombinant enzyme was produced using *E. coli* as a host and was successfully purified for investigation. The enzyme showed the highest activity toward sophorose (β-1,2) and comparable activity toward laminaribiose (β-1,2) among β-linked glucodisaccharides. However, the enzyme showed only β-1,2-glucooligosaccharides among glucooligosaccharides with degrees of polymerization 3 and higher. This result suggests that the enzyme is intrinsically a β-1,2-glucan associated enzyme. A complex structure of the enzyme with sophorose was obtained by X-ray crystallography. Comparison of structures with similar enzymes clarified structural factors for the enzyme in this study to achieve preference for β-1,2-glucooligosaccharides.

β-glucosidase, β-1,2-glucan, β-1,2-glucooligosaccharide

発表責任者：中島将博（m-nakajima@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4D5a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D5 会場

α-1,6-Cyclized β-1,2-glucohecadecaose 合成酵素の発見；*Xanthomonas* 属に汎用な新農薬ターゲット

Identification of α-1,6-cyclized β-1.2-glucohexadecaose synthase, the broad-adaptable inhibition target for *Xanthomonas* diseases

○元内 省[1]、今場 司朗[2]、中井 博之[3]、中島 将博[1]([1]東京理科大・創域理工、[2]農研機構、[3]新潟大・農)

○Sei Motouchi[1], Shiro Komba[2], Hiroyuki Nakai[3], Masahiro Nakajima[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]NARO, [3]Niigata Univ.)

【背景】*Xanthomonas* 属は世界の様々な主要作物に対する病原菌を多く含んでいる。*Xanthomonas* 属の様々な感染因子の中で、「α-1,6-cyclized β-1,2-glucohecadecaose (CβG16α)」はその合成の有無が菌の生存に関わらない因子である。したがって、この合成酵素の阻害剤は薬剤耐性菌問題の解決に資する新ジャンル農薬となりうるが、その阻害ターゲットとなる CβG16α 合成酵素は未同定であった。

【方法・結果】本研究では *Xanthomoans campestris* pv. *campestris* 由来 β-1,2-グルカナーゼホモログ（XccOpgD）が β-1,2-グルカンを単独で CβG16α に変換する酵素であると同定した。さらにX線結晶構造解析により得られた基質と酵素の複合体構造から、直鎖状糖鎖が環状化するためのユニークな基質認識機構と糖質加水分解酵素において前例のない糖転移反応機構 (anomer-inverting transglycosylation mechanism) を解明した。以上は、新規阻害剤の設計基盤となるものである。さらに XccOpgD の変異酵素解析とホモログ全体の系統解析により、当酵素ファミリー内での反応産物多様性が示唆された。すなわち、生物間相互作用に関わる新たな生理活性物質が多様に見つかると期待される。

Xanthomonas species contain various plant pathogens toward main crops. Among various pathogenic factors found in *Xanthomonas*, α-1,6-cyclized β-1.2-glucohexadecaose (CβG16α) is the factor that does not cause fertility by its absence. Therefore, discovery of inhibitors of CβG16α synthase will provide new-genre agrichemicals which may answer the issue, antimicrobial resistant bacteria. However, CβG16α synthase was not identified yet.

In this study, we identified the β-1,2-glucansase homolog from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XccOpgD) as the enzyme which alone converts linear β-1,2-glucan into CβG16α. Furthermore, the Michaelis complex (substrate-protein complex structure) of XccOpgD revealed the substrate-recognition mechanism for arranging linear β-1,2-glucan to pre-cyclized form and an unprecedented transglycosylation mechanism for converting β-glycoside bond to α-glycoside one. The structural basis of XccOpgD will provide an inhibition target for its functional homologs to regulate *Xanthomonas* pathogenicity. Furthermore, mutational and sequence analyses of XccOpgD suggest the diversity of rection products related to interactions between organisms in the phylogenetic group of XccOpgD.

Xanthomonas diseases, β-1,2-Glucan, Inverting transglycosylation

発表責任者：中島 将博（m-nakajima@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4D5a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D5 会場

子嚢菌 *Fusarium oxysporum* の GH131 タンパク質の発現系の構築と結晶構造解析
Heterologous expression and crystal structure of a GH131 protein from the ascomycete *Fusarium oxysporum*

○佐野 遼太郎[1]、小薗 拓馬[1]、西河 淳[1]、小松 健[2]、有江 力[2]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大院農応用生命化学、[2]東京農工大院農生物制御科学)
○Ryotaro SANO[1], Takuma KOZONO[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Ken KOMATSU[2], Tsutomu ARIE[2], Takashi TONOZUKA[1] ([1]Applied Biological Chemistry Program, School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Bioregulation Science Program, School of Agriculture, School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

［諸言］ 糖質加水分解酵素ファミリーGH131 に属するタンパク質は、菌類においてセルロースにより産生が誘導される酵素として同定された。すでに構造と機能が解明されている GH131 タンパク質である PaGluc131A は、β-1,3-、β-1,4-、β-1,6-グルコシド結合に対する幅広い加水分解活性を持つことが報告されている。我々は、担子菌 *Coprinopsis cinerea* の GH131 タンパク質 CcGH131A で同様の実験を行ったが、結果は再現性に乏しいものであった。植物病原性子嚢菌 *Fusarium oxysporum* の GH131 タンパク質(FoGH131)は、CcGH131A と配列相同性が 20%と低い。我々は GH131 の構造機能相関を明らかにする目的で、FoGH131 の発現系を構築し立体構造解析を行った。
［方法と結果］ *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* JCM 12575 菌株から FoGH131 の cDNA を取得し、pET28a にクローニングし発現ベクターを作製した。発現ベクターを大腸菌 Origami2(DE3)に形質転換し、N末端に His タグを結合した融合タンパク質として FoGH131 を発現させた。Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーで精製を行い、SDS-PAGE にて単一バンドであることを確認した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。高エネルギー加速器研究機構 PF BL-5A で X 線回折強度測定を行い立体構造を決定した。FoGH131 は GH131 に共通するβ-jelly roll fold をとっていた。他の GH131 の構造と比較することでアミノ酸残基とループの違いなどについて現在解析中である。
[Introduction] GH131 proteins have been identified as proteins induced by the presence of cellulose in fungi. PaGluc131A has been reported to exhibit broad hydrolytic activity against a variety of β-glucans. We performed similar experiments with CcGH131A from a basidiomycete *Coprinopsis cinerea,* but the activity was still not unclear. In this study, a GH131 protein from the plant pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FoGH131; 20% identity to CcGH131A) was investigated.
[Methods and Results] The cDNA of FoGH131 was cloned into pET28a and FoGH131 was expressed in *Escherichia coli*. FoGH131 was purified using Ni-NTA affinity chromatography, resulting in a single band on SDS-PAGE. The enzyme was crystallized, and the diffraction was collected at the beamline BL-5A of KEK PF, and its structure was determined. FoGH131 was composed of a β-jelly roll fold that is commonly found in GH131. Comparison of the structure to those of other GH131 is being performed.

GH131, ß-glucan, Fusarium oxysporum

発表責任者：佐野　遼太郎（s238690q@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：4D5a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D5 会場

結核菌の細胞壁多糖を分解する新規酵素 ExoMA2 の反応機構
Reaction mechanism of the novel enzyme ExoMA2 that degrades cell wall polysaccharides of mycobacteria

○福島 陸[1]、石渡 明弘[2]、鹿島 騰真[1]、宮永 顕正[1,4]、藤田 清貴[3]、伏信 進矢[1,4]([1]東大院・農生科、[2]理研、[3]鹿児島大・農、[4]東大 CRIIM)
○Riku Fukushima[1], Akihiro Ishiwata[2], Toma Kashima[1], Akimasa Miyanaga[1,4], Kiyotaka Fujita[3], Shinya Fushinobu[1,4] ([1]Grad. Sch. of Agricultural and Life Sciences, The Univ. of Tokyo, [2]RIKEN, [3]Faculty of Agriculture, Kagoshima Univ., [4]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

結核菌などの *Mycobacterium* 属細菌は、リポアラビノマンナン(Lipoarabinomannan; LAM)と呼ばれる特徴的な細胞壁多糖を持っている。LAM は環境中での存在比が低い D 体のアラビノースから構成されており、結核菌が宿主の免疫から逃れて病原性を示すために重要な役割を担っている事が知られている。鹿児島大グループは *Microbacterium arabinogalactanolyticum* JCM 9171 から LAM を分解する複数の酵素を発見した。そのうち ExoMA2 はこれまでに報告例のない exo-β-D-arabinofuranosidase 活性を持っている事が分かった。本研究では ExoMA2 の持つ新規の活性についてその構造的基盤の解明を目指した。

ExoMA2 の組換え酵素を結晶化し、分解能 1.35 Å で単糖 β-D-arabinofuranose (β-D-Ara*f*)との複合体構造を決定した。β-D-Ara*f* は基質結合部位の複数のアミノ酸残基と水素結合を形成しており、Asp557 が酸/塩基触媒残基、Glu431 が求核触媒残基として作用する、アノマー保持型の加水分解機構であると示唆された。Asp557、Glu431 の変異体の比活性は野生型に比べて大きく減少しており、ExoMA2 の活性において重要である事が明らかとなった。

Mycobacterium species possess a characteristic polysaccharide called lipoarabinomannan (LAM), which is composed of D-arabinose, which is low in abundance in the environment. LAM is known to be important for *M. tuberculosis* to escape the host's immune response and to become pathogenic. Kagoshima University group discovered several enzymes involved in the degradation of LAM from *Microbacterium arabinogalactanolyticum* JCM 9171. Among them, ExoMA2 was found to possess exo-β-D-arabinofuranosidase activity, which has never been reported before. In this study, we aimed to elucidate the structural basis of the novel activity of ExoMA2.

The recombinant ExoMA2 was crystallized and its complex structure with β-D-arabinofuranose (β-D-Ara*f*) was determined at a resolution of 1.35 Å. β-D-Ara*f* forms hydrogen bonds with multiple amino acid residues in the substrate binding site, suggesting a retaining mechanism in which Asp557 acts as the acid/base catalyst residue and Glu431 as the catalytic nucleophile residue. The activities of the Asp557 and Glu431 mutants were greatly reduced compared to the wild type, indicating that they are important for the activity of ExoMA2.

X-ray crystallography, Glycoside hydrolase, D-arabinan

講演番号：4D5a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D5 会場

ゴマリグナン配糖体加水分解酵素の X 線結晶構造と C 末端ドメインの新奇機能
The Crystal Structure of Sesame Lignan Glycoside Hydrolase and the Novel Function of its C-terminal Domain
○矢内 太朗[1]、高橋 由季乃[1]、坂井 直樹[2]、竹下 浩平[2]、今泉 璃城[1]、松浦 滉明[2]、和氣 駿之[3]、高橋 征司[3]、山本 雅貴[2]、片岡 邦重[1]、中山 亨[3]、山下 哲[1] ([1]金沢大院 自然科学、[2]理研 RSC、[3]東北大院 工)
○Taro YANAI[1], Yukino TAKAHASHI[1], Naoki SAKAI[2], Kohei TAKESHITA[2], Riki IMAIZUMI[1], Hiroaki MATSUURA[2], Toshiyuki WAKI[3], Seiji TAKAHASHI[3], Masaki YAMAMOTO[2], Kunishige KATAOKA[1], Toru NAKAYAMA[3], Satoshi YAMASHITA[1] ([1]Kanazawa Univ., [2]RIKEN RSC, [3]Tohoku Univ.)

ゴマリグナンの一種であるセサミノールは、近年、パーキンソン病予防効果が見出されたため、応用が期待されている。しかし、ゴマ油におけるセサミノール存在量は極めて微量であり、ゴマ種皮に比較的多量に存在するセサミノールトリグルコシド (STG: 2,6-O-di(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosylsesaminol) は難分解性であるため、ヒトが摂取しても有効性を示さずに排出されてしまう。我々は、単独酵素で STG からセサミノールの生産を可能にする β-グルコシダーゼである *Paenibacillus* STG-degrading glucosidase 1 (PSTG1)の酵素科学的解析を行なってきたが、本酵素が如何にして STG に含まれる全てのグルコシド結合を加水分解するかは、未解明である。今回、PSTG1 の X 線結晶構造を決定したところ、本酵素が属する GH3 に見られる 3 ドメイン構造に加えて、C 末端の機能不明の第 4 ドメインが、基質認識機構に関与することが強く示唆された[1]。この末端ドメイン等について、変異型酵素の解析を行なったため、報告する。

Sesaminol, a sesame lignan, is expected to be used in healthcare, due to its potential preventive effects against Parkinson's disease. Sesaminol exists in trace amounts in sesame oil. In contrast, sesaminol triglucoside (STG) is abundantly present in sesame seeds and the oil cake. However, STG is nonfunctional in human body. PSTG1 (*Paenibacillus* STG-degrading glucosidase 1) is a GH3 beta-glucosidase that is capable of hydrolyzing all glucoside bonds in STG. However, the precise mechanism by which PSTG1 hydrolyzes all glucoside bonds in STG has not yet been elucidated. This time, we determined the X-ray crystal structure of PSTG1. Although typical GH3 enzymes have a multi-domain structure up to three domains, PSTG1 had the fourth domain in its C-terminus which is likely to be involved in the substrate recognition mechanism. We also report the mutagenesis studies of the novel C-terminal domain.

1) T. Yanai, Y. Takahashi, E. Katsumura, N. Sakai, K. Takeshita, R. Imaizumi, H. Matsuura, S. Hongo, T. Waki, S. Takahashi, M. Yamamoto, K. Kataoka, T. Nakayama, S. Yamashita, *J. Biochem.* **2023**, *174*, 335-344

β-glucosidase, sesaminol, lignan

発表責任者：山下 哲（yamashita@se.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：4D5a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D5 会場

新奇酵素ガラクトース 2-エピメラーゼの X 線結晶構造とα7-α8 ループ変異酵素の解析

Structure of the novel enzyme galactose 2-epimerase and function of α7-α8 loop mutants

○内山 昌典[1]、佐分利 亘[1]、武井 梓穂[2]、尾瀬 農之[2]、森 春英[1] ([1]北大院農、[2]北大院生命)
○Masaonori UCHIYAMA[1], Wataru SABURI[1], Shiho TAKEDA[2], Toyoyuki OSE[2], Haruhide MORI[1]
([1]Hokkaido Univ. Agriculture, [2]Hokkaido Univ. Life Science)

ガラクトース 2-エピメラーゼ (Gal_2E) は，ガラクトース-タロース間の相互変換 (2-エピメリ化) を触媒する．マンノース 2-エピメラーゼ (ME) と類似した配列を持つが，基質特異性が明確に異なる新奇酵素として我々により見出された．本発表では，Gal_2E の基質特異性に関わる構造の理解を目指し，Gal_2E の X 線結晶構造解析およびα7-α8 ループ変異酵素の解析を行った．

Gal_2E の立体構造を決定し，ME のグルシトール複合体と重ね合わせて比較した．$(\alpha/\alpha)_6$ バレルからなる触媒ドメインおよび活性部位の構造は良く一致した．しかしα7-α8 ループの主鎖構造は異なり，一次構造上では保存される Trp 残基が異なって配置された．ME では Trp251 がグルシトールの 4-H 近傍にあるのに対し，Gal_2E の対応残基 Trp249 はグルシトールの 4-OH と立体障害を生じる位置にあった．W249G 変異酵素では反応速度は低下したものの，基質特異性はほぼ変化しなかった． Trp249 に続く 3 残基を ME の対応残基に置換した変異酵素では，タロースに対する k_{cat}/K_m は顕著に低下し，相対的にマンノースに対する特異性が増大した． α7-α8 ループの構造がタロースおよびガラクトースへの特異性に関与すると示唆された．

Galactose 2-epimerase (Gal_2E) catalyzes the interconversion (2-epimerization) between galactose and talose. Amino acid sequence of this enzyme is similar to that of mannose 2-epimerase (ME) but the substrate specificity is distinctly different. In this study, we determined the crystal structure of Gal_2E and analyzed α7-α8 loop mutant enzymes to understand the structure involved in the novel substrate specificity of Gal_2E.

The structure of Gal_2E was determined and compared with the glucitol complex of ME. The $(\alpha/\alpha)_6$ barrel catalytic domain and active site are structurally well conserved, but the α7-α8 loop differs, and Trp residues conserved in the primary structure are located differently on the loop. In Gal_2E, Trp249 was predicted to cause a steric hindrance on 4-OH of glucitol, whereas the corresponding residue Trp251 in ME is located near the 4-H of glucitol. W249G mutant showed a decrease in reaction rate but retained the substrate specificity. Replacing three residues following Trp249 by the corresponding residues of ME decreased k_{cat}/K_m for talose and increased specificity to mannose. These results suggest the involvement of the α7-α8 loop in the specificity of Gal_2E to talose and galactose.

Carbohydrate epimerase, Galactose 2-epimerase, Talose

発表責任者：内山昌典（uchiyama.masanori.o4@elms.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D5a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D5 会場

イネ GH1 β-グルコシダーゼ TAGG2 の基質アグリコン依存的なグリコシド特異性の各種配糖体と変異酵素を用いた解析

Analysis of aglycone structure-depending glycoside preference of rice GH1 β-glucosidase TAGG2 using various glycosides and the mutants.

○宇野 裕弥、堀越 秀、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Hiroya UNO, Shu HORIKOSHI, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

β-グルコシダーゼは基質の β-グルコシド結合を加水分解する．糖質加水分解酵素群 1（GH1）の β-グルコシダーゼは高度に保存されたグリコン結合部位を有するが，グルコシドに限らず D-フコシド等にも作用する．我々は，イネ由来 GH1 β-グルコシダーゼ TAGG2 がメチル配糖体ではグルコシド，*p*-ニトロフェニル（*p*NP）配糖体では D-フコシドに特異性を示し，そのグリコシド特異性が基質アグリコンに依存することを見出した．本研究では，さらに各種配糖体および TAGG2 変異酵素を用いて解析を行った．

各種配糖体を有機合成あるいは酵素法により合成した．野生型酵素はイソプロピル配糖体および 3-ペンチル配糖体ではグルコシド特異性を示した．一方，3-ヘキシル配糖体，フェニル配糖体およびシクロヘキシル配糖体では D-フコシド特異性を示した．推定アグリコン結合残基の変異酵素のうち T179A は，いずれの配糖体でもグルコシド特異性を示した．以上により，TAGG2 の D-フコシド特異性は，3-ヘキシル基以上の嵩高いアグリコン構造と Thr179 の相互作用に起因すると考えられた．

β-Glucosidases hydrolyze β-glucosidic bond of substrates. Glycoside hydrolase family 1 (GH1) β-glucosidases share the highly conserved glycone-binding site but hydrolyze not only glucosides but also various glycosides including D-fucosides. Rice GH1 β-glucosidase TAGG2 prefers glucoside on methyl glycosides, and D-fucoside on *p*-nitrophenyl (*p*NP) glycosides. In this study, we investigated the glycoside specificity of TAGG2 using glucosides and D-fucosides with various aglycone structures in combination with TAGG2 mutants.

The glycosides used in this study were prepared by organic synthesis and enzymatic synthesis. The glucoside preference was observed on isopropyl and 3-pentyl glycosides, while the D-fucoside preference was observed on 3-hexyl, phenyl and cyclohexyl glycosides. T179A, a possible aglycone-binding residue mutant, showed glucoside specificity on all the glycosides. The results suggest that possible interaction of Thr179 with bulky aglycone structures is involved in the D-fucoside preference of TAGG2.

Glycoside hydrolase family 1, β-Glucosidase, Glycoside specificity

発表責任者：宇野裕弥（hiroyan_uno@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D5a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D5 会場

Rhodothermus marinus 由来セロビオース 2-エピメラーゼにおける還元末端糖残基の 2-OH 基との相互作用残基の反応特異性への寄与の解析
Contribution of the residues of *Rhodothermus marinus* cellobiose 2-epimerase interacting with 2-OH of reducing end sugar residue of substrate to the reaction specificity
○佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) はセロビオースなど β-(1→4)-結合した二糖の還元末端 Glc を Man にエピメリ化する反応を触媒する．本酵素は，このエピメラーゼ反応に高い特異性を示すものの，ごく僅かにケトースへの異性化も触媒する．本研究では，*Rhodothermus marinus* 由来 CE (RmCE) を対象とし，還元末端糖残基の 2-OH との相互作用を担うアミノ酸残基 (Tyr124, Asn196, His200) の反応特異性への寄与を検討するため，飽和変異を導入した変異酵素を解析した．

N196A/G/S/T/V/I および H200K において Glcβ1-4Fru からのセロビオース生成活性が見られた．これらの変異酵素では，Glcβ1-4Man に対するエピメラーゼ反応の k_{cat}/K_m は野生型酵素の 0.00330–0.867% に低下したが，10 mM Glcβ1-4Fru に対するイソメラーゼ反応速度は野生型酵素の 42–580%であった．Glcβ1-4Man に対するエピメラーゼ反応速度に対する Glcβ1-4Fru に対するイソメラーゼ反応速度の比率は，野生型酵素では 0.00443%であったのに対し，各変異酵素では 0.645–166%であった．特に N196V および N196I の上記イソメラーゼ反応速度比率はそれぞれ 166%および 105%と高く，イソメラーゼ反応速度がエピメラーゼ反応速度の同等以上となった．

Cellobiose 2-epimerase (CE) catalyzes the epimerization of reducing end glucose residue of β-(1→4)-disaccharides such as cellobiose to mannose residue. This enzyme is highly specific to the epimerase reaction, but it also slightly catalyzes the isomerization to ketose. In this study, we analyzed mutant enzymes of *Rhodothermus marinus* CE (RmCE) in which saturating mutations were introduced to investigate the contribution of the amino acid residues (Tyr124, Asn196, His200) interacting with 2-OH of the reducing end sugar residue to the reaction specificity.

Cellobiose production from Glcβ1-4Fru was observed in N196A/G/S/T/V/I and H200K. The k_{cat}/K_m values for the epimerase reaction to Glcβ1-4Man and the isomerase reaction rate to 10 mM Glcβ1-4Fru of these mutant enzymes were 0.00330–0.867% and 42–580% of those of the wild type, respectively. The ratio of the isomerase reaction rate to Glcβ1-4Fru to the epimerase reaction rate to Glcβ1-4Man was 0.00443% for the wild type, but 0.645–166% for the mutant enzymes. The isomerase reaction rate ratios of N196V and N196I were particularly high (166% and 105%, respectively), and the isomerase reaction rate of these enzymes was equal to or higher than the epimerase reaction rate.

cellobiose 2-epimerase, epimerization, isomerization

発表責任者：佐分利亘（saburiw@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D5a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D5 会場

シアノバクテリア由来ホスホリラーゼの構造機能解析
Structural and functional characterization of cyanobacterial phosphorylases
生田 あいり、○鈴木 龍一郎、鈴木 英治（秋田県大生物資源）
Airi IKUTA, ○Ryuichiro SUZUKI, Eiji SUZUKI (Akita Prefectural University)

グリコーゲンホスホリラーゼ（Pho; EC 2.4.1.1）は初めて発見されたアロステリック酵素であり、糖転移酵素（GT）ファミリー35（GT35）に属している。GT35Pho は、グリコーゲンおよび澱粉の非還元末端側からα-1,4-結合を加リン酸分解することで分解に関わっている。シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物であり、グリコーゲンまたは澱粉を生産する。グリコーゲン生産種（*Synechococcus elongatus* PCC 7942 株）は GT35Pho 遺伝子を 1 種（Synpcc7942_0244）のみ持つが、澱粉生産種（*Crocosphaera subtropica* ATCC 51142 株）は 3 種（cce_1603、cce_1629、cce_5186）有する。本研究では、アイソザイム間の差異を明らかにするために、触媒特性と結晶構造を解析した。これら 4 種の GT35Pho 遺伝子を大腸菌内で発現させて精製酵素を調製し、カキグリコーゲン（OGG）またはポテトアミロペクチン（PAP）に対するキネティックパラメータを求めた。グリコーゲン生産種由来 GT35Pho は OGG に高い活性を示したが、澱粉生産種由来酵素は PAP を好んでいた。このことから、シアノバクテリアが有する酵素特性と蓄積する多糖構造は相関することが示された。また cce_1603 がマルトヘプタオースと結合した状態の結晶構造を解明し、サブサイト-1～+6 を同定した。

Glycogen phosphorylase (Pho; EC 2.4.1.1) is the first allosteric enzyme and is classified into glycosyl transferase (GT) family 35 (GT35). GT35Pho is involved in degradation of glycogen and starch by catalyzing phosphorolysis of alpha-1,4-linkage. Cyanobacteria are oxygenic photosynthetic bacteria accumulating glycogen or starch in their cells. Glycogen-producing strain (*Synechococcus elongatus* PCC 7942) has single GT35Pho isoform (Synpcc7942_0244), while three isoforms (cce_1603, cce_1629, and cce_5186) are found in starch-producing strain (*Crocosphaera subtropica* ATCC 51142). In this study, to clarify similarity and dissimilarity among these isoforms, biochemical properties of the four isoforms were characterized and crystal structure was solved. Recombinant proteins of these isoforms were overexpressed in *Escherichia coli* cells and purified to homogeneity. Kinetic parameters of the purified enzymes against oyster glycogen (OGG) and potato amylopectin (PAP) were determined. GT35Pho from glycogen-producing and from starch-producing strains showed high activity against OGG and PAP, respectively. These results suggest that catalytic specificities are correlated with produced polysaccharides. In addition, crystal structure of cce_1603 in complex with maltoheptaose identified subsites -1 to +6.

Glycogen, Phosphorylase, Cyanobacteria

発表責任者：鈴木龍一郎（ryuichi@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4D5a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D5 会場

Pseudomonas stutzeri L-ラムノースイソメラーゼの 1-デオキシ希少糖の基質認識の理解
Understanding the recognition of 1-deoxy rare sugar by *Pseudomonas stutzeri* L-rhamnose isomerase based on X-ray structure analyses

○吉田 裕美[1,2]、吉原 明秀[2,3]、何森 健[2,3]、神鳥 成弘[1,2]（[1]香川大・医・総合生命、[2]香川大・国際希少糖研究教育、[3]香川大・農）
○Hiromi YOSHIDA[1,2], Akihide YOSHIHARA[2,3], Ken IZUMORI[2,3], Shigehiro KAMITORI[1,2] ([1]Dept. of Basic Life Sci., Fac. Med., Kagawa Univ., [2]Int'l Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ., [3]Fac. Agric., Kagawa Univ.)

Pseudomonas stutzeri 由来 L-rhamnose isomerase（PsL-RhI）は L-rhamnose と L-rhamnulose 間の異性化反応を触媒するだけではなく、希少糖 D-allose と D-allulose 間の異性化反応も触媒することができ、希少糖生産酵素として報告されている。先行研究において、PsL-RhI に 1-deoxy 3-keto D-allitol を作用させていたところ、ほぼ全てが 1-deoxy D-allulose となっていた。本研究では、1-デオキシ希少糖の基質認識を理解するため、基質の C1 近傍に存在する Trp179 の変異酵素を用いて 1-deoxy 希少糖との複合体構造解析を行うことを目的とした。C 末端に His タグをもつ PsL-RhI 野生型酵素、および変異酵素 W179F, W179A の組換え酵素を調製し、結晶化を行った。得られた結晶に対し、1-deoxy D-allulose, 1-deoxy L-tagatose, D-allulose のソーキングを行い、これらの複合体の結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 PF BL5A にてデータ収集を行った。 PsL-RhI の変異酵素 W179A および W179F のそれぞれについて、1-deoxy D-allulose, 1-deoxy L-tagatose, D-allulose の複合体構造を決定した。発表では、複合体構造解析の結果と合わせて W179 の役割を考察したい。

L-Rhamnose isomerase (L-RhI) reversibly catalyzes between L-rhamnose and L-rhamnulose. L-RhI from *Pseudomonas stutzeri* (PsL-RhI) known as an enzyme for rare sugar production, is also able to reversibly catalyze between D-allose and D-allulose. In our preliminary experiment, 1-deoxy 3-keto D-allitol was almost fully converted to 1-deoxy D-allulose by using the recombinant PsL-RhI. To understand the recognition mechanism of 1-deoxy rare sugars, X-ray structure analyses on PsL-RhI have been done. In this study, mutant enzymes of recombinant PsL-RhI on W179 that is located close to C1 of substrate, were used. Mutant enzymes W179A and W179F were expressed as C-terminal His-tagged protein and purified by affinity chromatography. Crystals were obtained using the sitting drop vapor diffusion method, and the X-ray diffraction data were collected at Photon Factory BL-5A (Tsukuba). The complex structures of PsL-RhI mutants with 1-deoxy D-allulose, 1-deoxy L-tagatose, and D-allulose were determined. In the structure of PsL-RhI W179F/ 1-deoxy D-allulose, O2 and O3 of the substrate interact with structural metal, while in the structure of PsL-RhI W179A/ 1-deoxy D-allulose, O3 and O4 of the substrate interact with structural metal, and O2 and O3 of the substrate interact with catalytic metal in the active site where 1-deoxy D-allulose would be able to be converted to 1-deoxy 3-keto D-allitol. The role of W179 would be discussed based on the X-ray structure analyses of PsL-RhI mutants.

X-ray structure, L-rhamnose isomerase, 1-deoxy rare sugar

発表責任者：吉田　裕美（yoshida.hiromi@kagawa-u.ac.jp）

講演番号：4D5a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 D5 会場

ラフィノース合成酵素の予測立体構造に基づく基質選択機構の推定
Estimation of the mechanism about substrate specificity of raffinose synthase 2
○前田 美紀、戸田 恭子（農研機構・資源研）
○Miki MAEDA, Kyoko TODA (RCGR, NARO)

前回の大会において、農業生物資源ジーンバンクのコアコレクションから顕著に低い RFO（ラフィノースファミリオリゴ糖）含量を示す系統としてツルセンゴク（ダイズコアコレクション ID; GmJMC172）を発見し、この現象が RS2（ラフィノース合成酵素 2）の構造遺伝子中に生じたフレームシフトによるものであることを報告した。本系統の RFO 量の減少はラフィノースではなくスタキオース含量の低下に由来していたことから、ダイズ RS2（GmRS2）は STS 活性を持つのではないかと予想した。この予想を検証するために立体構造予測を行った。RS2 のアミノ酸配列に相同性が検出されたシロイヌナズナαーガラクトシダーゼの立体構造（7EXF）をテンプレートとし、ホモロジーモデリングにより GmRS2 の立体構造を構築した。予測構造中に検出された最大ポケットは W331（欠損により酵素活性が低下する報告のある残基）を含むことから基質結合部位と判定し、この構造に対してガラクチノールとの二者複合体モデル、ガラクチノールとショ糖またはラフィノースを基質とする三者複合体モデルの構築を試みた。得られた二者複合体モデルからガラクチノールのガラクトース部位が W331 と相互作用し得ることが示された。現在のところ精度の高い三者複合体モデルはまだ得られていないが、ポケットの大きさとドッキングポーズの比較から、ショ糖またはラフィノースの一部がポケットから露出している可能性が示唆され、これにより基質選択制が緩くなっていることが考えられる。

GmJMC172, a soybean variety with significantly low RFO (raffinose family oligosaccharide) content, was discovered from the core-collection of the NARO Genebank. This decrease was derived from the stachyose decrease but not raffinose. As mechanism for this phenomenon, we propose a hypothesis, that is soybean RS2 (GmRS2) is an enzyme with dual activities producing raffinose and stachyose. To elucidate this hypothesis, 3D structure prediction was performed by homology modeling technique. The 3D structure of GmRS2 was constructed by homology modeling using the 3D structure (7EXF) of Arabidopsis α-galactosidase, which was detected as having homology to the amino acid sequence of GmRS2, as a template. As a result of molecular docking for binary complex of GmRS2 and galactinol, it was estimated that galactose moiety of galactinol could interact with W331.

raffinose synthase 2, homology modeling, soybean

発表責任者：前田美紀（mmaeda@naro.affrc.go.jp）

講演番号：4D5a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 D5 会場

Paenibacillus 属細菌由来キチンセンサータンパク質の機能解析
Functional analysis of chitin sensor protein from Paenibacillus sp. str. FPU-7
○小川 朋希、伊藤 貴文、日び 隆雄、木元 久（福井県立大 生物資源）
○TOMOKI OGAWA, TAKAFUMI ITOU, TAKAO HIBI, HISASHI KIMOTO (Fukui Prefectural University)

【目的】細菌 *Paenibacillus* sp. FPU-7 (*P.* FPU-7) は、キチンを 2 糖($(GlcNAc)_2$)にまで強力に分解する。そして、2 つの相同な糖質結合タンパク質 NagB1 と NagB2 を用いて、$(GlcNAc)_2$ を細胞表面に捕捉し、細胞質に輸送する。本細菌のゲノムを解析したところ、ヒスチジンキナーゼをコードする *nagS* が *nagB1* 遺伝子の隣に存在していた。本研究では、細菌によるキチンの認識に関する知見を得るために、NagS のセンサードメインのみのタンパク質 ($NagS^{30-294}$) のオリゴ糖認識能を解析した。
【方法】組換えタンパク質 $NagS^{30-294}$、NagB1、NagB2 は、それぞれ大腸菌により調製した。$NagS^{30-294}$ が NagB1 もしくは NagB2 を介して、キチンオリゴ糖を認識しているのか、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび動的光散乱法 (DLS) を用いて解析した。$NagS^{30-294}$ がオリゴ糖を直接認識しているのかについては、示差走査蛍光法 (DSF) により解析した。
【結果】生化学的実験から $NagS^{30-294}$ が NagB1-$(GlcNAc)_2$ 複合体と相互作用することが明らかになった。NagB1 とは対照的に、NagB2 との複合体形成は観察されなかった。また、DSF では、$NagS^{30-294}$ がオリゴ糖を直接結合している結果は得られなかった。

Purpose: We have previously isolated the Gram-positive chitin-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. FPU-7. This bacterium captures chitin disaccharide $(GlcNAc)_2$ on its cell surface using two homologous solute-binding proteins, NagB1 and NagB2. We identified that the *nagS* gene, encoding a histidine kinase, is located next to the *nagB1* gene. To gain insight into the bacterial recognition of chitin oligosaccharides, we analyzed the oligosaccharide recognition of the sensor domain of NagS ($NagS^{30-294}$).
Methods: Gel filtration chromatography and dynamic light scattering (DLS) were employed to confirm that $NagS^{30-294}$ senses chitin oligosaccharides via NagB1 or NagB2. The interactions between $NagS^{30-294}$ and oligosaccharides were confirmed by differential scanning fluorimetry (DSF).
Results: Biochemical experiments revealed that $NagS^{30-294}$ enables to interact with the NagB1-$(GlcNAc)_2$ complex; in contrast to NagB1, no complex formation with NagB2 was observed. Additionally, DSF did not support direct interactions between $NagS^{30-294}$ and oligosaccharides.

Chitin oligosaccharide, Paenibacillus, Sensor histidine kinase

発表責任者：伊藤貴文（ito-t@fpu.ac.jp）

講演番号：4D6a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 D6 会場

新規ヒトビタミン D 標的 non-coding RNA 遺伝子群の同定
A long non-coding RNA as a direct vitamin D target transcribed from the anti-sense strand of the human HSD17B2 locus.
○金本 義明[1,2]、早川 哲[1,2]、澤田 崇広[1,2]、森 甚一[2]、黒川 友博[2,3]、加藤 茂明[1,2,3]([1]医療創生大学健康科学リサーチセンター、[2]ときわ会先端医学研究センター、[3]福島県立医科大学)
○Yoshiaki KANEMOTO[1,2], Akira HAYAKAWA[1,2], Takahiro SAWADA[1,2], Jinich MORI[2], Tomohiro KUROKAWA[2,3], Shigeaki KATO[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Science and Technology, Iryo Sosei University, [2]Research Institute of Innovative Medicine, Tokiwa Foundation, [3]Graduate School of Medicine, Fukushima Medical University)

ヒトゲノム領域の 80%以上で、タンパク質をコードしない non-coding RNA（ncRNA）遺伝子群が無数に産生されることが最近明らかになった。中でも長鎖の ncRNA（lncRNA）は、転写・翻訳・エピゲノム制御等の様々な機能を有することが明らかになりつつある。ncRNA 遺伝子群は RNA ポリメラーゼ II によって転写されるため、ビタミン D 受容体（VDR）の標的遺伝子となりうるが、その存在や機能については不明である。筆者達は、VD 標的 lncRNA の存在とその機能を探る目的に、ビタミン D（VD）応答 lncRNA の検索を試みた。VD 処理した VDR 野生型および欠失型 HaCaT 細胞株を用いて、網羅的トランスクリプトーム解析を行った。VD・VDR 依存的かつ強力に転写誘導される *CYP24A1*（VD 代謝鍵酵素）を指標に、公開ヒトデータベースから 28 個の VD 応答性 ncRNA を見出した。このうちプロモーター領域近傍にコンセンサス VD 応答類似配列（VDRE）と VDR 結合シグナルを有する遺伝子として 4 つの lncRNA が該当した。そのうち 1 つは前立腺癌と関連があるステロイド代謝酵素（*HSD17B2*）遺伝子座のアンチセンスから転写される lncRNA（*AS-HSD17B2*）だった。VD 応答性 *HSD17B2* 転写誘導を確認し、両遺伝子座プロモーター内に存在する VDRE モチーフの性状解析を行なったところ、 VDRE としての機能や内因性 VDR の結合が確認できた。これら lncRNA 遺伝子群は、新たな VD 標的遺伝子群である事を明らかにできた(Kanemoto et al., Bioscience Reports, 2022)。More than 80% of the human genome region encodes numerous non-coding RNA (ncRNA). Among them, long ncRNAs (lncRNAs) are known to elicit various functions such as transcription, translation and epigenetic regulation. ncRNAs transcribed by RNA polymerase II can be target genes of the vitamin D receptor (VDR), although their existence and function remain elusive. We in silico searched for lncRNAs induced by vitamin D (VD) from transcriptome analysis in HaCaT cells with public human database. Using *CYP24A1* (the VD metabolic key enzyme) as a positive marker, we found 28 ncRNA VD target candidates. Among them, four lncRNAs were identified as VD-targets from the databases for consensus VD response elements (VDREs) and VDR binding signals near their promoter regions. One of them, *AS-HSD17B2* is transcribed from the antisense of a steroid metabolizing enzyme (*HSD17B2*) locus associated with prostate cancer. Both genes were responded to VD through VDR and the VDRE motif in the promoter in HaCaT and LNCaP cells. Thus, these findings suggest lncRNAs as one of the VD-responsive target ncRNAs at a transcriptional level.

lncRNA, Vitamin D, Transcriptome

発表責任者：金本義明（ykanemo164@gmail.com）

講演番号：4D6a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D6 会場

ビタミン D 誘導性エンハンサーRNA(eRNA)を介した核内ビタミン D 受容体による転写制御機構の解明

Functional characterization of vitamin D-inducible eRNAs in gene regulation by vitamin D receptor. expression regulated by vitamin D receptors.

早川 哲[1,2]、野尻 光希[1,2]、金本 義明[1,2]、澤田 崇広[1,2]、黒川 友博[2,3]、○加藤 茂明[1,2,3] ([1]医療創生大学　健康科学リサーチセンター、[2]ときわ会先端医学研究センター、[3]福島県立医科大学)

Akira HAYAKAWA[1,2], Koki NOJIRI[1,2], Yoshiaki KANEMOTO[1,2], Takahiro SAWADA[1,2], Tomohiro KUROKAWA[2,3], ○Shigeaki KATO[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Science and Technology, Iryo Sosei University, [2]Research Institute of Innovative Medicine, Tokiwa Foundation, [3]Graduate School of Medicine, Fukushima Medical University)

ヒトゲノム領域の８０％以上からタンパク質をコードしない non-coding RNA(ncRNA)が無数に産生される事が最近明らかになった。ncRNA であるエンハンサーRNA(eRNA)群はスーパーエンハンサー(SE)領域から転写され、染色体上で転写タンパク質群と液液相分離(LLPS)を経て染色体ルーピングにより転写活性化増強が示唆されている。筆者達はこれまでに eRNA の転写機能解明を目指し、ビタミン D（VD）により強力に転写誘導されるヒトビタミン D-24 水酸化酵素遺伝子（CYP24A1:VD 代謝鍵酵素）SE 領域から産生される eRNA 群を同定している（*CYP24A1*eRNA：Kanemoto et al., JNSV, 2021）。また染色体ルーピング制御因子 CTCF・YY1 の VD による *CYP24A1* 転写誘導への鍵である事を報告した。本研究では *CYP24A1*eRNA 群機能解明を目的にこの eRNA コード領域同定をゲノム編集により試みた。まず *CYP24A1* 転写開始点から 50kb, 66kb 下流に VDR 結合領域が存在する事を ChIP-seq で確認した。そこで VD 誘導性 eRNA 群コード領域欠損ヒト皮膚 HaCaT 細胞株（Δ3）及び更に VDR 結合領域を含んだ広領域欠損細胞株(ΔM)を作出したところ、VD による CYP24A1 の転写誘導においてΔ3 細胞株では部分的、ΔM 細胞株では顕著な減少した。一方ΔM 細胞株では、ATAC-seq による染色体構造解析では欠失領域近接領域では大きな高次構造変化は見られなかった事から、*CYP24A1*eRNA の VD 依存的な局所的な高次構造を調節する可能性を示唆するものであった。

Numerous non-coding RNAs(ncRNAs) are transcribed from 80 % of human genome and one class of ncRNAs, enhancer RNA (eRNA), is encoded in the super enhancer (SE) regions, serving as an epigenetic factor by chromatin looping via LLPS complex formation with the other transcription factors. To uncover unknown function of eRNAs in gene regulations, we are characterizing vitamin D-inducible eRNAs produced from the SE region of the CYP24A1 (a critical VD catabolism enzyme). Chromatin looping on the CYP24A1 SE was verified in HaCaT cells by si-Knockdown of CTCF and YY1, that are fundamental factors for looping. In this study, we have tried to narrow down the SE regions to identify the key eRNA(s) by genetic deletion of the regions by genome editing. By ChIP-seq, VDR was found to associated with the regions 50 and 66kd downstream from the TSS. By deletion of this VDR binding region（Δ3）and the wider region containing the VD-inducible eRNAs coding region (ΔM) in human keratinocyte cells (HaCaT), VD-induced CYP24A1 expression was found to be lowered partially in Δ3 but remarkably in ΔM cells. No alteration in surrounding regions of the deleted regions by ATAC-seq suggests that VD-induced chromatin reorganization is locally regulated by VD-induced eRNAs.

eRNA, Vitamin D, CYP24A1

発表責任者：加藤茂明（shigeaki.kato@isu.ac.jp）

講演番号：4D6a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D6 会場

PGC1α は神経筋接合部の形成に重要な Dok-7 の発現を正に制御する

PGC1α positively regulates Dok-7 expression important for neuromuscular junction formation

○酒巻 千広[1]、杉本 拓海[1]、木村 徳士[1]、江口 貴大[2]、三浦 進司[3]、亀井 康富[1]([1]京都府大院、[2]国立長寿研、[3]静県大院)
○Chihiro Sakamaki[1], Takumi Sugimoto[1], Tokushi Kimura[1], Takahiro Eguchi[2], Shinji Miura[3], Yasutomi Kamei[1] ([1]Kyoto Prefectural University, [2]National Center for Geriatrics and Gerontology, [3]University of Shizuoka)

【背景・研究目的】超高齢社会を迎えた我が国において健康寿命の延伸は重要な課題である。運動神経と骨格筋線維との間に形成される神経筋接合部 (NMJ) は加齢によって形成が悪化し、運動機能が低下することが知られている。NMJ の骨格筋側で発現する Dok-7 は欠損によって、NMJ の構造が失われるため NMJ 形成に Dok-7 は重要である。また、運動によって骨格筋で発現が増加する転写共役因子として PGC1α が知られている。一方で、運動によって NMJ の形態が改善されることは知られているが、どのような経路で生じるかは解明されていない。そこで、PGC1α を骨格筋でのみ過剰発現したマウスと欠損したマウスを用いて、PGC1α が Dok-7 の発現や NMJ の形態に与える影響を検討した。
【結果・考察】遺伝子改変マウスを用いた解析から PGC1α は Dok-7 の発現を調節していることが分かった。また、PGC1α 過剰発現マウスでは、アセチルコリン受容体の構造が大きくなり、欠損マウスでは小さくなっていた。また、Dok-7 のプロモーター活性は、PGC1α と核内受容体 ERRα の共過剰発現で大きく増加した。最後に運動によって生理的に PGC1α の発現を増加させたところ Dok-7 の発現が増加していた。ここから、PGC1α は Dok-7 の発現を増加させることで運動を介した NMJ の形態改善に関わっていることが示唆された[1] (下図)。

The neuromuscular junction (NMJ)—formed between a motor nerve terminal and skeletal muscle fiber—plays an important role in muscle contraction and other muscle functions. Aging and neurodegeneration worsen NMJ formation and impair muscle function. Downstream of tyrosine kinase-7 (Dok-7), expressed in skeletal muscle fibers, is essential for the formation of NMJ. Exercise increases the expression of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC1α) in skeletal muscles and restores NMJ formation. In this study, we used skeletal muscle-specific PGC1α overexpression or knockout mice to examine the role of PGC1α in regulating Dok-7 expression and NMJ formation. Our findings revealed that Dok-7 expression is regulated by PGC1α, and luciferase activity of the Dok-7 promoter is greatly increased by co-expressing PGC1α and estrogen receptor-related receptor α. Finally, physiologically increased PGC1α expression by running increased Dok-7 expression. Thus, PGC1α suggest involved in exercise-mediated restoration of NMJ formation by increasing Dok-7.

[1] Scientific Reports in press

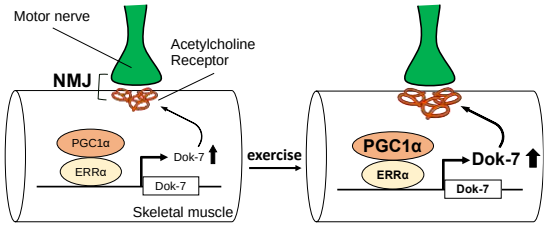


Fig. PGC1α positively regulates Dok-7 expression

PGC1α, NMJ, Dok-7

発表責任者：亀井康富（Kamei@kpu.ac.jp）

講演番号：4D6a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D6 会場

転写因子 POU2F3 による 2 型味細胞分化誘導のメカニズム解明
Elucidating the mechanism of type 2 taste cells differentiation by a transcription factor POU2F3
○大原 麻美絵[1]、竹村 孝一[1]、松井 伸祐[1]、渡邉 晴也[2]、米谷 達哉[1]、千葉櫻 拓[2]、今井 啓雄[3]、岩槻 健[1] ([1]東農大応生、[2]東農大生命科学、[3]京大進化研)
○Mamie OHARA[1], Koichi TAKEMURA[1], Shinsuke MATSUI[1], Seiya WATANABE[2], Tatsuya KOMETANI[1], Taku CHIBAZAKURA[2], Hiroo IMAI[3], Ken IWATSUKI[1] ([1]The Tokyo univ. Agri. Applied Biosciences, [2]The Tokyo univ. Agri. Life Sciences, [3]The Kyoto univ.)

【目的】味細胞と tuft 細胞は、細胞構造や発現遺伝子において類似性が多く性質が似た化学受容細胞と考えられている。Ⅱ型味細胞（うま味、甘味、苦味受容細胞）および tuft 細胞に共通して発現する転写因子 POU2F3 (POU domain class 2 homeobox 3)は、これらの細胞分化に必須であることが Pou2f3 欠損マウスの解析により明らかとなっている。しかし、Ⅱ型味細胞および tuft 細胞の分化制御において POU2F3 がどのように機能しているかは分かっていない。そこで本実験では、マウスの実験結果をもとに、霊長類オルガノイド培養系と遺伝子編集技術を組み合わせ、細胞分化における POU2F3 の機能を解明することを目的とした。【方法】サル味蕾オルガノイドから抽出した RNA から POU2F3 をクローニング後、レンチウイルスベクターに挿入し、ウィルス粒子にパッケージングを行い HT1080 細胞にてウィルス活性を確認後、サル味蕾オルガノイドへ感染させた。【結果】ウィルスを HT1080 細胞に感染後、ウェスタンブロットおよび免疫染色により POU2F3 の発現を確認した。同様に、サル味蕾オルガノイドへの感染と POU2F3 の発現を確認した。現在、POU2F3-KO サル味蕾オルガノイドを構築中であり、POU2F3 を再導入・強制発現させた際の遺伝子発現変動を調べる予定である。

【Purpose】Taste cells and tuft cells are chemosensory cells that are similar in terms of structure and gene expression. Type Ⅱ taste cells (umami, sweet, and bitter cells) and tuft cells both express a transcription factor POU domain class 2 homeobox 3 (POU2F3). Although the gene has been shown to be essential for cell differentiation by analyses of Pou2f3-KO mouse model, the function of the molecule during cell differentiation is still unknown. Therefore, in this experiment, we aim to analyze the function of POU2F3 using monkey taste organoid by gene editing techniques. 【Method】We first cloned POU2F3 gene from the monkey, prepared Lentiviruses carrying full length of POU2F3 with HA-tag and then infected the virus to taste organoids. 【Result】Both Lentiviral infected HT1080 cells and taste organoids expressed POU2F3 protein which was detected by Western blotting and immunohistochemistry. We are now generating POU2F3-KO taste organoids to analyze POU2F3 function as a transcription factor. By infecting the Lentivirus carrying POU2F3 gene to POU2F2-KO cells, we will examine if a reversion event, i.e. a taste cell differentiation, occurs or not.

POU2F3, Organoid, Differentiation

発表責任者：岩槻　健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：4D6a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D6 会場

高嗜好性食品摂取による快情動産生機序の組織学的解析

Understanding mechanisms underlying the induction of positive emotion by feeding palatable food

○相原 史佳、福山 雄大、程 曦、喜田 聡（東大院農）
○Fumika AIHARA, Yudai FUKUYAMA, Xi CHENG, Satoshi KIDA (The Univ. of Tokyo)

食物に対する嗜好性は我々の食行動を制御する一因である。最近の解析でマウスでは甘味がポジティブな情動を産生することが明らかにされた。一方、恐怖や不安などのネガティブな情動産生機構については研究が進展しており、この情動産生を担う扁桃体における局所回路が詳細に解析されている。しかし、ポジティブな情動産生機構の解明は進展していない。我々のグループでは、マウスではチーズが高嗜好性を示すこと、また、チーズ摂食によりポシティブな情動が産生されることを本大会で発表している。以上より、本研究では、高嗜好性の食物摂取によりポジティブな情動が産生される神経基盤を解明すること目的として、情動産生を司る扁桃体を中心にして島皮質、分界条床核においてポジティブな情動を産生するニューロン集団の同定とその性状解析を試みている。絶食したマウスに通常餌あるいはチーズを 30 分間給餌して、この 60 分後に神経活動依存的遺伝子発現マーカーである c-Fos の発現量を免疫組織染色法により解析した。その結果、チーズ摂食後に通常餌摂取に比較して扁桃体中心核内 CeC、CeM、CeL 領域、島皮質 VISC 領域内 Layer5、GU 領域内 Laye2 と 3 と Layer5、さらに AIP 領域内 Layer5、また、分界条床核内 OV 領域と rh 領域において有意に高い c-Fos 発現が観察された。続いて、高い嗜好性を示すスイートチョコレート（SC）あるいは低い嗜好性を示すビターチョコレート（BC）摂食後の c-Fos 発現を同様に解析した結果、通常餌摂取に比較して、SC 摂食後にはチーズ摂食に類似して扁桃体中心核 CeC、CeM、CeL 領域、島皮質 VISC 領域 Layer5、GU 領域 Laye2 と 3 と Layer5、AIP 領域 Laye2 と 3 と Layer5、分界条床核 al 領域において有意に高い c-Fos 発現が観察されたが、BC 摂食後には c-Fos 発現に差異は観察されなかった。以上より、チーズや SC 摂食時のポジティブ情動産生にこれらの領域が関与していると考えられた。現在、扁桃体中心核においてチーズ摂取後に c-Fos 発現が誘導されるニューロン集団の性状解析を行っている。

The purpose of this study is to understand the mechanisms for the generation of positive emotion by feeding palatable foods such as cheese and sweet chocolate in mice. Mice fed cheese or sweet chocolate showed induction of c-fos expression in the sub-regions of the central nucleus in the amygdala, sub-regions in the medial insular cortex, and the bed nucleus of the stria terminals compared to mice fed a normal diet. In contrast, no c-fos induction was observed in these brain regions when mice were fed bitter chocolate with low valence. We suggest that these brain regions play critical roles in the generation of positive emotion following feeding food with high valance.

positive emotion, palatable food, mice

講演番号：4D6a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D6 会場

cAMP 情報伝達過活性化を原因とする心的外傷後ストレス障害（PTSD）の分子機構
Molecular mechanisms for re-experiencing symptoms of PTSD by over-activation of cAMP signaling pathway

○石川 理絵[1]、長葭 大海[1]、福島 穂高[2]、Zhuo Min[3]、岡本 賢一[3,4]、喜田 聡[1]（[1]東大院農、[2]東農大生命科学、[3]トロント大医、[4]マウントサイナイ病院ルーネンフェルド・タネンバウム研）
○ Rie ISHIKAWA[1], Taikai NAGAYOSHI[1], Hotaka FUKUSHIMA[2], Min ZHUO[3], Kenichi OKAMOTO[3,4], Satoshi KIDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, [3]Univ. of Toronto, [4]Mount Sinai Hospital)

心的外傷後ストレス障害（PTSD）は恐怖記憶を代表とするトラウマ記憶を原因とする精神疾患であり、その主症状は再体験症状（自発的なトラウマ記憶想起；フラッシュバック）である。近年の大規模ゲノム解析から、PTSD の発症機序には遺伝的要因も含まれることが示唆されている。一方、我々は cAMP 情報伝達経路の活性化によって海馬依存的記憶想起が促進されることを発見した。本発表では、PTSD の再体験症状が cAMP 情報伝達経路の活性化と関連することを報告する。再体験症状を示す PTSD 患者とマウス PTSD モデルとのトランスクリプトーム解析から、cAMP 情報伝達の活性化と PTSD の再体験症状の関連性が見出された。そこで、マウスにおける恐怖記憶想起に対する cAMP 情報伝達経路の役割を薬理学的・光遺伝学的に解析した。恐怖記憶想起前に cAMP 量の増加を導くホスホジエステラーゼ 4 阻害剤、または、cAMP 量の低下を導くアデニル酸シクラーゼ 1 阻害剤を腹腔内投与した結果、恐怖記憶想起とその後の恐怖記憶の保持がそれぞれ促進あるいは障害されることが示された。光依存的に cAMP を産生または分解する光プローブ（bPAC または LAPD）を発現するウイルスを野生型マウス海馬に注入し、海馬に 30 分間光照射した結果、薬理学的解析と同様に恐怖記憶想起と保持がそれぞれ促進または障害された。さらに、海馬 CA1 領域に対する 30 分間の光照射による光プローブの操作により、cAMP により活性化される A キナーゼの標的である CREB のリン酸化（pCREB）レベルも有意に増加または低下すること、すなわち、光操作により cAMP 情報伝達が上方または下方制御されることも示した。トランスクリプトーム解析結果も併せて、PTSD 主症状である再体験症状は cAMP 情報伝達過活性化によるトラウマ記憶想起異常を原因とすると結論した。
Re-experience of traumatic events (flashback) is a main symptom of PTSD. Our previous study demonstrated that memory retrieval is facilitated by the activation of the cAMP signaling pathway. In this study, we investigated molecular mechanisms of re-experiencing symptoms of PTSD. Transcriptome analyses of PTSD patients and mouse models showed the implication of overactivation of the cAMP signaling pathway and re-experiencing symptoms. We found that pharmacological and optogenetic upregulation or downregulation of the cAMP signaling pathway enhanced or impaired, respectively, the retrieval and subsequent maintenance of fear (traumatic) memory in mice. Taken together, we concluded that overactivation of the cAMP signaling pathway causes re-experiencing symptoms of PTSD by enhancing retrieval of traumatic memory.

PTSD, cAMP, fear memory

発表責任者：石川理絵（aishikawa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4D6a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D6 会場

高嗜好性食物を摂食するエピソード記憶形成に対する海馬の役割の解析

Roles of the hippocampus in the generation of episodic memory of feeding palatable food

○高島 咲希、桑鶴 良文、喜田 聡（東大院農）
○Saki TAKASHIMA, Yoshifumi KUWATSURU, Satoshi KIDA (The Univ. of Tokyo)

ヒトでは高嗜好性食物の摂取は快（ポジティブ）情動を誘導し、情動産生を伴う摂食経験エピソード（食記憶）はその後の摂食行動を認知制御すると考えられる。しかし、食経験のエピソード記憶による認知食行動制御のメカニズムは不明である。一方、海馬は恐怖記憶や社会記憶などエピソード記憶制御に中心的な役割を果たしている。本研究では、高嗜好性食物の食経験エピソード記憶制御に海馬機能が重要な役割を果たしていると仮説し、この記憶制御に対する海馬の役割を解明することを目的とした。我々は、これまでの報告で、嗜好性（食物価値）の高い食物としてチーズを同定し、チーズ摂食によりポジティブな情動が産生されることを明らかにしている。そこで、マウスに新規空間において高嗜好性食物であるチーズを連日摂食させた場合の行動と、このエピソード時の海馬における神経活動活性化による遺伝子発現を解析した。絶食させたマウスを底面 50 cm 四方、高さ 40 cm の箱（オープンフィールド装置）内を５分間自由探索させた後、通常飼料（Normal food 群）またはチーズ（Cheese 群）を装置の中央区画に提示して 30 分間自由摂食と自由探索させるトレーニングを３日間繰り返した（day 1、day 2、day 3 群）。対照群として食物を提示しない No food 群を設けた。その結果、Cheese 群のみ食物を提示しない５分間の自由探索中の中央区画滞在率が day 1 から day 3 にかけて有意に上昇し、マウスがチーズの存在場所を記憶していたことが示唆された。続いて、この記憶形成に対する海馬の役割を検証するために、免疫組織染色法を用いて海馬 CA1 領域における神経活動依存的 c-fos 発現を解析した結果、Cheese day 2 群では No food day2 群に比べて c-fos 陽性細胞数が有意に多く観察された。以上の結果から、新規空間において高嗜好性食物であるチーズを摂食するエピソード記憶が形成されること、さらに、この記憶形成に対する海馬の関与が示唆された。

The purpose of this study is to investigate the formation of episodic memory of feeding palatable food (cheese) and the involvement of the hippocampus in this memory formation. To do this, mice were fed cheese or normal chow that were placed in the center region of a novel open field once a day for 3 consequence days and assessed time spent in this center region. Mice-fed cheese showed significant increases in the time spent in the center region on day 3 compared to day 1 and c-fos expression in the hippocampal CA1 region on Day 2 compared to the control group. These results suggest that the episodic memory of feeding cheese was formed and the hippocampus played an important role in this memory formation.

episodic memory, hippocampus, palatable food

講演番号：4D6a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D6 会場

生体由来マスト細胞における接着分子 CD103 の発現調節機構

Regulatory mechanisms of expression of adhesion molecule CD103 in peritoneal mast cells

○石井 健大、長田 和樹、西山 千春（東理大院先進工生命システム）
○Kenta ISHII, Kazuki NAGATA, Chiharu NISHIYAMA (Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

マスト細胞（MC）は IgE 受容体を発現し、アレルギー反応において中心的な役割を果たす白血球である。生体内では、局在部位によって異なる性質をもつ結合組織型と粘膜型の 2 種の亜群が存在する。消化管に局在する粘膜型 MC は、接着分子 CD103 を発現しており、そのリガンドである E-カドヘリンとの相互作用を介して粘膜面に結合する。インテグリンαE はインテグリンβ7 と共に CD103 を構成する分子であるが、その転写調節機構の詳細は不明である。以前、我々はマウス骨髄由来 MC（BMMC）において TGF-β刺激により粘膜型への分化の誘導を促進すること、転写因子 GATA2 と PU.1 が CD103 発現をそれぞれ負と正に制御することを報告した。一方、BMMC は人工的に誘導した細胞であることから、MC の正しい理解には生体内で成熟した MC の利用が望まれる。そこで本研究ではマウス腹腔浸潤細胞（PEC）に含まれる MC を用い、インテグリンαE の転写調節機構を解析するとともに、TGF-β と転写因子の関係性の解析に取り組んだ。PEC に TGF-β刺激を行い、mRNA 量を測定した結果、インテグリンαE をコードする *Itgae* 遺伝子の mRNA レベルの上昇が確認された。また、PEC を IL-3、SCF 存在下で 14 日培養することによって腹腔マスト細胞（PMC）を濃縮・調製し、siRNA 導入によるノックダウン（KD）を行った。その結果、GATA2 KD の PMC において *Itgae* mRNA 量が増加し、PMC の *Itgae* mRNA 量は TGF-β刺激によっても増加することが判明した。以上より、PMC において、インテグリンαE 発現は TGF-β刺激により発現が誘導され、GATA2 によって発現抑制されることが明らかとなった。

Mast cells (MCs), which express FcεRI, the high affinity receptor for IgE, play key roles in IgE-dependent allergic responses. Previously, we reported that expression of adhesion molecule CD103 was induced in bone marrow-derived MCs by GATA2 knockdown (KD) or TGF-β treatment but suppressed by PU.1 KD. In the present study, we used MCs contained in freshly isolated mouse peritoneal cells to exclude the effects of artificial phenotypes in BMMCs. When peritoneal cells were treated with TGF-β, mRNA levels of *Itgae*, a gene encoding integrin αE, which forms CD103 as a heterodimer with integrin β7, were upregulated. We also performed a knockdown experiment using peritoneal MCs, which were enriched by 14-days culture in the presence of IL-3 and SCF, and we found that *Itgae* mRNA levels were increased in *Gata2* siRNA-introduced and/or TGF-β-stimulated peritoneal MCs.

Mast cell, CD103, TGF-β

発表責任者：西山　千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4D6a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D6 会場

核内受容体 NR4A3 は樹状細胞の転写調節を制御し、その欠損は接触性皮膚炎の緩和と乾癬の増悪化をもたらす

NR4A3 deficiency ameliorate contact hypersensitivity and deteriorate psoriasis by affecting transcriptional regulation of dendritic cells.

○片桐 万由佳[1]、伊藤 直人[1]、南川 夏己[1]、長田 和樹[1]、吉村 昭彦[2]、西山 千春[1] ([1]東理大院先進工生命システム、[2]慶大医)
○ Mayuka KATAGIRI[1], Naoto ITO[1], Natsuki MINAMIKAWA[1], Kazuki NAGATA[1], Akihiko YOSHIMURA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Dept. Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci, [2]Keio Univ. Sch. Med)

私達はこれまでに、核内受容体スーパーファミリーに属する NR4A3 の全身欠損マウスに皮膚疾患の病態モデルを展開し、接触性皮膚炎の発症や病態が顕著に抑制される一方、乾癬が有意に増悪化することを見出し報告してきた。いずれの病態にも関わる免疫細胞として樹状細胞(DC)に着目し解析したところ、NR4A3 Knockout (KO)DC では分化成熟が遅延傾向にあり、接触性皮膚炎誘導剤ハプテン取り込み後に本来発現上昇するはずのケモカイン受容体 CCR7 の発現が抑制され、乾癬誘導剤イミキモドの受容体である TLR7 の発現レベルが亢進していることが判明した。そこで今回、DC の機能変化が病態変化の要因であることを検証するため DC 移入実験を行うと共に、NR4A3 KO が CCR7 や TLR7 の発現変化をもたらす転写調節機構の解析を行った。NR4A3 KO と野生型(WT)マウスより調製した DC をハプテン処理後にマウス耳皮内に移入したところ、WT、KO、いずれのマウスとも WT DC 移入群ではハプテン経皮感作後に顕著な耳介の腫れが引き起こされたのに対し、KO DC 移入群では KO マウスはもとより WT マウスにおいても腫れの減弱化が確認された。TLR7 リガンドである R848 で処理した KO DC を耳皮内に移入した C57BL/6 マウスでは、移入翌日をピークに耳介の肥厚が引き起こされた一方、WT DC 移入群では有意な変化は認められなかった。KO DC において転写因子 IRF4 の発現レベルが低下していたことから、レトロウイルスベクターを用いた過剰発現を行ったところ、KO DC の成熟遅延と CCR7 発現低下が IRF4 ベクター導入によりいずれも回復した。更に、R848-TLR7 経路活性化亢進に関連して KO DC では転写因子 IRF7 と IFN-βの発現が上昇していることが判明し、siRNA 導入や ChIP assay の実験から NR4A3 KO は転写因子 PU.1 の機能亢進を介して IRF7 発現上昇させると共に、IRF7 や IRF3 の IFN-β遺伝子へのリクルートを促進させていることが示唆された。

NR4A3 is a transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily. To reveal the roles of NR4A3 in skin diseases, we utilized contact hypersensitivity (CHS) and imiquimod-induced psoriasis models to *Nr4a3*$^{-/-}$ mice. In CHS model, ear swelling was significantly reduced in *Nr4a3*$^{-/-}$ mice, accompanied with suppressed migration of dendritic cells (DCs), in which CCR7 expression was reduced. In contrast, ear swelling in psoriasis were enhanced in *Nr4a3*$^{-/-}$ mice. The expression levels of inflammatory cytokines in psoriasis skin lesion and in TLR7-ligand stimulated DCs were increased by NR4A3 deficiency. Subcutaneous (s.c.) injection of hapten-treated *Nr4a3*$^{+/+}$ DCs restored ear swelling in *Nr4a3*$^{-/-}$ mice, and s.c. injection of R848-stimulated *Nr4a3*$^{-/-}$ DCs caused significant ear swelling. *Nr4a3*$^{-/-}$ DCs expressed lower levels of CCR7 and IRF4, and higher levels of TLR7, IRF7, PU.1, and IFN-β compared with *Nr4a3*$^{+/+}$ DCs. Taken together, NR4A3 deficiency ameliorates CHS and deteriorates psoriasis by affecting the expression of CCR7, TLR7, and related transcription factors in DCs.

dendritic cell, nuclear receptor, tlr7

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4D6a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D6 会場

筋再生過程における酸化ステロール受容体 LXR の新規機能解析

Novel functional analysis of oxysterol receptor LXR during muscle regeneration

○髙瀬 飛天[1]、清水 誠[2]、堂前 純子[3]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1]、佐々木 崇[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]お茶大・基幹研究院、[3]中部大院・応生)
○Hayataka TAKASE[1], Makoto SHIMIZU[2], Sumiko DOHMAE[3], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1], Takashi SASAKI[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ, [3]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ)

骨格筋は体重の約 40%を占める最大の臓器であり、運動やエネルギー代謝の役割を担う一方で、加齢による筋肉の量的質的な低下(サルコペニア)はフレイルを加速させる。筋肉の機能低下は運動耐容能の低下に直結し、健康寿命の短縮を招く。筋肉の機能維持には筋再生能力の恒常性が重要であるが、加齢に伴い筋再生能力は低下するため、筋再生メカニズムの解明は喫緊の課題の 1 つである。これまで我々は、マウスの筋再生モデルを用いて、筋再生過程に酸化ステロール受容体である LXR (Liver X Receptor)の標的遺伝子が顕著に発現上昇し、LXR の活性化が骨格筋細胞の炎症を緩和することを示した。LXR は主にコレステロール代謝や炎症応答を制御する転写因子であるが、骨格筋における LXR 及びその標的遺伝子の機能は不明な点が多い。本研究では、骨格筋における LXR 及びその標的遺伝子である ABCA1(ATP-binding cassette transporter A1)の機能解析を実施した。その結果、LXR の活性化はタンパク合成のシグナルである mTOR 経路を亢進させ、タンパク合成量を有意に増加させることを明らかとした。また、ABCA1 欠損マウスでは筋再生遅延が認められた。以上の結果より、筋再生における LXR-ABCA1 経路の重要性が示された。

Skeletal muscle is the largest organ, accounting for about 40% of the human body weight, and its role in exercise and energy metabolism contributes to our health. Age-related quantitative and qualitative decline of muscles (sarcopenia) accelerates frailty. This decline in muscle function is directly related to a decrease in exercise tolerance and shortens healthy life expectancy. Keeping muscle regenerative capacity is important in maintaining muscle function, since muscle regenerative capacity declines with aging, elucidation of detailed mechanisms of muscle regeneration is considered one of the most pressing issues. Using a mouse model of muscle regeneration, we have found that the target genes of the LXR, an oxysterol receptor, is markedly upregulated during muscle regeneration, and exhibited anti-inflammatory effect on skeletal muscle cells. In this study, we analyzed the function of LXR and its target gene ABCA1 in skeletal muscle. The results showed that activation of LXR significantly enhanced the mTOR pathway, a signal for protein synthesis. In addition, ABCA1-knockout mouse showed delayed muscle regeneration. Taken together, our results suggest that LXR-ABCA1 axis is important for muscle regeneration.

skeletal muscle, cholesterol, muscle regeneration

発表責任者：高瀬飛天（hayataka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4D6a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D6 会場

前頭前野における新規食物摂食経験を記憶するエングラムニューロンの発見

Memory engram neurons store memory for novel food in the medial prefrontal cortex

○福山 雄大[1,2]、石川 理絵[1]、山本 航史[1]、喜田 聡[1] ([1]東大院農、[2]学振特別研究員)
○Yudai FUKUYAMA[1,2], RIE ISHIKAWA[1], KOJI YAMAMOTO[1], SATOSHI KIDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]JSPS Research Fellowship for Young Scientists)

食行動は体内エネルギーの必要性に基づく代謝制御と食物の摂食経験記憶（食記憶）に基づく認知制御を受けるが、認知食行動制御機構の解明は進んでいない。本研究では、食記憶による認知食行動制御の神経基盤の解明を目指している。我々は、マウスの食物新奇性恐怖課題では、新規食物の２回目呈示時に初回呈示時と比較して摂食量の増加が観察され、摂食経験の記憶により食物新奇性恐怖が減弱することを報告してきた。そこで、本発表では、この課題を用いて新規食物の食記憶を貯蔵する脳領域、さらに、この領域内で食記憶を貯蔵する記憶エングラムニューロンを同定することを目的とした。昨年度までの本大会では、新規食物としてチーズを用いた食物新奇性恐怖課題ではチーズ摂食経験により新奇性恐怖の減弱が観察されること、神経活動マーカーc-fos の発現解析とその後の数理学的な解析、さらには、タンパク質合成阻害剤を用いた介入解析から、前頭前野 PL 領域が食記憶貯蔵において中心的な役割を果たすことが示唆されることを報告した。本年度は、脳搭載型顕微鏡を用いて摂食中の前頭前野ニューロンの神経活動の Ca^{2+}ライブイメージングを実施して、食記憶貯蔵に対する前頭前野ニューロンの役割を解析した結果を報告する。Ca^{2+}ライブイメージングにより、前頭前野には摂食中に神経活動が増加するニューロン集団が存在することが示された。さらに、通常餌とチーズ摂食時のニューロンの神経活動を測定した結果、通常食とチーズ摂食時に神経活動が増加するニューロンがそれぞれ観察された。興味深いことに、初めてのチーズ摂食時にその神経活動が増加したニューロンはその後のチーズ再摂食時にも継続して神経活動が増加することが示された。以上までの結果から、前頭前野には食物摂食経験を記憶し、その食物の再摂食時に神経活動が再活性化するニューロン集団、すなわち、食物を記憶する食記憶エングラムニューロンが存在することが強く示唆された。

In the food neophobia task, the memory is formed for the experience of feeding novel food (food memory). To understand the mechanisms for the storage of food memory, we tried to identify food memory engram neurons in the brain. We found that significant increases in expression of c-fos were observed in the PL of the medial prefrontal cortex (mPFC) following feeding novel food (cheese) and that inhibiting protein synthesis in the mPFC blocks the increases in cheese consumption following the first experience of feeding it, suggesting the mPFC plays a critical role in novel food memory. In this current study, Ca^{2+} live imaging in the moving mice showed that mPFC reveals distinct neuron populations responding to feeding familiar or novel food (cheese), respectively. Our findings suggest that food memory engrams are generated in the mPFC following the first experience of feeding novel food.

memory, feeding, mPFC

発表責任者：喜田 聡（akida@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4D6a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D6 会場

時間帯依存的記憶想起制御に対する海馬グリコーゲンホスホリラーゼの役割の解析
Understanding the roles of glycogen phosphorylase in the hippocampus in the time-dependent regulation of memory retrieval
○張 思南、ボーグ ジェームス、喜田 聡 (東大院農)
○Sinan ZHANG, James Borg, Satoshi Kida (The Univ. of Tokyo)

グルコースはニューロンのエネルギー源であり、その枯渇は脳機能に影響する。一方、我々はマウスの海馬依存的な記憶想起能力がサーカディアン制御を受け、時間帯依存的（明期開始後 10 時間付近；ZT10）に低下することを明らかにした（Hasegawa et al., Nat, Commun.,2019)。本研究では、この低下の原因として、ニューロンに対するエネルギー供給低下が関連すると仮説して、グルコースを供給するグリコーゲンホスホリラーゼに着目し、記憶想起に対するグリコーゲンホスホリラーゼ阻害の影響を解析した。社会的認知記憶課題では、記憶評価対象の成熟マウスに幼若マウスを 24 時間間隔で３分間２回提示し（トレーニングとテスト)、この間の社会行動時間の低下を指標として社会記憶を評価する。また、トレーニング時に対するテスト時の社会行動時間の比（Recognition Index）を算出し、記憶の強さを評価する。昨年度の本大会では、ZT10 にトレーニングを行い、テスト前にグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤（CP-316819）を腹腔内投与すると想起の阻害が観察され、一方、ZT4 でトレーニングを行い、テスト前にこの阻害剤を腹腔内投与した場合には想起の阻害は観察されないことを報告した。本年度は、社会記憶想起は海馬による制御を受けることから、海馬に阻害剤を注入することで、海馬におけるグリコーゲンホスホリラーゼの役割を解析した結果を中心に報告する。ZT10 でトレーニングを行い、テストの 2 時間前にこの阻害剤（1000pmol あるいは 1400pmol）を海馬 CA1 領域に注入した結果、対照群と阻害剤投与群において社会記憶が認められたものの、阻害剤投与群では有意に高い Recognition Index が観察され、阻害剤の海馬注入による想起の障害が示された。以上の結果から、マウスが示す ZT10 付近の想起能力低下の一因として海馬におけるグリコーゲンからのグルコース供給量の低下が関係することが示唆された。Mice show time-dependent memory retrieval impairment around ZT10. The purpose of this study is to understand the roles of glycogen phosphorylase in this time-dependent regulation of memory retrieval that requires the function of the hippocampus. Our previous study showed that systemic injection of glycogen phosphorylase inhibitor (CP-316819) before the retrieval test at ZT10, but not ZT4, impairs memory retrieval. In this study, we found that the micro infusion of this inhibitor into the hippocampus CA1 area before the retrieval test impaired memory retrieval when the test was performed at ZT10. Our findings suggest the impaired memory retrieval around ZT10 is due to reduced glucose supply from glycogen in the hippocampus.

glycogen phosphorylase, memory retrieval, time-dependent regulation

講演番号：4D6a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 D6 会場

Caenorhabditis elegans の生殖線発達におけるヒストンバリアント H2A.Z の機能解析
Roles of the histone variant H2A.Z in gonad development of *Caenorhabditis elegans*
○堀井 菜摘[1]、北川 紗帆[2]、原田 昌彦[1] ([1]東北大院農、[2]金沢大ナノ生命)
○Natsumi HORII[1], Saho KITAGAWA[2], Masahiko HARATA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kanazawa Univ.)

近年のエピジェネティック研究により、ヒストンバリアントが遺伝子発現や細胞の発生・分化のエピジェネティック制御に重要な役割を持つことが明らかになってきた。ヒストンバリアント H2A.Z は真核生物において進化的に保存されており、細胞の発生や分化を含むエピジェネティック制御機構に重要な影響を及ぼすことが示唆されている。しかし、マウスなどの脊椎動物では H2A.Z をノックアウトすると胚性致死となるため、多細胞生物における H2A.Z の機能解析は困難であり不明な点が多い。本研究では、オーキシン誘導デグロンシステム（AID）や RNAi 法を用いて、線虫の H2A.Z 機能を全身あるいは生殖腺特異的にノックダウンする方法を確立した。全身で H2A.Z をノックダウンすると生殖腺に異常が生じ、異常な核内有糸分裂（Emo）や生殖腺の雄性化（Mog）の表現型を示した。同様に、オスの線虫を全身ノックダウンすると、精子形成に異常が観察された。さらに、H2A.Z ノックアウト個体では、減数分裂期にいくつかの異常が観察された。これらの結果は、H2A.Z が線虫の正常な生殖腺形成において必須な機能を有しており、減数分裂の維持にも重要な役割を果たしていることを示唆している。

Recent molecular epigenetic research has revealed that histone variants have important roles in the epigenetic regulation of gene expression and cell development and differentiation. The histone variant H2A.Z is evolutionarily conserved in eukaryotic organisms and is suggested to exert significant influences in epigenetic phenomena, including cell development and differentiation. However, since conventional knockout of H2A.Z induces cell lethality, the functions of H2A.Z in multicellular organisms are largely unknown. In this study, we established a method to knockdown the H2A.Z function in *C. elegans* in a whole-body or a gonad-specific manner using the auxin-induced degron system (AID). The knockdown of H2A.Z in the whole body resulted in abnormalities in the gonads and exhibited the Endomitotic oocyte (Emo) and the Masculinization of the germline (Mog) phenotypes. Similarly, when male nematodes were subjected to whole-body knockdown, abnormalities in spermatogenesis were observed. Furthermore, the knockout of the H2A.Z gene induced several abnormalities in the meiosis phase. These findings suggest that H2A.Z is essential for normal gonad development in *C. elegans* and plays a significant role in the maintenance of meiosis.

Caenorhabditis elegans, histone variant, H2A.Z

講演番号：4D7a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 D7 会場

麹菌ハイドロフォビン RolA の自己組織化経路とその制御機構の解明
Elucidation of the self-assembly pathway and its control mechanism of hydrophobin RolA from *Aspergillus oryzae*

○高橋 尚央[1]、寺内 裕貴[2]、田中 拓未[3]、吉見 啓[4]、藪 浩[5]、阿部 敬悦[1]([1]東北大院農、[2]山口大中高温研、[3]阪大院工、[4]京大院地環学、[5]東北大 AIMR)
○Nao Takahashi[1], Yuki Terauchi[2], Takumi Tanaka[3], Akira Yoshimi[4], Hiroshi Yabu[5], Keistsu Abe[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]RCTMR, Yamaguchi Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [4]Grad. Sch. Glob. Env. Stud., Kyoto Univ., [5]WPI-AIMR, Tohoku Univ.)

糸状菌(カビ)は地球上に 150 万種以上存在し、高い高分子分解能で地球の物質循環に寄与している。糸状菌は細胞表層をハイドロフォビン(HP)と呼ばれる両親媒性タンパク質で被覆することで細胞表層を疎水的に改質し、分生子の気中分散性や菌糸の固体表面への接着性を高めている。HP は分生子表面では自己組織化して rodlet と呼ばれるアミロイド様の多量体構造を形成することがあり、HP は rodlet 状態になることで表面疎水改質能が高まる。したがって HP の自己組織化は生物学的に重要であるといえるが、詳細な自己組織化機構はほとんど不明である。本研究では、麹菌由来 HP のひとつである RolA について、構造観察・分光計測を介してその自己組織化経路を推定した。

まず、Rodlet に結合して強い蛍光を発する蛍光プローブ Thioflavin T を用いて RolA の自己組織化を経時的に追跡した。また、円二色性スペクトル測定による二次構造変化の解析、原子間力顕微鏡を用いた自己組織化構造の観察も実施した。その結果、RolA はモノマーからオリゴマーへ、そして最終的に rodlet を形成するという自己組織化経路を辿ることが示唆された。興味深いことに、オリゴマーが形成される反応は反応系内に親水-疎水界面が存在する場合のみ進行した。RolA はオリゴマー形成段階での制御によって、界面上でのみ自己組織化するという性質を発現していることが示唆された。

Filamentous fungi make their cell-wall surface hydrophobic by coating it with amphiphilic proteins called hydrophobin (HP). This modification enhances the airborne dispersion of the conidia and the adhesion of the hyphae to a solid surface. Some HPs self-assemble to form rod-like multimeric structures called rodlet on the cell-wall surface. Because the rodlet layer is more hydrophobic than a simple molecular membrane of HP, self-assembly of HPs is biologically important. However, the detailed process of the self-assembly of HPs remains unclear. In this study, we analyzed the self-assembly mechanism of RolA, an HP isolated from *Aspergillus oryzae*. RolA self-assembly was followed over time using the fluorescence probe Thioflavin T. Secondary structure change was analyzed by the circular dichroism spectra measurements, and self-assembled structures were observed using atomic force microscope. These analyses revealed that RolA self-assembly progresses from monomer to rodlet via oligomer. Interestingly, oligomerization did not progress without air-water interface. Thus, the property that RolA self-assembles only at the interface seems to be regulated by the oligomerization step at the interface.

Aspergillus oryzae, Self-assembly, Bio-surfactant

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：4D7a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 D7 会場

耐性機構から紐解く節足動物由来抗菌ペプチドの作用メカニズム

The mode of action of an arthropod antimicrobial peptide based on the mechanism of resistance

○下田 蒼[1]、小川 拓也[2]、川本 純[2]、戸部 隆太[1]、栗原 達夫[2]、米山 裕[1] ([1]東北大院農、[2]京大院農)
○So SHIMODA[1], Takuya OGAWA[2], Jun KAWAMOTO[2], Ryuta TOBE[1], Tatsuo KURIHARA[2], Hiroshi YONEYAMA[1] ([1]The Univ. of Tohoku, [2]The Univ. of Kyoto)

抗菌ペプチド（Antimicrobial peptides, AMPs）は幅広い動植物や微生物が有する抗菌因子であり、次世代抗菌化合物として注目を集めている。節足動物由来の AMP である persulcatusin（IP）は、グラム陽性菌に対する高い抗菌活性をもち、これまでの解析から細胞膜傷害に加えて、細胞壁合成阻害に関連した作用メカニズムを有する可能性が示唆された。そこで本研究では、黄色ブドウ球菌の IP 耐性変異株を用いて IP に対する耐性機構を解析することにより、IP の抗菌作用メカニズムの解明を試みた。

IP に対する耐性化に伴う細胞膜の変化について i) 細胞膜リン脂質組成、ii) 細胞膜カロテノイド産生、iii) 細胞膜流動性 を解析した。IP 耐性変異株の細胞膜リン脂質組成は親株と有意な差は認められなかった。一方、IP 耐性変異株は菌体色調が変化しており staphyloxantin および 4,4’-diaponeurosporene などカロテノイドの産生量が増加していた。また、膜環境感受性蛍光色素 Laurdan を用いて細胞膜流動性を解析した結果、IP 耐性変異株は親株および他の薬剤耐性変異株よりも膜の流動性が低下しており、細胞膜が固くなっていることが明らかとなった。以上の結果から、IP 耐性変異株はカロテノイド産生量および膜流動性の変化により IP の抗菌作用を回避していることが考えられた。このことから IP の抗菌作用メカニズムとして膜流動性の変化を惹起することにより、細胞壁合成等に関連する膜タンパク質の機能障害が作用機構であることが示唆された。

Antimicrobial peptides (AMPs) are promising next- generation antimicrobial agents. An arthropod AMP persulcatusin (IP) has potent antimicrobial activity against AMR bacteria, such as methicillin- resistant *Staphylococcus. aureus* (MRSA). Our previous study suggests that IP has an activity related to inhibition of cell-wall biosynthesis in addition to bacterial cytoplasmic membrane damage. In this study, we attempted to elucidate the antibiotic mechanism of IP by analyzing the IP resistant mutant in *S. aureus*. We analyzed the changes in the cytoplasmic membrane with IP resistance such as i) phospholipid composition, ii) membrane carotenoid production, and iii) membrane fluidity. There is no significant difference in phospholipids between the IP resistant mutant strain (IPR) and the parental strain. However, the production of carotenoids such as staphyloxanthin and 4,4’-diaponeurosporene was increased in IPR, and the membrane fluidity of IPR was lower than that of the parental strain. From these results, it was clarified that carotenoids and membrane fluidity contributed to IP resistance in *S. aureus*. Namely, it was suggested that IP induced changes in membrane fluidity caused dysfunction of the cell- wall biosynthesis system.

antimicrobial peptide, mode of action, *Staphylococcus aureus*

発表責任者：下田蒼（so.shimoda.t7@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4D7a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 D7 会場

クライオトラップ法によるセルロース分解酵素 BcsZ の反応中間体構造解析
Structure analysis of reaction intermediates of cellulose hydrolase BcsZ by cryo-trapping method

○高崎 佑也[1]、藤原 孝彰[1,2]、南後 恵理子[1,2] ([1]東北大院理、[2]東北大多元研)
○Yuya Takasaki[1], Takaaki Fujiwara[1,2], Eriko Nango[1,2] ([1]The Univ. of Tohoku, [2]Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku Univ.)

酢酸菌などの一部の微生物は、細胞外多糖としてセルロースを合成する。エンドグルカナーゼ BcsZ は、細胞外に適切に輸送されないセルロースを分解して品質を保つ働きがあると考えられている。QM/MM シミュレーションによる先行研究では、BcsZ による加水分解反応過程において、糖のコンフォメーションが ${}^{2}S_{O}\rightarrow{}^{2,5}B\rightarrow{}^{5}S_{1}$ の 3 つの状態を経ることが示された[1]。変異体酵素と糖鎖基質との複合体構造から ${}^{2,5}B$ と ${}^{5}S_{1}$ の状態は観測されている[2][3]。しかし、${}^{2}S_{O}$ の状態は未だ実験的に観測されていない。そこで我々は X 線結晶構造解析により、反応中間体 ${}^{2}S_{O}$ を捉えることで、BcsZ の反応機構の全容を解明することを目的とした。異なる複数の条件で BcsZ の結晶を得た後、結晶に cellopentaose をソーキングすることで糖鎖との複合体結晶を作成した。構造解析の結果、中性 pH 条件では、加水分解された後の糖鎖が活性部位に結合していた。一方、塩基性 pH 条件では、${}^{2}S_{O}$ の状態と考えられる糖鎖が結合しており（Fig. 1）、提案された反応機構を支持する結果となった。

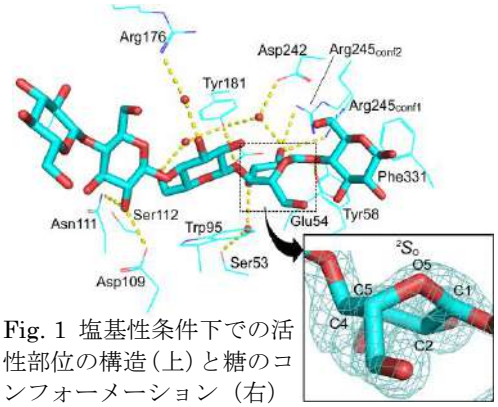


Fig. 1 塩基性条件下での活性部位の構造（上）と糖のコンフォーメーション（右）

Some microbes, including *Acetobacter* genera, synthesize cellulose as an extracellular polysaccharide. BcsZ, the endo-β-1,4-glucanase, plays a crucial role in maintaining the quality of cellulose by trimming cellulose transported improperly to the extracellular milieu. QM/MM simulation suggested that the conformation of the sugar changes in the order ${}^{2}S_{O}$, ${}^{2,5}B$, and ${}^{5}S_{1}$ during the reaction for BcsZ [1]. The ${}^{2,5}B$ and ${}^{5}S_{1}$ conformations have been elucidated by the structure analysis using mutant enzymes bound to substrates [2][3], while the ${}^{2}S_{O}$ conformation has not yet been observed. We aimed to elucidate the reaction mechanism of BcsZ by capturing the ${}^{2}S_{O}$ by X-ray crystallography. The substrate-bound forms of BcsZ were obtained by soaking BcsZ crystals grown in different reservoir conditions in a cellopentaose solution. Under the neutral pH condition, the degraded substrate was bound to the substrate binding cleft. On the other hand, the substrate with the ${}^{2}S_{O}$ was bound to the substrate binding cleft under the basic pH condition (Fig. 1), supporting the proposed reaction mechanism of BcsZ.

[1] M. A. B. Morais, *et al.*, *Nat. Commun.*, **12**, (2021). [2] D. M. A. Guérin, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **316** (2002). [3] T. Fujiwara, *et. al.*, *Acta Cryst.* **D78**, (2022).

cellulose, X-ray crystallography, reaction intermediate

発表責任者：高崎佑也（yuya.takasaki.r6@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4D7a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 D7 会場

The anti-COVID-19 function research of lectins from microalgae.

○ZHENGGUANG WANG (Graduate School of Agricultural Science,Tohoku University.)

【Introduce】Lectin is a group of proteins or glycoproteins with ability to bind carbohydrate molecules. It is known that some microalgae lectins have ability to recognizes coronavirus spike protein and inhibit infection. For example, MVL lectin, Griffithsin (GRFT) lectin and Cyanovirin-N(CV-N) lectin have been applied to the treatment of envelope virus, especially on HIV. Covid-19 and HIV are both belongs to envelope virus, and based on the same principle, microalgae lectins may also can be used as a natural anti-coronavirus drug in future clinical treatment.

The purpose of this experiment is to identify more lectins with antiviral activity and develop new antiviral drugs to face the future epidemic crisis. For this purpose, we prepared recombinant microalgae lectins and investigated the interaction mechanism with Covid-19 spike proteins by Surface plasmon resonance (SPR) method.

【Methods】In silico method (Alphafold2 and ZDOCK) was used to screen candidate lectins from microalgae, which may interact with COVID-19 spike proteins. The lectins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) for purification. Meanwhile, receptor binding domain (RBD) of spike proteins including variants and human Angiotensin Converting Enzyme 2 (hACE2), receptor of the virus, were expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells for purification. Ultimately, the interactions between lectins and spike proteins were analyzed by SPR using purified proteins.

【Results】Through structure prediction and docking study, we identified 12 lectins with potential antiviral ability. Especially, the docking study indicates that MVL may interact with spike proteins in protein-protein interactions in addition to its interaction with glycans. Among them, MVL, Griffithsin and other lectins were expressed in *E. coli* and purified. As for the Covid-19 mutations, 4 kinds of RBD (Alpha, Delta, Omicron and Original) and hACE2 receptor expressed in HEK293T mammalian cell. According to the results of SPR, the recombinant lectin MVL and the natural lectin VEC-L (Jacalin type) from *Artocarpus altilis* can bind to the RBD proteins, and the affinity of VEC-L lectin is higher than that of MVL. Moreover, the affinity between VEC-L lectin and spike proteins is Delta has the highest affinity, Original higher than Alpha, and Omicron has the lowest affinity, which is same with MVL lectin. The structure and binding ability of lectins against COVID-19 spike proteins will be discussed in this presentation.

Lectin, Covid-19, Anti-coronavirus

講演番号：4D7a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 D7 会場

プロテオーム解析によるヒ素凝集タンパク質の同定
Identification of Arsenic-Aggregating Proteins through Proteome Analysis
○河合 野間 繁子[1]、大塚 康児[1]、後藤 千穂[1]、丹羽 達也[2]、田口 英樹[2]、神谷 克政[3]、佐藤 成樹[4]、田中 佑樹[5]、小椋 康光[5]、梅野 太輔[6]([1]千葉大工、[2]東工大生命理工、[3]神奈川工大、[4]千葉大理、[5]千葉大薬、[6]早大理工)
○Shigeko Kawai-Noma[1], Koji Otsuka[1], Chiho Goto[1], Tatsuya Niwa[2], Hideki Taguchi[2], Katsumasa Kamiya[3], Nariki Sato[4], Yuki Tanaka[5], Yasumitsu Ogura[5], Daisuke Umeno[6] ([1]Chiba Univ. Eng., [2]Tokyo Institute of Technology, [3]Kanagawa Institute of Technology, [4]Chiba Univ. Sci., [5]Chiba Univ. Pharm. Sci., [6]Waseda Univ.)

ヒ素は地球上に普遍的に存在する毒性の高い元素であり、システイン（Cys）と結合親和性が高く、タンパク質を凝集に導くことが我々の最近の研究成果も含め知られている。しかし、ヒ素により凝集するタンパク質に関する情報は限られており、その凝集メカニズムはわかっていない。そこで本研究では、ヒ素凝集性を示すタンパク質を網羅的に探索し、ヒ素によるタンパク質凝集の分子機構の解明を目指した。まず、モデル生物である大腸菌の全タンパク質（約 4000 種）に対して LC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った。その結果、23 種の As(Ⅲ)凝集候補タンパク質を同定した。これらの内、タンパク質発現系の構築が完了した 21 種のタンパク質を各々発現させた大腸菌破砕液を用いて、ヒ素との混合溶液における沈殿画分の SDS-PAGE と ICP-MS 測定を行い、21 種全てがヒ素凝集候補タンパク質であることを多角的に明らかにした。これら 21 種は、機能的な相互の関係がないタンパク質であった。アミノ酸含有率の統計解析から、Glu や Lys といった荷電側鎖を有するアミノ酸が多く、Phe,Tyr,Trp のような疎水性側鎖を有する芳香族アミノ酸が少ないという分子的特徴があることが示された。この分子的特徴の抽出は、これまでシステインとの結合しか報告のなかったヒ素とタンパク質の分子相互作用において、新たな知見をもたらした。
Arsenic is a highly toxic element to have a high binding affinity for cysteine (Cys), leading to protein aggregation. However, the aggregation mechanism is unknown. In this study, our objective was to comprehensively identify proteins undergoing arsenic-induced aggregation and elucidate the associated molecular mechanisms. First, we performed proteome analysis using LC-MS/MS on all proteins (about 4000 species) of E. coli. As a result, we identified 23 As(III) aggregation candidate proteins. Subsequent verification through SDS-PAGE and ICP-MS measurements of precipitate fractions, obtained from mixtures with arsenic using E. coli lysates expressing each of the 21 proteins, confirmed their candidacy for As(III) aggregation. Interestingly, these 21 proteins exhibited no discernible functional relationship to one another. Statistical analysis of amino acid content unveiled a distinct molecular characteristic: an enrichment of amino acids with charged side chains, such as Glu and Lys, coupled with a reduction in aromatic amino acids possessing hydrophobic side chains, such as Phe, Tyr, and Trp.

Arsenic, Protein aggregation, proteome

発表責任者：河合（野間）繁子（kawai-noma@chiba-u.jp）

講演番号：4D7a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 D7 会場

甲殻類の赤色色素凝集ホルモンのレトロインベルソペプチドの化学合成と機能解析
Chemical synthesis and function of retro-inverso peptide of crustacean red pigment-concentrating hormone

○片山 秀和[1]、古川 雄裕[2]、竹内 梨乃[2]、筒井 直昭[2]、山根 史裕[3]、大平 剛[4]([1]東海大工、[2]三重大院生資、[3]三重栽培セ、[4]神奈川大理)
○ Hidekazu KATAYAMA[1], Takahiro FURUKAWA[2], Rino TAKEUCHI[2], Naoaki TSUTSUI[2], Fumihiro YAMANE[3], Tsuyoshi OHIRA[4] ([1]Tokai Univ., [2]Mie Univ., [3]Mie Prefectural Fish Farming Center, [4]Kanagawa Univ.)

クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* は日本において盛んに養殖されていることから、メスの人為催熟に有用な性成熟誘導ホルモン剤の開発が望まれている。甲殻類の赤色色素凝集ホルモン(RPCH)は、8 アミノ酸からなるペプチドであり、体色を制御する機能を有している。近年、RPCH が、メスの卵巣成熟を抑制する機能を示すことが明らかになった。そのため、RPCH アンタゴニストがメスの性成熟誘導ホルモン剤の候補分子になりうると考えられる。

レトロインベルソペプチドは、ペプチドのアミノ酸配列を逆転させ、かつすべてのアミノ酸を D-アミノ酸にしたペプチドのことである。このようなペプチドは、元のペプチドの分子と側鎖が同じ方向に配向し、元のペプチドと同様の立体構造を有しているため、受容体と結合し、アンタゴニスト活性を示す可能性があると考えられる。そこで本研究では、RPCH のレトロインベルソペプチドを化学合成し、それが RPCH のアンタゴニストになりうるかを検証することを目的とした。本発表では、そのデザイン、化学合成および機能解析について、詳細に報告する。

In is known that the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, is aquacultured actively in Japan, and it is, therefore, desired to develop a sexual maturation-inducing hormone agent useful for artificial maturation. Crustacean red pigment-concentrating hormone (RPCH) consists of 8 amino acid residues, and it controls the body color in nature. In the recent studies, it has been demonstrated that RPCH suppresses the vitellogenesis in female animals. Therefore, RPCH-antagonist might be a good candidate for the artificial sexual maturation-inducing hormone agent.

Retro-inverso peptides possess reversed sequences and chirality compared to the parent molecules, and this subclass of peptides maintains an identical array of side chains. Therefore, it might have a potential to bind to RPCH receptor as an antagonist. In this study, we aimed to synthesize retro-inverso peptides of RPCH and verify whether these peptides could act as antagonists of RPCH. We will present the design, chemical synthesis and functional evaluation of RPCH retro-inverso peptides in detail.

Marsupenaeus japonicus, Red pigment-concentrating hormone, Retro-inverso peptide

発表責任者：片山　秀和（katay@tokai-u.jp）

講演番号：4D7a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 D7 会場

麹菌 *A. oryzae* の酸性ハイドロフォービン HypG および融合酵素の精製と物性解析

Purification and physical property analysis of acidic hydrophobin HypG and fusion enzyme in *Aspergillus oryzae*

○増子 綾乃[1,2]、錦見 京樹[1,2]、藤原 里緒[1,2]、中島 春紫[1,2] ([1]明大、[2]農化)
○Ayano MASHIKO[1,2], Keiju NISHIKIMI[1,2], Rio FUJIWARA[1,2], Harushi NAKAJIMA[1,2] ([1]Meiji Univ., [2]agricultural chemistry)

ハイドロフォービンは糸状菌・担子菌が生産する両親媒性の低分子量タンパク質であり、気中菌糸や胞子の表層で整列して自己集合することにより菌体に撥水性を付与している。

演者らは、これまでに麹菌 *Aspergilus oryzae* のゲノムから 10 個のハイドロフォービン遺伝子(*hypA-J*)を単離し、それぞれの発現時期や局在部位が異なることを観察している。HypG は 106 アミノ酸から構成される pI 3.88 の酸性タンパク質であり、菌糸の表面に局在する。

ハイドロフォービンが有する吸着性などのユニークな物性の応用を目的に、HypG および加水分解酵素 N-acetylglucosaminidaise (NagA)の C 末端に HypG を連結した融合酵素 NagA-HypG を高生産する麹菌 *A. oryzae* 株を構築し液体培養を行った。HypG については、凝集を避けるために TritonX-114 を用いた水性二相分配(ATPS)法を用いて濃縮し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製に成功した。水接触角測定等により、吸着能等のハイドロフォービンとしての物性を確認した。一方、NagA-HypG についても酵素活性を保持した生産を確認した。陰イオン交換クロマトグラフィー等による精製を行い、NagA 単体との物性比較を行って、HypG 融合の効果について検討を進めている。

Hydrophobin is an amphiphilic low molecular weight protein produced by filamentous fungi and basidiomycetes, and provide water-repellent properties to fungal cells by aligning and self-assembling on the surface layer of airborne hyphae and spores.

So far, the presenters have isolated 10 hydrophobin genes (*hypA-J*) from the genome of *Aspergilus oryzae*, and observed that each gene has a different expression time and localization site. HypG is an acidic protein with pI 3.88, consisting of 106 amino acids, localized on the surface of hyphae. For the purpose of applying the unique physical properties such as adsorption of hydrophobin, we have developed *A. oryzae* strain that produces a high concentration of HypG and the fusion enzyme NagA-HypG, which is HypG linked to the C-terminus of the hydrolase N-acetylglucosaminidaise (NagA). HypG was concentrated using a TritonX-114-based aqueous two-phase (ATPS) system to avoid aggregation, and was successfully purified by anion exchange chromatography. By measuring the water contact angle, the physical properties of hydrophobin such as adsorption capacity were confirmed. On the other hand, the production of NagA-HypG retained enzyme activity was confirmed. We are investigating the effects of HypG fusion by purifying by anion exchange chromatography and comparing the physical properties of NagA.

Aspergillus oryzae, hydrophobin, purification

講演番号：4D7a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 D7 会場

超好熱性サチライシン様プロテアーゼの大量生産系の開発
Development of overproduction system of a hyperthermophilic subtilisin-like protease
○上原 了[1]、西崎 柊登[1]、雨坂 心人[2]、高野 和文[2]、松村 浩由[1]、田中 俊一[2]([1]立命館大・院生命、[2]京都府大・院生環)
○ RYO UEHARA[1], SHUTO NISHIZAKI[1], HIROTO AMESAKA[2], KAZUFUMI TAKANO[2], HIROYOSHI MATSUMURA[1], SHUNICHI TANAKA[2] ([1]Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Ritsumeikan, [2]Grad. Sch. of Life Env. Sci. , Kyoto Pref Univ.)

TKSP は *Thermococcus kodakarensis* KOD1 が分泌する高い安定性を有するサチライシン様セリンプロテアーゼで、高濃度の界面活性剤・変性剤存在下で活性を有し、医療器具に付着した難分解性の病原タンパク質の除染のため洗剤への利用が検討されている。一方で、TKSP は細胞毒性を持つため大腸菌における発現量が低く、大量生産方法が無いことが産業化のボトルネックである。

TKSP は不活性な前駆体として発現し、N 末端のプロドメイン（TKSPpro）が阻害剤として働く。自己切断後に TKSP は TKSPpro から解離し、細胞内タンパク質を攻撃することで細胞毒性を示す。本研究では TKSP の発現量を改善するため、細胞内における活性制御に取り組んだ。TKSP を発現する大腸菌において、TKSPpro やホモログタンパク質のプロドメイン（TKSpro）を過剰発現させると、TKSP の収量は 5 倍まで増加した。興味深いことに、TKSPpro よりも TKSpro の TKSP に対する阻害活性は高く、X 線結晶構造解析では TKSP の S1 サブサイトに結合するアミノ酸残基の違いが活性阻害に重要であることが示唆され、細胞毒性を抑制するタンパク質設計の指針が得られた。さらに現在取り組んでいるカルシウムを利用した活性制御についても発表する。

TKSP is a hyperstable subtilisin-like serine protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. TKSP is highly active in the presence of surfactants and denaturants, and therefore is supposed to be useful for medical detergents to remove proteolysis-resistant pathogenic proteins from the instruments. However, the expression level of TKSP in *E. coli* is extremely low due to the severe cytotoxicity, which is the bottleneck for the industrial applications.

As with other subtilisin-like proteases, TKSP is produced as an inactive precursor including the N-terminal prodomain (TKSPpro), which acts as a specific inhibitor towards the protease domain. Cleavage of the peptide bond between TKSPpro promotes the release of active TKSP, resulting in degradation of cellular proteins. To enhance the yield of TKSP, we challenged to repress the cytotoxicity caused by the protease activity. We found that an excessive expression of TKSPpro and its homologue (TKSpro) increased the yield of TKSP by 5-fold. The crystal structures of TKSP and the prodomains revealed that TKSpro tightly bound to the S1 subsite of TKSP as compared with TKSPpro, suggesting that these interactions at this pocket are essential for the inhibition.

Subtilisin, Propeptide, Maturation

発表責任者：上原了（ueharar@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4D7a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 D7 会場

タンパク質性足場 CutA1 を利用したナノバイオ界面における高次構造体の設計と利用
Design and utilization of higher-order structures at the nano-biointerface using the proteinaceous scaffold CutA1

○今中 洋行、川上 達磨、光成 麻耶、今村 維克（岡山大環生自科）
○ Hiroyuki IMANAKA, Tatsuma KAWAKAMI, Maya MITSUNARI, Koreyoshi IMAMURA (Okayama Univ.)

標的分子を特異的に捕捉する分子認識素子を固体基材上に固定化する技術は*in vitro*での生体分子間相互作用検出や機能性ナノバイオ界面の構築において極めて重要である．我々の研究グループでは，超好熱アーキア*Pyrococcus furiosus*由来CutA1の極めて安定な3量体基本構造を利用した生体分子固定化配向制御技術の開発を進めてきた．高い構造安定性を有するCutA1は，固体表面上にリガンド分子を機能性を維持しつつ提示するための足場分子として，多様な変異導入の適用が期待できる．本研究では，CutA1に剛直で安定な構造ドメインであるCoiled-coil及び自発的にイソペプチド結合を形成するSpyTag/SpyCatcherシステムを適用したタンパク質性高次構造体構築によるナノバイオ界面の高機能化について検証した．*Archaeoglobus fulgidus*由来Esterase (EstAf)の固定化では，ナノバイオ界面におけるEstAfの三次元的配置により高密度化が図れること，リガンド分子としてStrepTagIIを固定化した場合は，リガンドをナノレベルで配置改変させることで相互作用における立体障害が緩和され，相互作用検出感度が向上することがわかった．

The immobilization of molecular recognition elements on solid substrates that specifically capture target molecules is quite important for the detection of biomolecular interactions *in vitro* and the construction of functional nano-biointerfaces. Our research group has been developing technologies for biomolecular immobilization with controlled orientation by utilizing the extremely stable trimeric basic structure of CutA1 from the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus*. The high structural stability of CutA1 makes it a promising scaffold molecule for presenting ligand molecules on solid surfaces while maintaining their functionality. It also allows for the introduction of various mutations. In this study, we examined the application of the coiled-coil, a rigid and stable structural domain, and the SpyTag/SpyCatcher system, which spontaneously forms isopeptide bonds, to CutA1. This was done to construct proteinaceous higher-order structures for the functionalization of nano-bio interfaces. In the case of immobilizing esterase (EstAf) from *Archaeoglobus fulgidus*, the three-dimensional arrangement of EstAf at the nano-biointerface allows for densification. When immobilizing StrepTagII as a ligand molecule, modifying the nano-level arrangement alleviated steric hindrance in the interaction, thereby improving the sensitivity of interaction detection.

immobilization, CutA1, proteinaceous scaffold

発表責任者：今中洋行（imanaka@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4D7a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 D7 会場

サンゴ由来レクチン AML-I の活性制御と多量体化による構造変化の解明
Regulation of the activity of coral-derived lectin AML-I and elucidation of the structural changes by oligomerization
○高橋 優希、郷田 秀一郎（創価大院理工）
○Yuki TAKAHASHI, Shuichiro GODA (Soka Univ.)

サンゴ(*Acropora millepora*)由来レクチン AML-I はウサギ赤血球に対して凝集活性を示し、C 末端 19 残基を除くと(AML-IΔC)溶血活性を示す。そこで、その境界に TEV protease 認識配列を挿入し、protease で活性を制御することを 1 つ目の目的とした。protease 認識配列を挿入した AML-I は凝集活性を示し、TEV protease で切断したものはアルギニン存在下で溶血活性を示したことから、TEV protease で 2 つの活性を制御できた。また AML-I は、単量体及び溶血活性を示した時の膜孔形成多量体の立体構造が報告されておらず、C 末端 19 残基が活性に与える影響は不明である。そのため多量体化における構造変化を Size-Exclusion Chromatography Small-angle X-ray Scattering (SEC-SAXS)、および SEC Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS)で解明することを 2 つ目の目的とした。試料には AML-IΔC を用い、SEC-MALS 測定の結果、0.8M Arg 存在下で単量体、0.2M Arg 存在下で膜孔形成多量体に近い分子量を得た。SEC-SAXS 測定の結果、単量体は 0.8M Arg 存在下でギニエ半径が 33.7Å、単量体を人工的に多量体化すると 0.2 M Arg 存在下で 60.8Åとなり、相同性を示すナマコ由来溶血性レクチン CEL-III の単量体及び膜孔形成七量体に近い値を示した。このことから AML-IΔC の多量体化はアルギニンの存在及び濃度に大きく影響されることが明らかになった。

AML-I, a coral lectin exhibits agglutinating activity against rabbit erythrocytes and hemolytic activity by C-terminal 19 residues deletion mutant (AML-IΔC). TEV protease recognition site was inserted at the site and its showed hemagglutinating activity. After digestion by TEV protease, it showed hemolytic activity in the presence of arginine. Therefore, two activities were controlled by protease. The structures of monomeric and oligomeric AML-I have not been reported, and it is unclear how C-terminal 19 residues affects its activities. Therefore, structural change in oligomerization of AML-IΔC was analyzed by Size-Exclusion Chromatography Small-angle X-ray Scattering (SEC-SAXS) and SEC Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). As a result of SEC-MALS, AML-IΔC was monomer and oligomer in the presence of 0.8 M and 0.2 M Arg, respectively. As a result of SEC-SAXS, radius of Gyration was 33.7 Å and 60.8 Å in the presence of 0.8 M and 0.2 M Arg, respectively. These values indicates that the AML-IΔC was monomer and membrane pore-forming heptamer, respectively. These results suggest that the oligomerization and quaternary structure of AML-IΔC was strongly affects by the presence and concentration of Arg.

Lectin, Hemolysis, Structure

発表責任者：郷田秀一郎（goda@soka.ac.jp）

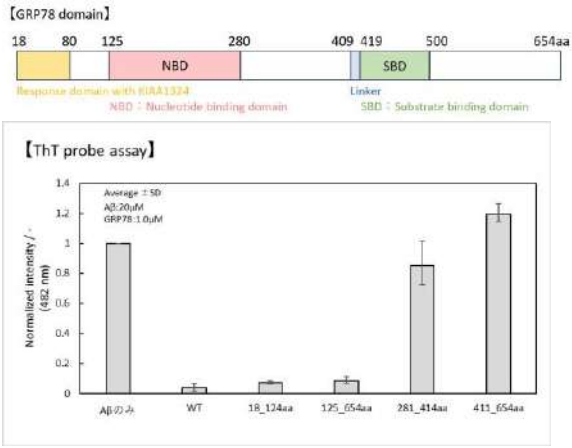
講演番号：4D7a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 D7 会場

アミロイドベータの線維伸長抑制に関与する分子シャペロン GRP78 ドメインの同定

Identification of domain of molecular chaperone GRP78 involved in suppression of amyloid-beta fibrillation

○渡邉 和久[1]、迫野 昌文[2] ([1]富山大工、[2]富山大院理工)
○Kazuhisa WATANABE[1], Masafumi SAKONO[2] ([1]Eng., Univ. Toyama, [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

アミロイドベータ（以下、Aβ）の沈着により形成される老人班がアルツハイマー型認知症（以下、AD）の初期病変であると考えられている。AD の詳しい発症メカニズムの解明や根本的な予防策及び治療法の確立は早急に解決しなければならない問題である。当研究室では ATPase 活性をもつ分子シャペロンの GRP78 に注目し、先行研究では ATP 非存在下において GRP78 が Aβ の凝集を抑制することが In vitro 実験で明らかになった(1)。本研究では凝集抑制に関与するドメインを同定するため、GRP78 の変異体を作製し先行研究と同様に ATP 非存在下での In vitro 実験で凝集確認を行った。GRP78 のドメインは大まかに分けて N 末端側からエンドソームとの応答シグナルドメイン（1_124aa）、ATP との結合ドメイン（125_280aa）、基質との結合ドメイン（420_500aa）というように繋がっている。今回 Aβ の凝集抑制を行うドメインはエンドソームとの応答シグナルドメインと ATP との結合ドメインの二箇所であることが示唆された。



Senile plaques formed by amyloid-beta (Aβ) deposition are considered to be the initial lesion in Alzheimer's disease (AD). Elucidation of the detailed pathogenic mechanism of AD and establishment of fundamental preventive and therapeutic measures are urgently needed. We have focused on GRP78, a molecular chaperone with ATPase activity, and have shown in vitro that GRP78 suppresses Aβ aggregation in the absence of ATP in a previous study (1). In order to identify the domain involved in the inhibition of aggregation, I produced a mutant of GRP78 and confirmed aggregation in vitro in the absence of ATP, as in the previous study. The domains of GRP78 can be roughly divided from the N-terminal side into a response signal domain with endosomes (1_124aa), a binding domain with ATP (125_280aa), and a substrate binding domain (420_500aa). Interestingly, the present study suggests that the two domains that inhibit Aβ aggregation are the response signaling domain with endosomes and the ATP-binding domain.

(1) Masafumi Sakono *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications ,2017

GRP78, Amiloid bata, Molecular chaperone

講演番号：4D7a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 D7 会場

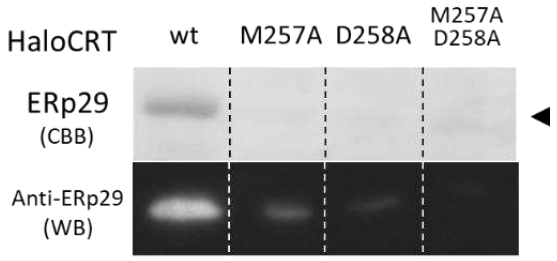
ER 内在分子シャペロンと ERp29 の複合体形成に関する検討

Investigation of complex formation between ER intrinsic molecular chaperone and ERp29.

○金 博恩、迫野 昌文（富山大院理工）
○Hakuon KIN, Masafumi SAKONO (Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

レクチン型分子シャペロンであるカルネキシン(CNX)およびカルレテイキュリン(CRT)は、タンパク質産生の品質管理の中心的な役割を果たし、新生タンパク質の糖鎖構造とフォールディング状態のチェックを行う。これらは Protein Disulfide Isomerase(PDI)ファミリーの一つである酸化還元酵素 ERp57 と複合体を形成し、糖タンパク質のジスルフィド結合形成の補助を行う。近年我々は、CNX および CRT が、ERp57 だけでなく ERp29 とも複合体形成することを報告した。ERp29 は PDI 様構造を一部含むが、酸化還元活性を持たないことから、その生化学的役割は詳細には解明されていない。本発表では CRT-ERp29 複合体に焦点を当て、形成の詳細なメカニズムを解明し、タンパク質品質管理における ERp29 の関与を明らかにすることを目的とした。

CRT の tip ドメインのアミノ酸をそれぞれアラニン(A)に変異した CRT 変異体を作製し相互作用実験を行い、複合体を形成した ERp29 量の評価を行った。その結果、M257A, D258A で顕著なバンドの低下が確認できた。したがって、CRT-ERp29 の複合体形成に M257 および D258 が重要な役割を果たすことを明らかにした。



The lectin-type molecular chaperones Calnexin (CNX) and Calreticulin (CRT) play a central role in protein quality control system, checking the glycan structure and folding state of nascent proteins. They form a complex with the oxidoreductase ERp57, a member of the Protein Disulfide Isomerase (PDI) family, and assist in the formation of disulfide bonds in glycoproteins. Recently, we reported that CNX and CRT form a complex not only with ERp57 but also with ERp29, which contains some PDI-like structures but lacks redox activity. Therefore, its biochemical role has not been clarified in detail. In this presentation, we focus on the CRT-ERp29 complex to elucidate the detailed mechanism of its formation and to clarify the involvement of ERp29 in protein quality control system.

CRT mutants were created by mutating each amino acid in the tip domain of CRT to alanine. Interaction experiments were performed to evaluate the amount of ERp29 that formed the complex. As a result, a significant decrease in the band was observed at M257A and D258A. Therefore, it is clear that M257 and D258 play an important role in the formation of the CRT-ERp29 complex.

ERp29, molecular chaperone, Endoplasmic Reticulum

講演番号：4E1a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E1 会場

Streptomyces coelicolor A3(2)の抗生物質生産に及ぼすアセトフェノンの影響
Effect of acetophenone on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)
○中島 菜々海[1]、石井 花奈[2]、本間 颯太[1]、伊藤 晋作[1,2]、矢嶋 俊介[1,2]、佐々木 康幸[1,2] ([1]東農大院バイオ、[2]東農大バイオ)
○Nanami NAKAJIMA[1], Kana ISHII[2], Sota HONMA[1], Shinsaku ITO[1,2], Shunsuke YAJIMA[1,2], Yasuyuki SASAKI[1,2] ([1]Biosci.Grad.Sch.Tokyo Univ.of Agric, [2]Biosci.Tokyo Univ.of Agric)

近年、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株において、硝酸、亜硝酸、一酸化窒素 （NO）が循環する窒素酸化物代謝サイクルが見いだされた。NO は二次代謝及び形態分化を調節するシグナル分子であることが示唆されている。一方、高濃度 NO 存在条件下では、本菌の二次代謝及び形態分化が顕著に抑制される事が明らかになっている。しかし、亜硝酸高感受性変異株（NS5 株）との共培養を行ったところ、同抑制条件下にも関わらず、WT の抗生物質生産活性が復帰した。そこで NS5 株からの抽出物を GC-MS で解析し、検証した結果、復帰候補物質として acetophenone を見出した。acetophenone は濃度依存的に抗生物質生産活性に影響することが明らかとなった。加えて、細胞内 NO 量にも影響を与えた。以上の結果から acetophenone は NO シグナリングに影響を及ぼす代謝調節分子であることが示唆された。

We previously suggested that *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 has the NO metabolic cycle in which nitric oxide (NO), nitrate and nitrite are circulated. NO regulates secondary metabolism and morphological differentiation in this bacterium. In addition, the both regulations were repressed under the presence of massive NO. In this study, we found that WT strain produced antibiotics in the co-incubation with a nitrite-sensitive mutant strain (NS5) even under high concentrations of NO. We analyzed the volatile components of the NS5 strain by GC-MS and further found that the acetophenone was a candidate as the restoring activity. Acetophenone affected antibiotic production activity and intracellular NO conditions in a concentration-dependent manner. These results suggest that acetophenone is a metabolic regulator that affects NO signaling.

nitric oxide, actinomycete, volatile components

講演番号：4E1a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E1 会場

SCO0199 は放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の NO ホメオスタシスを維持する
SCO0199 maintains NO homeostasis in the actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)
○向後 美野里、吉住 友希、渋井 佑生子、本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大院バイオ）
○Minori KOGO, Tomoki YOSHIZUMI, Yukiko SHIBUI, Sota HONMA, Shinsaku ITO, Shunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of Agric)

放線菌は抗がん剤、農薬、抗寄生虫剤など多種多様な二次代謝産物を生産するのに加え、気中菌糸を伸ばし胞子を形成する複雑な形態分化を示す。一方、結核菌などの病原性放線菌も数多く知られている。*Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株において、一酸化窒素（NO）を生産する窒素酸化物代謝サイクルが見出された。内在的に生産される NO は、NO 依存性二成分制御系 DevS/R を介して抗生物質生産のシグナル分子として働くことが示唆されている。過剰な NO の蓄積は酸化ストレスとなり細胞障害を引き起こすため、細胞内の NO 濃度は厳重に制御されなければならないが本菌におけるその詳細は不明である。SCO0199 は、NO 依存性二成分制御系 DevS/R に制御されており、アルコールデヒドロゲナーゼファミリーに属することがわかっている。

本研究では、SCO0199 の生理学的意義の解明を目的とした。SCO0199 を欠失させた結果、栄養細胞の growth と細胞内ニトロソチオール体量に減少が見られ、さらに細胞内 NO 濃度にも影響を及ぼした。以上の結果は SCO0199 が NO ホメオスタシスを制御する酵素であることを示唆する。

Actinomycetes produce a wide variety of secondary metabolites such as anticancer drugs, pesticides, and antiparasitic agents, and also show complex morphological differentiation. On the other hand, many pathogenic actinomycetes, such as *Mycobacterium tuberculosis*, are also known. Previous studies suggested a nitric oxide (NO) metabolic cycle in which NO, nitrate (NO_3^-), and nitrite (NO_2^-) are circulated. The produced NO is suggested to act as a signaling molecule for antibiotic production via the NO-dependent two-component regulatory system DevS/R in the bacterium. Since excessive NO causes oxidative stress, Cells must strictly control the intracellular NO concentration.

SCO0199 regulated by the NO-dependent two-component regulatory system DevS/R belongs to alcohol dehydrogenases family. Deletion of SCO0199 gene caused disorder of NO homeostasis in *S. coelicolor*. Moreover, the mutation affected in the growth and intracellular NO concentrations. These results suggest that SCO0199 is a component that regulates NO homeostasis.

Nitric oxide, homeostasis, Actinomycete

講演番号：4E1a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E1 会場

酢酸菌に特徴的な細胞表層酸化代謝が生育に与える効果
Role of cell-surface oxidation system in the cell growth of acetic acid bacteria
吉冨 宙[1]、平田 花織[1]、○片岡 尚也[1,2]、松下 一信[1,2]、薬師 寿治[1,2] ([1]山口大・院創成科、[2]山口大・中高温微セ)
Sora YOSHITOMI[1], Kaori HIRATA[1], ○ Naoya KATAOKA[1,2], Kazunobu MATSUSHITA[1,2], Toshiharu YAKUSHI[1,2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

酢酸菌に特徴的な細胞表層での酸化は，エネルギーを生産することで細胞の成長を助けると考えられている。しかし，そのような生理的意義は実験的に検証されていなかった。そこで，*Gluconobacter thailandicus* NBRC 3255 Δ*dhaK* Δ*derK* Δ*glpK* 株 (3Δ) の生育挙動を解析することで検証を行った。3Δ 株は，細胞表層酸化系によりグリセロールをジヒドロキシアセトンに酸化するが，生成したジヒドロキシアセトンを細胞内に取り込んで代謝することはできない変異株である。3Δ 株のグルコース培地での生育をグリセロールの有無で比較したところ，3Δ 株の生育は，グリセロールの存在により亢進した。加えて，ここで観察された生育増進効果は，グリセロールの表層酸化を担うグリセロール脱水素酵素を欠損させることで消失した。これらの結果は，表細胞表層での酸化が細胞内代謝の機能に寄与することを示唆していた。さらに，グルコースの細胞表層酸化系を破壊した *Gluconobacter oxdans* NBRC 3293 株の変異株 (Δ*gdhM*) でも同様の検討を行った。Δ*gdhM* 株はキナ酸を表層酸化系で酸化するが，それ以上の代謝は認められない。その結果，前述の検討と同様に，グルコース培地における生育が，キナ酸の添加により亢進した。現在，観察された表層酸化系の生育促進効果の要因を解析しているので，その結果も合わせて議論したい。

Oxidation of the cell surface, characteristic of acetic acid bacteria, is thought to aid cell growth by producing energy. However, its physiological significance has not been experimentally verified. Therefore, we analyzed the growth behavior of a *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255 Δ*dhaK* Δ*derK* Δ*glpK* strain (3Δ). This mutant strain oxidizes glycerol to dihydroxyacetone on the cell surface, but cannot take it into the cell. This mutant strain grew better on glucose in the presence of glycerol than in its absence. Moreover, its derivative strain lacking glycerol dehydrogenase, which is a key enzyme of surface oxidation of glycerol, lost the growth promotion by glycerol. These results suggest that surface oxidation contributes to the function of intracellular metabolism to promote the growth. We also examined it with a mutant derivative of *Gluconobacter oxdans* NBRC3293 strain of which the gene for glucose dehydrogenase has been eliminated. This mutant strain does not oxidize glucose on the cell-surface but does quinate on the cell-surface. However, the oxidized form of quinate is not metabolized further. The mutant strain promoted the growth on glucose by addition of quinate. We are now investigating the factors of the growth promotion by the cell-surface oxidation that have been clarified from our results presented here.

acetic acid bacteria, *Gluconobacter* spp., energy metabolism

発表責任者：片岡 尚也（nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4E1a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E1 会場

Acetobacter pasteurianus の C3 化合物代謝におけるコハク酸:アセチル CoA CoA 転移酵素（AarC）の役割

Role of Succinate:acetyl-CoA CoA transferase (AarC) in the C3 metabolism of *Acetobacter pasteurianus*

村上 果穂[1]、片岡 尚也[1,2]、松下 一信[1,2]、松谷 峰之介[3]、○薬師 寿治[1,2]（[1]山口大・院創成科学、[2]山口大・中高温微研セ、[3]東京農大・ゲノム）

Kaho MURAKAMI[1], Naoya KATAOKA[1,2], Kazunobu MATSUSHITA[1,2], Minenosuke MATSUTANI[3], ○Toshiharu YAKUSHI[1,2] ([1]Grad Sch Sci Tech Innov, Yamaguchi Univ, [2]RCTMR, Yamaguchi Univ, [3]NODAI Genome, Tokyo Univ Agr)

酢酸菌にとって酢酸耐性は重要な特徴であり，酢酸の代謝，排出，膜構造などが関与している。AarC は，*Acetobacter pasteurianus* における acetic acid resistance C（*aarC*）として発見されたコハク酸：アセチル CoA CoA 転移酵素で，酢酸分解の第一段階を担う。本菌はスクシニル CoA シンテターゼを持たないため，AarC は TCA 回路に重要な役割を担う。*A. pasteurianus* SKU1108 株は，２つの *aarC* 遺伝子を持つので，その二重破壊株（Δ*aarC*）を作製した。Δ*aarC* 株は酢酸では生育できなくなったが，グリセロールで生育した。その生育特徴として，ラグ期が長く，最終到達濁度が若干低いが，生育速度はほとんど変わらないことがわかった。Δ*aarC* 株は TCA 回路が遮断されているため，エネルギー生成に問題が生じたと考え，エネルギー源として 2-プロパノールを添加して培養した。ラグ期は長かったが，最終到達濁度は親株並みであった。また，C4 ジカルボン酸を添加したところ，ほとんど効果は認められなかった。天然で TCA 回路が不完全な *Gluconobacter* 属酢酸菌では，細胞内代謝により酢酸が最終産物となることから，本菌の細胞内代謝も酢酸を生じると推測した。しかし，Δ*aarC* 株とその親株では，酢酸の生成は認められなかった。AarC は C2 化合物の代謝には必須であるが，C3 化合物代謝においては，エネルギー生成に部分的に関わることが示唆された。

Acetic acid resistance is an important feature of *Acetobacter* species and is related to acetate metabolism, acetic acid efflux, and cell envelope structure. The protein encoded in acetic acid resistance C gene (*aarC*) is an enzyme that catalyzes conversion of succinate and acetyl-CoA, which is important for the TCA cycle because of loss of succinyl-CoA synthetase. Since *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 strain possesses a paralog gene of *aarC*, we constructed a double deletion (Δ*aarC*) strain. The Δ*aarC* strain could not grow on a medium containing acetate as a carbon source, but grew well on a medium containing glycerol as a carbon source. On glycerol, Δ*aarC* grew after longer lag phase and reached lower final cell density. We cultivate Δ*aarC* on glycerol with 2-propanol as energy source, and Δ*aarC* grew with the still longer lag phase and with better cell density as the parental strain. On the other hand, addition of C4-dicarboxylates showed almost no effect on the growth. Acetic acid was not detected in the growth of the Δ*aarC* and the parental strains. We suggest that AarC is essential for C2 metabolism but partially involved in C3 metabolism.

Acetic acid bacteria, succinate:acetyl-CoA CoA transferase, acetic acid

発表責任者：薬師 寿治（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4E1a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E1 会場

発酵細菌 *Pelosinus* sp. IPA-1 株がヒ素存在下で発現するタンパク質の網羅的解析
Comprehensive analysis of proteins expressed by the fermentative bacterium *Pelosinus* sp. strain IPA-1 in the presence of arsenate

○松尾 晏佳[1]、山村 茂樹[2]、黒田 真史[3]、天知 誠吾[4]（[1]千葉大園芸、[2]国環研、[3]常葉大社会環境、[4]千葉大院園芸）
○Haruka Matsuo[1], Shigeki Yamamura[2], Masashi Kuroda[3], Seigo Amachi[4] ([1]Fac. of Hort., Univ. Chiba, [2]Natl. Inst. for Environ. Stud., [3]Fac. of Soc. and Environ. Stud., Univ. Tokoha, [4]Grad. Sch. of Hort., Univ. Chiba)

Pelosinus sp. IPA-1 株は嫌気条件で乳酸をプロピオン酸と酢酸に発酵代謝するが、培地にヒ酸[As(V)]を添加すると As(V)濃度に依存して生育が増大する。この時、添加した As(V)は全て亜ヒ酸[As(III)]に還元されるが、IPA-1 株は従来型の異化的 As(V)還元酵素遺伝子(*arrA*)を保持せず、未知のメカニズムで As(V)を還元することが示唆されている。そこで本研究では、IPA-1 株の As(V)還元酵素の同定と、ヒ素存在下で発現するタンパク質の網羅的解析に加え、呼吸阻害剤が生育に与える影響を培養実験により検討した。まず、IPA-1 株の異化的 As(V)還元酵素を活性バンドの LC-MS/MS 解析により同定した結果、ArrA と比較的近縁なテトラチオン酸還元酵素（TtrA）が検出された。また、*ttrA* 遺伝子の転写量はヒ素存在下で 96 倍増加した。プロテオーム解析より、ヒ素存在下では Ttr の他に、ヒ素耐性に関わる Ars やシステイン・鉄硫黄クラスター生合成系のタンパク質群、さらにニトロゲナーゼのサブユニットを構成するタンパク質群の高発現が観察された。一方、メチルマロニル CoA 経路や乳酸資化に関わるタンパク質の発現は低下していた。呼吸阻害剤であるロテノンを添加すると、ヒ素存在下でのみ生育が顕著に阻害された。以上のことから、IPA-1 株の As(V)還元には電子伝達系における酸化的リン酸化が大きく関与することが示唆された。

Pelosinus sp. strain IPA-1 ferments lactate to propionate and acetate anaerobically through the methylmalonyl-CoA pathway (Wood-Werkman cycle). Interestingly, strain IPA-1 can reduce 10 mM of arsenate [As(V)] to arsenite [As(III)] and its growth is enhanced depending on the As(V) concentration added to the medium. In this study, we found that As(V)-reducing enzyme of strain IPA-1 is a tetrathionate reductase (Ttr)-like protein but not a conventional dissimilatory As(V) reductase (Arr). Quantitative proteomic analysis revealed that not only Ttr but also arsenic resistance proteins (Ars), proteins involved in cysteine and Fe-S cluster biosynthesis, and nitrogenase subunit proteins were upregulated in the presence of As(V). In contrast, proteins involved in the methylmalonyl-CoA pathway and lactate utilization were downregulated. When strain IPA-1 was grown in the presence of a respiratory inhibitor rotenone, its growth was significantly inhibited only in the presence of As(V). Our results suggest that oxidative phosphorylation at the electron transfer chain is responsible for As(V) reduction by strain IPA-1.

Pelosinus, arsenic, proteomics analysis

講演番号：4E1a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E1 会場

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.における接合性 **a** 特異的発現機構の解析
Analysis of mating **a**-specific expression mechanism in miso and shoyu yeast *Zygosaccharomyces* sp.
○小出 琴理、尾形 智夫（前工大院・生物工学専攻）
○Kotori KOIDE, Tomoo OGATA (Maebashi Institute of Technology)

高品質な味噌・醤油製造に寄与するため、その製造に利用される酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合育種を試みている。味噌・醤油酵母は、類縁種 *S. cerevisiae* で失われた HMG-box 型転写因子 Mat**a2** を保持しており、Mat**a2** がなければ **a** 特異的遺伝子の転写活性が起こらないと予想している。Mat**a2** の結合配列や機能を明らかにすることで接合性発現の制御機構についての知見を深める。
味噌・醤油酵母で接合性 **a** 特異的発現すると予想される *STE6* 遺伝子のプロモーター600bp を *lacZ* 遺伝子に接続し、レポーターアッセイによって転写活性を測定したところ、**a** 特異的発現を確認した。転写活性に特に重要とされる UAS(Upstream Activation Sequence)のうち、Mat**a2** の HMG-box ドメインが結合する 7b を *S. pombe* の MatMc 結合配列、ショウジョウバエにおける HMG-box 型転写因子のコンセンサスな結合配列に置換したところ、**a** 特異的遺伝子の発現が確認できた。HMG-box 結合配列の相同性は比較的低いことから、味噌・醤油酵母の転写因子 Mat**a2** は DNA 結合配列を幅広く認識できる柔軟性があると推察した。
Mat**a2** による制御機構の解明のために、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いて *mat**a2**Δ* 株を作製した。今後はこの株を用いて、転写活性化能や接合能が喪失しているかを確かめる。
In order to contribute to the production of high-quality miso and shoyu, attempts are being made to mating expression the yeast *Zygosaccharomyces* sp. which is used in their production. To gain insight into the regulatory mechanisms of mating expression by elucidating the binding sequence and function of the HMG-box transcription factor Mat**a2** in miso and shoyu yeasts.
a-specific expression was confirmed at 600 bp of the promoter of the *STE6* gene, which is mating **a**-specifically expressed in miso and shoyu yeast. The replacement of 7b in the promoter's UAS, to which the HMG-box domain of Mat**a2** binds, with the consensus binding sequence for HMG-box-type transcription factors in *S. pombe* and *Drosophila* also confirmed **a**-specific gene expression. The relatively low homology between them suggests that the transcription factor Mat**a2** in miso and shoyu yeast is flexible enough to recognize a wide range of DNA-binding sequences.
To elucidate the mechanisms of regulation by Mat**a2**, the CRISPR/Cas9 system, a genome editing technology, was used to generate the *mat**a2**Δ* strain. In the future, this strain will be used to ascertain whether loss of transcriptional activation and mating activity has occurred.

Zygosaccharomyces sp., mating specific gene, regulation

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4E1a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 E1 会場

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の転写因子 Ste12 の天然変性領域の解析
Analysis of the intrinsically disordered region of the transcription factor Ste12 in the miso and shoyu yeast *Zygosaccharomyces* sp.
○木村 和佳奈、尾形 智夫（前工大院・生物工学専攻）
○Wakana KIMURA, Tomoo OGATA (Maebashi Institute of Technology)

高品質な味噌・醤油製造に寄与するため、味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合育種を試みている。*Z. rouxii* CBS732 は転写因子 Ste12 の遺伝子に変異があり、接合性を示さないことを見出している事から[1)]、本研究では転写因子 Ste12 の接合性発現への関与を調べた。味噌・醤油酵母の Ste12 の C 末端配列は種特徴的であり、43 個の Q と 25 個の N が連続していて、プリオン様ドメインであると推察された。*S. cerevisiae* を宿主とした場合の味噌・醤油酵母の Ste12 の C 末端領域が転写活性化能を持つかを検討するため、*S. cerevisiae* Gal4 の DNA 結合領域に、味噌・醤油酵母 Ste12 の C 末端や、Poly Q または Poly N を除いた C 末端をそれぞれ結合し、レポーター遺伝子の発現を調べた。味噌・醤油酵母 Ste12 の C 末端は転写活性化能があり、Poly-Q や Poly-N を除去してもレポーター遺伝子が発現するため、*S. cerevisiae* を宿主とした場合、Poly-Q や Poly-N は転写活性化能に影響を与えないと推察している。リン酸化部位と想定される *S. cerevisiae* Ste12 の 310 と 317 番目の Y を A に変換すると、基底状態での転写活性化能が上昇した。味噌・醤油酵母 Ste12 の同様の領域の Y も転写活性化と関係があるか検討していく。

1) T. Ogata & K. Kuroki Yeast Vol.38, 471-479 (2021)

Ste 12 of miso and shoyu yeast, *Zygosaccharomyces* sp. is involved in the mating expression. The C-terminal sequence of Ste 12 is species-characteristic, with 43 glutamine residues and 25 asparagine residues repeated, and bioinformatics analysis suggests a prion-like domain. To examine whether the C-terminal region of Ste12 in *Zygosaccharomyces* sp. yeast has a transcriptional activation function when *S. cerevisiae* is used as a host, we examined reporter gene expression by connecting the DNA-binding region of Gal4 with the C-terminus of *Zygosaccharomyces* sp. Ste12 and the C-terminus with Poly-Q or Poly-N removed, respectively. As a result, the C-terminus of *Zygosaccharomyces* sp. Ste12 has a transcriptional activation function, and the expression of the reporter gene was confirmed even when Poly-Q and Poly-N were removed, suggesting that Poly-Q and Poly-N don't affect the transcriptional activation function in *S. cerevisiae*. Conversion of Y at 310 and 317th Y of *S. cerevisiae* Ste12 to A, increased transcriptional activation capacity in the basal state. It will be examined whether Y in a similar region of *Zygosaccharomyces* sp. Ste12 is also associated with transcriptional activation.

Zygosaccharomyces sp., mating type, *STE12*

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4E1a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E1 会場

高塩条件が味噌・醤油酵母の接合に与える影響について

Effect of high salt stress on the mating of miso and shoyu yeast

○須藤 美羽、藤井 聖愛、瀬戸 菜々子、尾形 智夫（前工大・生物工）
○Miu SUTO, Seira FUJII, Nanako SETO, Tomoo OGATA (Maebashi Instutute of Technology)

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.は、耐塩性が極めて強いことが知られていた。当研究室では、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合は、高塩条件下でより促進されていたことを見出していた(T. Ogata & K. Kuroki Yeast Vol.38, 471-479 (2021))。そこで、本研究では、接合性関連遺伝子群の発現が、高塩条件下で促進されるかを検討した。さらに、出芽酵母 *S. cerevisiae* で見いだされた高浸透圧ストレス応答機構、すなわちプロテインキナーゼ Hog1 が、*Zygosaccharomyces* sp.酵母においても、中心的な役割をはたしているかについても検討した。

接合性 **a** の発現に関与する *STE6* 遺伝子と、接合性 alpha の発現に関与する *STE3* 遺伝子の発現は、レポーター遺伝子 *lacZ* に接続されることによって測定した。その結果、両遺伝子の発現とも、高塩条件で、有意に促進していた。

現在、高浸透圧ストレス応答機構において、中心的な役割をはたしているプロテインキナーゼ Hog1 の遺伝子破壊株の作成をおこなっている。

Miso and soy shoyu yeast, *Zygosaccharomyces* sp., was known to have extremely high salt tolerance. Our laboratory found that mating of *Zygosaccharomyces* sp. yeast was more promoted under high salt conditions (T. Ogata & K. Kuroki Yeast Vol. 38, 471-479 (2021)). Therefore, in this study, we investigated whether the expression of mating related genes is promoted under high-salt conditions. Furthermore, we investigated whether the hyperosmotic stress response mechanism found in the budding yeast *S. cerevisiae*, namely the protein kinase Hog1, also plays a central role in the yeast *Zygosaccharomyces* sp.

The expression of the *STE6* gene, which is involved in the expression of mating **a**, and the *STE3* gene, which is involved in the expression of mating alpha, was measured by being connected to the reporter gene *lacZ*. As a result, the expressions of both genes were significantly promoted under high salt conditions.

Currently, we are creating a gene-disrupted strain of *HOG1*,encoding a protein kinase that plays a central role in the hyperosmotic stress response mechanism.

Zygosaccharomyces sp., mating, high salt stress

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4E1a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E1 会場

清酒における真性火落菌の迅速な定量法の開発と火落ちリスクの評価に関する検討

Rapid quantification of hiochi bacteria using digital PCR and evaluation of a risk of spoilage by hiochi bacteria in sake

○高橋 正之、森川 佳奈、赤尾 健 (酒総研)
○Masayuki TAKAHASHI, Kana MORIKAWA, Takeshi AKAO (NRIB)

清酒製造において、品質劣化に繋がる乳酸菌、いわゆる火落菌はその生育により製品価値を大きく損なうことから、非常に警戒されている微生物の１つである。中でも好アルコール性を示す真性火落菌として *Lactobacillus acetotolerans* や *Fructilactobacillus fructivorans* が知られているが、いずれも極めて生育が遅く培養法での検出は時間を要する。そのため、検出の迅速化を目指した検討がなされ、rrn オペロンをターゲットとした PCR 法による特異性の高い検出系などが開発されている。一方、高感度な手法による定性的な検出と、検出された清酒におけるその後の火落ちの発生について評価した研究は少なく、検出されたことがその後の火落ちに繋がるか否か、生酒製品で検出された場合や火入れ後に検出された場合など、その検出結果の解釈が重要となるケースもある。

今回、我々は菌数を正確に反映する可能性が高い領域として DNA 複製終結点 Ter 近傍領域をターゲットとして、デジタル PCR を用いた真性火落菌の定量系を確立した。この系では *L. acetotolerans* と *F. fructivorans* それぞれに特異的なプライマーを設計することで、個別の定量が可能であり、また、マルチプレックス PCR とすることで、２種同時定量も可能である。また、複製開始点 Ori と Ter の比率は定常期では 1.0 程度、対数増殖期では増加することが知られている。我々は加水分解プローブを用いたマルチプレックス検出系を設定することで、真性火落菌２種の菌数及び Ori/Ter 比を１反応で同時評価可能な手法を確立した。これを指標に解析時点における菌数とその生育状態を推定することが可能となり、将来的な火落ちの発生確率を推定できる可能性が示された。

Spoilage of sake caused by hiochi bacteria makes product worthless so that sake breweries should be aware of the contamination of hiochi bacteria. A spoilage by *Fructilactobacillus fructivorans* and *Lactobacillus acetotolerans* should be avoided, but it takes a long time to detect them due to their extremely slow growth rate among hiochi bacteria. PCR-based method is one of the solutions to detect hiochi bacteria in short time, however, there are still some problems to evaluate the spoilage risk of sake by *F. fructivorans* and *L. acetotolerans*. In this study, we designed species specific primer sets which amplify the neighborhood of ter region of *F. fructivorans* or *L. acetotolerans* separately in order to determine the cell density of each bacterium precisely. Additionally, the risk of a sake spoilage by the two species may be anticipated by combination with measurement of ori/ter ratio by using digital PCR.

hiochi bacteria, ori/ter ratio, sake spoilage

発表責任者：高橋　正之（m.takahashi@nrib.go.jp）

講演番号：4E1a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E1 会場

麹菌ゲノム編集育種用マーカーの開発
Development of genetic marker for genome editing breeding in *Aspergillus oryzae*
○織田 健[1]、上田 佳佑[1,2]、島本 和美[1]、林 梨咲[1]、赤尾 健[1,2] ([1]酒総研、[2]広大院統合生命)
○Ken ODA[1], Keisuke UEDA[1,2], KAZUMI SHIMAMOTO[1], RISA HAYASHI[1], Takeshi AKAO[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* においてもゲノム編集技術の展開が図られ、共ゲノム編集が実施されるようになってきたが、現在、醸造上影響を与えない実利用マーカーとしては、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrI* しかない。多重変異導入などの応用を目的として、ポジティブセレクションとなるように薬剤耐性を選択し、育種用のマーカーの拡充を図った。糸状菌への汎用性を考慮して *A. nidulans* や *A. fumigatus* で見出された核酸のトランスポーターである 5-fluorouracil(5-FU)耐性遺伝子 *furD* および 5-fluorocytosine(5-FC)耐性遺伝子 *fcyB* に着目し、麹菌オルソログ遺伝子を探索した。

実用麹菌株 RIBOIS01 に対して遺伝子組換えにより *furD* および *fcyB* 破壊株および相補株を作成し、それぞれの薬剤耐性を確認したところ *fcyB* 破壊株では耐性を示し、相補株で耐性が失われることを確認した。さらに *fcyB* 遺伝子をマーカーとして、分生子着色の *wA* および酸性プロテアーゼの生産制御転写因子 *ptrR* をターゲットとして破壊する共ゲノム編集を実施した。その結果、それぞれの破壊株の表現型を示す株の取得が確認され、*fcyB* が共ゲノム編集のマーカーとして利用可能であることが示された。　現在、実醸造への影響を探るため、*fcyB* 破壊株での製麹を実施し、酵素活性などの醸造特性を検討している。

Although genome editing technology has been deployed in the *Aspergillus oryzae* and co-genome editing has been implemented, currently the only marker of practical use that has no impact on brewing is the pyrithiamine resistance gene *ptrI*. For the purpose of multiple mutation introduction and other applications, drug resistance was selected to be a positive selection, and the marker for breeding was expanded. Considering versatility for filamentous fungi, we focused on the 5-fluorouracil (5-FU) resistance gene *furD* and 5-fluorocytosine (5-FC) resistance gene *fcyB*, which are nucleic acid transporters found in *A. nidulans* and *A. fumigatus*, and searched for orthologous genes in *A. oryzae*. We produced *furD* and *fcyB* disrupted and complementary strains by genetic transformation against a practical strain RIBOIS01, and confirmed that the *fcyB* disrupted strain showed resistance to each drug, while the complementary strain lost resistance to the drugs. In addition, we performed co-genome editing using the *fcyB* gene as a marker and targeted disruption of *wA* and *ptrR*. The results showed the phenotypes of each disrupted strain, indicating that *fcyB* can be used as a marker for co-genome editing.

genome editing, Aspergillus oryzae, breeding

発表責任者：織田健（k.oda@nrib.go.jp）

講演番号：4E1a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 E1 会場

Production of glyceric acid using engineered Escherichia coli

○Sarah Abdelnaser, Long Bui Hoang Dang, Yuji Aso (Kyoto institute of technology)

[Background and Objective] Using biomass as a renewable feedstock for desirable products is in demand to substitute for petroleum-based products. Glyceric acid (GA) biologically obtained from biomass can be used as a renewable material. Attempts to produce GA from galacturonate and glycerol have been demonstrated using *Escherichia coli*. Although the approaches reported the possibility to produce GA in moderate amounts, the substrates used in the studies are considerably expensive. In this study, GA production was attempted using *E. coli* from glucose as a common carbon source by engineering either (1) glycerol or (2) glyoxylate pathway.
[Methods] *E. coli* BW25113 was used as an engineered host. (1) Glycerol pathway (glycerol → GA) was engineered by disruption of GA-2-kinases (*garK*, *glxK*) and glycerol facilitator (*glpF*) genes, and introduction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase and phosphatase (*gpd1*, *gpp2* from *Saccharomyces cerevisiae*), and alditol oxidase (*aldO* from *Streptomyces violaceoruber*) genes. (2) Glyoxylate pathway (glyoxylate → tartronate semialdehyde → GA) was engineered by overexpression of tartronate semialdehyde synthase and reductase (*gcl*, *garR*, *glxR*) genes, and disruption of malate synthases (*aceB*, *gclB*) and glyoxylate reductase (*ycdW*) genes. *E. coli* strains were cultivated at 37°C with shaking. To evaluate the glyoxylate pathway, enzymatic assay was performed with the cell crude extract. GA production in the culture supernatants was analyzed using HPLC.
[Results and Discussion] (1) Glycerol pathway engineering: *E. coli* expressing *gpd1*, *gpp2*, and *aldO* produced 0.5 g/L GA from 1% glucose. In M9 medium, disruption of *garK* and *glxK* resulted in an impaired growth rate with low production of GA, while supplementation of 0.5 g/L casamino acids and 0.5 g/L $MgSO_4$ to the medium replenished the growth rate and elevated the GA titer. Further disruption of *glpF* increased the GA production to 0.8 g/L. MR2 medium improved the GA production titers and specific productivities. Upscale production of GA in a jar fermentor with MR2 medium, resulting in an improvement in GA production up to 2.4 g/L with specific productivity at 0.3 g-GA/g-cells. (2) Glyoxylate pathway engineering: *aceB* and *glcB* disruptant produced up to 0.8 g/L GA after 72 h of fermentation. While non-engineered strain produced 0.3 g/L.

[Reference] Long B.H.D., *et al. J. Biosci. Bioeng.*, 135(5):375–381 (2023).

Escherichia coli, glyceric acid, alditol oxidase

発表責任者：Yuji Aso（aso@kit.ac.jp）

講演番号：4E1a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 E1 会場

ナフタレンボロン酸を用いた培養液からのグリセリン酸の反応抽出
Reactive extraction of glyceric acid from microbial culture with naphthalene boronic acid
○青木 啓太朗、リソ リカルド、麻生 裕司（京工繊大院・バイオベース）
○Keitaro AOKI, Riccardo RISO, Yuji ASO (Kyoto Inst. Tech., Biobased)

【目的】グリセリン酸（GA）は微生物生産可能な工業原料である。GA はジオール構造を持つためボロン酸とエステルを形成し培養液から反応抽出できると考えられるが実証されていない。そこで本研究では、ナフタレンボロン酸（NB）を用いて培養液から GA を反応抽出するための条件を検討した。
【方法】NaOH 含有 GA 水溶液（水層）に NB および相間移動触媒（TOMAC）含有ヘキサン・オクタノール（有機層）を添加・撹拌後、得られた有機層に HCl 水溶液（抽出層）を添加・撹拌した。各層中の GA 量を HPLC 定量し、マスバランスを考慮して抽出率を算出した。また、GA 水溶液の代わりに酢酸菌 *Acetobacter tropicalis* NBRC 16470 の GA 含有培養液を用いて同様の実験を行った。
【結果と考察】反応抽出には TOMAC 添加が必要であったが、更なる NB 添加で抽出率は 2 倍向上した。よって、反応抽出は TOMAC と NB の二段階で起こることが示唆された。GA 含有培養液を用いた場合の反応抽出では抽出率は 80%であった。現在は有機層を繰り返し用いた抽出操作を試みている。

Glyceric acid (GA) is a feedstock that can be produced by microbes. GA is a diol, suggesting that it is esterified with boronic acid and consequently, the product can be obtained from the culture by reactive extraction. However, this has not been proven. In this study, the conditions for the reactive extraction were characterized using naphthalene boronic acid (NB). After the addition of NB and a phase transfer catalyst TOMAC (organic phase) to GA solution with NaOH (aqueous phase), HCl solution was added to the organic phase obtained. GA was quantified with HPLC and GA yield was calculated based on mass balance. The reactive extraction employing the same conditions was conducted using the culture of Acetobacter tropicalis NBRC 16470. TOMAC was required for the reactive extraction, and further addition of NB provided a 2-fold yield. This suggested that the process is a two-step reaction. GA yield was 80% when using the culture. The reactive extraction using the organic phase reused is under characterization.

reactive extraction, boronic acid, glyceric acid

発表責任者：麻生裕司（aso@kit.ac.jp）

講演番号：4E1a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 E1 会場

フォトクリック反応とフルオラスタグ法を用いたイタコン酸類縁体生産菌の迅速分離

Rapid screening for itaconic acid derivative producers with photoclick reaction and fluorous-tag method

○數土 綾乃、片岡 親良、麻生 祐司（京工繊大院・バイオベース）
○Ayano SUDO, Chikara KATAOKA, Yuji ASO (Kyoto Inst. Tech., Biobased)

【目的】微生物の生産するイタコン酸類縁体は新規医薬品・高分子原料として有望であるが、生産菌のみを自然界から迅速分離する技術はない。そこで、イタコン酸類縁体の末端 C=C 結合への選択的な付加反応に基づくフォトクリック反応とフルオラスタグ法を用いた迅速分離技術の開発を試みた。
【方法】分離株培養液にジフェニルテトラゾール化合物を添加し、UV 照射(30 s)によりフォトクリック反応し蛍光を確認した。溶媒とラジカル開始剤存在下でイタコン酸類縁体とフルオラスタグを等量反応後、フルオラス固相抽出(F-SPE)により精製し ^{1}H NMR でフルオラスタグ法の効率を解析した。
【結果・考察】フォトクリック反応を用いることで、高速かつ高感度で自然界より生産菌候補株を分離した。また、イタコン酸類縁体の極性に応じて溶媒とラジカル開始剤を選択することでイタコン酸類縁体を効率的にフルオラスタグ化できることがわかった。現在、F-SPE の条件を検討中である。

Itaconic acid derivatives produced by microbes are promising chemicals as novel pharmaceutical and polymer feedstocks. There is, however no technique to screen rapidly only the producers from nature. In the study, development of a rapid using the photoclick reaction and the fluorous-tag method based on the selective addition reaction to the terminal C=C bond of itaconic acid derivatives was performed. A diphenyltetrazole was added to the culture medium of the isolates and then UV irradiation (30 s) photoclick reaction and fluorescence detection were performed. The efficiency of the fluorous-tag method was investigated by the reaction with a fluorous-tag and itaconic acid derivatives in the presence of solvents and radical initiators, followed by a fluorous solid-phase extraction (F-SPE) and ^{1}H NMR analysis. The photoclick reaction resulted in the rapid and sensitive screening of the producers from nature. It was shown that appropriate selection of solvents and radical initiators according to the polarity of the itaconic acid derivatives led to an efficient reaction with a fluorous-tag. Optimization of the conditions for F-SPE is currently being performed.

itaconic acid derivatives, photoclick reaction, fluorous tag

発表責任者：麻生祐司（aso@kit.ac.jp）

講演番号：4E1a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 E1 会場

タルク添加によるヒドロキシヘキシルイタコン酸の発酵生産性向上

Improvement of fermentative production of hydroxyhexylitaconic acids by addition of talc

○麻生 祐司、片岡 親良、數土 綾乃（京工繊大院・バイオベース）
○Yuji ASO, Chikara KATAOKA, Ayano SUDO (Kyoto Inst. Tech., Biobased)

【目的】微生物の生産するイタコン酸類縁体は新規医薬品・高分子原料として有望であるが、発酵生産性向上に関する知見は殆どない。一方、イタコン酸を生産する *Aspergillus terreus* を鉱物微粒子であるタルクを添加した培地で振とう培養すると、菌糸隗粒径が小さくなりイタコン酸の発酵生産性が向上する。そこで本研究では、イタコン酸類縁体のうちヒドロキシヘキシルイタコン酸を生産する *Aspergillus niger* をタルク添加培地で振とう培養し、発酵生産に与える効果を調べた。
【方法】5 g/L タルク添加グルコース無機塩培地に *A. terreus* NBRC 6123 および *A. niger* S17-5 の胞子を 10^2～10^6 個/mL となるようにそれぞれ接種し振とう培養した。HPLC でイタコン酸とヒドロキシヘキシルイタコン酸生産量、顕微鏡観察で菌糸隗粒径を解析した。培養後に乾燥菌体重量を調べた。
【結果・考察】胞子濃度を増加すると菌糸隗粒径が小さくなりイタコン酸とヒドロキシヘキシルイタコン酸の発酵生産性が向上した。また、胞子濃度が低くてもタルク添加により菌糸隗粒径が小さくなり発酵生産性が向上した。一方、タルク添加は菌体量に顕著な影響を与えなかった。よって、胞子濃度の増加またはタルク添加が菌糸隗比表面積を増加させ、ヒドロキシヘキシルイタコン酸の発酵生産性を向上させることが示唆された。

Although itaconic acid derivatives have attracted attention as novel drug and polymer feedstocks, knowledge on improvement of the fermentative production is limited. This study investigated the effect of addition of talc to the medium on production of hydroxyhexylitaconic acids produced by *A. niger*, based on the fact that addition of talc promotes the production of itaconic acid produced by *A. terreus*. Increase in the concentration of spores in the medium or addition of talc to the medium resulted in decrease in the pellet sizes of *A. terreus* and *A. niger* and consequently production of itaconic acid and hexylitaconic acids was improved. This result suggested to improve the production of hexylitaconic acids by increase in the specific surface area of pellet.

itaconic acid derivatives, hydroxyhexylitaconic acid, fermentation

発表責任者：麻生祐司（aso@kit.ac.jp）

講演番号：4E2a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E2 会場

出芽酵母 TORC1 の上流因子 SEACAT と相互作用するタンパク質の同定
Identification of proteins interacting with SEACAT, the upstream regulator of budding yeast TORC1
○市川 宙[1]、芝田 篤史[1]、加藤 祐介[1]、三岡 哲生[1]、井野 洋子[2]、木村 弥生[2]、阿部 文快[1]([1]青山学院大・理工、[2]横浜市大・先端研)
○SORA ICHIKAWA[1], ATSUSHI SHIBATA[1], YUSUKE KATO[1], TETSUO MIOKA[1], YOKO INO[2], YAYOI KIMURA[2], FUMIYOSHI ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin University, [2]Yokohama City University)

真核生物の TORC1 シグナル伝達経路は、細胞内のアミノ酸レベルを検知して増殖を正に制御する。我々は、出芽酵母の TORC1 が高圧（25 MPa～250 kg/cm^2）ストレス下での増殖に不可欠であること明らかにした（Uemura et al. *J. Cell Sci.* 2020）。TORC1 を液胞膜に係留している EGO 複合体を欠損すると、高圧下で細胞内にはグルタミンが異常蓄積し増殖不全に陥る。すなわち TORC1 は、少なくともグルタミン濃度の適切な管理に重要と言える。TORC1 の上流にはタンパク質複合体 SEACAT が存在する。哺乳類ホモログ GATOR2 は、CASTOR1、Sestrin2 および SAR1B と相互作用するが、酵母では相互作用タンパク質が同定されていない。そこで本研究では、SEACAT と相互作用するアミノ酸センサータンパク質の同定を試みた。SEACAT の構成因子である Sea3 を欠損すると高圧感受性を示したことから、SEACAT から TORC1 へのシグナルインプットが高圧増殖には重要と言える。SEACAT を構成する Seh1, Sea2, Sea3 および Sea4 に 3FLAG タグを導入したプラスミドを作製し、細胞内で発現させた。次いで抗 FLAG 抗体磁気ビーズを用いた免疫沈降を行い、質量分析によって SEACAT 結合タンパク質の同定を行った。その結果、対照（ベクターのみ）では見出されない多くの相互作用タンパク質が同定され、アミノ酸代謝や翻訳に関わる因子が含まれていた。今回、それらの詳細について報告する。

The TORC1 signaling pathway in eukaryotes positively regulates growth by monitoring amino acid levels within the cell. Our previous study demonstrated TORC1's essential role in budding yeast growth under high pressure (25 MPa ~ 250 kg/cm2) (Uemura et al. *J. Cell Sci*. 2020). Deletion of the EGO complex, anchoring TORC1 to the vacuolar membrane, results in abnormal glutamine accumulation and impairs growth under high pressure, emphasizing TORC1's importance in glutamine homeostasis. Upstream of TORC1 is the SEACAT protein complex. While mammalian homolog GATOR2 interacts with CASTOR1, Sestrin2, and SAR1B, yeast lacks identified interacting proteins. This study aimed to identify amino acid sensor proteins interacting with SEACAT. Plasmids introducing a 3FLAG tag into SEACAT components Seh1, Sea2, Sea3, and Sea4 were constructed and expressed within cells, followed by immunoprecipitation mass spectrometry. Several SEACAT-binding proteins, including those involved in amino acid metabolism and translation, were identified, and detailed results will be reported.

yeast, TORC1, SEACAT

発表責任者：市川宙（c5622088@aoyama.jp）

講演番号：4E2a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E2 会場

Saccharomyces cerevisiae プロテインキナーゼ C の HR1 ドメインの機能解析
Functional analysis of the HR1 domain of protein kinase C in *Saccharomyces cerevisiae*
○井澗 和也[1]、野村 亘[1,2]、井上 善晴[1] ([1]京大院農、[2]京大・生理化学研究ユニット)
○Kazuya ITANI[1], Wataru NOMURA[1,2], Yoshiharu INOUE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto Univ.)

出芽酵母 *S. cerevisiae* の唯一のプロテインキナーゼ C（PKC）である Pkc1 は、細胞壁健全性の維持において、下流の Mpk1 MAP kinase を活性化することで細胞壁の合成や修復に関与する。Pkc1 は哺乳類 PKCs が有するほとんどのドメインを持つが、それらのドメインの中で HR1 ドメインの機能については酵母でも哺乳類でもよく分かっていない。そこで今回我々は、Pkc1 の HR1 ドメインに着目して、その機能的役割についての解析を行った。

HR1 ドメインの変異体（*PKC1*^{L54S}）を用いた解析の結果、*PKC1*^{L54S}株は細胞壁の脆弱性および細胞壁ストレス剤感受性を示すことを見出したが、Mpk1 の活性化には顕著な影響は認められなかった。一方、*PKC1*^{L54S} と *mpk1*Δの二重変異（*PKC1*^{L54S}*mpk1*Δ）は合成致死となり、浸透圧保護剤ソルビトールの培地への添加によって合成致死性が抑圧された。これらのことは、HR1 ドメインが Mpk1 非依存的に細胞壁の健全性に関与することを示唆している。そこで、*PKC1*^{L54S}*mpk1*Δ株の合成致死性を抑圧するマルチコピーサプレッサーを取得し解析を行ったところ、取得したマルチコピーサプレッサーの中に *PKC1*^{L54S} 株の細胞壁ストレス剤感受性を抑圧できるクローンが複数含まれていた。本研究結果は、HR1 ドメインを介した Pkc1 の新規な機能の解明に繋がることが期待される。

Pkc1 is the sole protein kinase C（PKC）in *S. cerevisiae,* and plays an important role in the maintenance of cell wall integrity through cell wall synthesis and repair by activating the downstream effector Mpk1 MAP kinase. Pkc1 possesses most of domains identified in mammalian PKCs, but among those domains, the functional role of HR1 domain remains unclear in yeast and mammals. In this study, we focused on the HR1 domain of Pkc1.

We found that HR1 domain mutant (*PKC1*^{L54S}) exhibited susceptibility to cell wall stress, but this mutation hardly influenced on Mpk1 activation. Meanwhile, a *PKC1*^{L54S}*mpk1*Δ double mutant exhibited synthetic lethality, which was suppressed by the addition of the osmotic protectant, sorbitol, to the medium. We screened multicopy suppressors of the lethality of this mutant in a medium without sorbitol. We obtained several suppressors, some of which were able to suppress an increased sensitivity of the *PKC1*^{L54S} mutant to cell wall stress. These results suggest that the HR1 domain is involved in cell wall integrity in an Mpk1-independent manner.

Saccharomyces cerevisiae, Yeast, Protein kinase C

発表責任者：野村亘（nomura.wataru.4r@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E2a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E2 会場

グルタチオンは分裂酵母の栄養制御に関わる細胞間コミュニケーション分子である
Glutathione, a communication molecule in fission yeast, play a role in nutrient regulation
○吉住 僚太朗[1,2]、三浦 俊一[1]、松山 晃久[1,2]、八代田 陽子[2]、吉田 稔[1,2,3]、西村 慎一[1,3,4] ([1]東大院・農、[2]理研 CSRS、[3]東大・微生物連携機構、[4]広島大院・統合生命)
○Ryotaro YOSHIZUMI[1,2], Shunichi MIURA[1], Akihisa MATSUYAMA[1,2], Yoko YASHIRODA[2], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Shinichi NISHIMURA[1,3,4] ([1]Grad. Sch. of Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]RIKEN CSRS, [3]CRIIM, Univ. Tokyo, [4]Grad. Sch. of Integr. Sci for Life, Hiroshima Univ.)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はモデル真核微生物として幅広い生命現象の解明に用いられてきたが、微生物間相互作用等、その生態学的特性についてはほとんど分かっていない。以前に我々は、分裂酵母が Nitrogen Signaling Factors (NSFs)を分泌・感知することで窒素カタボライト抑制を解除し、窒素源の取り込みを制御することを報告した（Sun *et al.*, 2016)。我々はこの発見をきっかけに、分裂酵母の細胞間コミュニケーション全貌の理解を目指して、非必須遺伝子破壊株コレクション（3420 株）を用いた組織的解析を開始した。NSFs 発見の契機となった適応生育現象（寒天培地上で単独では生育することができない遺伝子破壊株が野生株近傍で生育回復を示す現象）に注目して、貧栄養環境である最少培地で適応生育現象を示す 37 株を取得した。これらは、野生株コロニーから放出されるコミュニケーション分子により生育回復していると考えられる。取得した 37 株と野生株培養上清の解析から、分裂酵母がグルタチオン（GSH）の分泌と取り込みを行うことを見出した。さらに、GSH を取り込めない変異株では、GSH を合成できるにも関わらず細胞内 GSH 量が減少し、細胞内 GSH の枯渇は細胞形態異常を引き起こすことがわかった。本発表では組織的探索の最新の結果と、分裂酵母が同種異細胞間で GSH を共有する生理的意義について議論したい。
The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is a valuable, eukaryotic model microorganism to investigate fundamental cellular systems. However, its ecological properties such as cell-cell interactions are poorly understood. We previously identified Nitrogen Signaling Factors (NSFs) as cell-cell communication molecules of this organism (Sun *et al.*, 2016). To find other communication molecules, we performed a genome-wide screen employing a gene deletion mutant collection (3420 strains). 37 mutants exhibited an adaptive growth phenomenon, wherein these mutants displayed growth defects on minimal media but recovered their growth in the vicinity of wild-type cell colonies. The analysis of wild-type cells' culture supernatant revealed that *S. pombe* cells secrete and incorporate glutathione (GSH). Furthermore, in mutant cells that are unable to incorporate GSH, intracellular GSH levels decreased despite the ability to synthesize it, while the depletion of intracellular GSH induced abnormal cell morphology. We will present the most recent results of our comprehensive analysis and discuss the physiological significance of sharing GSH in *S. pombe* cells.

microbial interaction, glutathione, fission yeast

発表責任者：西村慎一（nshin@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E2a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E2 会場

マクロファージにおけるアラキドン酸代謝物 PGE_2 を介した酸化ステロール産生のフィードバック調節機構
Feedback regulation of 25-hydroxycholesterol synthesis by prostaglandin E_2 in macrophages
○西村 瑞希[1]、齋藤 穂高[1]、落合 翔[2]、原 俊太郎[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]昭和大薬)
○Mizuki NISHIMURA[1], Hodaka SAITO[1], Tsubasa OCHIAI[2], Shuntaro HARA[2], Ryuichiro SATO[1], Yoshio YAMAUCHI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agr. and Life Sci. , Univ. of Tokyo, [2]Sch. Pharm., Showa Univ.)

25-Hydroxycholesterol（25HC）はコレステロール恒常性制御において重要な役割を果たすコレステロール代謝物である。マクロファージではウイルス感染や細菌感染による炎症反応によって cholesterol 25-hydroxylase（CH25H）の発現が誘導され、産生された 25HC が抗ウイルス・抗細菌活性を示すことが知られている。しかし、過剰な 25HC は細胞毒性や炎症シグナルの増幅等の原因になることから、その合成は厳密に制御される必要があるが、CH25H の発現制御機構は不明な点が多い。一方、炎症反応ではアラキドン酸カスケードが活性化され、多様なプロスタノイドも産生される。最も主要なプロスタノイドである prostaglandin E_2（PGE_2）は、炎症促進作用と抗炎症作用を有し、免疫反応で多様な役割を演じている。そこで、本研究では、炎症反応において、アラキドン酸代謝物 PGE_2 が 25HC の産生制御に果たす役割について解析した。我々は、マウスマクロファージにおいて、LPS 刺激によって誘導された CH25H 発現や 25HC 産生が PGE_2 存在下で顕著に抑制されることを見出した。PGE_2 産生の律速酵素である COX-2 の阻害や、PGE_2 受容体である EP4 の阻害によって LPS 刺激による CH25H の発現がさらに上昇したことから、COX2 依存的に産生された PGE_2 が EP4 を介して CH25H 発現を抑制することが示唆された。さらに、PGE_2 による CH25H の発現抑制には、cAMP-PKA シグナルを介した JAK1-STAT1 経路の不活化が関与していることが示唆された。以上の結果より、炎症反応で産生される PGE_2 は CH25H の発現をフィードバック阻害することで 25HC の過剰な産生を抑制し、炎症収束に寄与していると考えられる。

25-Hydroxycholesterol (25HC) plays a key role in the regulation of cholesterol homeostasis. In macrophages, inflammatory stimuli induce 25HC production by upregulating cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) expression. However, how macrophages prevent the excess 25HC production in inflammatory settings remains poorly understood. Here, we found that prostaglandin E_2, one of the inflammatory lipid mediators produced from arachidonic acid by COX-2 and mPGES1, markedly suppresses LPS-dependent CH25H expression and 25HC production. We also showed that the cAMP-PKA signaling is involved in the suppression of CH25H expression by PGE_2 through the inactivation of the JAK-STAT pathway. These results suggest that as a negative regulator, PGE_2 signaling participates in the feedback regulation of CH25H expression and 25HC synthesis in macrophages, which may contribute to the resolution of inflammation.

cholesterol, 25-hydroxycholesterol, prostaglandin

発表責任者：山内祥生（yoshio-yamauchi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E2a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E2 会場

分裂酵母の核肥大化メカニズムの解析
Studies on the mechanisms of nuclear expansion in fission yeast
○久米 一規[1]、Nurse Paul[2] ([1]広島大学、[2]フランシスクリック研究所)
○Kazunori KUME[1], Paul Nurse[2] ([1]Hiroshima University, [2]The Francis Crick Institute)

真核生物において核サイズは、細胞サイズと比例関係を示し、核と細胞の体積比（N/C ratio）は細胞増殖時に一定に維持されている。このことが最初に報告されてから約 1 世紀以上が経過しているが、細胞がいかにして N/C ratio を決定し、維持しているのかについての理解には至っていない。また、核サイズの異常はがん細胞や老化細胞でみられることから核サイズ研究の重要性が示唆されているが、その詳細は不明である。わたしたちは、N/C ratio が 0.08 を示す分裂酵母を真核生物のモデルとして用いて、普遍的な核サイズ制御機構の解明を目指し研究に取り組んでいる。これまでに N/C ratio 異常変異体の網羅的スクリーニングから、当該変異体を選抜し、N/C ratio 増加変異体の解析を中心に進めてきた。そして、少なくとも 3 つの細胞内プロセス（核-細胞質間の物質輸送、脂質代謝、核への膜輸送）の適切な制御が N/C ratio の制御に重要であることがわかってきた。本研究では、N/C ratio 増加を引き起こす核肥大化のメカニズムにせまるために、N/C ratio 増加変異体 *rae1-167*（Rae1: mRNA 核外輸送）が示す核肥大化の原因（核内凝集体や過剰な核膜成長）についての詳細な解析を行なった。本発表ではその結果について報告する。

In eukaryotes, nuclear size is proportional to cell size, and the ratio between nuclear volume and cell volume, called N/C ratio is maintained constant during cell growth and division. Although more than a century has passed since this was first reported, it is still unclear how cells determine and maintain the N/C ratio. Using fission yeast with an N/C ratio of 0.08 as a model organism, we have been studying the universal nuclear size control mechanism. We have selected mutants with altered N/C ratio from a fission yeast gene deletion library and have focused on analyzing mutants with increased N/C ratio. We have found that at least three intracellular processes (nucleocytoplasmic transport, lipid metabolism, and membrane flow to the nuclear envelope) is important for the control of N/C ratio. To understand the mechanism of nuclear expansion that causes increased N/C ratio, we studied in detail the cause of the nuclear expansion (nuclear aggregates and excess nuclear membrane growth) observed in N/C ratio mutant *rae1-167* (Rae1: mRNA export factor). In this presentation, we report the results.

Fission yeast, Nuclear size, Nuclear expansion

講演番号：4E2a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E2 会場

出芽酵母の *S*-アデノシルホモシステインによる寿命延長機構の解析

Mechanism of lifespan extension by *S*-adenosyl-L-homocysteine in budding yeast

○吉田 未来[1]、益村 晃司[2]、古原 優希[2]、小川 貴史[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大工、[2]広島大院統合生命)
○ Miku YOSHIDA[1], Koji MASUMURA[2], Yuki KOHARA[2], Takafumi OGAWA[2], Masaki MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. of Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ.)

メチオニン(Met)制限(MetR)は、カロリー制限(CR)と同様に多くのモデル生物の寿命を延長する。我々は、Met 代謝物である *S*-アデノシルホモシステイン（SAH）を出芽酵母に添加すると、経時寿命（定常期後の制限栄養下における生存期間）が延長することを見出した。このメカニズムは、SAH により *S*-アデノシルメチオニン（SAM）合成が促進され、Met と ATP が消費されることによって MetR と長寿遺伝子 AMPK（AMP 依存性キナーゼ）が活性化され、寿命を延長するものである（*Aging Cell, 21*, e13604, 2022）。これらのメカニズムに加えて、SAH を添加した酵母では CR の際に増加すると報告されている NAD^+やスペルミジンなどの代謝物が増加したことから、SAH は CR を模倣することが示唆された。

そこで、本研究では、寿命延長における SAH と CR との遺伝学的関連を調べることとした。SAH と CR（0.5% グルコースの条件）を同時に行うとそれぞれ単独で観察された寿命延長が打ち消された。より厳しい CR（0.05% グルコースの条件）を行うと寿命延長しないことが知られていることから、SAH は CR の効果を強めたと予想した。次に、SAH の遺伝子発現への影響を調べたところ、SAH はミトコンドリアの機能や酸化ストレス応答の関連遺伝子の発現を増加させた。現在、SAH の作用についてさらに解析を進めている。

We showed that the supplementation with the Met metabolite (Met) *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) extends lifespan in budding yeast. The mechanism is that SAH stimulates *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) synthesis, which consumes Met and ATP, thereby inducing Met restriction (MetR) and activating the AMPK, which extends lifespan (*Aging Cell*, *21*, e13604, 2022). In addition, SAH treated cells increased the metabolites such as NAD^+ and spermidine, which are reported to increase during calorie restriction (CR), suggesting that SAH mimics the effect of CR as well as MetR. Therefore, we examined the genetic link between SAH and CR. When SAH and CR (0.5% glucose condition) are treated in wild-type cells simultaneously, the effect of longevity was not observed. Since severe CR (0.05% glucose) does not extend lifespan, we expected that SAH would enhance the effect of CR. Next, we examined the effects of SAH on gene expression and found that SAH increased the expression of genes related to mitochondrial function and oxidative stress response. Further analysis of the effects of SAH is currently conducted.

budding yeast, lifespan, methionine metabolism

発表責任者：水沼正樹（mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E2a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 E2 会場

S-アデノシルホモシステインによる酸化ストレス耐性機構の解析
Analysis of the oxidative stress resistance induced by *S*-adenosyl-L-homocysteine
○金地 美由子[1]、小川 貴史[2]、益村 晃司[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大工、[2]広島大院統合生命)
○Miyuko KANAJI[1], Takafumi OGAWA[2], Koji MASUMURA[2], Masaki MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. of Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ.)

寿命研究は、健康寿命の延伸や老化に伴う多くの疾患治療への応用に繋がる。我々は、出芽酵母と線虫 C.エレガンスにおいてメチオニン代謝物 *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)を添加すると *S*-アデノシルメチオニン(SAM)合成が促進され、寿命が延長することを発見した(*PNAS*, 2016, *Aging Cell*, 2022)。SAM は生体内メチル化反応のメチル基供与体として著名で、SAH は SAM のメチル化を競合的に阻害する。最近の解析から、SAH を作用させた酵母や線虫は酸化ストレスに対して耐性を示すことを見出した。寿命延長とストレス耐性は関連が深いことから、SAH による酸化ストレス耐性獲得は寿命決定に重要な役割を持つと予想した。本研究では出芽酵母および線虫を用いて SAH による酸化ストレス耐性獲得のメカニズムについて解析することを目的とした。

SAH を作用させると SAH のみならず SAM も高蓄積したことから、酸化ストレス耐性の獲得にはメチル基転移酵素が関与すると予想した。出芽酵母に存在するメチル基転移酵素の破壊株の中から SAH による影響を受けない株を選抜した。取得された遺伝子に着目して、メチル化が関与する SAH による酸化ストレス耐性獲得メカニズムの解析を進めている。

Elucidating the mechanism of lifespan can provide practical applications on lifespan extension and aging-related diseases. We reported that supplementation with *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) promotes *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) synthesis and extends lifespan in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae* and nematode, *Caenorhabditis elegans*. In the methionine metabolism, SAM acts as a methyl donor for methylation reactions, and SAH competitively inhibits its methylation. We found that supplementation with SAH in yeast and nematode exhibits oxidative stress resistance. Since lifespan extension and stress resistance are closely related, the achievement of oxidative stress resistance by SAH would play an important role in lifespan extension. Since supplementation with SAH causes high accumulation of SAH and SAM, we predicted that methyltransferases might be involved in the process of oxidative stress resistance. Among the methyltransferase deletion mutants, we screened for strain(s) that did not affect the stress resistance by SAH using in yeast. We are currently analyzing the methylation-mediated mechanism by which SAH increased oxidative stress resistance using yeast and nematode.

oxidative stress, budding yeast, nematode

発表責任者：水沼正樹（mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E2a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E2 会場

Aspergillus 属糸状菌における異種タンパク質生産に対する応答

Response to the production of foreign proteins in Aspergilli

○野口 絵理奈[1]、三澤 恒汰[2]、張 斯来[2]、五味 勝也[2]、新谷 尚弘[2] ([1]東北大農、[2]東北大院農)
○Erina NOGUCHI[1], Kota MISAWA[2], Silai ZHANG[2], Katsuya GOMI[2], Takahiro SHINTANI[2] ([1]Tohoku Univ. Fac. Agric., [2]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agric. Sci.)

麹菌はタンパク質分泌能力が高く異種タンパク質の分泌生産宿主として有望である。しかし、近縁種のタンパク質の生産量に比べて高等生物由来のそれが著しく低いという課題がある。麹菌を宿主として、麹菌グルコアミラーゼ A 触媒ドメイン(GlaA)とオボアルブミン(OVA)の融合タンパク質遺伝子をマルトース誘導性プロモーターで発現させたところ、OVA の翻訳に依存して麹菌の生育が顕著に遅延し、OVA 生産量も極めて低かった。宿主の品質管理機構によって異種タンパク質の生産が阻害される可能性が示唆された。本研究では、異種タンパク質生産の遺伝学的解析の実施を見据えて、麹菌よりも遺伝学的解析が容易な近縁の *Aspergillus nidulans* を宿主とした OVA の生産系を構築した。

上記発現カセットを *A. nidulans* に導入しマルトース培地で培養したところ、麹菌と比べ弱い生育抑制が観察された。また麹菌とは異なり、10 mg/L 程度の GlaA-OVA 融合タンパク質の分泌が確認され、*A. nidulans* の品質管理機構は麹菌ほど厳密ではない可能性が考えられた。今後は、コピー数の増加、発現プロモーターやキャリアタンパク質の最適化などにより、生産性向上を目指したい。また、変異源処理により生産性が向上した変異株を取得し、生産性に関わる遺伝子の同定を行う予定である。

Although *A. oryzae* is utilized to produce recombinant proteins, there is a problem that the productivity of proteins derived from higher organisms is much lower than that of fungal proteins. When the gene encoding a fusion protein of a catalytic domain of *A. oryzae* glucoamylase A (GlaA) and ovalbumin (OVA) was expressed from a maltose-inducible promoter, the growth of *A. oryzae* was significantly delayed depending on the translation of OVA and the production was extremely low. This suggests that the production of foreign proteins may be inhibited by quality control mechanisms. In this study, we constructed an OVA production system using the closely related *Aspergillus nidulans* to conduct the genetic analysis of heterologous protein production.

When the above expression cassette was introduced into *A. nidulans* and cultured in maltose medium, its growth inhibition was observed. Also, unlike *A. oryzae*, secretion of approximately 10 mg/L of GlaA-OVA fusion protein was observed. These suggests that the quality control mechanism of *A. nidulans* may not be as strict as that of *A. oryzae*. We would like to improve productivity by increasing copy number and optimizing promoters and carrier proteins, obtain mutant strains with improved productivity by treatment with mutagens, and identify genes related to productivity.

Aspergillus, foreign protein production, ovalbumin

発表責任者：新谷尚弘（takahiro.shintani.d7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4E2a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E2 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の同株のコロニー間で生じる増殖抑制の制御メカニズムの解明
Elucidation of regulatory mechanism of growth inhibition between colonies of the same strain in *Aspergillus oryzae*

○浜中 祐弥[1]、片山 琢也[1,2]、黒田 裕樹[3]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]慶應大・環境情報)
○Yuya HAMANAKA[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Hiroki KURODA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Fac. of Env. and Info. Stud., Keio Univ.)

糸状菌では他種または他株どうしを対峙培養したときにコロニー間で増殖が抑制される現象が生じ、拮抗作用として知られている。一方、我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* において同株どうしにも関わらずコロニー間の増殖抑制が生じることを見いだした。そしてスクリーニングにより、広範な遺伝子の発現制御に関与する FlbA と LaeA をコードする遺伝子の破壊株で増殖抑制が生じないことがわかり、同株どうしの増殖抑制に関与する遺伝子を初めて明らかにした。本研究ではこの知見にもとづき、増殖抑制の制御メカニズムの解明を試みた。

はじめに、RGS (Regulator of G protein signaling)タンパク質である FlbA に着目した。FlbA は G タンパク質 α サブユニット FadA の GTPase 活性を促進する。*flbA* を破壊すると FadA の GTPase 活性を促進する働きが損なわれ GTP 結合型の FadA が増加するが、GTPase 活性を失った FadA のドミナントアクティブ変異株 *fadA*^{Q204L} においても同様の表現型が予想された。*fadA*^{Q204L} 株を対峙培養したところ増殖抑制が生じなかったことから、FadA を介した G タンパク質シグナルが増殖抑制に関与することが示唆された。さらに、増殖抑制に関与するもう一つの因子 LaeA は、FadA を介した G タンパク質シグナルの下流に位置し、栄養生長と分化の転換を制御することが知られている。*flbA* 破壊株と *laeA* 破壊株の同株どうしのコロニー対峙面におけるトランスクリプトーム解析により、発現量が減少した遺伝子の多くが両破壊株で重複していることがわかり、FlbA と LaeA がシグナル経路を共有している可能性が示された。本発表では、同株どうしのコロニー間の増殖抑制を制御する機能について、FadA を介した G タンパク質シグナル経路全体を網羅的に解析した結果を報告する。

In filamentous fungi, growth inhibition occurs between colonies of different species/strains, which is known as “antagonistic effect”. On the other hand, we found growth inhibition between colonies of the same strain in *Aspergillus oryzae*. By performing the screening, we discovered that FlbA and LaeA were involved in the growth inhibition. Based on the findings, we aimed to elucidate the regulatory mechanism of the growth inhibition. A dominant active mutant of FadA, a G protein α subunit, which is negatively regulated by RGS protein FlbA, did not show growth inhibition, suggesting the involvement of FadA-mediated G protein signaling in the growth inhibition. In addition, many downregulated genes overlapped in Δ*flbA* and Δ*laeA*, implying that FlbA and LaeA share a common signaling pathway. We will present the function of whole signaling pathway mediated by FadA G protein in the growth inhibition between colonies of the same strain.

Aspergillus oryzae, microbial interaction, G protein signaling

発表責任者：丸山潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E2a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E2 会場

糸状菌間相互作用に関与する *Trichoderma* 属の揮発性化合物（VOCs）の解析
Analysis of *Trichoderma* volatile organic compounds (VOCs) related to fungal-fungal interactions
○中村 洸[1]、浦山 俊一[2,3]、萩原 大祐[2,3] ([1]筑波大・生命農学、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大・MiCS)
○Kou NAKAMURA[1], Syun-ichi URAYAMA[2,3], Daisuke HAGIWARA[2,3] ([1]Degree Program in Life and Agric. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]MiCS., Univ. of Tsukuba)

植物や細菌、菌類は多種多様な揮発性化合物（volatile organic compounds ; VOCs）を生産する。VOCs は、同種間や異種間において、受け手の生育等に影響を与えることが報告されており、自然界における競争や協働といった生物間相互作用において重要なコミュニケーション分子であると考えられる。しかし VOCs のうち、糸状菌が産生する VOCs（fungal VOCs ; fVOCs）の探索例は少なく、相互作用解析の事例も限られているため、fVOCs の生態内機能については未解明な部分が多い。そこで本研究では、糸状菌が生産する fVOCs に着目し、特に糸状菌間で成長抑制作用を示す fVOCs の探索および解析から、その生理的および生態的な機能の解明を目指す。

まず、成長抑制作用を示す fVOCs の探索に、6well plate を用いた double dish set 法を確立し、PDA 培地上における糸状菌 10 菌種を、総当たりで対峙させスクリーニングを行った。その結果、*Trichoderma reesei* が生産する fVOCs により、複数の *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属の成長が抑制された。次に、*T. reesei* が引き起こす成長抑制作用が、培地組成により変化するか検討したところ、Malt extract agar（MEA）培養時に成長抑制作用が消失した。PDA、MEA 培養で生産される fVOCs をシリカモノリスに吸着、溶媒抽出して GC/MS で分析し比較すると、11 種類の化合物生産量が MEA 培養において減少していた。これらは benzen や terpene 類の化合物が含まれ、成長抑制作用を示すものが含まれると予想された。

Plants, and microbes produce a wide variety of volatile organic compounds (VOCs). In nature, VOCs have been reported to affect the growth of recipients and thought as important molecules when organisms interact with other species. However, the number of fungal VOC（fVOC）searches and these interaction analyses are not so much, so their functions are unclear. In this study, we aimed to elucidate physiological and ecological functions of fVOCs through screening and analysis of fVOCs exhibiting growth-inhibitory effects. First, we established more efficient screening-method of fVOCs using 6 well plate and performed screening with 10 species of fungi on PDA. As a result, fVOCs produced by *Trichoderma reesei* inhibited the growth of *Aspergillus* and *Penicillium* species. Next, we investigated whether the growth inhibitory effect caused by *T. reesei* depended on culture media, and found that this effect disappeared on malt extract agar (MEA) culture. The fVOCs produced on PDA and MEA were collected by monolithic material sorptive extraction and analyzed by GC/MS. The productions of 11 compounds decreased on MEA. These compounds included benzene and terpene analogs.

Fungal-fungal interaction, Volatile organic compounds, *Trichoderma*

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4E2a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 E2 会場

Aspergillus nidulans における 2 つの遺伝子クラスターを介した NO ストレス耐性機構の機能解明
Functional elucidation of NO stress tolerance mechanisms through two gene clusters in *Aspergillus nidulans*.

○進士 恭誠、天久 まどか、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命環境/ MiCS）
○Kyosei Shinji, Madoka Amahisa, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya (Fac. Life & Env. Sci./ MiCS, Univ. of Tsukuba)

一酸化窒素(NO)は様々な細胞成分と反応することで強い細胞毒性を示す。糸状菌は宿主の免疫系や自身の代謝で生じる NO に対して強い耐性を持つと予想されている。これまでに、NO ストレス存在下で発現が誘導される *Aspergillus nidulans* の cytochrome P450（CYP540A2）が NO 耐性に関わることを明らかにした。本菌は、この P450、転写因子、電子伝達タンパク質及び脂肪酸分解酵素と推定される遺伝子からなる遺伝子クラスターを 2 つ有する。これらの遺伝子破壊株と遺伝子クラスター間で対応する遺伝子の二重遺伝子破壊株を作製・解析した。その結果、これらの遺伝子の多くが NO ストレス存在下での生育に関わることが示された。また、推定転写因子の遺伝子破壊株の生育は C9～C12 の飽和脂肪酸に対して感受性を示した。トランスクリプトームの Gene Ontology 解析により、これらの遺伝子と共に脂肪酸の異化に関わる遺伝子群の発現が NO ストレス存在下で上昇することが示された。また、NO ストレス存在下の菌体は、細胞内に C16:0、C18:2、C18:1 の脂肪酸を蓄積した。以上の結果から、これらの遺伝子クラスターは脂肪酸の代謝を介して本菌の生育の NO 耐性に関わることが示された。

Nitric oxide (NO) reacts with various cellular components and is highly cytotoxic. Filamentous fungi are predicted to tolerate NO produced by the host immune system. We found that *Aspergillus nidulans* cytochrome P450 (CYP540A2), of which expression is induced in NO stress conditions, is involved in NO tolerance. This fungus contains two gene clusters containing this P450, a transcription factor, an electron transfer protein, and putative fatty acid-degrading enzyme genes. Here, we analyzed gene disruptants of these genes to find that most of them are involved in the NO tolerance. Gene Ontology analysis of the fungal transcriptome showed that the expression of genes involved in fatty acid catabolism along with these genes was increased in the presence of the NO stress. Fungal cells in the presence of NO stress accumulated C16:0, C18:2, and C18:1 fatty acids. These results indicate that these gene clusters are involved in the fungal NO tolerance through fatty acid metabolism.

Aspergillus nidulans, Nitric oxide, Fatty acid

発表責任者：進士恭誠（s2010949@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4E2a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 E2 会場

Aspergillus 属糸状菌における糖アナログによるアミラーゼ生産誘導の差異
Difference in the amylase induction by sugar analogues in *Aspergilli*
○沼本 穂[1]、森山 貴博[2]、田邉 理子[2]、寄立 麻琴[2]、平井 剛[2]、加藤 直樹[1] ([1]摂大農、[2]九大院薬)
○Minori Numamoto[1], Takahiro Moriyama[2], Riko Tanabe[2], Makoto Yoritate[2], Go Hirai[2], Naoki Kato[1] ([1]Fac. of Agric., Setsunan Univ., [2]Grad. School of Pharm. Sci., Kyushu Univ.)

Aspergillus 属糸状菌におけるアミラーゼは、デンプンの分解過程で生成されるイソマルトースによって発現誘導される。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、細胞外でマルトースなどから糖転移反応によって生成したイソマルトースがシグナルとなり、アミラーゼ遺伝子の発現を誘導する。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* では、マルトースがトランスポーターMalP によって取り込まれ、細胞内のマルターゼ MalT の糖転移活性によってイソマルトースが生成される。これらのイソマルトースシグナルは転写因子 AmyR を細胞質から核に移行させることで転写を活性化させる。しかしながら、イソマルトースが AmyR を活性化するまでのシグナル伝達経路は未解明のままである。我々は、糖が転写因子の活性を制御するメカニズムを解明するため、代謝されない糖アナログを合成し、その有効性について検討してきた。これまで、イソマルトースのグリコシド結合の酸素原子を炭素原子に変えたイソマルトースアナログ (*CH_2*-IM) が、*A. nidulans* のアミラーゼ生産誘導物質として機能することを見出した。本研究では、*A. oryzae* におけるイソマルトースアナログに対するアミラーゼ生産誘導能について調べた。*A. nidulans* で評価を行ったのと同様の培養条件において、イソマルトースは *A. oryzae* においてもアミラーゼ生産を誘導したのに対し、イソマルトースアナログ添加ではアミラーゼ生産が誘導されなかった。これらのことから、*A. nidulans* と *A. oryzae* ではイソマルトースアナログに対する感受性が異なることが明らかとなった。

In *Aspergilli*, amylase production is induced by isomaltose formed during starch degradation. Isomaltose triggers the nuclear localization of pathway-specific transcriptional activator AmyR, followed by the amylase gene expression. *Aspergillus nidulans* converts maltose to isomaltose extracellularly, which acts as a signaling molecule. In contrast, *Aspergillus oryzae* transports maltose into the cell through maltose permease MalP and converts it to isomaltose by intracellular maltase MalT. However, the isomaltose signaling pathway that activates AmyR remains largely unknown. Previously, we found isomaltose analogue having *CH_2*-glycosidic bound induced the amylase production in *A. nidulans*. In this study, we observed the difference in the amylase induction between *A. nidulans* and *A. oryzae* in response to isomaltose analogues.

Amylase, Isomalotse, *Aspergilli*

発表責任者：沼本穂（minori.numamoto@setsunan.ac.jp）

講演番号：4E2a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 E2 会場

ST 合剤を用いた大腸菌の二剤併用薬剤耐性進化実験
Laboratory evolution of *Escherichia coli* under two-drug combinations with sulfamethoxazole/trimethoprim

○後藤 琉[1]、小谷 葉月[2]、吹谷 智[1]、古澤 力[2,3]、前田 智也[1,2] ([1]北大院農、[2]理研、[3]東大院理)
○Ryu GOTO[1], Hazuki KOTANI[2], Satoru FUKIYA[1], Chikara FURUSAWA[2,3], Tomoya MAEDA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]RIKEN, [3]Univ. of Tokyo)

近年、抗生物質に耐性を持つ薬剤耐性菌の出現が世界的な問題になっている。薬剤耐性菌の出現を防止するために、細菌の耐性進化機構を理解し、その進化的制約を利用することで、病原菌が耐性化できない薬剤の組合せを処方するという方法が考案されている。一方、二薬剤以上併用した場合の薬剤耐性化を予測することは未だ困難であり、その薬剤の組合せによる進化的拘束をもたらすメカニズムについても現状ほとんど明らかにされていない。本研究では、大腸菌 *Escherichia coli* MG1655 株を用いて二薬剤を併用した薬剤耐性進化実験を行うことで、大腸菌の薬剤耐性進化を抑制出来るのか検証した。薬剤は sulfamethoxazole/trimethoprim（ST 合剤）, piperacillin, amikacin, fosfomycin, D-cycloserine を使用し、ST 合剤と他の薬剤を組み合わせた二薬剤併用系列と、それぞれの薬剤を単独添加した系列について進化実験を行った。進化実験では、自動分注ロボットを用いた自動化を行い、薬剤濃度勾配培地上で 24 時間ごとの植え継ぎ操作を 30 日間繰り返した。進化実験の結果、piperacillin, fosfomycin, D-cycloserine と ST 合剤の二剤併用系列では単独薬剤条件よりも耐性進化が抑制される傾向が見られ、特に piperacillin と ST 合剤の併用においては、二重耐性株の出現が完全に抑制された。今後、得られた進化株について全ゲノムリシーケンス解析を行い、二剤併用により耐性進化が抑制されるメカニズムを明らかにしていく予定である。

The emergence of antibiotic-resistant bacteria has become a global health problem. A combination therapy prescribing drug pairs that prevent antimicrobial resistance evolution has been proposed as a promising therapy. However, prediction of antimicrobial resistance evolution under such combination therapy remains challenging, and the underlying mechanisms for evolutionary constraints are poorly understood. In this study, we performed laboratory evolution of *Escherichia coli* under two-drug combinations (sulfamethoxazole/trimethoprim; SMZ-TMP and piperacillin, amikacin, fosfomycin, or D-cycloserine). As a result, it was found that the combinations of SMZ-TMP and piperacillin, fosfomycin or D-cycloserine could suppress antibiotic resistance evolution. In particular, the emergence of double-resistant strains was completely suppressed when treated with SMZ-TMP and piperacillin pair. We are planning to perform whole-genome resequencing analysis of the evolved strains to reveal the underlying mechanism for suppression of the drug resistance evolution.

antibiotic resistance, laboratory evolution, *Escherichia coli*

発表責任者：前田智也（tomoya.maeda@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E2a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 E2 会場

他の腸内細菌存在下における大腸菌の薬剤耐性進化実験
Laboratory evolution of *Escherichia coli* under antibiotic treatments when embedded in a synthetic gut bacterial community

○永野 有佳理[1]、小谷 葉月[2]、吹谷 智[1]、古澤 力[2,3]、前田 智也[1,2]([1]北大院農、[2]理研、[3]東大院理)
○ Yukari NAGANO[1], Hazuki KOTANI[2], Satoru FUKIYA[1], Chikara FURUSAWA[2,3], Tomoya MAEDA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]RIKEN, [3]The Univ. of Tokyo)

近年、病原菌の薬剤耐性化が深刻な問題となっている。自然界や宿主腸内などでは、通常、病原菌が単一種のみの集団として存在することは稀であり、薬剤耐性化には様々な微生物相互作用が影響していると考えられている。しかしながら、その具体的なメカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで我々は、異種の存在が薬剤耐性進化に与える影響を明らかにするために、大腸菌を対象として、ヒト腸内細菌の代表種 5 種を含む共培養条件と、純粋培養条件の両方における薬剤耐性進化実験を行った。進化実験は嫌気条件下で行い、薬剤として感染症治療に用いられる一般的な 4 種類の抗菌薬（レボフロキサシン、アミカシン、メロペネム、ピペラシリン）を使用した。進化実験後に進化株を単離し、各株の薬剤耐性能の定量および全ゲノムリシーケンス解析による変異解析を行った。その結果、ピペラシリン以外の 3 薬剤では共培養条件で耐性能の上昇が抑制される傾向が見られた。一方、ピペラシリンに関して、純粋培養条件で得られた進化株は、純粋培養条件下では高い耐性能を示すにもかかわらず、他の腸内細菌種と共存させた場合では祖先株と同程度の薬剤耐性能しか示せなかった。これに対し、共培養条件で得られた進化株は、異種の存在下においても薬剤耐性能の上昇が観察された。さらに、変異解析の結果、ピペラシリンでは共培養条件と純粋培養条件で獲得していた変異に違いが見られ、異種が存在するかどうかによって薬剤耐性獲得機構が異なる可能性が示唆された。

The emergence of antibiotic-resistant bacteria is a global health crisis. Considering microbiota functionality influenced by interspecies interactions in the natural world, we hypothesized that these interactions could impact antimicrobial resistance evolution. To explore this, we conducted laboratory evolution of *Escherichia coli* under anaerobic conditions, exposing it to levofloxacin (LVX), amikacin (AMK), meropenem (MEM), and piperacillin (PIP), with or without five gut bacteria. Evolved strains from co-culturing experiments exhibited relatively lower minimal inhibitory concentrations (MICs) for LVX, AMK, and MEM compared to those from pure culturing. In contrast, both pure-cultured and co-cultured PIP-evolved strains showed similar PIP MICs. However, in the presence of the five bacteria, co-cultured strains displayed increased resistance, while pure-cultured strains did not. Genome resequencing analysis revealed distinct fixed mutations between the pure-cultured and co-cultured PIP-evolved strains. These results suggest different mechanisms for PIP resistance acquisition in the presence or absence of other bacteria.

antibiotic resistance, laboratory evolution, microbial interactions

発表責任者：前田智也（tomoya.maeda@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E3a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E3 会場

フタホシコオロギの ELOVL の同定と機能解析
Identification and characterization of ELOVL in the two-spotted cricket Gryllus bimacultus
○寺坂 優里、永田 晋治（東大院新領域）
○Yuri TERASAKA, Shinji NAGATA (GSFS, Univ of Tokyo)

【背景と目的】脂肪酸由来の脂質は、栄養分、細胞膜の構成分子、細胞内シグナル分子など、生命現象を担う重要な働きをもつ。昆虫においても同様の機能をもつが、体表におけるワックス成分が特徴的である。体表ワックスは C20 以上からなる炭化水素であり、脂肪酸から生合成される。その際、炭素鎖の伸長反応は超長鎖脂肪酸伸長酵素(Elovl/ Elongase)が担う。バッタやコオロギなどの直翅目昆虫は、体表のワックス成分が種内のセミオケミカルとして機能する。そこで、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて Elovl を同定し、その機能を解析することを試みた。
【方法と結果】RNA-sequencing 解析に基づくデータベースを用いて BLAST 検索を行った結果、他の昆虫種の Elovl と相同性の高い Contig を 13 種得た。これらの発現量を定量 PCR にて解析した結果、雌雄で発現量が異なるものや、各成長段階で発現量が異なるものが認められた。体表ワックスが生合成されるエノサイトを含む体表における発現量が認められるものも 5 種見出された。現在、RNAi によるノックダウンスクリーニングで各サブタイプの機能解析を試みている。

【Background】Lipids derived from fatty acids exert important roles in biological and physiological processes. Insects also have characteristic lipid derivatives in addition to wax component on the body surface. The cuticular waxes are hydrocarbons composed of C20 or higher carbon chain are biosynthesized from fatty acids by the very-long-chain fatty acid elongase (Elovl or Elongase). In orthopteran species, the cuticular wax component functions as a conspecific semiochemical. We attempted to identify Elovls and analyze their functions using the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.
【Methods and Results】A BLAST search using in-house database generated by RNA-sequencing analyses in our laboratory revealed 13 contigs having high homology to Elovl in other insect species. Quantitative RT-PCR revealed that sexually differentiated expression pattern and differently expression pattern according to growth and development. We also found 5 subtypes expressing in the epidermal cells, where include enocyte where cuticular hydrocarbon is biosynthesized.

Insect, ELOVL, Cricket

発表責任者：寺坂優里（yu.jute@gmail.com）

講演番号：4E3a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E3 会場

エクダイソン生合成候補中間体の脱皮活性評価
Evaluation of molting activity of candidate intermediates in the ecdysone biosynthetic pathway
○小野 肇[1]、船橋 智輝[1]、藤永 大輝[2]、齊藤 惇基[1]、片岡 宏誌[2]（[1]京大院農、[2]東大院新領域）
○Hajime ONO[1], Tomoki Funahashi[1], Daiki Fujinaga[2], Junki Saito[1], Hiroshi Kataoka[2] ([1]Kyoto Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

昆虫ホルモンのエクダイソンは脱皮・変態をはじめとする昆虫特有の発育を制御している。エクダイソンは前胸腺でコレステロールから生合成されるが、基本骨格が形成される経路は未解明のままである。一方で、転写因子 Séance はコレステロールを 7-デヒドロコレステロール (7dC) へと変換する酵素の発現を制御することが明らかにされている。そのため、Séance をノックアウトしたショウジョウバエ幼虫（Séance-KO 幼虫）は、エクダイソンを生合成できずに 1 齢で死亡する。しかし，7dC より下流の生合成中間体を摂食させると，幼虫は中間体からエクダイソンを生合成して脱皮する。本研究では、カイコ前胸腺から同定されたステロイド化合物の構造から推定された未知中間体を合成した。合成した候補化合物を Séance-KO 幼虫に摂食させて、脱皮活性を検定した。7dC を出発材料として、2 種類の立体異性体、T1-a, T1-b を合成した。T1-a, T1-b を餌に添加して、Séance-KO 幼虫に摂取させた。その結果、T1-a を摂取させた場合、全ての幼虫が 1 齢から 2 齢へと脱皮した。さらに、3 齢まで発育する個体が認められた。一方で、T1-b を摂取させた場合、全ての幼虫が 1 齢で死亡した。以上より，T1-a が未知のエクダイソン生合成中間体であることが推定された。

Ecdysone, a steroid hormone in insects, coordinates major developmental transitions. Ecdysone is biosynthesized from dietary cholesterol in the prothoracic gland. Despite extensive studies, the steps from 7-dehydrocholesterol (7dC) to the ketodiol, building the formation of the ecdysteroid skeleton have not been characterized. In contrast, various ecdysteroid biosynthetic enzymes and related transcriptional factors have been characterized. The transcriptional factor Séance regulates the enzyme catalyzing the conversion from cholesterol to 7dC. The knockout of Séance results in lethality at the first instar larval stage due to molting deficiency. This phenotype can be rescued by feeding appropriate intermediates to the larvae. We synthesized candidate intermediates, the isomers T1-a and T1-b, from 7dC, based on a sterol identified from the prothoracic gland of the silkworm *Bombyx mori*. The Séance knock-out larvae molted to the second larval stage by feeding T1-a, but not by T1-b. Some larvae fed with T1-a further developed to the third instar larval stage. These results suggest that T1-a is an uncharacterized intermediate in the ecdysone biosynthetic pathway.

Ecdysone, Biosynthesis, Intermediate

発表責任者：小野　肇（ono.hajime.5a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E3a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E3 会場

ハロ酸デハロゲナーゼ様フォスファターゼと融合したバクテリア由来テルペン環化酵素の構造的洞察

Structural insights into a bacterial terpene cyclase fused with haloacid dehalogenase-like phosphatase

○藤山 敬介、髙木 海、VO Nhu Ngoc Quynh、森田 直子、高橋 俊二 (理研 CSRS)
○ Keisuke FUJIYAMA, Hiroshi TAKAGI, Nhu Ngoc Quynh VO, NAOKO MORITA, Shunji TAKAHASHI (RIKEN CSRS)

テルペノイドは天然物の中で最も大きなグループの一つとして知られており、その多様なテルペン骨格はテルペン環化酵素（TC）によって構築される。TC は特定のドメイン構造を持つことが知られているが、近年では、N 末端側の haloacid dehalogenase (HAD)-like phosphatase (HLP)ドメインと、C 末端側の TC のβ（TCβ）ドメインから構成される酵素（HAD-TC）が次々に単離されている。しかしながら、HAD-TC の実験構造は未だに決定されておらず、詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では HAD-TC の分子メカニズムを明らかにするため、我々が同定した海洋微生物由来の HAD-TC であるドリメノール合成酵素 AsDMS を研究対象とし、X 線結晶構造解析に取り組んだ。結晶構造解析に適した変異型 AsDMS を用いることにより、基質である farnesyl-pyrophosphate（FPP）結合型および中間生成物である drimenyl pyrophosphate（DPP）結合型 AsDMS の結晶構造を決定した（図 1)。加えて、得られた基質との相互作用情報をもとに部位特異的変異導入を実施し、変異酵素の活性を調査した。これにより、環化と脱リン酸化に関わる触媒残基を同定した。前大会の進捗として、主に DPP 結合型 AsDMS の結晶構造解析と変異体を用いた実験結果について報告する。

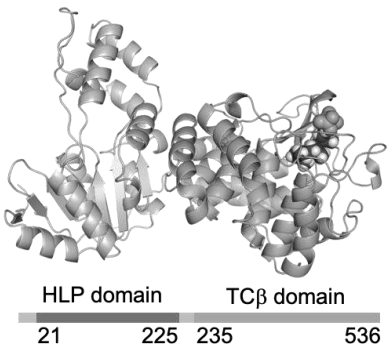


図 1 AsDMS の全体構造

Terpenoids are known as one of the largest groups of natural products, and their terpene skeletons are constructed by terpene cyclases (TCs). Recently, some unique TCs, which are constructed by haloacid dehalogenase (HAD)-like phosphatase (HLP) domain at N-terminus and TC β (TCβ) domain at C-terminus, were isolated, and they are so-called HAD-TC. Despite their molecular mechanisms are attractive, there is no experimental structure, and the detailed molecular mechanisms remain unclear. In this study, to reveal the molecular mechanisms of HAD-TC, we performed X-ray crystallographic analysis of AsDMS, which was reported as a marine bacterial HAD-TC in our previous study. In this presentation, I will talk about the crystal structures of AsDMS in complex with its substrates, especially, intermediate-bound form of AsDMS.

terpenoid, biosynthesis, crystal structure

発表責任者：藤山敬介（keisuke.fujiyama@riken.jp）

講演番号：4E3a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E3 会場

Iron-sulfur protein catalyzed [4+2] cycloadditions in verticilactam biosynthesis
○Yu ZHENG[1], Katsuyuki Sakai[1], Kohei Watanabe[2], Hiroshi Takagi[1], Yumi Sato-Shiozaki[1], Yuko Misumi[3], Yohei Miyanoiri[3], Genji Kurisu[3], Toshihiko Nogawa[1], Ryo Takita[2,4], Shunji Takahashi[1]
([1]RIKEN CSRS, [2]The Univ. of Tokyo, [3]Osaka Univ., [4]Univ. of Shizuoka)

The Diels-Alder reaction is the [4+2] cycloaddition of a conjugated diene and a substituted dienophile to form a substituted cyclohexene derivative and up to four contiguous stereogenic centers. Natural products presumably biosynthesized by the [4+2] cycloadditions are frequently reported in the literature. Verticilactams is a tetracyclic macrolactam metabolite isolated from *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 and shows moderate activity against the malaria parasite *Plasmodium falciparum* 3D7. Like other polycyclic macrolactams, the [4+2] cycloaddition in verticilactam biosynthesis was thought to be spontaneous because of the lack of homologues of known [4+2] cyclases or candidate enzymes in the gene cluster.

In this study, we addressed the cryptic mechanistic mystery of post-PKS modification in verticilactam biosynthesis through gene disruption, *in vitro* enzyme characterization, and computational calculations. We confirmed that VtlG is a cytochrome P450 that catalyzes mono-hydroxylation reaction of polyene macrolactam precursor in post-PKS modification. Most importantly, we report that the intramolecular [4+2] cycloadditions can be significantly accelerated by ferredoxins (Fds). Fds are widely distributed small iron-sulfur (Fe-S) proteins that act as versatile electron carriers in various biological processes including photosynthesis, carbon assimilation, nitrogen fixation, among others. Our findings were initially discovered using $[2Fe\text{-}2S](Cys)_4$ cluster spinach Fd and verified using $[3Fe\text{-}4S](Cys)_3$ cluster actinobacterial Fd (VtlF). Based on catalytic activity evaluation using sodium dithionite-reduced Fds and apo-Fds lacking the Fe-S cluster, we confirm that the catalytic activity is not affected by the oxidized state but depends on the Fe-S cluster. A more detailed mechanistic study will be presented in the meeting. Our work highlights Nature's ingenious strategy to generate complex molecule structures, which, to our knowledge, is the first time for [4+2] cycloaddition reaction by iron-sulfur protein Fd.

[4+2] cycloaddition, *Streptomyces*, Iron-sulfur protein

講演番号：4E3a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E3 会場

維管束植物とは全く異なる進化を遂げた蘚類イソプレン合成酵素の解析

Evolutionary origin of the moss isoprene synthase quite different from that of vascular plants

○川上 哲也[1]、野中 彩智[2]、宮崎 翔[3]、川出 洋[1,2]（[1]東農工大院農、[2]東農工大農、[3]東農工大 GIR）
○Tetsuya KAWAKAMI[1], Sachi NONAKA[2], Sho MIYAZAKI[3], Hiroshi KAWAIDE[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]GIR, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

イソプレンは多くの陸上植物で生合成される最小のテルペノイドである。維管束植物におけるイソプレンはモノテルペン合成酵素から機能進化したイソプレン合成酵素（ISPS）により生産されることが知られ、イソプレンに関する生物学的・環境学的研究は盛んに行われている。一方、非維管束植物のコケ植物（蘚類）ではイソプレンの生産が確認されていたが、ISPS の構造と機能などの分子生物学的な知見はほとんどない。我々は Alphafold を用いた立体構造予測とゲノム情報に基づいた遺伝子探索の結果，蘚類ハイゴケ（*Calohypnum plumiforme*）から被子植物以外で初めて ISPS を同定したことを報告する。テルペン合成酵素（TPSs）の系統解析から、CpISPS はジテルペン環化酵素と相同性が高く、モノテルペン合成酵素から派生した被子植物 ISPS とは進化系統的に大きく異なる酵素であることが示された。CpISPS の進化起源を探るために、CpISPS の基質ポケットを構成する２つの芳香族アミノ酸に対して変異を導入したところ、ジテルペン環化活性を獲得した。この結果を受け、蘚類と被子植物におけるイソプレン生合成能の獲得は異なる進化起源に由来することを酵素学的視点から解明した。本研究につづき、今後は蘚類におけるイソプレンの生理的役割をはじめ、蘚類がイソプレンを放出する機構について環境学的な研究に展開させたい。

Isoprene is the smallest terpenoid biosynthesized in many terrestrial plants. Isoprene in vascular plants is known to be produced by isoprene synthase (ISPS), a functionally evolved from monoterpene synthase. In contrast, isoprene production in non-vascular moss plant (bryophytes) has been observed, but little is known about ISPS of mosses, including its structure and function. We report the first identification of ISPS from the bryophyte *Calohypnum plumiforme* based on the prediction of 3D structure using Alphafold and genome database. Phylogenetic analysis of terpene synthases (TPSs) indicates that CpISPS is homologous to diterpene cyclases and evolutionary different from the ISPSs derived from monoterpene synthases of vascular plants. To explore the evolutionary origin of CpISPS, we introduced mutations in two aromatic amino acids constituting the substrate binding site, resulting that the mutant ISPS acquired the activity of a diterpene cyclization enzyme. These results indicate that the acquisition of isoprene biosynthesis between bryophytes and angiosperms has different evolutionary origins.

Biosynthesis, Calohypnum plumiforme, diterpene synthase

発表責任者：川出洋（hkawaide@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4E3a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E3 会場

ゲノム比較解析を用いたアゾキシアルケン化合物の生合成機構に関する研究

Biosynthetic investigation of azoxyalkene compounds using comparative genome analysis

○福森 海人[1]、長野 遥[1]、田中 悠[1]、岸本 拓也[2]、國武 博文[2]、荒川 賢治[1,2] ([1]広島大院・統合生命、[2]広島大院・先端研)
○ Kaito FUKUMORI[1], Haruka NAGANO[1], Yu TANAKA[1], Takuya KISHIMOTO[2], Hirofumi KUNITAKE[2], Keniji ARAKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】

放線菌は多種多様な生理活性を有する化合物を生産することで知られており、1 株当たり 30 種類以上の二次代謝生合成遺伝子群を有するが、実際の生産物を考慮すると、約 8 割の生産物は確認されておらず、「休眠状態」と言える。我々はこのような二次代謝遺伝子クラスター覚醒を目的として、*Streptomyces rochei* 7434AN4 株の 3 つの遺伝子に変異を加えた KA57 株を構築した。KA57 株は親株非生産のアゾキシアルケン化合物 KA57-A を生産する。この化合物は、アゾキシ結合を有しているが、その結合形成機構の全容はまだ明らかになっていない。

今回、我々は KA57-A におけるアゾキシ結合形成機構に関与される遺伝子の特定を目指した。

【方法・結果】

KA57-A の生合成遺伝子クラスター*azx* のうち、同じアゾキシアルケン化合物である valanimycin や maniwamycin G の生合成遺伝子クラスターと高いホモロジーがある遺伝子に注目した。これらの遺伝子変異株を培養、二次代謝産物の抽出、精製を行ったところ、KA57-A 非生産株が現れた。本発表では、その経緯について報告する。

Actinomycetes are known to produce a wide variety of bioactive compounds, and each strain has more than 30 secondary metabolic biosynthetic gene clusters (BGCs), however about 80% of the BGCs and are “silent”. We constructed strain KA57 with mutations in three genes of *Streptomyces rochei* 7434AN4 to awaken silent secondary metabolic gene clusters. Strain KA57 produces the azoxyalkene compound KA57-A, which is not produced by the parent strain. This compound has an azoxy bond, but the whole biosynthetic mechanism has not yet been elucidated.

In this study, we aimed to identify genes involved in the biosynthesis of KA57-A.

Among the KA57-A BGC (*azx*), we focused on genes that are highly homologous to the BGCs of the similar azoxyalkene compounds, valanimycin and maniwamycin G. Some of *azx* mutants failed to produce KA57-A, indicating that these genes are responsible for KA57-A biosynthesis. In this paper, we will report the detail of this study.

Streptomyces, Azoxyalkene, Biosynthesis

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E3a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 E3 会場

放線菌由来 2,3-二置換ブテノライド型シグナル分子 SRB の分子多様性

Structural diversity of 2,3-disubstituted butenolide-type signaling molecules in *Streptomyces* sp.

○秋元 萌々子[1]、平田 朝陽[1]、藤田 葉月[1]、住吉 美保[2]、大塚 みゆき[3]、松浦 舞紀[3]、手島 愛子[1]、荒川 賢治[1,2] ([1]広島大院・統合生命、[2]広島大院・先端研、[3]玉川大・農)
○Momoko AKIMOTO[1], Asahi HIRATA[1], Hazuki FUJITA[1], Miho SUMIYOSHI[2], Miyuki OTSUKA[3], Maki MATH|SUURA[3], Aiko TESHIMA[1], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]Coll. Agric., Tamagawa Univ.)

【目的】
放線菌は多種多様な二次代謝産物を産生し、その生産はシグナル分子によって制御されている。当研究室で単離・構造決定した *Streptomyces rochei* 7434AN4 株が有するシグナル分子 SRB は、二つのポリケチド抗生物質であるランカサイジン(LC)とランカマイシン(LM)の生産を制御している。SRB は合成酵素 SrrX により合成され、ブテノライド骨格を有しており、構造多様性に興味が持たれた。
【方法・結果】
これまでに報告されている放線菌のシグナル分子のうち、約 6 割は A-factor のようなγ-ブチロラクトン骨格であると推定されている。近年ブテノライド型の 1 つである Avenolide に関しては放線菌全体の 24%に利用されていると報告されており、その他のフラン型、SRB のようなブテノライド型の構造多様性に興味が持たれた。今回我々は、100 株超の *Streptomyces* 属放線菌を供試菌とし、これらの中に SRB 型ブテノライドが存在するか否かについて、バイオアッセイ法および供試菌抽出物の *srrX* 変異株への添加実験を行い、SRB 生産性を評価した。その経緯について報告する。

Secondary metabolite production in *Streptomyces* is strictly controlled by signaling molecules. The signaling molecule SRB of *Streptomyces rochei* strain 7434AN4 regulates the production of two polyketide antibiotics, lankacidin (LC) and lankamycin (LM). We are interested in the structural diversity of SRB that has butanolide skeleton. Regarding to structural diversity, about 60% of *Streptomyces* strains were estimated to produce g-butyrolactone-type molecules that could induce antibiotic production. Furthermore, avenolide-producing activity was detected in 24% of actinomycetes. Distribution of other-type signaling molecules, including SRB-type butenolides, furan-type, and uncharacterized novel-type molecules is worth studying in view of their antibiotic-inducing property in *Streptomyces* species. In this study, we investigated the structural diversity of SRB-type butenolides among randomly selected more than 100 *Streptomyces* strains using a co-fermentation with an *srrX*-deficient strain KA20 of *S. rochei* and a feeding of their culture extracts into strain KA20. The details will be described in this paper.

Streptomyces, signaling molecule, secondary metabolite

講演番号：4E3a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E3 会場

放線菌由来の新規トリプトファンプレニルトランスフェラーゼの発見
Discovery of a novel tryptophan prenyltransferase derived from Streptomyces species

○辻 瑞紀、薛 飛、師 嘉辰、澄本 慎平、岡田 正弘 (神奈川大院工)
○Mizuki TSUJI, Fei XUE, Jiachen SHI, Shimpei SUMIMOTO, Masahiro OKADA (Kanagawa University)

枯草菌のクオラムセンシングフェロモンである ComX フェロモンは、トリプトファン残基が翻訳後修飾によりプレニル化されたオリゴペプチドである。このクオラムセンシングフェロモンとしての機能発現に必須のプレニル化を行う翻訳後修飾酵素が ComQ であり、枯草菌においてのみその機能が確認されている (Figure 1)。一方、多様な二次代謝産物を生産する放線菌のゲノムには相同性は高くないものの、ComQ のモチーフが保存された機能未知タンパク質がコードされていることから、今回、その機能や役割を解明することにした。その結果、放線菌由来の機能未知タンパク質が新規トリプトファンプレニルトランスフェラーゼであることを見出し、この結果は、枯草菌やその近縁種である納豆菌以外の生物からは初めての例であった。さらに、枯草菌とは立体化学の異なる修飾様式であることも見出した。

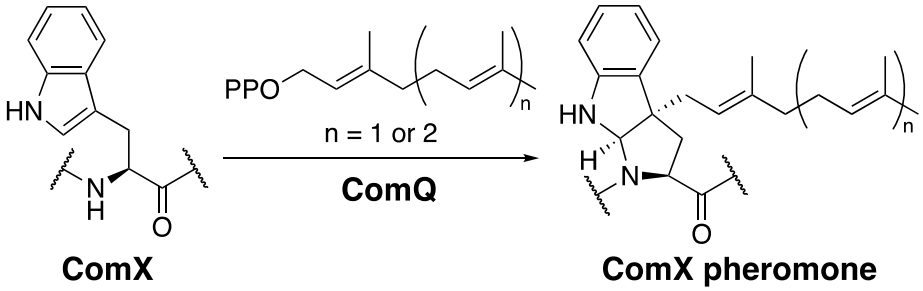


Figure 1. ComX フェロモンの生合成

ComX pheromone is *Bacillus* quorum sensing pheromone and a post-translationally prenylated oligopeptide at the tryptophan residue. ComQ is a modifying enzyme responsible for the prenylation, which is essential for the function of the ComX pheromone, and has only been confirmed to function in bacilli (Figure 1). *Streptomyces* are well known as a producer of various secondary metabolites, and in which genome a hypothetical protein is encoded possessing conserved ComQ motifs but with low homology. In this study, the proteins derived from *Streptomyces* species were confirmed to be a novel tryptophan prenyltransferase, which is the first example from organisms other than bacilli. In addition, the modification pattern with respect to stereochemistry was different from that of bacilli.

Streptomyces, prenyltransferase, tryptophan

講演番号：4E3a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E3 会場

The structural-guided studies for Amaryllidaceae O-methyltransferases

○Sawyuyu Hnin, Yu Nakashima, Takeshi Kodama, Hiroyuki Morita (Univ. of Toyama)

The four Amaryllidaceae *O*-methyltransferases, including *Narcissus pseudonarcissus* norbelladine 4'OMT (NpN4OMT), *Lycoris aurea* OMT (LaOMT), *Lycoris longituba* OMT (LlOMT), and *Lycoris radiata* OMT (LrOMT) have been identified as pivotal enzymes that generate 3'-*O*-methylnorbelladine (**2**) and 4'-*O*-methylnorbelladine (**3**) from norbelladine (**1**) in the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids. However, these enzymes showed different regioselectivities for **1**. For example, NpN4OMT mainly generated **3** with a trace amount of **2** in a ratio of 9:1, while LaOMT and LlOMT produced **2** and **3** at the ratio of 2:1. However, the regulatory mechanism of the 3'- and 4'-*O*-methylation of **1** by these OMTs remains unclear yet. Herein, we will discuss how these OMTs regulate the resulting products, **2** and **3**, based on the crystal structure analyses of the Amaryllidaceae OMTs. The comparisons of complex crystal structures of NpN4OMT with **1** and SAH and the binary crystal structures of LlOMT and LaOMT with SAH solved at ~2 Å resolution unveiled that Ser52/Tyr186 in NpN4OMT, Met52/Phe186 in LlOMT, and Thr52/Phe186 in LaOMT, lining around the active sites, are significantly different. Indeed, further structure-guided mutagenesis studies of LlOMT indicated that these two amino acids are crucial for regioselective *O*-methylation of **1**. Furthermore, the crystal structure of NpN4OMT Ser52T/Tyr186F double mutant revealed that **1** was accommodated in the active site with two conformations suggestive of possible generation of **2** and **3** by a single enzyme. The *in vitro* assay indicated the same regioselectivity of the double mutant for **1** as that of LaOMT, suggesting that residues at 52 and 186 in Amaryllidaceae OMTs control their regioselective *O*-methylation. Thus, this study provided new insights into not only the catalytic diversity of Amaryllidaceae OMT, but also the creation of unnatural Amaryllidaceae alkaloids in the future.

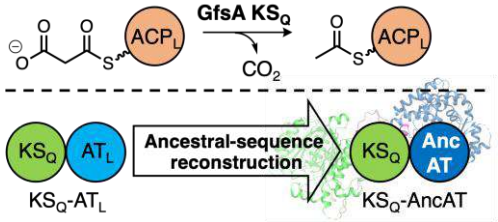
O-methyltransferases

講演番号：4E3a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E3 会場

祖先型設計法を活用したモジュール型ポリケタイド合成酵素の構造解析

Ancestral-sequence reconstruction as a tool for structural analysis of modular polyketide synthase

○千菅 太一[1]、滝浪 翔太[1]、廖 増威[2]、中野 祥吾[1]、伊藤 創平[1]、工藤 史貴[3]、江口 正[3]、宮永 顕正[2,4] ([1]静県大院・薬食生命、[2]東大院農生科、[3]東工大理、[4]東大 CRIIM)
○ Taichi CHISUGA[1], Shota TAKINAMI[1], Zengwei LIAO[2], Shogo NAKANO[1], Sohei ITO[1], Fumitaka KUDO[3], Tadashi EGUCHI[3], Akimasa MIYANAGA[2,4] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]Tokyo Tech., [4]CRIIM, Univ. Tokyo)



I 型ポリケタイド合成酵素（PKS）は複数の反応触媒ドメインが連なった巨大タンパク質である。抗生物質 FD-891 の生合成に関わる I 型 PKS GfsA はケト合成酵素様脱炭酸酵素（KS_Q）ドメインを有し、マロニル-GfsA アシルキャリアタンパク質（ACP_L）の脱炭酸反応を触媒する。これまで我々は GfsA KS_Q ドメインの基質認識機構・反応機構解明を目指し、隣接するアシル基転移酵素（AT_L）ドメインを含む 2 ドメインタンパク質 KS_Q-AT_L の構造解析に取り組んできた。しかし、決定した結晶構造の分解能が低く、基質を模したリガンドに対応する電子密度は部分的にしか観察されなかった。そこで本研究では、祖先型設計法（ASR）を活用してより高分解能の構造情報取得を試みた。

ASR は系統樹上の祖先のアミノ酸配列を推定する手法であり、祖先型酵素は天然型酵素より構造解析が容易となる例が知られている。まず、祖先型 AT（AncAT）ドメインを ASR で設計し、これを融合したキメラタンパク質 KS_Q-AncAT を調製した。KS_Q-AncAT の構造解析は KS_Q-AT_L に比べて高分解能の構造情報を与え、ASR は I 型 PKS の構造解析に対して有用であることが示唆された。本発表ではこれら詳細について報告する。

Type I polyketide synthases (PKSs) are huge proteins containing several catalytic domains. Ketosynthase-like decarboxylase (KS_Q) domain of type I PKS GfsA catalyzes the decarboxylation of malonyl-acyl carrier protein (ACP_L) in the biosynthesis of antibiotic FD-891. To elucidate the substrate recognition mechanism and the reaction mechanism of the KS_Q domain, we previously determined the structure of the didomain protein (KS_Q-AT_L), which contains an adjacent acyltransferase (AT_L) domain. However, the electron density for the ligand mimicking a substrate was only partially observed because the resolution was low. In this study, we attempted to improve the resolution of the KS_Q-AT didomain structure by utilizing ancestral-sequence reconstruction (ASR).

ASR is a method to estimate the amino acid sequence of the ancestor on the phylogenetic tree, and there are some examples where structural analysis of ancestral enzymes is easier than that of natural enzymes. We designed the ancestral AT (AncAT) by ASR, and conducted structural analysis of a chimeric protein (KS_Q-AncAT). As a result, the resolution of KS_Q-AncAT structure was significantly higher than that of the original KS_Q-AT_L. These results suggest that ASR is useful for structural analysis of type I PKSs. This presentation will report on the details.

Ancestral-sequence reconstruction, Modular polyketide synthase, Structural analysis

発表責任者：宮永顕正（amiyanaga@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E3a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 E3 会場

非リボソームペプチオ環化酵素を用いた head-to-side chain 型環状ペプチドの化学－酵素合成

Chemoenzymatic synthesis of head-to-side chain cyclic peptides by non-ribosomal peptide cyclases

小林 雅和、○松田 研一、脇本 敏幸（北大院薬）
masakazu KOBAYASHI, ○ kenichi MATSUDA, Toshiyuki WAKIMOTO (Fac. Pharm. Sci., Hokkaido Univ.)

ペプチド骨格の環状化による配座制限は、消化酵素に対する抵抗性や生体膜透過性、さらには作用標的特異性を向上に寄与する重要な構造修飾であるが、競合する分子間反応を抑制しつつ効率よく分子内で結合を形成することは困難である。一方で、天然に豊富に存在する多様な環状ペプチドの生合成過程では、ペプチド環化酵素が位置選択的な環化反応を効率良く触媒する。我々はこれまで放線菌の非リボソーム環状ペプチドの生合成に関わる新規ペプチド環化酵素ファミリー、ペニシリン結合タンパク質型チオエステラーゼ（PBP-type TE）を発見し、その触媒利用により、主鎖両末端を環化点とする多様な head-to-tail 型環状ペプチドを供給可能な化学－酵素合成法を開発した。一方、ポリミキシンやダプトマイシンをはじめとする医薬品応用された天然環状ペプチドの多くは主鎖末端と内部残基の側鎖を環化点とする head-to-side chain 型の環化様式を有するが、このようなラリアット型環状ペプチドの選択的かつ汎用性の高い酵素合成法は前例がない。そこで本研究では、PBP-type TE を用いた化学－酵素合成法を応用し、ラリアット型環状ペプチド合成への展開を目指した。

PBP-type TE は脱離基を付与した C 末端 D-アミノ酸残基と、N 末端 L-アミノ酸残基間の分子内アミド結合形成を触媒する。そこで N 末端残基を D-アミノ酸とすることで head-to-tail 型環化を抑制し、さらにアミノ酸側鎖に環化点を導入するために、側鎖アミノ基に L-アミノ酸残基を縮合した擬 N 末端ユニットを配列内部に導入した分岐型のペプチド基質を設計・合成した。本ペプチドは分子内に 3 種類の求核基（N 末端アミノ基・擬 N 末端アミノ基・内部リジン残基の側鎖アミノ基）を有するが、PBP-type TE である SurE は擬 N 末端アミノ基と C 末端残基間でのラクタム化を選択的かつ定量的に触媒し、ラリアット型環状ペプチドを与えた。発表では、本手法の基質一般性についても報告する。

Macrocyclization of peptide improves their pharmaceutical properties such as cell-membrane permeability, target specificity and metabolic stability. However, regio- and chemoselective intramolecular cyclization remain challenging. In the previous study, we developed a streamlined chemoenzymatic method for the synthesis of head-to-tail cyclic peptide by using non-ribosomal peptide cyclases. In this study, we modified this method for the synthesis of head-to-side chain cyclic peptides. The detail and scope of newly developed method will be reported.

Cyclic peptide, Biocatalysis, Cyclization

発表責任者：松田研一（kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp）

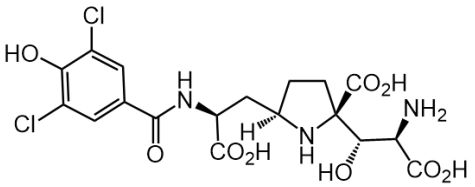
講演番号：4E3a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 E3 会場

カイトセファリンの生合成研究

Biosynthesis of kaitocephalin

○前野 優香理[1]、齋藤 直也[1]、白石 太郎[1,2]、小川 哲弘[1,2]、丸山 潤一[1,2]、新家 一男[3]、葛山 智久[1,2] ([1]東大院農、[2]東大・微生物連携機構、[3]産総研)
○ Yukari MAENO[1], Naoya SAITO[1], Taro SHIRAISHI[1,2], Tetsuhiro OGAWA[1,2], Jun-ichi MARUYAMA[1,2], Kazuo SHIN-YA[3], Tomohisa KUZUYAMA[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]AIST)

Kaitocephalin (KCP) は、真菌 *Eupenicillium shearii* から単離され、哺乳動物の記憶に関与するイオンチャネル型グルタミン酸受容体のアンタゴニスト活性を示す[1]。KCP は 3 つのアミノ酸が C–C 結合で連結された他に例が無い特異な化学構造を有しており、その生合成機構に興味が持たれる。本研究では、麹菌を宿主とした KCP の異種生産と KCP 生合成機構の解明を目指す。



Kaitocephalin (KCP)

はじめに、*E. shearii* のゲノム解析を行い、予測プログラムを用いて KCP の推定 BGC を見出した。推定 BGC 中の全ての ORF に対し麹菌を宿主とした遺伝子導入[2]を行ったものの、形質転換体から KCP は検出されなかった。このことから ORF の予測に間違いがあると考え、生産菌のトランスクリプトーム解析を行うことにした。*E. shearii* による KCP の生産量はきわめて低いことが知られていたものの、培地に数種の栄養塩を添加することで安定的に KCP を生産させることに成功し、KCP 生産条件（栄養塩添加）と非生産条件（栄養塩非添加）の RNA-seq を比較した。その結果、推定していた BGC 領域の遺伝子が生産条件においてのみ高発現していること、さらに、予測プログラムでは見出されなかった数種の遺伝子が存在することが分かった。対象とする領域が KCP の BGC である強固な証拠が得られたため、今後は新たに見出された数種の遺伝子も加えて、麹菌への導入を試みる。

Kaitocephalin (KCP) was isolated from *Eupenicillium shearii* as antagonist of ionotropic glutamate receptors involved in mammalian memory. KCP has a unique chemical structure in which three amino acids are linked by C–C bonds. In this study, we aim to elucidate the mechanism of KCP biosynthesis. At first, we conducted genome sequencing of *E. shearii* and found one putative BGC of KCP. Next, we introduced all genes in the putative BGC into *A. oryzae*, but KCP was not detected from the transformant. Therefore, we compared RNA-seq of KCP production condition and non-production condition using *E. shearii*. It was found that genes in the putative BGC region were highly expressed under production conditions, and several genes were newly found. Since we have strong evidence that the target region is the BGC of KCP, we plan to introduce all genes into *A. oryzae*.

[1] Shin-ya, K. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **1997**. [2] Katayama, T. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2019**.

Biosynthesis, Fungi, Aspergillus oryzae

発表責任者：前野優香理（ymaeno@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E3a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 E3 会場

Studies on terpene synthases from cyanobacteria

○JIAYI YU[1], TARO SHIRAISHI[1,2], AYAKO YOSHIDA[1,2], TOMOHISA KUZUYAMA[1,2] ([1]GSALS, Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo)

Terpenes are the largest group of natural products, constituting over 80,000 compounds that are mainly isolated from plants and fungi. Because of the low sequence homology among bacterial terpene synthases, it is hard to use sequence alignment to retrieve novel ones. Especially in cyanobacteria, few terpene synthases have been reported except for the biosynthesis of carotenes, geosmin, and 2-methylisoborneol. Despite low homology among terpene synthases, they contain conserved metal binding domains such as the aspartate-rich DDXXD/DXDD motif and the NSE or DTE motif. Thus, we attempted to retrieve novel terpene synthase candidates using a hidden Markov model (HMM), which is constructed on the basis of these motifs.

We established a new Pfam model using HMMER3.3.2 based on 110 known bacterial terpene synthases. The cyanobacteria protein sequences were used as the local database to retrieve the inferred terpene synthases. After phylogenetic tree analysis, candidates with a higher than 30% similarity to known sequences were removed. A gene named *cts11* was selected with a gene family analysis. In addition, *cpt11*, which is speculated to be the copalyl-diphosphate synthase, was found at the upstream region of *cts11*.

Using geranylgeranyl diphosphate (GGPP) as the substrate, *in vitro* reactions of Cpt11 and Cts11 were conducted. The results show that GGPP was converted into **2** by the action of Cpt11 and then into **3** by Cts11. Based on the reference NMR spectral data of *syn*-copalol in $CDCl_3$, **2** was identified as *syn*-copalol. Based on the 1D and 2D NMR spectral data, the planar structure of **3** was determined as a novel diterpene with a 6,6,7-tricyclic fused ring system, and the relative configuration of **3** was also determined.

In addition, we successfully determined the high-resolution three-dimensional structure of substrate-free Cts11 (apo form) at 1.76 Å resolution. In the crystal structure, Cts11 is monomeric, which is consistent with the result of size exclusion chromatographic analysis, indicating that Cts11 is stable as a monomer in solution. To clarify the mechanism underlying the Cts11-catalyzed reaction, we are now analyzing the crystal structure of Cts11 in detail.

terpene synthase, cyanobacteria, biosynthesis

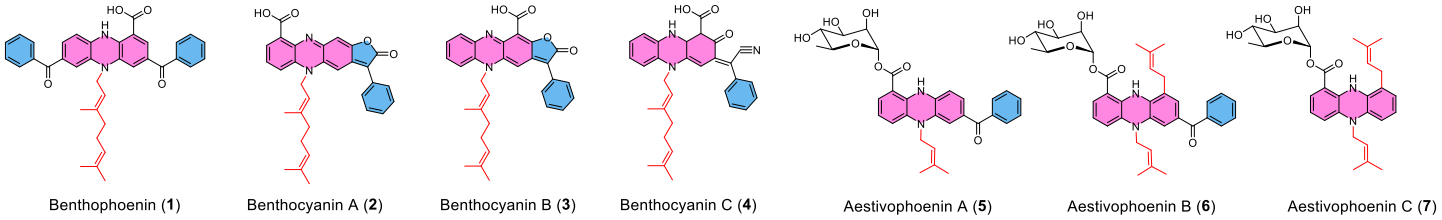
講演番号：4E3a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 E3 会場

Studies on the biosynthesis of phenazine derivatives from Streptomyces purpeofuscus and S. prunicolor

○Dan XIA[1], Qi LUO[1], Taro SHIRAISHI[1,2], Shin-ya Kazuo[3], Tomohisa KUZUYAMA[1,2] ([1]GSALS, Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo, [3]AIST)

Phenazine natural products (PNPs), a class of *N*-containing heterocyclic compounds produced by *Pseudomonads* and *Streptomycetes*, exhibit a broad range of biological activities. Among them, benthophoenin (**1**) and benthocyanins (**2**–**4**) found from the fermentation broth of *Streptomyces prunicolor* show strong free radical scavenging activity. In addition, aestivophoenins (**5**–**7**) possessing neuroprotective property were identified in *S. purpeofuscus* 2887-SVS2. In addition to the phenazine-back bone, these PNPs contain a characteristic *N*-prenyl group and an additional benzyl group. To explore the fascinating enzymatic reactions behind the biosynthesis, we conducted the analyses of the biosynthetic pathway for these PNPs.

First, we aimed to identify the biosynthetic gene clusters (BGCs) for these PNPs using a comparative genomics approach. As a result, we found the BGC candidates (*btn* and *atn* clusters) for each compound, which contain a set of genes responsible for the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid (PCA). Further analyses of these BGCs, we found three homologs of prenyltransferases (PTs) (Atn18, Btn101 and Btn76). Thus, we hypothesized that these PTs may catalyze the prenylation or geranylation reaction on *N*-5 of the precursor PCA or its derivatives to form the key intermediates of these PNPs. To confirm this hypothesis, we aimed to elucidate the function of these PTs. Through *in vitro* and gene knock-out experiments, *btn76* and *atn18* are found to be involved in the biosynthesis of **1**–**4** and **5**–**7**, respectively. Based on these results and further analyses, we proposed the biosynthetic pathway for these rare PNPs.



natural product, prenyltransferase, biosynthesis

発表責任者：葛山 智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E4a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E4 会場

ESCRT はメタノール酵母 *Komagataella phaffii* のミクロペキソファジーに必要である
ESCRTs are required for micropexophagy in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*
○石垣 颯斗[1]、白石 晃將[1]、光部 雅俊[1]、奥 公秀[2]、阪井 康能[1]([1]京大院・農、[2]京都先端科学大バイオ環境)
○ Hayato ISHIGAKI[1], Kosuke SHIRAISHI[1], Masatoshi KOBE[1], Masahide OKU[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. of Advanced science)

主要な細胞内分解機構であるオートファジーには、液胞膜の形態変形を伴うミクロオートファジーと液胞膜の形態変形を伴わないマクロオートファジーの 2 つの形態が存在する。当研究室により酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における脂肪滴を対象としたミクロリポファジーにおいて、ESCRT（Endosomal Sorting Complex Required for Transport complex）分子群が必要なことが明らかとなった [1)]。ESCRT 分子群は、ESCRT-0、-I、-II、-III 及び ATPase Vps4 が順に機能することで、MVB の膜変形や種々膜修復機構において機能することが知られている。

本研究では、ペルオキシソーム分解機構であるミクロペキソファジーへの ESCRT 分子群の関与を *K. phaffii* を用いて調べた。ミクロペキソファジー誘導時、ESCRT 遺伝子破壊株（*vps27Δ*、*snf7Δ*、*vps4Δ*）の液胞膜が変形しなかったこと、ESCRT-0 構成因子である Vps27 がペルオキシソーム–液胞コンタクトサイトに局在したことから、ESCRT 分子群がミクロペキソファジーに必要であることがわかった。一方、マクロペキソファジー誘導時には ESCRT 分子欠損株でも野生株と同様にペキソファジーが進行しており ESCRT 分子群はマクロペキソファジーには不要であった。

Autophagy is a highly conserved cellular process responsible for degradation of proteins and organelles. There are two types of autophagy pathways: macroautophagy, which does not involve deformation of the vacuolar membrane, and microautophagy, which does. While the molecular mechanism of macroautophagy have been extensively studied, there are many unexplored aspects on microautophagy. In *Saccharomyces cerevisiae*, our previous study showed that ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport complex) is involved in lipid droplet degradation, i.e., microlipophagy.

This study aims to elucidate the role of the ESCRT in both macro- and micro-pexophagy, specific degradation of peroxisomes, in the methylotrophic yeast *K. phaffii*. We revealed that micropexophagy was defective in ESCRT-depleted strains. We also found that Vps27, an ESCRT-0 component, colocalized at the contact sites between vacuoles and peroxisomes during micropexophagy, indicating that ESCRT machinery is required for micropexophagy. On the other hand, macropexophagy occurred normally in the ESCRT mutants as in the wild-type strain.

1) Oku et al., J. Cell Biol, 216, 3263 (2017). https://doi.org/10.1083/jcb.201611029

methylotrophic yeast, pexophagy, ESCRT

講演番号：4E4a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E4 会場

麹菌のヌクレオファジーでは核全体が液胞を介して分解され、AoAtg11 はその効率化に関与する

In *Aspergillus oryzae* nucleophagy, degradation of entire nucleus occurs in vacuole and is facilitated by AoAtg11

○橋本 真宇[1]、山口 誉登[1]、木村 聡[2]、有岡 学[1,3]（[1]東大院農・応生工、[2]東大院農・技術基盤センター、[3]東大・微生物連携機構）
○Mau HASHIMOTO[1], Hiroto YAMAGUCHI[1], Satoshi KIMURA[2], Manabu ARIOKA[1,3] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]Tech. Adv. Ctr., UTokyo, [3]CRIIM, UTokyo)

オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内分解プロセスであり、そのうち核を特異的に分解するものをヌクレオファジーとよぶ。当研究室では以前、麹菌 *Aspergillus oryzae* において核全体が分解を受ける現象を見出した。本研究はその分子機構の解明を目的とする。第一に核の分解経路の特定を行った。オートファジーの各段階に必要な遺伝子 *Aoatg1*, *Aoatg8*, *Aoypt7*, *Aoatg15* 破壊株をそれぞれ作製し、飢餓により誘導されるヌクレオファジー活性をそれぞれ定量した。その結果、核の分解率は野生株と比較して有意に低下した。また、蛍光顕微鏡や透過型電子顕微鏡を用いた観察では核を取り囲んだオートファゴソーム様の構造が細胞質や液胞内に認められた。以上から麹菌のヌクレオファジーも一般的なオートファジーと同様に液胞を介した分解経路をたどることが示された。第二に AoAtg11 の機能解析を行った。出芽酵母の Atg11 は選択的オートファジーにおいて分解対象となるオルガネラを認識する受容体と相互作用し、その機能に重要な役割を果たしている。麹菌のヌクレオファジーが核を認識する受容体を介したものであるなら AoAtg11 が関与すると予想し、*Aoatg11* 破壊株の表現型を調べた。その結果、窒素飢餓によって誘導されるヌクレオファジーやマイトファジーは部分的ではあるが有意に低下した。これらの結果から、麹菌のヌクレオファジーにおける核の分解は、少なくともその一部が未知の受容体を介した選択的オートファジーによるものであることが示唆された。

Nucleophagy, a type of autophagy, is a mechanism that specifically degrades nuclei. Our laboratory previously discovered a phenomenon, in which the entire nucleus undergoes degradation in *Aspergillus oryzae*. This research aims to elucidate the molecular mechanism of it. First, we identified the nucleus-degradation pathway. Nucleophagy activity in *Aoatg1*/*Aoatg8*/*Aoypt7*/*Aoatg15* deletion strains were significantly lower than that of the wild-type strain. In addition, autophagosomes surrounding the nucleus were observed in the cytoplasm and vacuoles using a fluorescence microscope and a transmission electron microscope. These results indicate that nucleophagy in *A. oryzae* is a vacuole-mediated degradation process. Second, we analyzed the function of AoAtg11, the ortholog of Atg11 in *Saccharomyces cerevisiae*. Atg11 plays a specific and essential role in selective autophagy, by interacting with receptors present on target organelle membranes. In *Aoatg11* deletion strain, autophagy activity under nutritious condition was significantly reduced, and nucleophagy and mitophagy activities induced by nitrogen starvation were also significantly suppressed compared to the wild-type strain. Furthermore, a decrease in the number of conidia occurred, which is widely observed in strains lacking autophagy function. These results suggested that AoAtg11 plays a role in increasing the efficiency of selective autophagy.

Aspergillus oryzae, autophagy, vacuole

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E4a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E4 会場

麹菌における核の増加と菌糸形態および酵素生産性の関連
Correlation among nuclear increase, enzyme production and hyphal morphology in *Aspergillus oryzae*

○井谷 綾花[1]、一ノ瀬 恵[1]、細田柊志 柊志[1]、高谷 直樹[1]、織田 健[2]、山下 秀行[3]、酒井 香奈江[4]、田中 拓未[4]、楠本 憲一[4]、竹下 典男[1]([1]筑波大・MiCS、[2]酒類研、[3]樋口松之助商店、[4]阪大院・工)
○Ayaka Itani[1], Aya Ichinose[1], Syuji Hosoda[1], Naoki Takaya[1], Ken Oda[2], Hideyuki Yamashita[3], Kanae Sakai[4], Takumi Tanaka[4], Kenichi Kusumoto[4], Norio Takeshita[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]NRIB, [3]Higuchi Moyashi, [4]Univ. of Osaka)

麹菌は糖質・タンパク質などの分解酵素の生産・分泌能が高く、醸造発酵や酵素生産などのバイオ産業で広く利用される。私たちは培養時間の経過に伴って *Aspergillus oryzae* (RIB40)の核の数が著しく増加する現象を発見した（菌糸細胞あたり 20 から 200 以上の核に増加)。核数の増加により転写・翻訳量の増加が予想され、核数と酵素活性との相関が見られた。この表現型は、*Aspergillus sojae* でも見られたが、*Aspergillus nidulans* や *Aspergillus flavus* などでは見られなかった。*A. oryzae* においても株により表現型が異なることが判明したため、同一クレード内で表現型の異なる株のゲノム比較により核増加に関与すると予想される遺伝子を選出した。また、核が増加した菌糸とそうでない菌糸における形態や生長速度を比較した。ライブイメージングにより、分岐により核の増加した菌糸が出現しコロニー周辺で優占することが示された。さらに、レーザーマイクロダイセクションにより核が増加した菌糸とそうでない菌糸を回収し遺伝子発現変化解析を行った。核が増加した菌糸において、細胞骨格や細胞壁などの形態形成、核・細胞の分裂、Ca^{2+}イオンの輸送などに関与する遺伝子の発現が特異的に上昇した。今後、これらの結果を網羅的に解析することで、核増加機構の解明を目指す。

Koji molds have long been used for fermentation and brewing due to their high secretion capacity of enzymes that break down carbohydrates, proteins, and other substances. We have discovered a phenomenon in which the number of nuclei of *Aspergillus oryzae* (RIB40) increases with the passage of incubation time. The increase in the number of nuclei is expected to increase the amount of transcription and translation. In fact, correlation between the number of nuclei and enzyme activity was found. This phenotype was also observed in *Aspergillus sojae*, but not in *Aspergillus nidulans* or *Aspergillus flavus.* Therefore, we searched for genes predicted to be involved in nuclear increase by comparing the genomes of *A. oryzae* strains with different phenotypes within the same clade. Furthermore, we collected hypha with and without increased nuclei by laser microdissection and analyzed changes in gene expression. In hypha with increased nuclei, the expression of genes involved in morphogenesis such as cytoskeleton and cell wall, nuclear and cell division, and $Ca2^{+}$ transport was specifically increased. In the future, we aim to elucidate the mechanism of nuclear increase by comprehensively analyzing these results.

Aspergillus oryzae, nuclei, morphology

発表責任者：竹下 典男（takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4E4a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E4 会場

新規因子 *KpATG14* はメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* のペキソファジーに必要である
A novel factor *KpATG14* is required for pexophagy in methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*

○有馬 ゆみ[1]、中村 元春[1]、中辻 拓実[1]、奥 公秀[2]、白石 晃將[1]、阪井 康能[1]([1]京大院農、[2]京都先端科学大バイオ環境)
○ Yumi ARIMA[1], Motoharu NAKAMURA[1], Takumi NAKATSUJI[1], Masahide OKU[2], Kosuke SHIRAISHI[1], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. of Advanced Science)

オートファジーは真核生物に広く保存されている細胞内分解機構であり、細胞質構成成分の一部を非選択的に分解する経路をバルクオートファジー、特定のオルガネラやタンパク質凝集体を選択的に分解する経路を選択的オートファジーと呼ぶ。特に、選択的なペルオキシソーム分解経路はペキソファジーとして知られる。ペキソファジーには膜動態の異なる 2 つの経路（マクロペキソファジーとミクロペキソファジー）が存在し、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* では炭素源をメタノールからエタノールへ移すことでマクロペキソファジーが、メタノールからグルコースへ移すことでミクロペキソファジーが誘導される。

我々はこれまでに、マクロペキソファジー欠損株を単離可能な fluorescence-activated cell sorting (FACS) による新規スクリーニング系を構築し、本酵母で長年同定されていなかった出芽酵母 *ScATG14* のホモログとして *KpATG14* を同定した。アミノ酸配列を用いた解析により、ScAtg14 と KpAtg14 の類似性は約 27 %と比較的低く通常の BLAST 検索では KpAtg14 がヒットしない一方で、他生物種の Atg14 で広く保存されている Cysteine rich domain と Coiled-coil domain は *KpATG14* においても保存されていた。また顕微鏡観察と生化学的解析の結果、*Kpatg14Δ* 株ではマクロ及びミクロペキソファジー、バルクオートファジーの進行が著しく阻害されていた。さらに、KpAtg14 はオートファジーの進行に不可欠な Atg12-5-16 複合体の構成因子 Atg5 の前オートファゴソーム構造体（pre-autophagosomal structure: PAS）へのリクルートに必須であることがわかった。

Pexophagy is a type of autophagy that selectively degrades peroxisomes. Depending on its membrane dynamics, pexophagy can be classified into two types (macro- and micro-pexophagy). In the methylotrophic yeast *K. phaffii*, macropexophagy is induced upon the carbon source shift from methanol to ethanol, while micropexophagy is induced by the shift from methanol to glucose.

Previously, we have developed a novel FACS-based screening system which could be used to identify novel *ATG* genes required for macropexophagy. Through the system, *KpATG14* was identified as a homolog of *ScATG14* in *K. phaffii*, which had long been undiscovered. Microscopic and immunoblot analyses revealed that both macro- and micro-pexophagy, as well as non-selective bulk autophagy, were impaired in the *Kpatg14Δ* strain.

Autophagy, Methylotrophic yeast, Atg14

講演番号：4E4a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E4 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における PE 合成酵素の生理的機能の解析
Analysis of the physiological functions of phosphatidylserine decarboxylase-encoding genes in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

○楊 淳児[1]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○ Chuner YANG[1], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、リン脂質組成は生体膜機能に大きな影響を与える。リン脂質の 1 種であるホスファチジルエタノールアミン（PE）は、ミトコンドリア機能に重要である。モデル酵母における解析から、最少培地において PE はホスファチジルセリン脱炭酸酵素（PSD）で合成されることが知られている。糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、PSD をコードする遺伝子は推定も含め *psdA*~*psdE* まで存在する。これまでに我々は、寒天平板最少培地において *psdB* 欠失株は、菌糸が多分岐になり、コロニー直径が大きく低下することを明らかにしてきた(1)。しかしながら、*A. nidulans* における各々の PSD の生理的意義がどのように異なるのかについては未解明である。

今回、最少培地において *psdB* 欠失株のコロニー直径が低下するにも関わらず、*psdB* 欠失株の分生子発芽には顕著な影響を与えないことを見出した。さらに、必須遺伝子であることが示唆されている *psdA* を除いた *psdB*~*psdD* の単独欠失株あるいは多重欠失株を用いて、分生子発芽およびミトコンドリの形態と菌糸内での分布に与える影響を解析した。発現量が非常に低い *psdE* も今後解析する予定である。本発表では、これら解析を通して糸状菌における各々の PSD の機能分担およびその生理的意義について議論する。

Phospholipids are major components of biological membranes. Phospholipid composition has a significant impact on biological membrane function. Phosphatidylethanolamine (PE), one of the major phospholipids, is important for mitochondrial function. Analysis in model yeasts indicates that PE is synthesized by phosphatidylserine decarboxylase (PSD) in minimal medium. In the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, the genes encoding PSD range from *psdA* to *psdE*, including putative genes. We previously showed that Δ*psdB* strain on agar plate minimal medium formed small colonies with hyperbranched hyphae (1). However, the physiological significance of each PSD in *A. nidulans* remains to be clarified.

We found that although the colony diameter of the Δ*psdB* strain was reduced in the minimal medium, the *psdB* deletion had no significant effect on the germination. In addition, we analyzed the effects of *psdB*~*psdD?* deletion on the germination and mitochondrial morphology and distribution in the hyphae using single or multiple deletion strains. We will discuss the functional roles of each PSD in filamentous fungi and their physiological significance through these analyses.

1) Takagi et al. J. Biosci. Bioeng. 131: 139-146 (2021)

Aspergillus nidulans, PSD, mitochondria

発表責任者：堀内裕之（ahhoriu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E4a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E4 会場

糸状菌の胞子発芽を特徴付ける脂質成分の探索
Identification of lipid components that characterize conidial germination in filamentous fungi
○岩間 亮[1,2]、岡橋 伸幸[3]、松田 史生[3]、堀内 裕之[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携、[3]阪大・院情報)
○Ryo IWAMA[1,2], Nobuyuki OKAHASHI[3], Fumio MATSUDA[3], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Info. Sci. Tech., Osaka Univ.)

生体膜は細胞と外界、あるいは細胞質と細胞内小器官を区画化する主要な構成要素であり、その大部分はリン脂質二重層が占めている。生体膜脂質の合成制御機構は哺乳細胞や出芽酵母などで研究されてきたが、発酵産業で重要な微生物である糸状菌における理解は大きく立ち遅れている。

糸状菌は分生子（無性胞子）から菌糸、分生子形成器官、分生子を分化させるライフサイクルの中で、明確で多様な形態変化を示すが、これらは無極性生長、極性生長が緻密に制御されることにより達成されている。今回、我々はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、分生子の無極性生長から極性生長へと切り替えていく過程である発芽プロセスに着目し、ターゲットリピドミクス、ノンターゲットリピドミクスにより、脂質変化を網羅的に解析した。その結果、発芽時には二重結合を 5 個あるいは 6 個持つリン脂質が顕著に上昇すること、多くのカルジオリピン種が増加することが示されるとともに、リン脂質以外においても、発芽時に増加する脂質成分が見出された。本発表では、これら胞子発芽時における包括的な脂質変化とその生理的意義について議論する。

Biological membranes are the major components that compartmentalize cells from extracellular environments and organelles from the cytosol. The regulatory mechanisms of membrane lipid synthesis have been studied in mammalian cells and the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but our understanding of the mechanisms in filamentous fungi, which are important microorganisms in the fermentation industry, needs further elucidation.

Filamentous fungi show distinct morphological changes throughout their life cycles, differentiating from asexual spores, conidia, into hyphae and then into conidiophores and conidia. These changes are achieved through precise regulation of polar and non-polar growth. Here, we focused on the germination of the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Germination is the process of switching from non-polar to polar growth. We comprehensively analyzed lipid changes during germination by targeted lipidomics and untargeted lipidomics, and found that phospholipids with five or six double bonds significantly increased and that many cardiolipin species were also increased. In this presentation, we will discuss these comprehensive lipid changes during germination and their physiological roles.

biological membrane, lipidomics, filamentous fungi

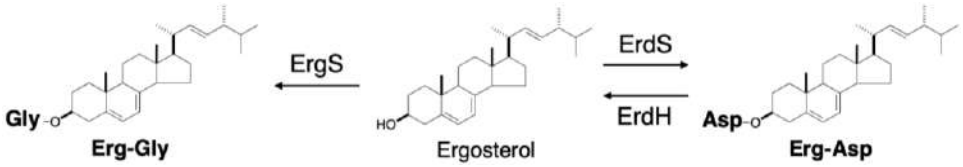
発表責任者：岩間亮（a-iwama@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E4a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 E4 会場

糸状菌由来新規ステロールアミノ酸誘導体の発見および生理機能解析

Discovery and physiological analysis of novel aminoacylated sterols in filamentous fungi

○横川 大祐[1]、今井 誠[1]、立松 俊祐[1]、佐賀 裕亮[1]、Frederic Fischer[2]、Hubert D. Becker[2]、中島 春紫[1]、久城 哲夫[1] ([1]明治大院農、[2]ストラスブール大)
○Daisuke YOKOKAWA[1], Makoto IMAI[1], Shunsuke TATEMATSU[1], Yusuke SAGA[1], Frederic Fischer[2], Hubert D. Becker[2], Harushi NAKAJIMA[1], Tetsuo KUSHIRO[1] ([1]Univ. of Meiji, [2]Univ. of Strasbourg)



アミノアシル tRNA 合成酵素（aaRS）は、アミノ酸を対応する tRNA に結合させるタンパク質合成に必須な酵素である。近年、aaRS にはタンパク質合成とは関係のない様々な二次機能が備わっていることが明らかとなってきた。糸状菌において二次機能を有する aaRS 遺伝子の探索を行ったところ、アスパルチル tRNA 合成酵素の C 末端側に機能未知の付加ドメイン（DUF2156）を有する遺伝子 *erdS* を見出した。また、単独の DUF2156 のみで構成される遺伝子 *ergS* も発見した。これら遺伝子は真菌のなかでも子嚢菌門と担子菌門に幅広く保存されていた。これら酵素の機能解析の結果、ErdS および ErgS はそれぞれ 1-ergosteryl L-aspartate（Erg-Asp）および 1-ergosteryl glycine（Erg-Gly）を生成していることが明らかとなった。このようなステロールのアミノ酸誘導体は全生物を通して初めての発見であった。さらに、Erg-Asp の特異的な加水分解を担う酵素 ErdH も見出した。

本発表では、さらにこれら化合物の生理機能解析の結果についても紹介する。

Aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) catalyzes attachment of amino acids to the corresponding tRNA. In addition to this function, aaRSs have known to possess non-canonical functions involved in numerous cellular processes. We have searched for non-canonical functions of aaRS in filamentous fungi, and discovered a fungal-specific gene, *erdS*, which contains a DUF2156 domain attached to the C-terminus of aspartyl-tRNA synthetase. We also discovered a free-standing DUF2156 gene, *ergS*. These genes are highly conserved among Ascomycota and Basidiomycota. We found that ErdS produces 1-ergosteryl L-aspartate (Erg-Asp), and ErgS produces 1-ergosteryl glycine (Erg-Gly). This is the first report on the discovery of aminoacylated sterols among whole organisms. We also discovered an Erg-Asp specific hydrolase ErdH.

We also discuss the physiological analysis of aminoacylated sterols.

Fungi, Sterol, Aminoacyl-tRNA synthetase

発表責任者：横川大祐（dyoko@meiji.ac.jp）

講演番号：4E4a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E4 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるコアオートファジータンパク質 Atg8 と相互作用するタンパク質の機能解析

Functional analysis of the core autophagy protein Atg8-interacting proteins in *Aspergillus oryzae*

○坂根 巧、武田 陽一、菊間 隆志（立命大院生命）
○Takumi Sakane, Yoichi Takeda, Takashi Kikuma (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】真核生物における細胞内分解機構であるオートファジーは，分解基質の選択性により選択的オートファジーと非選択的オートファジーの二つに分類される。一般的に選択的オートファジーでは，隔離膜上に存在するオートファジーのコアタンパク質 Atg8 が分解基質上に存在するレセプタータンパク質を認識することで分解基質の選択性を生みだしていると考えられている。しかし麹菌をはじめとする糸状菌では Atg8 と結合するレセプタータンパク質が未発見である。そこで本研究では，麹菌における選択的オートファジーのレセプタータンパク質を含む関連タンパク質の探索および機能解析を目的とした。

【方法・結果】先行研究において，Tandem Affinity Purification 法により，麹菌における Atg8 のオルソログ，AoAtg8 と相互作用すると推定されるタンパク質が獲得されている [1]。本研究において抽出した 36 タンパク質の中で，イーストツーハイブリッド法により 3 種類のタンパク質，AO642，AO103，AO498 が AoAtg8 と相互作用すると確認された。局在解析の結果 AO642 は主に細胞質に拡散し，オートファゴソーム前駆体(PAS)と考えられるドット状構造も観察された。AO103 は主に核様構造への局在が観察された。また，飢餓誘導により，それぞれドット状構造の増加または出現が見られた。AO498 については解析中である。現在それぞれの遺伝子の破壊株を作製中であり，候補タンパク質の生理機能の解析を行う予定である。

Autophagy, an intracellular degradation mechanism in eukaryotes, is classified into two types, selective autophagy and non-selective autophagy, depending on the specificity of degradation substrates. In selective autophagy, Atg8-interacting proteins are thought to function as a receptor protein on the degradation substrate. The purpose of this study is to search for and analyze the functions of selective autophagy-related proteins including receptor proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.

In a previous study, predicted AoAtg8 (an ortholog of Atg8 in *Aspergillus oryzae*)-interacting protein were identified using tandem affinity purification and LC-MS/MS[1]. Among the 36 proteins, AO642, AO103, and AO498 were confirmed to interact with AoAtg8 using yeast two-hybrid system. Localization analysis revealed that AO642 diffused in the cytoplasm and localized to punctate structures that appear to be preautophagosomal structures (PAS); AO103 localized mainly to nucleus-like structures; and AO498 diffused in the cytoplasm. Disruptants of each gene are currently being generated, and the physiological functions of these proteins will be analyzed.

1. Nishio *et al*., 2023, FEBS Lett., 597:608-617.

autophagy, *Aspergillus oryzae*, Atg8

発表責任者：菊間　隆志（tkikuma@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4E4a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E4 会場

単核糸状菌イネいもち病菌における部分的な多核化

Partial multinucleation in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

○北 遥生、宮本 雅史、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大院創域理工）
○Haruki KITA, Masahumi MIYAMOTO, Takayuki ARAZOE, Takashi KAMAKURA (TUS)

イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）はイネに感染して重篤な病害を引き起こす植物病原糸状菌である。多核細胞で構成される糸状菌が存在する一方、イネいもち病菌は基本的に単核細胞で構成され、いくつかの報告から単核の維持がイネへの感染に重要であることが示唆されている。我々は *P. oryzae* の核を可視化した H3::GFP 株の観察により、菌糸の一部に多核化した細胞が存在することを見出した。そこで、最小培地を用いた多核化細胞の定量化手法を確立し、各細胞区画における多核細胞の形成割合と細胞長を解析した。通常の最小培地においても多核化した細胞が形成されるが、窒素源を増加させると先端区画細胞の多核化の割合ならびに細胞長の増加がみられた。一方、窒素源を減少させた培地では、菌糸の中間区画での多核化が増加した。これらの多核化細胞を継時的にモニターしたところ、一部の多核化した細胞は連続的な隔壁形成によって単核細胞が複数形成される様子みられた。

The rice blast fungus *Pyricularia oryzae* causes the most devastating disease of cultivated rice worldwide. Although some filamentous fungi are composed of multinucleated cells, *P. oryzae* is recognized as a fungus composed of mononuclear cells. Several reports suggested that nuclear migration and mononuclear regulation are important for plant infection and pathogenicity. We found that multinucleated cells were present in some parts of hyphae by the observation of the histone H3-labeled transformant (H3::GFP) of *P. oryzae*. To characterize this phenomenon, we quantified the rate of multinucleated cells and each cell length by live-cell imaging using minimum medium. Multinucleated cells were formed even in normal minimum medium, but the rate and cell length within apical compartment of hyphae were increased when the nitrogen source was increased. Meanwhile, the number of multinucleated cells in the intermediate compartment of hyphae were increased by reducing the nitrogen source. Time-course observations of multinucleated cells showed that some multinucleated cells divided into multiple mononuclear cells due to sequential septum formation.

rice blast fungus, nuclei, nutrient response

講演番号：4E4a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E4 会場

ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞およびマウス筋芽細胞を用いた筋細胞成熟化誘導法の開発
Development of a method for inducing myocyte maturation using human iPS cell-derived skeletal muscle cells and mouse myoblasts.
○牧野 巧[1]、櫻井 英俊[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1] ([1]東大院農、[2]京大 iPS 細胞研究所)
○Takumi MAKINO[1], Hidetoshi Sakurai[2], Ryuichiro Sato[1], Yoshio Yamauchi[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]The Univ. of Kyoto)

骨格筋細胞は、分化・融合・成熟の過程を経ることで筋収縮の最小単位であるサルコメアを備える。しかしながら、骨格筋細胞の成熟化を制御する分子機序は不明な点が多い。また、一般的に用いられる骨格筋培養細胞である、C2C12 マウス骨格筋細胞やヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞は、ほとんどの細胞がサルコメアを有しておらず、骨格筋細胞として十分に成熟していないという課題がある。したがって、in vitro で骨格筋機能を評価・解析するためには、骨格筋細胞成熟化の分子機構を明らかにし、培養骨格筋細胞をより成熟化する方法の開発が重要である。TGF-βスーパーファミリー分子が骨格筋細胞の分化を制御していることは知られているが、筋細胞の成熟化との関連は十分に理解されていない。そこで、分化後の成熟レベルが異なる 3 種類の骨格筋細胞(マウス筋サテライト細胞、C2C12、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞)の分化過程における上記シグナルの変動を解析した。その結果、未熟な骨格筋細胞では BMP シグナルが分化に伴って減弱しないことを見出した。さらに、分化後の骨格筋細胞において、BMP シグナルを阻害した結果、サルコメアの形成・発達、それに伴う筋収縮力の向上などの筋細胞成熟が認められた。以上の結果から、BMP シグナルの減弱が筋細胞の成熟化に重要であり、分化後に BMP シグナルを阻害することで骨格筋細胞の成熟化を誘導できることが示された。

Skeletal muscle cells acquire a sarcomere which is the smallest unit for muscle contraction through the maturation. However, the molecular mechanism that regulates the maturation of skeletal muscle cell remains unclear. In addition, cultured myocytes such as C2C12 and human iPS cell-derived myocyte do not often possess sarcomeres. Therefore, to evaluate skeletal muscle functions in vitro, it is important to clarify the molecular mechanisms of myocytes maturation and to develop a method for further maturation of cultured myocytes. Although it is known that TGF-β superfamily proteins regulate myocyte differentiation, their involvement in the maturation is not fully understood. In this work, we investigated changes in TGF-β and BMP signals during the differentiation in three types of myocytes with different maturation levels. The result show that BMP signaling remains active in immature myocytes. Therefore, inhibiting BMP signaling by a small molecule in post-differentiated myocyte can induce the sarcomere formation in cultured myocytes.

human iPS cell, skeletal muscle cell, TGF-ß superfamily

発表責任者：山内 祥生（yoshio-yamauchi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

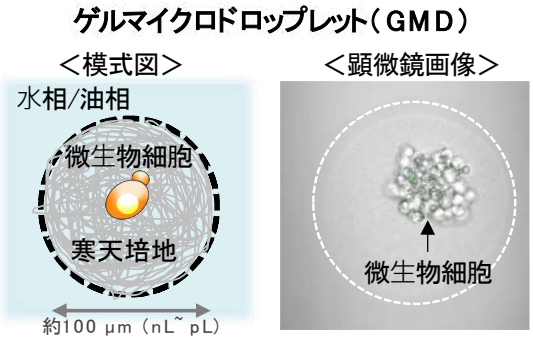
講演番号：4E5a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E5 会場

ゲルマイクロドロップレットを用いた油糧微生物の超高効率な変異育種法の開発

Development of an ultra-high-throughput mutagenesis breeding method for oil and oleaginous microorganisms using gel microdroplets

○中村 彰宏[1]、田中 裕真[2]、鈴木 義之[1]、丸田 航大[1]、志田 洋介[1]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大・工、[2]筑波大・数理物質)

○Akihiro NAKAMURA[1], Yuma TANAKA[2], Yoshiyuki SUZUKI[1], Kodai MARUTA[1], Yousuke SHIDA[1], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Ngaoka Univ. of. Tech., [2]Univ. of Tsukuba)



油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* は、乾燥細胞重量あたり 85%以上の脂質を蓄積できることから、本菌による発酵油脂生産技術の開発が期待されている。本菌を産業利用するために、野生型よりも脂質産生能を向上させた変異体が、セルソーターやパーコール密度勾配遠心分離などの方法でスクリーニングされてきた。これらの方法では、微生物細胞内の油脂の蓄積量は評価できるものの、増殖能力を指標にしたスクリーニングは不可能であった。つまり、本質的な油脂生産量に基づく選抜のためには、増殖（細胞量）と油脂蓄積量の解析が必要である。本研究では、ゲルマイクロドロップレット（GMD）(右図参照)を用いた油脂生産微生物のスクリーニング手法を開発した[1]。この方法では、微生物細胞を培養しつつ、油脂蓄積を評価できるため、*L. starkeyi* の細胞増殖と脂質蓄積量を同時に評価可能である。本実験では野生型に比べて増殖速度が低下した株を獲得し、増殖能力によるスクリーニングが可能であることを示した。開発した GMD スクリーニング手法は *L. starkeyi* 以外の油脂生産微生物への適応が可能であり、油脂生産微生物の育種を大幅に効率化するものである。

The oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is expected to be a new lipid source since this microorganism is capable of accumulating more than 85% lipid per dry cell weight. To effectively utilize this yeast, mutants with improved lipid production capacity compared to the wild type have been screened using methods such as single-cell sorting and Percoll density gradient centrifugation. These methods require the recultivation of all microbial cells after mutagenesis, making it difficult to assess the growth of individual mutants. In other words, while the traditional methods could evaluate lipid production, they could not perform high-throughput screening based on growth capability. In this study, we developed a high-throughput method using Gel Microdroplet (GMD) technology, which allows for the simultaneous evaluation of *L. starkeyi* cell proliferation and lipid production. We obtained strains with reduced growth rates compared to the wild type and demonstrated that screening based on growth capability is possible. The developed GMD high-throughput method can be adapted to other lipid-producing microorganisms, significantly enhancing the efficiency of breeding lipid-producing microorganisms.

[1] Y. Tanaka, A. Nakamura et al., *Journal of Biotechnology*, 358, 46-54, 2022.

この成果の一部は、NEDO の委託業務（JPNP20011）の結果得られたものです

oleaginous yeast, screening, droplet

発表責任者：中村彰宏（anakamura@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4E5a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E5 会場

油脂生産酵母 *Lipomyces starkeyi* における生育・油脂生産に関与する因子の解析
Analysis of factors involved in growth and lipid production in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○司東 来珠[1]、丸田 航大[1]、田中 裕真[2]、中村 彰宏[1]、鈴木 義之[1]、森 一樹[3]、佐藤 里佳子[4]、田代 康介[3]、志田 洋介[1]、高久 洋暁[4]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大・工、[2]筑波大・数理物質、[3]九大・農、[4]新潟薬科大・応生命)
○Kurumi Shito[1], Kodai Maruta[1], Yuma Tanaka[2], Akihiro Nakamura[1], Yoshiyuki Suzuki[1], Kazuki Mori[3], Rikako Sato[4], Kosuke Tashiro[3], Yosuke Shida[1], Hiroaki Takaku[4], Wataru Ogasawara[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Univ. of Tsukuba., [3]Kyushu Univ., [4]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は細胞内に大量の油脂を蓄積できることから、新たな油脂供給源として注目されている。*L. starkeyi* の油脂生産機構の解明は、産業利用へ向けた油脂生産効率の向上に繋がる。そこで本研究では、油脂生合成に関連する複数の代謝経路に焦点を当て、生育および油脂生産における新規知見の獲得を目的とした。

当研究室では生育が著しく遅延した後に野生株と同レベルに生育・油脂生産を行う変異株を取得している[1]。本変異株の 20 の変異遺伝子をそれぞれ破壊した株を構築し、表現型解析を行った。これにより生育遅延の要因となる遺伝子を同定し、生育および油脂生産に寄与する新規知見の獲得を試みた。その結果、3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ遺伝子のナンセンス変異が、生育遅延の主要な要因であることが明らかになった。この遺伝子はロイシン生合成に関与しているため、欠失によるロイシン生合成能の欠如が生育遅延を引き起こしていることが示唆された。

The oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* has attracted attention as an alternative source of lipid because it can accumulate large amounts of lipid in its cells. Elucidation of the lipid production mechanism of *L. starkeyi* will lead to improved efficiency of lipid production for industrial use. Therefore, this study focused on the multiple metabolic pathways involved in lipid biosynthesis and aimed to gain new insights on growth and lipid production.

Previously, we have obtained a mutant strain that grows and produces lipid at the same level as the wild-type strain after a significant growth delay [1]. To identify the genes responsible for this phenotype, disruptants of each the 20 mutated genes were constructed, and their phenotype was analyzed. Consequently, it was revealed that a nonsense mutation in the 3-isopropyl malate dehydratase gene was one of the reasons for growth delay. Since this gene is involved in leucine biosynthesis, it was suggested that the lack of leucine biosynthetic ability caused the growth delay.

[1] Y. Tanaka et al., Journal of Biotechnology, **358**, 46-54, 2022.
この成果の一部は、NEDO の委託業務（JPNP20011）の結果得られたものです。

Lipomyces starkeyi, oleaginous yeast, growth factor

発表責任者：司東来珠（s211046@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4E5a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E5 会場

植物葉圏からの酵母の単離・同定と生物間相互作用の解析
Identification of yeasts isolated from the phyllosphere and examination of their biological interactions
○重田 佳奈、白石 晃將、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Kana SHIGETA, Kosuke SHIRAISHI, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ. Agriculture)

植物-微生物間相互作用は長年、植物の地下部（根圏）を中心に研究が行われてきたが、地球表面積の約 2 倍に及ぶ植物葉面に 10^{26} 細胞もの微生物が棲息していることが明らかとなり、近年植物の地上部（葉圏）が注目されている。しかしながら、それらの研究は原核微生物が中心で、真核微生物に関しては病原体を除いてあまり研究が進んでいない。そこで、我々は酵母に注目し、炭素源資化能、酵母-酵母間相互作用、植物-酵母間相互作用などを調査することで、植物葉面に生息する酵母の生存戦略を解明することを目的に研究を行った。
本研究ではまず、京都大学周辺の植物から酵母を単離し、rDNA の D1/D2 ドメインおよび ITS 領域のシーケンス解析から 21 種類の酵母を同定した。これらの酵母に対して、植物細胞壁の主成分であり炭素源の候補として考えられるペクチンとその分解産物であるメタノールの資化能を調べたところ、全ての酵母がペクチンを資化した一方で、メタノールを資化する酵母は *Candida boidinii* の 1 種のみであった。*C. boidinii* はペクチンメチルエステラーゼの働きによりペクチンからメタノールを生成・利用すること、また同酵母が他の酵母とともに多くの植物葉サンプルから単離されたことから、ペクチンを炭素源とした培地における *C. boidinii* と他の酵母の酵母-酵母間相互作用を調べた。さらに、単離した酵母による植物生長促進効果を調査した。

Recently, growing attention has been paid to the above-ground part of plant, referred to as phyllosphere, as a site for plant-microbe symbiosis, because of some discoveries including the evidence that approximately 10^{26} microbes live on the surface of plant leaves globally. However, most of such research has been conducted with prokaryotes, and eukaryotic microbes are left uninvestigated. Therefore, we drew our attention to yeasts and explored their survival strategy in the phyllosphere.
In this research, we isolated 21 yeast strains from the phyllosphere, and investigated their growth on pectin and methanol as the most probable candidates of carbon sources for phyllosphere yeasts. We found that only *Candida boidinii* utilized methanol, whereas all the tested yeast strains grew on pectin. Further, we performed experiments to gain insights into the yeast-yeast and yeast-plant interactions in the phyllsphere.

yeast, phyllosphere, biological interaction

発表責任者：阪井康能（sakai.yasuyoshi.8x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E5a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E5 会場

出芽酵母の SAM 輸送に関与すると予想される Ssg1 による寿命延長メカニズム
Mechanisms of Ssg1-mediated lifespan extension that appear to be involved in SAM transport in yeast.

○川嵜 紗矢佳[1]、益村 晃司[2]、金井 宗良[3]、米山 香織[4]、河田 美幸[4]、関藤 孝之[4]、小川 貴史[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大工、[2]広島大院統合生命、[3]酒総研、[4]愛媛大農)
○Sayaka KAWASAKI[1], Koji MASUMURA[2], Muneyoshi KANAI[3], Kaori YONEYAMA[4], Miyuki KAWADA[4], Takayuki SEKITO[4], Takafumi OGAWA[2], Masaki MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. of Integr. Sci for Life, Hiroshima Univ., [3]Natl. Res. Inst. of Brew, [4]Grad. Sch. of Agric., Ehime Univ.)

老化・寿命制御機構の解明は、老化の仕組みの理解や老化に伴って発症する疾患のメカニズムの解明への貢献が期待される。我々は、出芽酵母の *SSG1* 長寿変異株の取得に成功し、この変異株では生体内の主要なメチル基供与体である *S*-アデノシルメチオニン(SAM)の高蓄積が観察された。*SSG1* 変異株の解析から、SAM 合成の促進が寿命延長を誘導することを見出した（Ogawa *et al., PNAS*, 2016)。このメカニズムは、SAM 合成活性化は SAM 合成に使われるメチオニンと ATP を消費するため、それぞれメチオニン制限と長寿遺伝子 AMPK（ATP 依存性キナーゼ）の活性化を誘導するものである。*SSG1* 変異株はフレームシフト変異により C 末端伸長型の Ssg1 を液胞膜に発現し、多剤輸送体 MATE(multidrug and toxic compound extrusion)ファミリーと高い相同性を有することから、Ssg1 は SAM の液胞への輸送体と予想した。そこで、本研究では、Ssg1 の機能解明を通して、SAM 輸送と寿命延長の機能的関連を明らかにすることを目的とした。

まず、Ssg1 のトランスポーターの機能が寿命延長に重要であるか調べるため、MATE ファミリーの輸送活性に重要なアミノ酸残基を Ssg1 で変異させた。その結果、*SSG1* 変異株で観察された SAM の高蓄積と寿命延長が消失した。また、SAM の液胞への輸送が SAM 合成の促進を誘導した。さらに、Ssg1 を高発現させた液胞膜小胞では SAM の輸送活性が観察された。これらのことから、Ssg1 は液胞膜に局在する SAM 輸送体でその輸送が寿命延長に関わることを世界で初めて示した。

Research on aging and lifespan is important to elucidate the mechanisms of aging and the pathogenesis of related diseases. We discovered that *SSG1* mutation in budding yeast extended lifespan with high accumulation of *S*-adenosylmethionine (SAM) in vacuole. The *SSG1* mutant expresses a C-terminally elongated Ssg1 protein at the vacuolar membrane due to a frameshift mutation. Given the high similarity of Ssg1 to the MATE family, Ssg1 was predicted to be a transporter of SAM. Mutating crucial amino acids in Ssg1 that is essential for MATE family transporter activity abolished SAM levels and lifespan extension observed in the *SSG1* mutant. From the analysis using vacuolar membrane vesicles with high expression of Ssg1, the transport activity of SAM was successfully demonstrated. These findings indicate for the first time that Ssg1 is a vacuolar membrane-localized SAM transporter and that its transport is involved in lifespan extension.

budding yeast, lifespan, MATE family transporter

発表責任者：水沼　正樹（mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E5a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E5 会場

S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素が関与する寿命制御機構の解析
Mechanism of lifespan regulation by *S*-adenosylhomocysteine hydrolase
○益村 晃司、山下 陽彩、小川 貴史、水沼 正樹（広島大院統合生命）
○Koji MASUMURA, Hiiro YAMASHITA, Takafumi OGAWA, Masaki MIZUNUMA (Grad. Sch. of Integr. Sci. for Life, Hiroshima University)

超高齢社会を迎えた我が国において、老化・寿命のメカニズムの解明は、ヒトの老化の仕組みを理解し健康寿命の延長を実現するため、最も重要な課題の一つである。メチオニン代謝経路において、*S*-アデノシルメチオニン(SAM)は生体内の主要なメチル基供与体であり、SAM はメチル基を供与後、*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)に変換される。SAH は SAM のメチル化反応を競合阻害するため、SAH 加水分解酵素により速やかに分解される。我々は、出芽酵母の SAH 加水分解酵素 *SAH1* に変異が生じた *sah1* 変異株を取得し、顕著な短命を示すことを見出した。そこで、新規寿命制御因子の取得を目的に、*sah1* 変異株が示す増殖遅延を抑圧するスクリーニングを行った。その結果、*SSG1*/*ERC1* 変異のほか、*SAH1* 遺伝子内に抑圧変異を有する 15 株の *sah1* 復帰変異株を取得した(*PNAS*, 2016)。変異点を同定したところ、2 つの変異に集約され、各変異は *sah1* 変異株の短命を抑圧し、うち 1 つの変異は野生株より寿命を延長した。*SAH1* と寿命との関連を調べるため、*SAH1* 阻害剤(DZnep)を酵母野生株に作用させた。その結果、高濃度の DZnep では短命となったが、低濃度で寿命を延長した。このことから、SAH 加水分解酵素活性が寿命を制御することが明らかになった。*sah1* 変異株では、寿命と関連するオートファジーの活性化やテロメア長の変化など興味深い表現型が観察されており、現在 SAH 加水分解酵素活性とこれら表現型との関連についても解析を行っている。

Elucidation of the mechanisms of aging and lifespan is important to understand human aging and extend healthy lifespan. In the methionine metabolic pathway, *S*-adenosylmethionine (SAM) is used as a methyl group donor for methylation reactions in vivo, and upon methylation reaction, SAM generates *S*-adenosylhomocysteine (SAH). SAH is an inhibitor of the methylation reaction of SAM and thus requires rapid degradation by SAH hydrolases. We obtained a *sah1* mutant strain of budding yeast that mutated in *SAH1*, which encodes SAH hydrolase, and found that this mutation resulted in markedly shorter lifespan. Therefore, we screened for suppresser mutants to obtain novel lifespan regulators to suppress the growth retardation exhibited by the *sah1* mutant strain. As a result, we obtained 15 *sah1* revertant mutant strains with suppressive mutations within the *SAH1* gene as well as *SSG1/ERC1* mutations (*PNAS*, 2016). Furthermore, supplementation with SAH inhibitor to wild-type cells showed extended lifespan. These results indicate that the activity of SAH hydrolase is involved in lifespan.

budding yeast, lifespan, *S*-adenosylhomocysteine hydrolase

発表責任者：水沼 正樹（mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E5a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E5 会場

培地の鉄可用性が関わる酵母の栄養飢餓適応戦略

Adaptive strategies for nutrient starvation in yeast involving iron availability in the medium

○松浦 彰[1]、岸 裕子[2] ([1]千葉大院理、[2]千葉大院融合理工)
○Akira MATSUURA[1], Yuko KISHI[2] ([1]Grad. Sch. Sci., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Chiba Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の富栄養培地として知られる YPD 培地の構成成分は炭素源としてのグルコース、窒素源としてのペプトン、およびその他微量栄養素を含む酵母エキスである。このうち、ペプトンと酵母エキスは供給会社によってその組成が異なる。今回我々は、ペプトンとしてハイポリペプトン（塩谷エムエス社）もしくはバクトペプトン（ベクトンディッキンソン社）を使用した場合に、グルコース枯渇後の酵母の増殖が大きく異なることを報告する。ハイポリペプトンを使用した YPD 培地では、グルコース枯渇後に呼吸制限がかかり 2 日から一週間程度の一時的な増殖停止期が見られる一方、バクトペプトンを使用した場合は増殖停止期が観察されない。解析の結果、両者の増殖の違いは鉄の利用効率の差であることが示され、牛乳カゼインが原料であるハイポリペプトン含有培地では鉄が十分量含まれるにもかかわらず酵母が鉄を利用できるようになるために数日の適応期間が必要であることがわかった。出芽酵母の定常期では同一の遺伝的背景を持つ細胞集団中の細胞が機能分化し、集団として不均一になることが知られている。その分化過程では、鉄の可用性により亜集団の割合が変化し、その結果集団として異なる生存戦略が選択されていることが示唆された。

YPD medium, a nutrient-rich medium for budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, consists of glucose, peptone, and yeast extract, but the specific composition of peptones and yeast extracts is manufacturer-dependent. We report that growth trajectories after glucose depletion diverge depending on whether hipolypepton (Shiotani) or Bacto peptone (Becton Dickinson) is chosen as the peptone component. In YPD medium containing hipolypepton, cellular respiration is transiently restricted after glucose depletion, causing growth arrest that lasts 2 days to 1 week. In contrast, no such growth cessation is evident in YPD medium containing Bacto peptone. The differences in the growth profiles of these media are attributed to differences in iron availability. Hipolypepton, derived from milk casein, provides sufficient iron to YPD medium; however, yeast cells require an adaptation period of several days to utilize iron in this medium. It is known that during the stationary phase of budding yeast, cells within a genetically identical population undergo functional differentiation. Our result suggests that the availability of iron affects the surviving strategies executed at a population level during the stationary phase.

budding yeast, stationary phase, iron availability

発表責任者：松浦　彰（amatsuur@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4E5a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E5 会場

出芽酵母におけるキヌレン酸によるロイシン要求量の増加

Increasing in leucine requirement by kynurenic acid in Saccharomyces cerevisiae

○大橋 一登（群大生調研）
○Kazuto Ohashi (IMCR, Gunma Univ.)

キヌレン酸（KA）はトリプトファン（Trp）代謝化合物の一つで、高等生物特有の受容体に作用し、抗炎症や摂食調節作用などを示すことが報告されている。しかし KA は高等生物だけでなく、原核微生物や出芽酵母などの単細胞生物でも生合成されており、生物間に共通の機能を有すると考えられる。そこで、真核生物のモデル細胞である出芽酵母を用いて、KA の機能を調べてきた。その結果、KA は過剰な Trp の分解で生じた排泄物の一種と考えられ、過剰な Trp が有害であることが示された（Ohashi *et al.*, Sci. Rep.,2017）。さらに、この知見をもとに、KA は、Trp から KA の生成を妨げ、結果として、Trp の蓄積と同様の影響を及ぼすと予想した。
これまでに、過剰な Trp や Trp の蓄積は出芽酵母が生育に必要とする Leu を増加させることを示す結果が得られている。そして、低 Leu 培地では、Trp の添加によって、出芽酵母の生育が抑制されるが、さらに Leu を加えることで、出芽酵母の生育は回復する。そこで、KA も Leu の要求量を増加させると推測した。低 Leu 培地では、KA 添加による出芽酵母の生育遅延と Leu 添加による生育回復が認められた。この結果は、KA による Leu 要求量の増加を示している。以上より、KA は、出芽酵母に Trp の蓄積と同様の影響を及ぼすことが示唆された。
Kynurenic acid (KA) is a tryptophan (Trp) metabolite that is synthesized in a branch of kynurenine pathway. It has been reported that KA exhibit anti-inflammatory and feeding-regulating effects via higher eukaryote specific receptors. Although KA synthesis is evolutionarily conserved from bacteria to humans, the cellular benefits of synthesizing KA are unclear. Previously, we proposed that KA synthesis is important for detoxification of excess Trp and KA is a safe waste yielded as a consequence of Trp degradation in budding yeast (Ohashi et al., Sci. Rep., 2017). Based on our results, we predicted that KA would prevent the synthesis of KA from Trp and give an effect similar to that of Trp accumulation on budding yeast.
Also, we have been revealed that excessive Trp or Trp accumulation increases requirement of Leu for growth. Therefore, KA can be also expected to lead to the increasing the amount of Leu required for growth via Trp accumulation. when KA was added to the culture medium with low levels of Leu, an increase in the amount of Leu required for yeast growth was observed. Thus, KA could have an effect similar to that of Trp accumulation on budding yeast.

Kynurenic acid, Tryptophan, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：大橋一登（ohashi@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4E5a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E5 会場

タケチップを含む培地で培養した *Ganoderma sinense* およびマンネンタケ（*Ganoderma lucidum*）が有する免疫チェックポイント阻害活性および抗アレルギー活性
Immune checkpoint inhibitory and anti-allergic activities of *Ganoderma sinense* and *Ganoderma lucidum* cultivated on bamboo-containing media

○小堀 一[1,2]、安間 太郎[3]、戸田 雅明[3]、ダレッサンドロガバザ コリナ[3]、ガバザ エステバン[3]（[1]岩出菌学研究所、[2]静大キノコ科学研究所、[3]三重大医）
○ Hajime KOBORI[1,2], Taro YASUMA[3], Masaaki TODA[3], Corina N. D'Alessandro-Gabazza[3], Esteban C. Gabazza[3] ([1]Iwade Research Institute of Mycology Co., Ltd, [2]Research Institute for Mushroom Science, Shizuoka University, [3]Department of Immunology, Mie University School of Medicine)

マンネンタケ属のキノコは霊芝とも呼ばれ、古来より漢方薬などの原料として薬用に用いられ、様々な研究が行われてきた。特に、紫霊芝の通称で知られる *Ganoderma sinense* や、赤霊芝の通称で知られるマンネンタケ（*G. lucidum*）は、様々な薬理活性を有することが知られている[1)]。また近年、放置竹林の増加に伴う竹害が国内で多く見られ、竹材の更なる有効活用法の開発が望まれている[2)]。したがって、我々は *G. sinense* およびマンネンタケを、タケチップを含む菌床で栽培し[3)]、それらの子実体が有する免疫チェックポイント阻害活性および抗アレルギー活性を調査することを目的とした。その結果、それらの子実体の亜臨界水抽出物がヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 細胞の Axl、PD-L1 および PD-L2 分子の発現を有意に抑制し、ヒトマスト細胞株である HMC-1 細胞の IL-4、IL-5 および IL-13 の発現を有意に抑制した。

Mushrooms belonging to the genus *Ganoderma* (Reishi) are popular ingredient of traditional Chinese medicine. People have utilized these mushrooms for medicinal purposes for a long time. In particular, *G. sinense*, commonly known as purple reishi, and *G. lucidum*, commonly known as red reishi, are known to have various pharmacological activities[1)]. In recent years, disordered proliferation and invasion of bamboo has increased in Japan, and the development of effective utilization of bamboo material is desired[2)]. Therefore, we cultivated fruiting bodies of *G. sinense* and *G. lucidum* in various proportions of bamboo-containing media[3)], and examined their immune checkpoint inhibitory and anti-allergic activities. The result showed that the subcritical water extracts obtained from these mushrooms significantly inhibited the expression of Axl, PD-L1 and PD-L2 in a lung cancer cell line (A549 cells), and inhibited the expression of IL-4, IL-5 and IL-13 in HMC-1 cells (mast cells).

1) Y. Zhang, et al., Progress in Molecular Biology and Translational Science, **163**, pp165-177 (2019)
2) 静岡県環境森林部、竹林整備読本、pp 2-3, pp 9-11 (2004)
3) 小堀一ら、日本きのこ学会誌、**28**, pp187-190 (2020)

Ganoderma, Immune checkpoint inhibitory activity, Anti-allergic activity

発表責任者：小堀一（kobori@iwade101.com）

講演番号：4E5a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E5 会場

栄養応答シグナル伝達因子 mTORC1 による RNA スプライシングを介した成長・寿命制御機構
Nutrient control of growth and lifespan through mTORC1 regulation of RNA splicing

○小川 貴史[1]、BLACKWELL T. Keith[2]、水沼 正樹[1] ([1]広大院統合生命、[2]ハーバード医大院ジョスリン糖尿病センター)
○ Takafumi OGAWA[1], T. Keith BLACKWELL[2], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Harvard Med. Sch.)

細胞成長や個体の発生を制御する mechanistic target of rapamycin（mTOR）複合体 1 は、活性の低下によりさまざまな生物の寿命を延長することから、本機能の解明は老化メカニズムの理解に重要である。本研究では、酵母や哺乳類細胞における mTORC1 リン酸化プロテオミクスで取得された遺伝子のオーソログライブラリを用いて、モデル生物線虫 *Caenorhabditis elegans* の成長制御に関与する遺伝子を RNAi スクリーニングにより取得した。その結果、RNA スプライシング関連遺伝子を多数取得し、mTORC1 は RNA スプライシングの活性化により成長を促進することを見出した。さらに、mTORC1 は食餌に応答して RNA スプライシングを活性化し、そのメカニズムとして、これまで知られていた mTORC1 下流の S6K を介した制御とは独立した機構により、グルコース代謝やヌクレオチド代謝を活性化することを見出した。興味深いことに、RNA スプライシングを活性化すると、mTORC1 活性低下による RNA スプライシング機能の低下を部分的に回復し、寿命がさらに延長することを発見した。このことから、RNA スプライシングの機能維持は、mTORC1 阻害によるアンチエイジング効果を向上させる可能性が示唆された。本発表では、mTORC1 による RNA スプライシング制御が寿命に与える影響に焦点をあてて紹介したい。

The evolutionarily conserved serine/threonine kinase complex mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) controls various processes involved in growth and development, and its inactivation extends lifespan across species. However, due to the complexity of mTORC1 function, its effects on longevity remain unclear. We employed genetic and bioinformatic screening in *Caenorhabditis elegans* using the orthologues of proteins that had been phosphorylated by mTORC1 in phosphoproteomics studies in yeast and mammalian cells. Through interactome analysis of screening hits, we revealed that mTORC1 promotes growth and development through RNA splicing. We demonstrate that RNA splicing is activated by nutrient response through mTORC1, largely independently of its target S6K. mTORC1-mediated RNA splicing regulation mediates nutrient control of mechanisms that include energy and nucleotide metabolisms. Although low activity of mTORC1 extends lifespan, genetic activation of RNA splicing further extends the lifespan when mTORC1 is attenuated. Thus, maintaining RNA splicing function during aging may provide additional anti-aging benefits.

Caenorhabditis elegans, growth, lifespan

講演番号：4E5a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 E5 会場

ヤギ腸内細菌叢を用いた *C*-配糖体 mangiferin からアグリコン norathyriol への微生物変換
Microbial conversion of *C*-glycoside mangiferin into its aglycone norathyriol by goat gut microbiota
○宇賀 悠人[1]、HASANAH Uswatun[1]、三木 香澄[1]、栢木 宏之[2]、川上 秀昭[2]、西谷 洋輔[2]、桑原 浩誠[2]、仁戸田 照彦[1]、神崎 浩[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]丸善製薬・総合研究所)
○Yuto UGA[1], Uswatun HASANAH[1], Kasumi MIKI[1], Hiroyuki KAYAKI[2], Hideaki KAWAKAMI[2], Yosuke NISHITANI[2], Hiroshige KUWAHARA[2], Teruhiko NITODA[1], Hiroshi KANZAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Research Center, Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.)

【目的】*C*-配糖体は *O*-配糖体と比べ酵素分解されにくく，これまで *C*-配糖体からそのアグリコンへの変換を触媒するヒトの腸内細菌について数例報告されているのみである。我々はヒトの腸内細菌叢が *C*-配糖体 mangiferin をアグリコン norathyriol へ変換すること，さらにヒトだけでなくマウスおよびウマの腸内細菌叢も同じ変換活性を有することを報告してきた[1,2]。そこで本研究では，新たな生物種であるヤギの腸内細菌叢にも mangiferin から norathyriol への変換活性が存在するか確認した。
【方法・結果】ヤギの糞便から腸内細菌叢試料として，糞便濾液，糞便濾液培養後菌体，糞便培養後菌体の 3 種を調製し，これらを酵素源として mangiferin と反応させたところ，糞便培養後菌体でのみ mangiferin から norathyriol への明確な変換活性が確認された。これはマウスやウマにおける結果と類似しており，ヒトにおいて糞便濾液および糞便濾液培養後菌体にも高い活性が認められる腸内細菌叢が存在している結果とは異なっていた。さらに，これまで報告されてきたヒト腸内細菌の多くは培養中の *C*-配糖体添加による酵素の発現誘導を必要とするが，ヤギの腸内細菌叢は培養中に mangiferin を添加しなくても活性を発現するという特徴を有していた。
1)農化中四国支部 2019.1.高知, A-6　2)農化中四国支部 2022.9.香川, E-10

C-glycosides are difficult to be deglycosylated by enzymes in comparison to *O*-glycosides, and so far, only a few cases of human intestinal bacteria have been reported to catalyze the conversion of *C*-glycosides into their aglycones. We previously reported that human gut microbiota was able to convert *C*-glycoside mangiferin into its aglycone norathyriol and furthermore intestinal microbiota not only of humans but also of mice and horses possessed the conversion activity. This study aimed to assess the conversion activity of mangiferin into norathyriol in the gut microbiota of goat. The activity was observed in the cultivated feces of goat, little in its fecal filtrate and not in its cultivated fecal filtrate. This phenomenon is similar to mice and horses, and is different from humans of which the activity was observed in their fecal filtrate. Furthermore, while most of the reported human intestinal bacteria exhibited the activity after cultivation in medium with *C*-glycoside for the induction of enzyme expression, the goat gut microbiota possessed the activity after cultivation in a medium without *C*-glycoside mangiferin.

C-glycoside, gut microbiota, bioconversion

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4E5a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 E5 会場

水素添加反応及び酢酸菌を用いた各種炭糖七炭糖生産

Production of various heptose using hydrogenation reaction and acetic acid bacteria

○綿貫 花菜[1]、高松 陽太[1]、望月 進[1,2]、花木 祐輔[1,2]、吉田 裕美[2,3]、神鳥 成弘[2,3]、何森 健[1,2]、吉原 明秀[1,2] ([1]香川大院農、[2]香川大国際希少糖、[3]香川大医)

○Kana WATANUKI[1], YOUTA TAKAMATU[1], SUSUMU MOCHIZUKI[1,2], YUSUKE HANAKI[1,2], YUMI YOSIDA[2,3], SHIGEHIRO KAMITORI[2,3], KEN IZUMORI[1,2], AKIHIDE YOSHIHARA[1,2] ([1]Faculty of Agriculture,Kagawa University, [2]International institute of Rare Sugar Research and Education, [3]Research Facility Center for Science & Technlogy and Faculty of Medicine, Kagawa University)

トランスケトラーゼとはほぼすべての動植物が有するペントースリン酸経路内で作用する酵素である。先行研究において、*T. thermophilus HB8* 由来のトランスケトラーゼは遊離の糖に作用し、さらに七炭糖生産に応用できることも確認された。また、七炭糖の効率的生産のために安価な D-フルクトースから 100%転換される、5-ケト-D-フルクトースをドナー基質に用いた場合でも七炭糖の生産が確認された。そこで本研究では、生産された七単糖のうち D-セドヘプツロースを用いて、さらなる七単糖生産を試みた。水素添加反応により、D-セドヘプツロースから１：１の割合で D-グリセロ-D-グロヘプチトールと D-グリセロ-D-マンノヘプチトールを生産することに成功した。さらに、各種酢酸菌を用いて、これら生産物の酸化効率の検討を行った。終濃度１%の水素添加反応によって得られた反応液と OD_{600}＝30 の各酢酸菌の菌体を反応させ、経時変化を確認した。その結果、3254、3172、3290 の 3 種類の酢酸菌による菌体反応において、24 時間で 100%転換が確認された。また、HPLC のリテンションタイムより、生産物が L-グロヘプツロースと D-マンノヘプツロースであることが示唆された。今後は、この 3 種の酢酸菌のうち、特に効率よく生産できる菌体の検討、および D-セドヘプツロース以外の基質を用いた七炭糖の生産に着手し、すべての七炭糖の生産を目指す。

Transketolase (TK) is an enzyme of the pentose phosphate pathway in almost animals and plants. TK catalyzes the transfer reaction of two carbon chain from phosphorylated ketose (D-xylulose 5-phosphate) to phosphorylated aldose (D-erythrose-4-phosphate) affording D-fructose 6-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate.

In previous studies, heptose production by TK from *Thermus thermophilus* HB8 was investigated. Heptose production was also observed when 5-keto-D-fructose, which is 100% converted from inexpensive D-fructose, was used as the donor substrate. In this study, we attempted a new heptose production using D-sedoheptulose. First, D-sedoheptulose was converted to D-glycero-D-altroheptitol and D-glycero-D-mannoheptitol by hydrogenation using a Raney nickel catalyst. Next, we attempted to oxidize these products using acetic acid bacteria, and found 100% conversion in 24 hours. HPLC analysis indicated that these products obtained from the reaction were L-guloheptulose and D-mannoheptulose.

production of various heptose, acetic acid bacteria, 100% conversion rate

講演番号：4E5a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 E5 会場

Thermus thermophilus HB8 由来トランスアルドラーゼを用いた九炭糖生産
Production of nonose using transaldolase from *Thermus thermophilus* HB8
○三好 恵梨佳[1]、望月 進[1,2]、花木 祐輔[1,2]、神鳥 成弘[2,3]、何森 健[1,2]、吉原 明秀[1,2] ([1]香川大院農、[2]香川大国際希少糖、[3]香川大医)
○ ERIKA MIYOSHI[1], SUSUMU MOCHIZUKI[1,2], YUSUKE HANAKI[1,2], SHIGEHIRO KAMITORI[2,3], KEN IZUMORI[1,2], AKIHIDE YOSHIHARA[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Kagawa University, [2]International institute of Rare Sugar Research and Education, Kagawa University, [3]Research Facility Center for Science & Technology and Faculty of Medicine, Kagawa University)

希少糖とは自然界に微量もしくは全く存在しない単糖およびその誘導体と定義されており，近年，機能性を持つ希少糖の存在が確認されつつある。

トランスアルドラーゼは，ペントースリン酸経路内に存在し，D-フルクトース 6-リン酸から D-エリスロース 4-リン酸に 3 炭素鎖を転移する反応を触媒する酵素である。本酵素の転移反応に着目し，*Thermus thermophilus* HB8 由来の本酵素を用いて希少糖である九炭糖生産を目指した。

まず、*T. thermophilus* HB8 由来の精製トランスアルドラーゼの六炭糖に対する基質特異性を検討した。その結果，D-ガラクトース，D-アロース，L-アルトロースをアクセプターとした時に生産物を確認した。ドナー基質にジヒドロキシアセトン，アクセプター基質に D-ガラクトース，D-アロース，L-アルトロースをそれぞれ用いて 50℃，24 時間反応させた後に HPLC 分析を行った。その結果，保持時間 13.5 分，10.9 分，12.6 分に生産物と思われるピークが確認された。これらの生産物を CARBOSep COREGEL 87C SemiPrep カラムにて分離，精製し LC/MS 分析，NMR 分析を行った結果，それぞれ九炭糖であることが示唆された。

Rare sugars are defined as monosaccharides and their derivatives that exist in small amounts in nature. In recent years, the existence of rare sugars with functional properties has been increasingly recognized.

Transaldolase is an enzyme that exists in the pentose phosphate pathway and catalyzes the transfer of the three-carbon chain from D-fructose 6-phosphate to D-erythrose 4-phosphate. Focusing on the transfer reaction of this enzyme, we attempted to produce nonoses (monosaccharide with nine carbons) using this enzyme from *Thermus thermophilus* HB8.

First, we examined the substrate specificity of purified transaldolase from *T. thermophilus* HB8 for 16 aldohexoses. After reacting with dihydroxyacetone as the donor substrate and D-galactose, D-allose, and L-altrose as the acceptor substrates at 50°C for 24 hours, HPLC analysis showed product peaks at retention times of 13.5, 10.9, and 12.6 minutes, respectively. These products were purified on a CARBOSep COREGEL 87C SemiPrep column, and LC/MS and NMR analyses suggested that they were nonoses.

Rare sugar, *Thermus thermophilus* HB8, Transaldolase

講演番号：4E5a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 E5 会場

Klebsiella pneumoniae 40b 由来ポリオールデヒドロゲナーゼと *Lactobacillus rhamnosus* 由来 L-ラムノースイソメラーゼを用いた L-タロース生産

L-Talose production using polyol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* 40b and L-rhamnose isomerase from *Lactobacillus rhamnosus*

○山本 菜帆[1]、吉田 裕美[2,3]、倉原 琳[4]、望月 進[1,3]、吉原 明秀[1,3]([1]香川大院農、[2]香川大総合生命科学医、[3]香川大国際希少糖、[4]香川大自律機能生理学医)
○NAHO YAMAMOTO[1], HIROMI YOSHIDA[2,3], RIN KURAHARA[4], SUSUMU MOCHIZUKI[1,3], AKIHIDE YOSHIHARA[1,3] ([1]Facalty of Agriculture, Kagawa University, [2]Life Science Research Center & Faculty of medicine, Kagawa University, [3]International Institute of Rare Sugar Research and Education, Kagawa University, [4]Dept. Cardiovascular Physiology, Faculty of medicine, Kagawa University)

希少糖とは自然界にほとんど存在しない単糖及びその誘導体と定義されており、いくつかの希少糖の誘導体が抗 B 型肝炎ウイルス剤やがん治療に有効である可能性が示されている。希少糖 L-タロースのアデ-9 ヌクレオシド誘導体は *in vitro* で白血病 L1210 細胞の増殖を阻害することが見出されている。しかし、L-タロースは非常に高価であり効率的な生産方法が必要とされている。そこで、本研究では簡易に生産可能なガラクチトールを基質とし、酸化還元酵素と異性化酵素を用いることで L-タロースの生産を試みた。

初めに、*Klebsiella pneumoniae* 40b 由来の糖アルコール脱水素酵素を 2 種類のカラムに供し部分精製を行った。次に、*Streptococcus pyogenes* 由来 NADH 酸化酵素を組換え酵素として発現させ，ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにて部分精製した。この 2 つの酵素を組み合わせ、補酵素の循環系を構築し、ガラクチトールから L-タガトースを生産した。さらに、*Lactobacillus rhamnosus* 由来 L-ラムノースイソメラーゼを組換え酵素として発現させ、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーで精製し、生産した L-タガトースを基質に酵素反応を行った。その結果、L-タロースを生産することに成功した。

Rare sugars are defined as monosaccharides and their derivatives that are rarely found in nature. Several rare sugar derivatives have been shown to be potentially effective as anti-hepatitis B virus agents and cancer therapies. In this study, we attempted to produce L-talose from galactitol as a substrate by using polyol dehydrogenase and isomerase.

First, polyol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* 40b was partially purified by two different columns. Second, recombinant NADH oxidase from *Streptococcus pyogenes* was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified by nickel affinity chromatography. These two enzymes were combined to construct a coenzyme cycle system that produces L-tagatose from galactitol. Furthermore, recombinant L-rhamnose isomerase from *Lactobacillus rhamnosus* was expressed in *E. coli* JM109, purified by nickel affinity chromatography, and enzymatic reaction was performed using the produced L-tagatose as substrate. As a result, L-talose could be produced from L-tagatose by recombinant L-rhamnose isomerase from *Lactobacillus rhamnosus*.

L-Talose, Polyol dehydrogenase, L-Rhamnose isomerase

講演番号：4E6a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E6 会場

定量 PCR 解析によるヒト糞便中のデオキシコール酸生成菌の存在量の解明

Elucidation of the abundance of deoxycholic acid-producing bacteria in human feces by quantitative PCR analysis

○原田 恕[1]、前田 智也[1]、後藤 恭宏[2]、林 哲也[2]、吹谷 智[1]（[1]北大院農、[2]九大院医）
○ Shinobu HARADA[1], Tomoya MAEDA[1], Yasuhiro GOTOH[2], Tetsuya HAYASHI[2], Satoru FUKIYA[1] ([1]Res. Facul. Agr., Hokkaido Univ., [2]Facul. Med., Kyushu Univ.)

胆汁酸は小腸で脂質の吸収に寄与する両親媒性のステロイド化合物である．大腸へと流入した胆汁酸は，腸内細菌による多種多様な変換反応を受ける．ヒトの主要な胆汁酸であるコール酸 (CA) は，多段階反応である 7α-脱水酸化により，7 位炭素に付加されたヒドロキシ基を失い，より強い抗菌活性を発揮するデオキシコール酸 (DCA) へと変換される．DCA は大腸がんや肝臓がんを引き起こすことが報告されており，ヒトの健康維持において重要な胆汁酸である．しかしながら，DCA 生成菌の存在量を解析した報告は限られており，腸内での DCA 生成の動態を知るためには，DCA 生成菌の存在量を正確に定量することが必要である．そこで本研究では，ヒト糞便中の DCA 生成菌の存在量を明らかにすることを目的とし，20~40 代の被験者（10 名）の糞便サンプルを ① 定量 PCR 解析による DCA 生成菌の存在量解析 ② LC-MS/MS を用いた胆汁酸分析 ③ Illumina MiSeq によるメタ 16S 菌叢解析に供した．これまでの解析の結果，*Clostridium scindens* と *Claveliimonas bilis* は被験者 10 名中 5 名および 6 名の糞便から検出されたが，*Peptacetobacter hiranonis* は全被験者において検出されなかった．②の分析では，CA の割合が高い人／DCA の割合が高い人に大別された．諸解析の結果，保有する DCA 生成菌の種類とその菌数，胆汁酸組成は各個人で大きく異なることが示され，ヒト腸内における DCA 生成の動態は多様であることが示唆された．

Bile acids are amphiphilic steroidal compounds that contribute to lipid absorption in the small intestine. Upon entering the large intestine, bile acids undergo a wide variety of conversion reactions by intestinal bacteria. Cholic acid (CA), the major bile acid in humans, is converted to deoxycholic acid (DCA), which loses the hydroxy group attached at C-7 position and exhibits higher antibacterial activity, by 7α-dehydroxylation, a multi-step reaction. DCA is an important bile acid for the maintenance of human health. However, there are only a limited number of reports analyzing the abundance of DCA-producing bacteria, and their accurate quantification is necessary to clarify the dynamics of DCA production in the large intestine.

In this study, we aimed to clarify the abundance of DCA-producing bacteria in human feces. Results of the quantification of DCA-producing bacteria and analysis of the bile acid profile indicated that the types of DCA-producing bacteria, their numbers, and bile acid composition differed significantly among individuals, suggesting that the dynamics of DCA production in the human intestine are diverse.

gut microbiota, bile acid transformation, secondary bile acid

発表責任者：吹谷智（s-fukiya@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E6a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E6 会場

Screening of deoxycholic acid-producing bacteria from human feces

○Ni Wayan Eka Putri Gayatri KASTAWA, Tomoya MAEDA, Satoru FUKIYA (Res. Facul. Agr., Hokkaido Univ.)

[Background & Aim] Bile acid (BA) facilitates digestion and absorption of lipids in the small intestine and regulates cholesterol homeostasis. Representative human primary bile acid, cholic acid (CA; 3α,7α,12α-trihydroxy-5β-cholan-24-oic acid), is secreted into the gastrointestinal tract. In the large intestine, biotransformation of CA by gut bacteria produces secondary bile acids. It mainly occurs in the hydroxy group at the C-7 position, which includes oxidation and epimerization by hydroxysteroid dehydrogenases (HSDHs) and multistep 7α-dehydroxylation. 7α-dehydroxylation of CA produces deoxycholic acid (DCA; 3α,12α-dihydroxy-5β-cholan-24-oic acid). DCA is known as a carcinogen of colon and liver cancer and plays a key role in controlling gut microbiota composition due to its strong antimicrobial activity. Therefore, controlling the DCA level and the population of DCA-producing bacteria in the gut is important for maintaining human health. However, the members and populations of DCA-producing bacteria in the human gut are not fully understood. The population of DCA-producing bacteria in the human large intestine has been estimated to be as small as 0.0001% in the gut microbiota, predominantly in the genus *Clostridium.* Therefore, in this study, we aimed to identify novel DCA-producing bacteria by screening them from healthy human feces.

[Materials & Methods] All culture experiments were conducted in strictly anaerobic conditions using an anaerobic chamber. Fresh feces from healthy human adults were used in this study. In the first screening step, feces were serially diluted with 1×PBS and inoculated into Gifu Anaerobic Medium (GAM) at pH 7 or 8 containing 1 mM CA-Na as a substrate for BA conversion analysis from CA to DCA. The BA conversion was visualized using thin-layer chromatography (TLC). The most diluted, DCA-positive cultures were further diluted to contain 10^3 to 10^7 cells and inoculated to the GAM containing 1 mM CA-Na in the 96-well plate for the second screening step. Cultures that produce DCA were spread onto GAM agar to isolate the single colony. Isolated single colonies were analyzed for their BA conversion ability. Single colonies that can convert CA to DCA were taxonomically identified by sequencing the 16S rRNA gene.

[Results] Using the indicated screening methodology, we have successfully isolated the DCA-producing bacteria, *Clostridium scindens,* although it was a known DCA-producing bacteria. These results indicated that the methodology is suitable for the screening of them. Further screening results will be presented at the conference.

bile acid transformation, deoxycholic acid, human intestinal bacteria

発表責任者：Satoru FUKIYA（s-fukiya@agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E6a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E6 会場

枯草菌を用いたセグメント細菌ゲノムの機能解析

Analysis of segmented filamentous bacteria genome function in *Bacillus subtilis*

○田中 滉起[1]、荻野 竜司[1]、小椋 義俊[2]、桑原 知巳[3]、朝井 計[1] ([1]東農大・バイオ、[2]久留米大・医・感染医、[3]香川大・医・分子微生物)
○Koki TANAKA[1], Ryuji OGINO[1], Yoshitoshi OGURA[2], Tomomi KUWAHARA[3], Kei ASAI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Kurume Univ. School of Medicine, [3]Kagawa Univ.)

Segmented filamentous bacteria（SFB）は非病原性のグラム陽性菌で、広範囲の哺乳類の腸管内に寄生して存在している。SFB は宿主の免疫系の誘導に関与することが知られている。しかし、SFB は難培養性であり、遺伝子機能の解析は困難であった。枯草菌は高い形質転換能と相同組換え能を有し、SFB の属する *Clostridium* 属と近縁である。本研究では、SFB ゲノムの大部分を枯草菌ゲノムに導入し、その機能を解析した。まず、SFB の胞子形成開始機構に着目した。胞子形成における重要な転写制御因子である SFB-Spo0A は枯草菌-Spo0A と相補的であった。また、キナーゼをコードする遺伝子（SFBM_0504）が枯草菌 Spo0A を直接リン酸化するが、SFB-Spo0A に対してはホスファターゼのように働くことが示唆された。また、SFB の鞭毛形成は宿主の免疫機構の誘導に深く関与していると推定されることから、鞭毛形成遺伝子にも着目した。5 つの遺伝子クラスター（全長約 57kb）からなる SFB の鞭毛形成遺伝子を、大規模 DNA 導入法を用いて枯草菌ゲノムに一括導入した。

Segmented filamentous bacteria (SFB) are non-pathogenic, Gram-positive bacteria that are colonized in the intestinal tracts of a wide range of mammals. SFB are known to be involved in induction of the host's immune system. However, SFB is non-culturable and it is difficult to analyse the gene function. *Bacillus subtilis* possesses high transformation and homologous recombination ability and is closely related to SFB. In this study, A large part of SFB genome was introduced into *B. subtilis* genome to analyse its function. First, we focused on mechanisms of SFB sporulation initiation. SFB-Spo0A, a key transcriptional regulator in sporulation, complemented *B. subtilis*-Spo0A. We also found that a gene (SFBM_0504), which codes for kinase, was suggested to phosphorylates *B. subtilis*-Spo0A directly but act like phosphatase against SFB-Spo0A. We also focused on the flagella formation of SFB because they are presumed to be deeply involved in induction of the host's immune mechanism. The SFB flagella-formation genes consisting of five gene clusters (approximately 57kb in total length) have been introduced all together into *B. subtilis* genome using a large-scale DNA introduction method.

Bacillus subtilis, segmented filamentous bacteria, non-culturable bacteria

講演番号：4E6a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E6 会場

定量的 16S rRNA アンプリコン解析法の検証
Method validation of a quantitative 16S rRNA amplicon sequencing

中村 圭佑、田代 幸寛、○大城 麦人（九大院農）
Keisuke NAKAMURA, Yukihiro TASHIRO, ○Mugihito OSHIRO (Kyushu univ.)

【目的】自発的な発酵が起こる伝統的発酵食品では、乳酸菌を主体とした細菌叢が形成されることが多い。近年普及している 16S rRNA アンプリコン解析はそれら食品が形成する乳酸菌叢を属または種のレベルで明らかにしているが、この解析で得られる情報は細菌叢中の相対的な存在数にとどまり、各乳酸菌の絶対数を明らかにできない。本研究は細菌叢中の各乳酸菌を一斉定量する手法を開発するため、試料に含まれない細菌種を添加して内部標準とする定量的アンプリコン解析を検討した。【方法】20 種の乳酸菌基準株を混合した乳酸菌 mock を作製して本解析法の妥当性を検証した。作製した乳酸菌 mock を殺菌食材（小麦粉と水）へ添加して、食品環境中の乳酸菌叢を模倣した。内部標準細菌に *Allobacillus halotolerans* を用いて、模倣食品環境へ既知数を添加した。ビーズ破砕法により全細菌 DNA を抽出した後、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的としたアンプリコン解析を行った。【結果】乳酸菌 mock の乳酸菌組成（相対存在数）を再現性良く解析できた。内部標準細菌を 0.1%から 10%の範囲で添加したときに乳酸菌 16S rRNA 遺伝子コピー数の定量値に再現性が得られる傾向にあった。アンプリコン解析による定量結果がどれくらい真値に近いかを明らかにするため、乳酸菌 mock に含まれる各乳酸菌種の正確な数を調べている。

【Aim】A variety of lactic acid bacteria (LAB) collaboratively contribute to spontaneous food fermentations, which are frequently observed in traditional fermented-foods. The 16S rRNA amplicon sequencing has uncovered fine compositions of those LAB communities at genus or even at species level, however, this amplicon method cannot reveal the absolute abundance of each species. The aim of this study is to develop a 16S amplicon method using an internal standard to quantify the absolute abundance of each LAB species.【Methods】Our method was validated by a cell mock, which was prepared by mixing 20 strains of 20 LAB species. This LAB mock was then added to a mixture of sterilized flour and water to simulate a food environment. *Allobacillus halotolerans* cells were spiked in a sample as internal standard. Total DNA was extracted by a beads-beating method. The V4 region of 16S rRNA gene was amplified.【Results】The amplicon method showed good repeatability in the composition analysis of LAB mock community. The 16S rRNA gene copy numbers of several LAB species were quantified with good repeatability when the internal standard was spiked at the range of 0.1 to 10 %.

mock, lactic acid bacteria, microbiome

発表責任者：大城麦人（oshiro@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4E6a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E6 会場

Metagenomic insights for naphthalene-degrading bacteria obtained by droplet-based microfluidics
○CHONGYANG YANG[1,2], Satoko MATSUKURA[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3], Kazunori OKADA[1], Naohiro NODA[2], Hideaki NOJIRI[1,3] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agri. Life Sci., UTokyo, [2]BRI., AIST, [3]CRIIM, UTokyo)

[Background and Objectives] In nature, numerous microorganisms engage in intricate interactions. Studying these microbes is vital for understanding effective mechanisms to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and for developing efficient bioremediation technologies. Our prior work established a droplet-based microfluidic system, achieving the cultivation and screening of naphthalene-degrading bacteria from environmental samples. This study used metagenomics sequencing to obtain detailed molecular information about these bacteria, laying the groundwork for investigating interactions among them.
[Methods] Naphthalene-degrading consortia was obtained using a droplet-based microfluidic system and then subjected to naphthalene degradability assay and 16S rRNA amplicon sequencing. We manually mixed consortia based on their similar microbial species and naphthalene degradation capacity and then obtained 4 mixed samples (EXT1, EXT2, EXT3, and CON) to conduct metagenomic sequencing, followed by assembly and genome annotation. Functional categorization was carried out based on the KEGG and COG database. Additionally, the reported naphthalene-degrading protein sequences of *Paraburkholderia*, and *Rhodococcus* were compared with our samples using BLAST.
[Results] Naphthalene-degrading consortia with various species and naphthalene degradation capacities were successfully obtained. The 16S rRNA analysis revealed that mixed samples were predominantly *Paraburkholderia* and *Rhodococcus*. Mixed samples (EXT1, EXT2, EXT3, and CON) exhibited average naphthalene degradation capacities of 22.77%, 1.24%, 18.98% and 82.39%. Comparative analysis of COG and KEGG databases revealed that genes related to cell motility, signal transduction, and membrane transport were significantly more abundant in CON than in EXT samples, while EXT samples exhibited overrepresented of genes related to lipid metabolism. The BLAST analysis revealed that CON contained genes encoding enzymes involved in naphthalene degradation upper pathway capable of converting naphthalene to salicylate. In EXT samples, genes related to naphthalene degradation were *nar* genes, commonly found in *Rhodococcus*.

Microdroplet, Naphthalene-degrading bacteria, Metagenomics

講演番号：4E6a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E6 会場

ゲル充填マイクロウェルアレイデバイスによるナフタレン分解菌群の取得と解析
Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacterial consortia by the gel-filled microwell array device

○劉 禹忻[1]、楊 重陽[1]、張 詩芸[2]、水口 千穂[1,3]、佐々 文洋[2]、野尻 秀昭[1,3]（[1]東大院・農生科・AgTECH、[2]九州大・システム情報科学研究院、[3]東大・微生物連携機構）
○Yuxin LIU[1], Chongyang YANG[1], Shiyi ZHANG[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3], Fumihiro SASSA[2], Hideaki NOJIRI[1,3] ([1]AgTECH, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo, [2]ISEE, Kyushu Univ, [3]CRIIM, UTokyo)

ゲル充填マイクロウェルアレイデバイス（マイクロデバイス）は小区画にゲルを充填できる固体培養装置であり、細菌を隔離した状態で培養することで競争を抑えるため、従来の培養法より細菌の多様性を保ちながら培養することができる。本研究は、マイクロデバイスを用いて佐鳴湖沿岸砂礫（SEA）から多様なナフタレン分解菌群を取得することを目標としている。SEA サンプルを用いて数回集積培養を行い、ナフタレンを唯一の炭素源とするゲル培地を充填したマイクロデバイス上に培養液を塗布した。一週間後、ナフタレンを唯一の炭素源とする液体培地を添加した 96 ウェルプレートに、ゲル表面のコロニーを含む領域（47 箇所）を移植したところ、このうち 27 ウェルが 6 日後に生育が確認された。取得した 27 の菌群全てがナフタレン分解能を示したことから、本手法によりナフタレン分解菌群を取得できることが確認された。細菌の多様性は集積培養を行う際に減少するため、より多様な分解菌群を取得するために SEA サンプルから直接細菌画分を抽出し、同様の手法でナフタレン分解菌群のスクリーニングを行った。その結果、マイクロデバイス上の 56 ウェルにコロニーが検出され、このうち 14 個で 96 ウェルプレートへの植え継ぎ後に生育が確認された。現在、取得されたナフタレン分解菌群の 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を進めており、発表ではマイクロデバイス培養前の集積培養の有無によるナフタレン分解菌群の菌叢の違いについても議論する。

The gel-filled microwell array device (microdevice) is a solid medium device that can fill gel in small wells. Competition can be suppressed by culturing the bacteria separately, which is more effective for screening bacteria with more diversity. This study aims to obtain diverse naphthalene-degrading consortia from the coastal gravel of Lake Sanaru (SEA) using the microdevice. The bacterial culture was enriched in a mineral medium containing naphthalene as the sole carbon source for a few generations and was inoculated onto the microdevice filled with agar medium containing naphthalene. 47 regions containing colonies on the gel surface were transferred to 96-well plates filled with a liquid medium containing naphthalene. 27 of them exhibited naphthalene-degrading capacity. To increase bacterial diversity, bacteria extracted directly from the SEA sample were used for the same screening. Colonies appeared in 56 wells on the microdevice, and 14 of them were successfully scaled up. Currently, 16S rRNA gene amplicon sequencing is in process, and bacterial diversity with or without enrichment culture will be discussed.

PAHs, microbial degradation, unculturable bacteria

講演番号：4E6a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 E6 会場

有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティの再構築

Reconstruction of an organochlorine insecticide-degrading bacterial community

○手塚 隆博、岸田 なつみ、加藤 広海、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院・生命科学）
○Takahiro Tezuka, Natsumi Kishida, Hiromi Kato, Kouhei Kishida, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (The Univ. of Tohoku)

有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 汚染環境試料から集積培養により取得した γ-HCH 分解細菌コミュニティ EB2 は、γ-HCH を唯一の炭素源とする無機塩液体培地（HCH 液体培地）で継代培養すると、γ-HCH 分解細菌が含まれると考えられる *Sphingobium* 属が優占することなく、むしろ非分解細菌と推定される属の割合の方が増加するにもかかわらず、分解活性を安定に維持する。すなわち、γ-HCH 分解機能に対して非分解細菌も何らかの意義を持つことが示唆される。本研究では、EB2 から単離した γ-HCH 分解細菌 *Sphingobium* sp. TKS 株と、非分解細菌 *Pseudomonas* sp. TKP 株、TKP2 株、*Cupriavidus* sp. TKC 株、*Achromobacter* sp. TKA 株、*Hyphomicrobium* sp. TKH 株を用いて γ-HCH 分解細菌コミュニティの再構築実験を行った。これら単離細菌株を EB2 での各属の存在割合で混合した EB2 の再構築系（ReEB2）を作製し、HCH 液体培地で 5 回継代培養した結果、EB2 と同様に γ-HCH 分解能は安定に維持された。現在、本継代培養過程の 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析を行い、ReEB2 を Glucose を唯一の炭素源とする無機塩液体培地で継代培養した場合との菌叢変化の比較を行うと共に、γ-HCH 分解遺伝子の定量解析を進めている。

The organochlorine pesticide γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH)-degrading bacterial community EB2 remained stable γ-HCH-degradation activity during subculturing in inorganic salt liquid medium containing γ-HCH as the sole carbon source (HCH liquid medium) even though the proportion of the genus *Sphingobium*, which is thought to contain γ-HCH degrading bacteria, did not predominate. This suggests that non-degrading bacteria also have some roles for the γ-HCH degradation. In this study, we reconstructed the γ-HCH-degrading bacterial community (ReEB2) using the isolates from EB2, γ-HCH-degrading bacterium *Sphingobium* sp. strain TKS and non-degrading bacterial strains belonging to other four genera, by mixing these bacterial isolates in the same proportion of each genus as in EB2. ReEB2 was subcultured in HCH liquid medium for five passages, and its γ-HCH degradation activity was maintained stably as in EB2. We are now analyzing the taxonomic succession of ReEB2 during the subculturing process using 16S rRNA gene amplicon sequences, as well as conducting quantitative analysis of genes for γ-HCH degradation.

bacterial community, organochlorine pesticide, reconstructed community

講演番号：4E6a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E6 会場

フロー型アピカル嫌気培養器 SMZ-II を用いた腸上皮細胞の嫌気性腸内細菌に対する応答
Response of intestinal epithelial cells to anaerobes by co-culturing with a plug flow-type apical anoxic chamber SMZ-II

○石川 秀紀[1]、坂本 佳純[1]、後藤 愛那[1]、高橋 実花子[2]、米田 恭子[2]、橋本 豊之[2]、加藤 紀彦[1]、片山 高嶺[1] ([1]京大院生命、[2]島津製作所基盤研)
○Hideki ISHIKAWA[1], Kasumi SAKAMOTO[1], Aina GOTOH[1], Mikako TAKAHASHI[2], Yasuko YONEDA[2], Toyoyuki HASHIMOTO[2], Toshihiko KATOH[1], Takane KATAYAMA[1] ([1]Grad. Sch. of Biostud., Kyoto Univ., [2]Tech. Res. Lab., Shimadzu Co.)

腸内細菌と宿主上皮細胞の間における相互作用は腸内環境の恒常性維持に寄与することが知られている。この相互作用を分子レベルで解明するためには、腸内細菌と腸上皮細胞を共に維持することが望まれる。しかしながら、実際の腸管のように嫌気環境と好気環境を両立させる実験装置はほとんどなく、これまでの共培養実験ではどちらか一方の酸素濃度環境に合わせる必要があったため、いずれかの細胞が長期的な培養に耐えられないという問題が存在した。フロー型アピカル嫌気培養装置 SMZ- II は pH の低下や過剰な菌の増殖といった課題を解決し、長時間の共培養実験を行うことが可能な培養装置である。本研究ではこの SMZ- II を用いて Caco-2 単層膜上でいくつかの腸内細菌の共培養実験を行い、RNA-seq によって細菌に対する宿主細胞応答の解析を行った。その結果、共培養した細菌種ごとに異なる遺伝子発現の変動が見られた。これらの結果は SMZ- II の共培養装置としての有用性を示しており、宿主細胞と各細菌間の個別の相互作用をより詳細に理解できる可能性を示唆している。

Gut microbe-host interactions at the intestinal epithelial surface markedly influence healthy maintenance of the gut environment. To investigate the molecular interactions that occur at the interface, it is preferable to co-cultivate gut microbes with intestinal epithelial cells. However, currently, there are few experimental devices that can establish both apical anaerobic and basolateral aerobic conditions simultaneously. A plug flow-type apical anoxic chamber, SMZ-II, is a co-cultivation device that allows prolonged co-cultivation of obligate anaerobic bacteria and monolayered epithelial cells, which was accomplished by maintaining two different oxygen environments across membranes and preventing bacterial outgrowth and pH decrease in the apical medium. With this device, we analyzed how Caco-2 cells respond to distinct intestinal bacteria. RNA seq analysis revealed that the response of Caco-2 cells significantly differ depending on the co-cultivated bacterial species (probiotic, opportunistic, and pathogenic bacteria). The results suggest that SMZ-II serves as a potentially useful co-cultivation system to examine the molecular interactions between gut microbes and host epithelial cells.

gut microbes, intestinal epithelial cell, co-cultivation

発表責任者：石川　秀紀（ishikawa.hideki.55p@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E6a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E6 会場

日本人に特徴的な還元的酢酸生成菌の多様性解析と共培養実験による酢酸生成への寄与

Diversity analysis of acetogenic bacteria in Japanese gut microbiome and co-culture experiments

○山口 啓[1]、山田 千早[1]、加藤 創一郎[2] ([1]明治大・農、[2]産総研・生物プロセス)
○Kei YAMAGUCHI[1], Chihaya YAMADA[1], Souichiro KATO[2] ([1]Meiji Univ., [2]AIST・Bioproduction)

大腸においてビフィズス菌などの腸内細菌によって生成される酢酸は、腸管バリア機能を高め感染防除機能があり、ヒトの健康にとって重要であることが知られている（Fukuda *et al.*, Nature, 2011）。日本人の腸内は水素と CO_2 から酢酸を生成する還元的酢酸生成菌（*Blautia* 属細菌）が多く、メタン生成菌が少ないという特徴があり（Nishijima *et al.*, DNA research, 2016）、その健康長寿との関連が期待される。しかし日本人の糞便サンプルから還元的酢酸生成菌が単離され詳細に研究されている例は少なく、酢酸生成菌の多様性や腸内における酢酸生成への寄与、健康への影響などは不明点が多い。そこで本研究では、日本人の糞便サンプルを対象とし還元的酢酸生成菌の多様性を明らかにし、新規単離株を取得することで腸内における酢酸生成への寄与について明らかにすることを目的とする。機能性遺伝子は還元的酢酸生成経路の中の Acetyl-CoA synthase (ACS)と Formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) をコードする遺伝子を用いて、５つの大人糞便サンプル 5 つおよび子供糞便サンプル 3 つに対して多様性解析を行なった。その結果、大人糞便サンプルから未培養と推測される ACS 遺伝子が検出された。同時に、*Blautia* 属細菌に対して高い類似性を示す遺伝子も検出された。現在、腸内環境に近い低水素培養システムを用いて集積培養を行い集積・単離を進めている。並行して、モデル還元的酢酸生成菌である *Blautia hydrogenotrophica* と他の腸内細菌との共培養実験によって酢酸生成量が増加されるかについて明らかにする予定である。

Acetate produced in the large intestine by human gut bacteria such as bifidobacteria enhances intestinal cell-mediated infection defense. The Japanese human microbiome are characterized by high levels of acetogenic bacteria that produce acetic acid from H_2 and CO_2 and low levels of methanogenic bacteria, which is expected to be associated with their health and long life span. However, acetogenic bacteria have not been isolated from Japanese gut microbiota, and little is known about the diversity, the contribution to acetate production, and the health effects in the Japanese gut. In this study, we detected functional genes of Wood-Ljungdahl pathway from uncultured bacteria, and co-culture experiments were conducted to determine the contribution to acetate production.

Acetogenic bacteria, Blautia, Human gut

発表責任者：山田千早（chihaya@meiji.ac.jp）

講演番号：4E6a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E6 会場

嫌気性腸内細菌と腸管上皮細胞の共培養システムの開発
Development of a simple device that enables co-cultivation of anaerobic gut microbes with intestinal epithelial cells

○土井 かおる[1]、加藤 紀彦[1]、後藤 愛那[1]、阪中 幹祥[1]、小酒井 智也[1]、中島 有登[1]、小西 悠月[1]、山本 英[2]、佐々木 淳[3]、神戸 大朋[1]、片山 高嶺[1] ([1]京大院生命、[2]株式会社東洋製作所、[3]東洋濾紙株式会社)
○Kaoru DOI[1], Toshihiko KATOH[1], Aina GOTOH[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Tomoya KOZAKAI[1], Aruto NAKAJIMA[1], Yuzuki KONISHI[1], Takashi YAMAMOTO[2], Jun SASAKI[3], Taiho KAMBE[1], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]TOYO SEISAKUSHO KAISHA, LTD., [3]TOYO ROSHI KAISHA, LTD.)

腸内細菌やその代謝物はヒトの健康や疾患に大きな影響を及ぼす。我々は、腸内細菌−ヒト腸上皮細胞間の相互作用の解明を目指す目的で、*in vitro* で両者を共培養可能なアピカル嫌気培養装置（ディスポーザブルタイプ）を開発している。本装置は、腸内における酸素濃度環境を模倣する目的で、単層化させた腸上皮細胞の頂端膜側を嫌気環境としつつ基底膜側を好気環境に維持可能とするものである。まず、本装置の有効性を確認するために、単層化した Caco-2 細胞を本装置に設置して 48 時間培養した。その結果、経上皮電気抵抗値が培養期間中に正常に保たれること、また、培養終了後に基底膜側の溶存酸素濃度が 60%以上に保たれることを確認した。次に、ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 31944 を頂端膜側の培地に添加して Caco-2 細胞との共培養を行ったところ、生菌数が非共培養条件に比べて有意に増加した。共培養した *B. longum* 株の RNA-seq 解析を行った結果、いくつかの遺伝子において有意な発現上昇が確認された。現在、これらの遺伝子について遺伝子欠損株を作製しており、共培養下における機能解明を試みている。

Intestinal bacteria significantly influence human health and diseases. To elucidate the interplay between intestinal bacteria and intestinal epithelial cells, we have developed an apical anaerobic co-cultivation system that enables co-cultivation of them *in vitro*. The device is designed to keep the apical side of monolayered intestinal epithelial cells anaerobic while the basolateral side of the cells aerobic. Using the culture device, we first cultured monolayered Caco-2 cells for 48 hours, and found that transepithelial electrical resistance is maintained during the cultivation period and that the dissolved oxygen concentration in the basolateral medium was kept more than 60%. When we inoculated the apical medium with *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 31944, colony-forming units of the strain significantly increased, as compared when the bacterium was incubated in the medium alone. Upon co-cultivation, several genes of *B. longum* subsp. *longum* were upregulated, which was revealed by RNA-seq analysis. We are currently examining the roles of these genes in bacterial fitness under the co-cultivation conditions.

Gut microbes, intestinal epithelial cells, co-cultivation

発表責任者：片山　高嶺（katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E6a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 E6 会場

植物葉上共生細菌 *Methylorubrum extorquens* AM1 のメタノールデヒドロゲナーゼアイソザイムに関する研究
Analysis of the isozymes of methanol dehydrogenase in the plant symbiont bacterium *Methylorubrum extorquens* AM1.
○三井 亮司、高橋 莉史、竹内 赴登、友村 聡美、矢野 嵩典（岡山理大生命）
○Ryoji Mitsui, Rihito Takahashi, Hayato Takeuchi, Satomi Tomomura, Takanori Yano (Okayama Univ. of Sci.)

植物の生育を促す細菌（Plant Growth Promotion Bacteria：PGPB）の農業利用は持続可能な農業を構築する上で重要な役割を担うことが期待されている。本研究では植物葉上に共生する PGPB のモデルとしてメタノール資化性の *Methylorubrum extorquens* AM1 を用いた。本菌株は植物から放出されるメタノールを利用して生育するとともに、植物ホルモンや抗酸化活性物質を分泌し植物の生育を促すが、植物の生育段階にあわせて変化する共生環境への適応機構は十分わかっていない。*M. extorquens* AM1 はメタノール代謝の初発酵素である PQQ 依存型メタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)を 3 種類持っており、それぞれに発現条件が異なることから植物葉上での共生の鍵を担うものと予想して研究を行っている。3 つの MDH はそれぞれメタノールと希土類元素のランタノイドの組合せにより発現が調節される。そのうち MxaFI と XoxF1 の 2 つの MDH はランタノイドの有無により二成分制御系 MxbDM によって発現調節されることが明らかになっている。しかし残る XoxF2 の役割はよくわかっていない。このことから XoxF2 の欠損株を作成して様々な表現系の検討を行った結果、ランタノイド（ここでは La を使用）の濃度に関する応答性が失われることが明らかになった。このことから酵素の欠損が生育とランタノイド濃度への応答の関係に影響を与える現象についてタンパク質レベルで検討を行った。

Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) are expected to play a crucial role in sustainable agriculture. In this study, *Methylorubrum extorquens* AM1, a methanol-utilizing bacterium, was used as a model of PGPB symbiotically inhabiting plant leaves. This bacterium simultaneously secreted plant hormones and antioxidants to promote plant growth while utilizing methanol released by plants for its growth. *M. extorquens* AM1 possesses three types of PQQ-dependent methanol dehydrogenase, the starting enzyme of methanol metabolism. The expression conditions for each enzyme are different, suggesting their key roles in symbiosis on the phyllosphere. The expression of the three MDH enzymes is regulated by different combinations of methanol and lanthanides. Among them, MxaFI and XoxF1 are regulated by the two-component regulatory system MxbDM depending on the presence or absence of lanthanides. However, the role of XoxF2 is still unclear. To address this issue, a mutant lacking XoxF2 was generated and its phenotype was examined. The results showed that in the absence of XoxF2, the strain lost its responsiveness growth to lanthanide concentration. In another study, this phenomenon was further investigated using purified enzymes.

Methanol dehydrogenase, Methylotroph, Lanthanides

発表責任者：三井亮司（rmitsui@ous.ac.jp）

講演番号：4E6a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 E6 会場

微生物間共生とシトクロムオキシダーゼの分布

Microbial symbiosis and distribution of cytochrome oxidase

○上田 賢志、熊本 康平、向山 陸、馬場 悠史、薄井 拓海、西山 辰也（日大生資科）
○Kenji UEDA, Kohei KUMAMOTO, Riku MUKAIYAMA, Yuji BABA, Takumi USUI, Tatsuya NISHIYAMA (Bioresource Sci. Nihon Univ.)

鈴木と別府によって 1988 年に発見・命名された好熱細菌 *Symbiobacterium thermophilum* は、*Geobacillus* 属細菌との共培養（60℃、好気、静置）によって顕著な増殖を示す。微生物間共生の本質を論じる先駆けとなった本菌は、その後の検証により、高濃度の CO_2 を含む嫌気条件で単独増殖が可能である事が判明し、他の菌の増殖に伴って放出される CO_2 がその生育を支持していると考えられる。また、*Clostridia* 綱に含まれる本菌の分類位置は、嫌気環境を好むことと一致した。一方、本菌のゲノムには、好気呼吸酵素シトクロムオキシダーゼ（Cyt）複合体をコードする一連の遺伝子群が存在し、上記の好気共培養における低濃度条件下では酸素を利用した代謝を行う可能性が考えられた。Clostridia 綱に位置しながら Cyt 遺伝子群を保有する細菌を検索したところ、*Thermaerobacter*、*Sulfobacillus* および *Limnochorda* の 3 属が見つかり、また、‘*Caldinitratiruptor microaerophilus*’のゲノム解読を行ったところ、本菌にも存在することが判明した。これらの菌群は 16S 系統枝の独立性が高いこと、ならびに高い G+C 含量を示すことから、実際は *Clostridia* とは異なる分類群に位置し、かつての地球大気の酸素濃度上昇に伴って変遷を遂げた細菌群集が、好気共培養下で成立する低酸素環境に適応した可能性を想起させる。

Symbiobacterium thermophilum (Suzuki and Beppu, 1988) (ST) exhibits significant growth through co-cultivation with *Geobacillus* (60°C aerobic and static). ST is capable of independent growth under anaerobic conditions with high concentrations of CO_2. It is speculated that the CO_2 released during the growth of other bacteria supports its growth. The affiliation of ST to Class *Clostridia* aligns with its preference for anaerobic environments. However, ST genome contains a series of genes encoding the aerobic respiratory enzyme cytochrome oxidase (Cyt) complex. ST is supposed to perform aerobic metabolism under the low O_2 conditions in the aforementioned aerobic co-cultivation. Database search revealed that the three *Clostridia*, *Thermaerobacter*, *Sulfobacillus*, and *Limnochorda* also retained Cyt genes. Thus, these bacteria showing high independence in the 16S phylogenetic branch and a high G+C content may belong to different taxonomic groups from *Clostridia*. The adaptation of bacterial communities that underwent changes during the historical increase in O_2 in the Earth's atmosphere may evolved the syntrophic community that grow in the low-O_2 environments under aerobic co-cultivation conditions.

symbiotic interactions, Clostridia, cytochrome oxidase

発表責任者：上田賢志（ueda.kenji@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4E6a13
講演日時：3 月 27 日 11:58～ 1 号館 E6 会場

大腸菌による異種ギ酸トランスポーターのギ酸取り込み能の解析検討とその適応

Analysis and application of formate uptake capacity by heterologous formate transporters in Escherichia coli

○矢原 拓弥[1]、高坂 智之[2] ([1]山大院農、[2]山大中高微セ)
○ Takuya YAHARA[1], Tomoyuki KOSAKA[2] ([1]The Univ. of Yamaguchi, [2]RCTMR Univ. of Yamaguchi)

嫌気性のプロピオン酸酸化共生系で活躍する微生物であるプロピオン酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌において、ギ酸トランスポーターの重要性が示唆されてきている。しかし、それらギ酸トランスポーターの機能解析はほとんど行われていない。我々は知見や遺伝子工学が十分に発達した大腸菌において、異種微生物のギ酸トランスポーターの機能解析を試みた。ギ酸取り込み能に関しては、ギ酸と似た構造の次亜リン酸のギ酸トランスポーターによる取り込みによる嫌気条件での生育阻害を利用した。そして、大腸菌には FocA と FocB という既知のトランスポーターとその候補である NirC が存在している。そこでこれらを欠損させると同時に遺伝子を補完し、次亜リン酸存在下の嫌気培養により、取り込み能を分析した。残念ながら、メタン生成菌 *Methanothermobacter* sp. CaT2 の *focA* を大腸菌 BW25113 由来の株に導入しても、生育の阻害は明確には確認できなかった。そこで大腸菌株を C41 という異種膜タンパク質の発現に有利な菌株に変更し、さらに CaT2 の FocA と赤色蛍光タンパク質である RFP との融合を行ったところ、CaT2 の FocA の発現確認と、発現による次亜リン酸存在下での生育阻害を確認することができた。現在は同じ手法でプロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* SI の *focA* の機能解析を行うことを計画している。

Formate transporters of syntrophic microorganisms, propionate oxidizing bacteria and hydrogenotrophic methanogens, which utilize formate as an interspecies electron carrier, may play an important role. However, their functional characteristics have not been investigated yet. In this study, we try to assay the functions of formate transporter using constructed cells of *Escherichia coli*. We tested the disruption effects of *E. coli* formate transporters*, focA, focB*, and *nirC*, with hypophosphate which is taken up by the formate transporter and inhibits the anaerobic growth. However, the heterologous expression of *focA* of a methanogen, *Methanothermobacter* sp. CaT2 showed no clear effect. We applied two new tools. First, we introduced new parental strain, *E. coli* C41, which has advantages for the expression of membrane proteins. Second, we fused the red fluorescent protein with the FocA to check the expression. FocA of CaT2 was expressed in the cell according to the fluorescent indication of the fusion protein and we could check the growth inhibition with the effect of transporter expression. Now, we are planning to characterize the *focA* from a propionate oxidizing bacterium, *Pelotomaculum thermopropionicum* SI.

Escherichia coli, Formate transporter, Heterologous expression

発表責任者：高坂智之（tkosaka@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4E6a14
講演日時：3 月 27 日 12:09～ 1 号館 E6 会場

海洋生物の体色を構成する水溶性の色素結合タンパク質に関する研究

Water-soluble pigment-binding proteins in body color formation of marine organisms

○山崎 良介、金子 隆之、高市 真一、川﨑 信治（東農大院微生物）
○Ryousuke Yamasaki, Takayuki Kaneko, Shinichi Takaichi, Shinji Kawasaki (Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】海洋生物は多様で鮮やかな色彩を持つが、色の多様性を生む分子メカニズムは未解明な部分が多い。甲殻類は、赤色のアスタキサンチンを青色に変化させるタンパク質のクラスタシアニンを用いて体色を形成する。一方、研究室でカロテノイド結合タンパク質の生物分布を調査の折、ブルースポンジ（海綿動物）からクラスタシアニンとは異なる世界で 2 例目のアスタキサンチンを結合する水溶性青色タンパク質を同定し、EPD-BCP1 と命名した[1)]。本学会では、パープルスポンジの水溶性の紫色素に着目し、体色形成への関与に関して研究を行ったので報告する。
【方法・結果】パープルスポンジ（*Phyllospongia papyracea*）から体色と同じ色の水溶性の紫色素が抽出され、カラムクロマトグラフィーによる精製と N 末端アミノ酸配列解析を行った結果、海洋性シアノバクテリアに由来するフィコエリスリンが検出された。*P. papyracea* の飼育実験の結果、光条件に応じた赤色から白色への退色、白色から赤色への回復が観察された。赤色と白色の組織切片を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、体色の濃淡はシアノバクテリアの共生量に依存する結果が得られた。共生シアノバクテリアは難培養性を示したが、一定の増殖を可能とする培地条件が得られたため、純粋培養条件の確立と分子系統学的な種同定を行っている。

Marine animals display diverse vibrant colors, but the mechanisms underlying their specific coloration remain to be clarified. We previously identified a unique blue protein which was named EPD-BCP1 in the blue sponge[1)]. In this study, we investigated the purple protein in the body color formation of purple sponge, *Phyllospongia papyracea*. After purifying and identifying the water-soluble purple pigment, the pigment was found to be phycoerythrin derived from marine cyanobacteria. As a result of breeding experiments with *P. papyracea*, it was observed that the body color faded from red to white and then recovered from white to red depending on light conditions. We attempted to identify the species of symbiotic cyanobacteria using the 16S rRNA gene and to cultivate them in pure culture. As a result, we were able to obtain medium conditions that allow the growth of bacteria that are difficult to culture.

1) Kawasaki & Kaneko et al. *JBC* 299 105110 (2023)

Marine sponge, Marine cyanobacteria, symbiosis

講演番号：4E7a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 1 号館 E7 会場

ヒト嗅覚受容体応答を改善する新規分子シャペロンの発見
Novel molecular chaperones for functional expression of human olfactory receptors
○金子 龍成[1]、尾城 一恵[1]、柏木 貴裕[2]、寺田 育生[2]、星野 邦秀[2]、寺田 祐子[1]、伊藤 圭祐[1]([1]静岡県大院薬食、[2]高砂香料工業株式会社 研究開発本部)
○ Ryusei KANEKO[1], Ichie OJIRO[1], Takahiro KASHIWAGI[2], Ikuo TERADA[2], Kunihide HOSHINO[2], Yuko TERADA[1], Keisuke ITO[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Takasago International Corporation)

【背景・目的】ヒトは約 400 種類の嗅覚受容体（hOR）の応答パターンによって 1 兆種類以上の匂いを識別するため、匂い物質固有の hOR 応答パターンを解析できれば、匂いの“みえる化”が実現する。高解像度な“みえる化”には、HEK 細胞などを用いた hOR 応答解析システムの感度向上がカギとなるが、hOR は培養細胞での発現時に小胞体に蓄積しやすく、応答感度に直結する細胞表面への機能的発現が困難である。そこで本研究では、hOR 発現時のフォールディング過程に着目し、細胞表面発現量を増加させる新たな機能物質を探索した。
【方法・結果】hOR のリガンドには、フォールディング途中の hOR に作用することで構造を安定化し、細胞表面発現量を増加させる機能物質が存在すると仮定した。そこで、hOR1A1 をモデルとして、1,345 種類の香料原料サンプルによる細胞表面発現への影響を解析した結果、Ethyl 3-phenylglycidate などの複数成分が hOR1A1 の細胞表面発現量を増加させ、さらに応答感度も向上させることを発見した。以上より、特定の匂い物質には hOR の分子シャペロンとしての機能が備わっていることが初めて明らかとなった。本知見は、hOR 応答検出の高感度化に向けた新たなアプローチを提案するものである。
【Aims】Humans can distinguish over 1 trillion odors via approximately 400 different types of olfactory receptors (hOR). Since each odor has its unique response pattern of hORs, the sense of smell can be visualized by revealing the pattern of response hORs. Although the function of hORs can be analyzed with an in vitro system, a central challenge in this system is low expression levels of hOR in heterologous cells. Here, we searched for odorants that can guide the folding of hOR and enhance its expression level. **【Results】**Because most of the odorants are small and hydrophobic molecules, we hypothesize that some can access the hOR in the cells and support the folding as templates. Using hOR1A1 as a model of hOR, the ability to enhance the expression level of 1,345 odorants for hOR1A1 was measured. As a result, we succeeded in identifying Ethyl 3-phenylglycidate, D-neomenthol, etc., as novel molecules that can enhance the cell surface expression level of hOR1A1 and raise the sensitivity of the functional assay. Our results suggest that some odorants can be used as a molecular chaperone. These findings aid in advancing a clear visualization of smell.

Olfactory receptor, Molecular chaperone, Flavor

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4E7a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 1 号館 E7 会場

ヒト嗅覚受容体応答評価システムにおける N 末端 tag の最適化
Optimization of N-terminal tag for human olfactory receptor assay system
○尾城 一恵、勝山 響、金子 龍成、寺田 祐子、伊藤 圭祐（静岡県立大学）
○ICHIE OJIRO, HIBIKI KATSUYAMA, RYUSEI KANEKO, YUKO TERADA, KEISUKE ITO (University of Shizuoka)

【背景・目的】ヒトは約 400 種類の嗅覚受容体（hOR）の応答パターンによって 1 兆種類以上の匂いを識別するため、匂い物質固有の hOR 応答パターンを解析できれば、匂いの“みえる化”が実現する。先行研究において、HEK 細胞を用いた hOR 応答解析システムが構築され、ロドプシン由来の N 末端アミノ酸配列を hOR に付加することで、hOR の細胞表面発現量の増加と応答感度の改善がなされた。しかし、N 末端アミノ酸配列の機能の詳細は不明である。本研究では、hOR 応答解析システムのさらなる高感度化を目指し、ロドプシン以外の GPCR の N 末端アミノ酸配列について、網羅的に機能を解析した。【方法・結果】Class A に属するヒト GPCR のアミノ酸配列を TMHMM により網羅解析し、10～556 アミノ酸で構成される細胞外領域の N 末端アミノ酸配列を 271 種類取得した。続いて、それらをランダムに付加した hOR1A1 の遺伝子ライブラリーを構築し、HEK 細胞にトランスフェクションした。hOR1A1 の細胞表面発現量が高い上位 0.1%の細胞群をセルソーターにより分取し、それらの細胞に含まれる遺伝子をナノポアシーケンサーにより網羅的に解析した。その結果、ロドプシン由来の配列以上に hOR1A1 の細胞表面発現量を増加させ、応答感度も改善させることができる N 末端アミノ酸配列を見出すことに成功した。本知見は、食品の匂いの高解像度な“みえる化”技術に役立つと期待できる。
[Aim] Humans distinguish numerous odors through the response patterns of about 400 olfactory receptors (hORs). Studying the odorant-specific hOR response patterns could allow us to visualize the sense of smell. Previous study showed that the addition of the N-terminal amino acid sequence from rhodopsin to hOR increased cell surface expression and improved response. Here, we comprehensively analyzed the function of N-terminal amino acid sequences of GPCRs other than rhodopsin further to increase the hOR response. [Results] The amino acid sequences of human GPCRs belonging to Class A were comprehensively analyzed by TMHMM, and 271 N-terminal amino acid sequences were obtained. The top 0.1% of cells with high cell surface expression of hOR1A1 were sorted by cell sorter, and the hOR genes in those cells were analyzed by nanopore sequencer. As a result, we succeeded in finding the N-terminal amino acid sequence that can increase the cell surface expression of hOR1A1 and improve the response sensitivity more than the rhodopsin-derived sequence.

olfactory receptor, N-terminal, Flavor

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4E7a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 1 号館 E7 会場

ヒト嗅覚受容体応答を指標とした畜肉の判別解析

Analysis of meat flavor based on human olfactory receptor responses

○高田 こはる、寺田 祐子、伊藤 圭祐（静岡県大院薬食）
○Koharu TAKADA, Yuko TERADA, Keisuke ITO (University of Shizuoka)

【背景・目的】　近年、世界的なタンパク質不足や環境負荷軽減の観点から、大豆などを原料とした代替肉の開発が進められている。代替肉の価値として“肉らしさ”は最も重要であり、特定の動物種の“肉らしさ”を感じられる代替肉製品の需要も高まっている。しかし、“肉らしさ”には明確な基準が無く、各人の主観によって曖昧に評価されているのが現状である。ヒトは主に匂いによって肉の動物種を識別し、また匂いは約 400 種類のヒト嗅覚受容体の応答パターンによって感知される。そこで本研究では、畜肉の“肉らしさ”を客観的に判別する手法の確立を目的として、ヒト嗅覚受容体の網羅的応答解析を実施した。
【方法・結果】　加熱調理した牛肉、豚肉、鶏肉をサンプルとして、379 種類のヒト嗅覚受容体を対象とした網羅的気相応答解析を実施した。その結果、牛肉では豚肉や鶏肉よりも多数の嗅覚受容体の応答が検出されたことから、より多くの香気成分によって複雑な匂いが形成される可能性が示唆された。また、各畜肉の応答受容体にはほとんど共通性が見られず、それぞれに固有の応答受容体が検出された。以上の結果より、ヒト嗅覚受容体応答を指標として、牛肉、豚肉、鶏肉の“肉らしさ”を検出できる可能性が示唆された。
【Aims】The development of alternative meats from sources like soybeans has been progressing due to global protein shortages and efforts to reduce environmental impact. A key aspect, "meat-likeness," particularly in replicating specific animal meat flavors, is crucial but lacks clear standards and is often subjectively assessed. Humans primarily identify meat types by smell, which is detected by the response patterns of about 400 human olfactory receptors. This study aims to establish an objective method for discerning "meat-likeness" in livestock meats through a comprehensive response analysis of human olfactory receptors.
【Results】A comprehensive response analysis of 379 human olfactory receptors was conducted for pan-fried beef, pork, and chicken. Beef showed responses from more olfactory receptors than pork or chicken, suggesting a complex aroma from various odor components. Each meat type elicited unique receptor responses, with little overlap among them. These findings indicate that human olfactory receptors can potentially differentiate the "meat-likeness" of beef, pork, and chicken, providing a basis for objective assessment in alternative meat development.

Meat, Flavor, Olfactory receptor

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4E7a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 1 号館 E7 会場

市販プレーンヨーグルトの揮発性化合物による特徴解析

Characterization of commercial plain yogurt with volatile flavor compounds

○齋藤 和子（株式会社　明治）
○Kazuko SAITO (Meiji Co.,Ltd.)

プレーンヨーグルトが日本で初めて工業的に製造されてから５０年以上が経過した。発売当初、強い酸味と独特の香りはなかなか受入れられなかったが、腸内環境改善をはじめとした健康効果が広く認知され、現在では非常に多くの商品が発売されている。近年では、植物性ミルクを原料とした商品やプレミアム商品も登場し、お客様に多様な選択肢を提供している。

そこで、プレーンヨーグルトの特徴を表現する特性値のひとつとして揮発性化合物（ＶＦＣｓ）に着目し、市販品３０商品についてＧＣ-ＴＯＦＭＳ分析を実施した。同時に、専門性を有する社内パネルによる官能評価を実施した。ＧＣ-ＴＯＦＭＳ分析と官能評価結果について主成分分析による全体的な傾向を確認した後、クラスタリングを行った。

続いて、官能評価の各用語に対してＶＦＣｓとの重回帰分析を行い、プレーンヨーグルトの特徴に影響を与える要因について考察した。あわせてＶＦＣｓは、香りだけでなく、呈味や物性を表現した項目に対しても説明変数になり得るのか、検討した内容についても報告する。

More than 50 years have passed since plain yogurt was first industrially manufactured in Japan. When initially launched, the sour taste and unique aroma of plain yogurt were not widely familiar nor accepted. However, increased awareness of health benefits, such as improvements in the intestinal environment, has led to the widespread availability of many products in the market. In recent years, plant-based products and premium type products have also appeared, providing customers with a variety of choices.

We focused on volatile flavor compounds (VFCs) as one of the properties expressing the characteristics of plain yogurt and analyzed VFCs in 30 commercially available products using GC-TOFMS. At the same time, sensory evaluation was carried out by an in-house expert panel. After confirming the overall trend through principal component analysis (PCA) of GC-TOFMS analysis and sensory evaluation results, cluster analysis was conducted.

Subsequently, multiple regression analysis with VFCs was conducted for each term of sensory evaluation. VFCs associated with each term were selected, and factors influencing the characteristics of plain yogurt were discussed. We also report on whether VFCs can serve as explanatory variables for aroma but also for terms expressing taste and physical properties.

yogurt, volatile flavor compounds, sensory evaluation

発表責任者：齋藤　和子（kazuko.saitou@meiji.com）

講演番号：4E7a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 1 号館 E7 会場

Lactococcus lactis が有するセリンラセマーゼの酵素局在検討および遺伝子クローニング

Investigation of enzyme locations and gene cloning of serine racemase in *Lactococcus lactis*

○加藤 陽菜子、庄子 真樹、金内 誠 (宮城大院食産)
○Hinako KATO, Naoki SHOUJI, Makoto KANAUCHI (Miyagi Univ.)

D-アミノ酸の一種である D-セリンは、脳内神経伝達に関わる疾患の予防・改善効果や、腎臓を保護する効果等の機能性が報告されている。このことから、安全性が高い D-セリンの製造及び利用は、高齢者の健康維持に役立つ、新規機能性食品の開発につながると考えられる。D-アミノ酸の製造法として、微生物酵素（アミノ酸ラセマーゼ等）を利用する酵素法が知られている。

そこで、食品利用可能な高濃度 D-セリン製造への応用を目的とし、セリンラセマーゼ活性を有する乳酸菌 *Lactococcus lactis* の D-セリン生成について検討した。まず、本株を培養後、培養液を菌体外分画とした。菌体はリゾチーム処理後、細胞壁画分、細胞膜画分、細胞質画分に分画し、ラセマーゼ活性を検討した。その結果、酵素活性は細胞質中で強く見られ、細胞膜を介して菌体外に放出されていると考えられた。また、*Lactococcus lactis* のラセマーゼの遺伝子クローニングについても報告する。

今後はアミノ酸配列や酵素学的性質の解明を行い、食品への応用を目指す。

There are some reports that D-serine prevents and improves some diseases as brain neurotransmission disorder and kidneys disorder. D-serine which produced high efficiency and safety for food, uses to the development of new functional foods to support elder people for health. Enzymatic methods using microbial enzymes such as amino acid racemase are known for the production of D-amino acids. Therefore, serine racemase in *Lactococcus lactis* isolated from fermented food was investigated for application for food productions.

First, the enzyme locations in *Lactococcus lactis* were investigated. The culture medium of it was fracted as extrabacterial fractions. After treating with lysozyme, bacterial cells were isolated into cell wall, cell membrane, and cytoplasm fractions. These fractions were researched about racemase activity. As a result, enzyme activity was strong in the cytoplasm and suggested that enzyme released outside the cell through the cell membrane. Also, gene cloning of the racemase from *Lactococcus lactis* will be reported.

In the future, amino acid sequences and characteristics of enzyme will be elucidated for application for food productions.

D-serine, amino acid racemase, bacteria

発表責任者：加藤陽菜子（kanauchi@myu.ac.jp）

講演番号：4E7a06
講演日時：3 月 27 日 10:33～ 1 号館 E7 会場

液体塩こうじ副産物が有する辛味・旨味作用物質の探索
Search for Spicy and Umami-Enhancing Compounds in “Liquid Shio Koji”
○山本 英作[1]、白井 伸生[1]、髙橋 健司[1]、野田 響子[2]、千葉 智[1] ([1]ハナマルキ（株)、[2]お茶の水女子大学)
○EISAKU YAMAMOTO[1], NOBUKI SHIRAI[1], KENJI TAKAHASHI[1], KYOKO NODA[2], SATORU CHIBA[1] ([1]Hanamaruki Foods Inc., [2]Ochanomizu Univ.)

米麹と塩を熟成させた「塩こうじ」を圧搾することにより当社独自製品「液体塩こうじ」を製造している。この工程で生じる副産物を加熱乾燥し粉末化することで、新たなコク味調味料「熟成こうじパウダー（以下、JKP)」を開発した。JKP が有するコク味への効果のうち、本研究では辛味の持続と旨味のエンハンスに作用する物質の探索を試みた。

はじめに JKP に含まれる成分を幅広く推定するためにメタボローム解析を実施した。アノテーションされた 76 化合物について調べたところ、辛味の持続に関与している可能性のある化合物として Linoleoyl ethanolamide が見出されたが官能評価での寄与度は低く、本質的な作用物質ではなかった。そこで、辛味と旨味への作用を指標に分画を進めたところ、辛味及び旨味に関わる成分ともに 10 kDa 未満であった。更に、いくつかのモデルメイラード反応液の辛味及び旨味に対する作用を調べた結果、それぞれグルコースとシステイン及びグルコースとグルタミン酸の反応液が同様の作用を示すことが分かった。現在、これらのメイラード反応液と JKP で共通する成分について精製同定を進めている。

We produce “Liquid Shio Koji” by pressing salted rice malt. By heating, drying, and pulverizing the byproduct generated in this process, we have developed a new *koku* seasoning called “Jukusei Koji Powder (JKP). Among the effects demonstrated by JKP, this study aimed to search compounds involved in sustaining spiciness and enhancing umami flavor.

Initially, metabolome analysis was performed to widely estimate the compounds in JKP. Upon investigating the functions of the annotated 76 compounds, Linoleoyl ethanolamide was identified as a compound potentially involved in sustaining spiciness. However, its contribution in sensory evaluations was marginal, indicating that it might not be the primary active compounds. Subsequently, we purified based on the effects on spiciness and umami. The compounds involved in both spiciness and umami were found to be under 10 kDa. Further investigation into the effects of several Maillard reaction solutions on spiciness and umami revealed that reaction solutions of glucose with cysteine and glucose with glutamic acid exhibit similar effects, respectively. We are currently exploring common compounds between these Maillard reaction solutions and JKP.

koji, Maillard reaction, koku seasoning

発表責任者：山本　英作（e-yamamoto@hanamaruki.co.jp）

講演番号：4E7a07
講演日時：3 月 27 日 10:44～ 1 号館 E7 会場

味噌汁の保温にともなう香気特性の変化とそれに関わる要因成分の解明
Evaluation of changes in aroma characteristics of miso soup during warming and determination of the factors involved

○塩澤 天真[1]、眞鍋 太成[1]、亀山 龍[1]、山田 悠斗[2]、飯島 陽子[1]([1]工学院大先進工、[2]神奈川工科大健康医療)
○Terama SHIOZAWA[1], Taisei MANABE[1], Ryu KAMEYAMA[1], Yuto YAMADA[2], Yoko IIJIMA[1]([1]Kogakuin Univ., [2]Kanagawa Institute of Tech.)

従来、味噌汁は作り立てがおいしいと言われてきたが、生活様式の変化により、外食における大量調理によって保温された味噌汁を喫食する機会が多くなった。本研究では、保温に伴う味噌汁の風味変化について、特に香気特性に着目し、分子レベルで調べることを目的とした。まず大学生を対象に、作り立ての味噌汁と 90℃の保温ジャーで 1 時間保温した味噌汁の風味を官能評価で確認したところ、保温味噌汁の方が「コクがある」「塩っぽい」など濃厚感が高くポジティブに捉えることが分かった。また、味噌そのものを加熱したのち味噌汁を作成しても同様の結果となった。特に香りの変化が大きいことが分かったため、香気組成の違いについて GC-MS を用いた網羅的解析法により詳細に調べた。その結果、ストレッカーアルデヒド類を含む 6 種の香気成分の増加が要因と考えられた。これらの成分について、味噌汁中の含有量を検量線によって定量し、作り立ての味噌汁に添加したところ、保温味噌汁に近い香気特性となった。また、その影響を白味噌と赤味噌で比較すると、白味噌の方が影響が大きいことが分かった。現在モデル系によってこれらの成分の生成条件について調べているところである。

Miso soup has been recognized as delicious when it is just after cooked. However, due to changes in lifestyles, we frequently take more opportunities to eat miso soup which has been kept warm. In this study, we investigated flavor changes in the miso soup due to warming at a molecular level, especially focusing on aroma characteristics.

First, we conducted a sensory evaluation on the flavor of freshly made miso soup and miso soup that had been kept warm for 1 hour at 90 ℃. The results showed that the warmed miso soup had a positive strong flavor, such as “richer” and “salty". Next, since we found that the change in aroma characteristics was more significant, the differences in aroma composition were investigated in detail by a comparative comprehensive analysis using GC-MS. As a result, the increase in six aroma compounds, including Strecker aldehydes, was recognized as significant for flavor changes. After quantification of their contents in miso soup, we performed additional test of them to freshly made miso soup, resulting that the aroma characteristics were similar to those of warm miso soup. We are currently investigating the conditions for the formation of these compounds using a model system.

miso soup, flavor, volatiles

発表責任者：飯島　陽子（yiijima@cc.kogakuin.ac.jp）

講演番号：4E7a08
講演日時：3 月 27 日 10:55～ 1 号館 E7 会場

味噌の調理学的特性

Culinary characteristics of miso

○有住 茉莉、金内 誠（宮城大院食産）
○Mari ARISUMI, Makoto KANAUCHI (Miyagi Univ.)

味噌は大豆を用いた我が国の伝統的な発酵調味料であり、大豆由来のタンパク質などが豊富である。そのため，調味料としての摂取だけでなく、栄養源としても摂取されてきた。わが国では，家庭料理に広く使われているにもかかわらず、その調理特性に関する科学的研究は限られている。これまで、伊藤は、味の良い味噌汁には浮遊性の味噌コロイドが含まれていると報告している。[1]しかし、加熱後の味噌汁の成分や粒子径についてはほとんど報告されていない。

そこで，本研究では、様々な味噌サンプルの加熱後の成分とコロイドサイズの変化を調べた。まず、全国からタイプの異なる味噌 15 種を用い、10%懸濁溶液を調製した。これらを 60~100℃で 10 分加熱し、酸度、ホルモール窒素量、遊離アミノ態窒素量および平均粒径、流状斑の測定を行った。すべてのサンプル群において加熱温度が高くなるにつれ，遊離アミノ態窒素量が減少傾向を示した。また，サンプルの粒度測定も行った結果、加熱温度が高くなるにつれ平均粒度が小さくなった。

よって，味噌からのアミノ酸抽出量や大豆消化物の分散性に加熱が関与していることが考察された。

１）伊藤清枝；調理科学，Vol.1，No.2，75-79（1968）

Miso is a traditional Japanese fermented seasoning made from soybeans, rich in protein content. Beyond seasoning, it serves as a source of nutrition. Despite its widespread use in family cooking, there are limited scientific studies regarding its cooking properties. Ito reported that a well-tasting miso soup contained a suspended miso colloid. However, there is a few reports about on the components or particle size in miso soup after heating. This study investigated the changes in components and particles size in various miso samples after heating.

A 10% miso suspension was prepared from 15 different miso samples and heated to temperatures ranging from 10 to 100ºC for varying durations. Analysis as formol nitrogen, particle size and volume of turbidness were assayed. The results showed a decreasing formol nitrogen in the supernatant post-heating, indicating changes in the composition. Particle size was observed to be smaller in the heated miso suspension compared to the non-heated suspension.

Consequently, amino acid extraction and changes in particles size had relation of heat condition particularly boiling temperature.

Miso, Culinary, characteristics

発表責任者：有住茉莉（kanauchi@myu.ac.jp）

講演番号：4E7a09
講演日時：3 月 27 日 11:06～ 1 号館 E7 会場

Malabaricone 類による 5-リポキシゲナーゼ活性阻害

Inhibitory effect of malabaricones on 5-lipoxygenase activity

○川上 祐生、髙原 明日香、岩岡 裕二、戸田 圭祐、津嘉山 泉、山本 登志子、伊東 秀之、高橋 吉孝（岡山県大保福）
○Yuki Kawakami, Asuka Takahara, Yuji Iwaoka, Keisuke Toda, Izumi Tsukayama, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Hideyuki Ito, Yoshitaka Takahashi (Okayama Pref. Univ.)

5-リポキシゲナーゼはアラキドン酸の 5 位の炭素に 1 分子の酸素を添加する酵素である。この反応の生成物である 5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸（5-HPETE）は、5-リポキシゲナーゼがもつロイコトリエン（LT）A_4 合成活性により LTA_4 に変換される。LTA_4 から生成される LTB_4、LTC_4、LTD_4、LTE_4 は炎症疾患の増悪化に関わり、それぞれの受容体を介して、白血球遊走などの生理活性を示す。我々はこれまで、ナツメグに含まれる malabaricone C が 5-リポキシゲナーゼ活性を比較的低い濃度で阻害することを報告してきた（Free Radic Biol Med, 2022）。本研究では、malabaricone 類による 5-リポキシゲナーゼ活性阻害に対する影響について検討した。Malabaricone C と水酸基の数の異なる malabaricone A および malabaricone B は、5-リポキシゲナーゼによるアラキドン酸から 5-HPETE への変換を濃度依存的に阻害したが、それらの活性阻害は malabaricone C よりも弱かった。また、malabaricone C の水酸基をメトキシ基に変換すると、5-リポキシゲナーゼ活性阻害効果は今回検討したいずれの化合物よりも低かった。

5-Lipoxygenase is an enzyme incorporating one molecule of oxygen into the 5-position of arachidonic acid. The produced 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) is converted to leukotriene (LT) A_4 by the LTA_4 synthase activity of 5-lipoxygenase. LTB_4 and cysteinyl LTs including LTC_4, LTD_4 and LTE_4 are changed from LTA_4, and these LTs are involved in various inflammatory diseases. The biological activities of LTs are mediated by their own G protein-coupled receptors. We previously reported that malabaricone C from nutmeg (*Myristica fragrans*) inhibited the enzyme activity of 5-lipoxygenase with the low IC_{50} value (Free Radic Biol Med, 2022). In this study, we investigated the inhibitory effect of malabaricones on the enzyme activity of 5-lipoxygenase. Malabaricone A and B (malabaricones with fewer hydroxy groups than malabaricone C) were dose-dependently inhibited conversion of arachidonic acid to 5-HPETE by 5-lipoxygenase with higher IC_{50} values than malabaricone C. When we methylated the hydroxyl groups of malabaricone C, the inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by methylated malabaricone C was lower than that of other malabaricones.

5-Lipoxygenase, Malabaricones, Nutmeg

発表責任者：川上祐生（kawaka@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：4E7a10
講演日時：3 月 27 日 11:17～ 1 号館 E7 会場

食パンの膨化に影響を及ぼすモリンガの葉含有成分

Constituents in Moringa leaves affecting bread swelling

○黒須 友里愛、郡山 貴子、細谷 孝博（東洋大院食環境）
○Yuria KUROSU, Takako KORIYAMA, Takahiro HOSOYA (Toyo Univ.)

モリンガ（*Moringa oleifera*）は、ワサビノキ科ワサビノキ属の植物であり、熱帯・亜熱帯地域で広く栽培され、栄養や機能性面に優れおり、古くから食用とされている。近年、その高い機能性を有することから、我が国でも注目が高まっており、葉を主な利用用途として栽培が行われている。我々は食への応用の一例として、モリンガ含有の食パンを焼成したが、膨化が抑制されることを確認し、その原因がイーストへの影響であることを報告した。そこで、モリンガに含まれる膨化抑制成分を明らかにするため、イーストの生存を Cell Counting Kit-8（WST-8）を用いて評価系を構築し、活性を指標とした成分を分離、精製した。核磁気共鳴（NMR）や質量分析（MS）等の各種スペクトル解析により、Quercetin-3-glucoside（Q3G）および Kampferol-3-glucoside（K3G）であることが分かり、これら成分にイーストの生存率を低下させる活性が見られた。構造活性相関的知見より、Q3G（IC_{50}=0.34 mg/mL）は K3G（IC_{50}=0.43 mg/mL よりも強く、またアグリコンである Quercetin は、イーストの生存率に全く影響しないことが分かった。

Moringa (*Moringa oleifera*) is a plant belonging to the family Wasabinaceae. It is widely cultivated in tropical and subtropical regions, and has been used as food for long owing to its superior nutritional and functional properties. Recently, this plant has been attracting increasing attention in Japan and is cultivated mainly for the use of its leaves. Considering its suitability for use as food, we baked bread containing moringa and demonstrated a suppression in swelling, moreover, we validated that the effect of moringa on yeast was associated with this outcome. Therefore, to explore the active components of moringa that inhibit bloating, we constructed a Cell Counting Kit-8 (WST-8) -based system to evaluate yeast survival, and isolated and purified the active components considering the anti-fungal activity as an indicator. Based on spectral analyses, including nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), we identified quercetin-3-glucoside (Q3G) and kaempferol-3-glucoside (K3G) as the active components in moringa, which affect the survival rate of yeast. Structure-activity relationships revealed that Q3G (IC_{50}=0.34 mg/mL) was stronger than K3G (IC_{50}=0.43 mg/mL), and quercetin, an aglycone, did not alter the viability of yeast.

Moringa, Quercetin-3-glucoside, Yeast

講演番号：4E7a11
講演日時：3 月 27 日 11:36～ 1 号館 E7 会場

L-dopa の自動酸化を制御する食品由来成分の探索

Search for food-derived components regulating autoxidation of L-dopa

○小林 諒馬、郡山 貴子、細谷 孝博（東洋大食環境）
○Ryoma KOBAYASHI, Takako KORIYAMA, Takahiro HOSOYA (Toyo Univ.)

我々の摂取する食品には、ドーパミンの前駆物質である 3,4-dihydroxyphenylalanine（L-dopa）を含有するものがある。しかし、L-dopa の自動酸化作用により、その量が減少することで効率的な摂取ができなくなる一方で、高含有する食品では、L-dopa の過剰摂取による問題も浮上している。そのため、本研究は、L-dopa の自動酸化によるメラニン生成をコントロールする食品由来の成分を探索することとした。L-dopa の自動酸化を評価する方法として、96 穴マイクロプレートにおける評価系を構築し、当研究室所有のハーブ抽出物ライブラリーを供したところ、自動酸化を抑制するサンプルは見つからなかったものの、促進するハーブとして、サマーセイボリーがヒットした。サマーセイボリーに含まれる自動酸化を促進する成分を明らかにするため、活性を指標とした成分の分離を行ったところ、五環性トリテルペンである Ursolic acid を単離した。本化合物は、核磁気共鳴（NMR）および質量分析（MS）の各種スペクトルと文献値との比較により決定した。Ursolic acid の L-dopa を基質とした自動酸化の促進は 7 倍であり、自動酸化後の溶液には、黒色のメラニンが確認できた。これにより、L-dopa を高含有する食品での過剰摂取による安全性への問題の解決への糸口となることが示唆された。

Some of the foods we consume contain 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa), a precursor of dopamine. The autoxidation of L-dopa diminishes its quantity, leading to effective intake, whereas foods with elevated L-dopa content pose a challenge of excessive L-dopa consumption. In this study, we investigated food-derived ingredients that control melanogenesis by L-dopa autoxidation. A 96-well microplate system was constructed to evaluate L-dopa autoxidation, and our herbal extract library was used. Although no sample was found to inhibit autoxidation, summer savory was an herb that promoted autoxidation. To elucidate the component in summer savory that promoted autoxidation, we isolated ursolic acid, a pentacyclic triterpene, using its activity as an indicator. The identification of this compound was performed by aligning its nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) spectra with values documented in the literature. The promotion of autoxidation of ursolic acid was seven times higher compared to that of L-dopa as a substrate, and melanin was observed in the solution after autoxidation. The findings could offer insights into addressing the safety concern associated with the overdose of L-dopa when consuming foods with elevated L-dopa levels.

L-dopa, autoxidation, ursolic acid

講演番号：4E7a12
講演日時：3 月 27 日 11:47～ 1 号館 E7 会場

アルギン酸の M/G 比算出のための加水分解条件の検討

The examination of hydrolysis conditions for M/G ratio of alginic acid

○稲葉 亮成[1]、関 憧平[1]、石島 大義[1]、柳岡 直樹[2]、垣田 浩孝[2] ([1]日大文理、[2]日大院総合基)
○ Akinari INABA[1], Shouhei SEKI[1], Haruyoshi ISHIJIMA[1], Naoki YANAOKA[2], Hirotaka KAKITA[2] ([1]College of Humanities and Sciences, Nihon Univ., [2]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ.)

アルギン酸は主に褐藻類が生合成する直鎖型多糖で、マンヌロン酸とグルロン酸の２つのウロン酸から構成されている。グルロン酸のモル数に対するマンヌロン酸のモル比を M/G 比という。アルギン酸の性質は M/G 比が大きく影響する。グルロン酸の多いアルギン酸は固くもろいゲルを形成し、マンヌロン酸の多いアルギン酸は柔らかくしなやかなゲルを形成する。酸加水分解には１段階目 80%硫酸 20℃と２段階目 1M 硫酸 80℃の組み合わせがある。そこで本研究では加水分解時間がその生成物にどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的とした。各加水分解条件で得られた加水分解物を TSKgel G5000PWxl + G3000PWxL を用いたゲルろ過クロマトグラフィーと TSKgel Amide-80 を用いた順相クロマトグラフィーで分子量分布及び M/G 比を評価した。１段階目の加水分解では、加水分解時間が６時間までは時間とともにモノマーが増加し、その後６時間から１８時間までは一定となり、２４時間では減少することが明らかになった。１段階目の加水分解は１８時間、２段階目の加水分解は３時間が適していることが示唆された。さらに詳細な分解条件を検討中である。

Alginic acid is a linear polysaccharide mainly biosynthesized by brown algae, and is composed of two uronic acids, mannuronic acid and guluronic acid. The molar ratio of mannuronic acid to guluronic acid is called the M/G ratio. The properties of alginic acid are greatly influenced by the M/G ratio. Alginic acid rich in guluronic acid forms a hard but brittle gel, while alginic acid rich in mannuronic acid forms a weaker but flexible. Acid hydrolysis involves a combination of the first stage using 80% sulfuric acid at 20°C and the second stage using 1M sulfuric acid at 80°C. Therefore, the purpose of this study was to clarify how the hydrolysis time affects the products. The molecular weight distribution and M/G ratio of the hydrolysates obtained under each hydrolysis condition were evaluated by gel filtration chromatography using TSKgel G5000PWxl + G3000PWxL and normal phase chromatography using TSKgel Amide-80. In the first stage of hydrolysis, it was revealed that the monomer amount increased with time until the hydrolysis time was 6 hours, remained constant from 6 hours to 18 hours, and decreased at 24 hours. It was suggested that 18 hours is suitable for the first stage of hydrolysis, and 3 hours is suitable for the second stage of hydrolysis.

seaweed, alginic acid, hydrolyzate

シンポジウムプログラム

3 月 25 日（月）9:30〜12:00

2S01A1a　微生物の機能を拡張し，制約から解き放つ
Unleashing the Power of Microbes Beyond Their Constraints

3 月 25 日（月） 9:30〜12:00
後　援：環境バイオテクノロジー学会
世話人：豊福 雅典（筑波大生命環境），水口 千穂（東大院農）
座　長：豊福 雅典（筑波大生命環境），水口 千穂（東大院農）

9:30　2S01A1a-01　ミニマルセルを用いた細菌の高次機能の再構築 ……○柿澤 茂行（産総研）

10:00　2S01A1a-02　接接合伝達機構を介した核酸輸送による微生物制御に関する研究 ……○岸田 康平（東北大・院生命）

10:30　2S01A1a-03　**The potential of cell-penetrating peptides as biomolecules carriers and its application in bacterial manipulation**
……○Tetsushi Mori，Daichi Toyohara，Yasuhito Yokoi，Yugo Kawabuchi，Ernest Chandra，Go Inoue，Takahiro Muraoka（Tokyo Univ. Agric. and Tech.）

11:00　2S01A1a-04　アルコールに対する大腸菌のストレス応答とその 1 細胞解析 ……○加藤 節（広島大院統合生命）

11:30　2S01A1a-05　**Optoenergetic cell factory** の創製とその産業応用 ……○原 清敬（静県大院食栄環）

2S02A2a　化学昆虫学〜新たな視点からの昆虫科学の展開
Chemistry in Insect Sciences-New Perspectives in Insect Science-

3 月 25 日（月） 9:30〜12:00
世話人：森 直樹（京大院農），塩月 孝博（島根大生物資源）
座　長：森 直樹（京大院農），塩月 孝博（島根大生物資源）

9:30　2S02A2a-01　昆虫の食性とステロール化合物の獲得戦略 ……○永田 晋治（東大院新領域）

9:55　2S02A2a-02　鱗翅目害虫に対するリンゴ果実の防御応答
……○吉永 直子[1]，大畑 勇統[1]，石栗 陽一[2]，森 直樹[1]（[1]京大院農，[2]青森産技セ）

10:20　2S02A2a-03　幼若ホルモンの分子作用機構の解明と創農薬 ……○粥川 琢巳（農研機構(生物研)）

10:45　2S02A2a-04　カロテノイドによるトビバッタの体色発現 ……○管原 亮平（弘前大農生）

11:10　2S02A2a-05　昆虫の嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞による匂いセンシング技術の開発
……○光野 秀文[1]，祐川 侑司[1]，櫻井 健志[2]，神﨑 亮平[1]（[1]東大先端研，[2]東農大農）

11:35　2S02A2a-06　アリと共生する昆虫の多様性 ……○丸山 宗利（九大博）

2S03A3a　食品成分による脂質代謝制御
Regulation of lipid metabolism by food ingredients

3 月 25 日（月） 9:30〜12:00
世話人：井上 順（東京農大応生），高橋 信之（東京農大応生）
座　長：井上 順（東京農大応生），高橋 信之（東京農大応生）

9:30　2S03A3a-01　ビタミン A 代謝変動により非アルコール性脂肪肝炎を抑制させる玄米の効果について
……○山本 祐司（東京農大）

10:00　2S03A3a-02　レポーターシステムを活用した熱産生脂肪細胞活性化因子の探索と機能評価
……○後藤 剛[1,2]，川原﨑 聡子[1]，高橋 春弥[1]，井上 和生[1,2]（[1]京大院農，[2]京大・CPIER）

10:30　2S03A3a-03　**SREBP** 活性の抑制と免疫系を介した臓器線維化抑制作用 ……○煙山 紀子（東京農大）

11:00　2S03A3a-04　**NAD$^+$** 代謝制御酵素の発現調節を介した脂肪細胞の質的制御
……○三谷 塁一[1,2]（[1]信大農，[2]信大院農学専攻・食品生命）

11:30　2S03A3a-05　脂質代謝改善作用をもつ食品由来成分の探索 ……○井上 順（東京農大）

2S04A4a　農芸化学における有機合成の新展開：複合領域に挑む若手研究者たち
New Developments in Organic Synthesis in Applied Biological Chemistry：Young Researchers Advancing into Multidisciplinary Areas

3 月 25 日（月） 9:30〜12:00
共　催：学術変革領域 A「マテリアル・シンバイオシスのための生命物理化学」
世話人：小倉 由資（東大院農生科）
座　長：小倉 由資（東大院農生科），若森 晋之介（東農大生命科学），佐藤 伸一（東北大学際研）

9:30　はじめに ……小倉 由資（東大院農生科）
9:35　2S04A4a-01　天然物の成り立ちをひもとく有機合成化学 ……○榎本 賢（東北大院農）
10:03　2S04A4a-02　テルペノイド研究の加速を目指した有機合成化学研究 ……○中山 淳（阪公大院理）
10:31　2S04A4a-03　ADP-リボース鎖分子の自在化学合成のための効率合成法の開発 ……○田中 秀則（岐阜大iGCORE）
10:59　2S04A4a-04　生物活性分子の標的同定を指向したタンパク質熱変性の可視化プローブ開発 ……○佐藤 伸一（東北大学際研）
11:27　2S04A4a-05　凝集体形成を利用した Activatable 型ラマンプローブによる酵素活性イメージング ……○神谷 真子（東工大生命理工）
11:55　おわりに ……佐藤 伸一（東北大学際研）

2S05B6a　深海を耕せ - 生物鉱学の創成
Cultivate deep-sea! ~Creation of the BIOre-concept

3 月 25 日（月） 9:30〜12:00
共　催：科研費学術変革領域研究 B「生物鉱学の創成」
協　賛：極限環境生物学会，日本地球化学会，資源・素材学会
世話人：若井 暁（海洋研・超先鋭）
座　長：若井 暁（海洋研・超先鋭），小山 恵史（早稲田大・理工）

9:30　2S05B6a-01　農芸化学と生物鉱学の融合 ……○若井 暁（海洋研・超先鋭）
9:45　2S05B6a-02　海底熱水鉱床の初期生成プロセスにおける微生物活動の重要性 ……○野崎 達生[1,2,3,4]（[1]海洋機構資源，[2]東大院工，[3]神大院理，[4]オタワ大院理）
10:18　2S05B6a-03　深海バイオリソースを統合した生物鉱学カルチャーコレクション構想 ……○澄田 智美（海洋研究開発機構）
10:51　2S05B6a-04　海洋環境における微生物―鉱物反応およびガルバニック腐食反応の速度論的考察 ……○淵田 茂司（東京海洋大）
11:24　2S05B6a-05　金属資源開発における陸上・海洋微生物の可能性と展望 ……○小山 恵史[1]，淵田 茂司[2]，牧田 寛子[2]，所 千晴[1,3]（[1]早稲田大，[2]東京海洋大，[3]東大）
11:57　おわりに ……若井 暁（海洋研・超先鋭）

3 月 25 日（月）13:50〜16:20

2S06A2p　アミノ酸・代謝物の生物学的・栄養学的機能
Biological and nutritional functions of amino acids/metabolites

3 月 25 日（月） 13:50〜16:20
共　催：日本アミノ酸学会
世話人：亀井 康富（京都府立大院生命環境），高橋 伸一郎（東京大院農学生命科学）
座　長：亀井 康富（京都府立大院生命環境），高橋 伸一郎（東京大院農学生命科学）

13:50　はじめに ……亀井 康富（京都府立大院生命環境）
13:53　2S06A2p-01　アミノ酸の生理機能 ……○畑澤 幸乃（味の素株式会社）
14:17　2S06A2p-02　酵母におけるプロリン資化抑制機構の解明 - プロリンを含まないワイン・ビール製造への挑戦 - ……○西村 明[1,2]，高木 博史[2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]奈良先端大・研推）
14:41　2S06A2p-03　筋萎縮時の統合的メタボローム解析から見えてきたアミノ酸異化産物ポリアミンの代謝変動と筋量制御 ……○大藪 葵，亀井 康富（京都府立大学生命環境科学研究科）
15:05　2S06A2p-04　多能性幹細胞の維持および分化におけるメチオニンの役割 ……○白木 伸明（東工大）
15:29　2S06A2p-05　タンパク質栄養状態の悪化による脂肪肝形成機構 ……○豊島 由香，吉澤 史昭（宇大学術院）
15:53　2S06A2p-06　血中アミノ酸プロファイルが臓器特異的な脂質代謝を制御する ……○伯野 史彦（東大院農）
16:17　おわりに ……高橋 伸一郎（東大院農）

2S07A3p　海洋バイオスフィアからの視座：生分解性プラスチック研究の新潮流
Perspectives from the marine biosphere: new trends in biodegradable plastic research

3 月 25 日（月）　13:50〜16:20
協　賛：「ムーンショット型研究開発事業　生分解開始スイッチ機能を有する海洋分解性プラスチックの研究開発　プロジェクト」
世話人：山田 美和（岩手大農）
座　長：山田 美和（岩手大農），鈴木 美和（群大食健セ），高 相昊（神戸大院科技イノベ）

13:55　2S07A3p-01　海から発見された微生物が活躍するバイオプラスチックの合成と分解研究 ……○山田 美和（岩大農）

14:23　2S07A3p-02　微生物合成プラスチックと化学合成生分解性プラスチックの環境分解性の差異
……○鈴木 美和[1]，石井 俊一[2]，権田 昂平[3]，鹿島 裕之[2]，鈴木 志野[4]，植松 勝之[5]，新井 隆弘[5]，橘 熊野[1,3]，岩田 忠久[6]，粕谷 健一[1,3]
（[1]群大食健セ，[2]海洋機構，[3]群大院理工，[4]JAXA，[5]マリンワークジャパン，[6]東大院農）

14:51　2S07A3p-03　物性と海洋生分解性を両立した進化型ポリ乳酸 LAHB の研究ストーリー
……○高 相昊[1]，田口 精一[1,2]（[1]神戸大院科技イノベ，[2]神戸大先端バイオ）

15:19　2S07A3p-04　実海域における生分解性プラスチックの分解に寄与する生分解菌叢の特定とそれに紐付く分離株の解析
……○楠屋 陽子（製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター）

15:47　2S07A3p-05　環境移送技術を用いた，サンゴ礁生態圏の研究促進 ……○高倉 葉太（株式会社イノカ）

2S08A4p　金属主役の次世代の生命科学〜金属で生命・食糧・環境を自在に操る！〜
Next generation of Life Science with metals 〜Regulation of lives, foods and environments by metals〜

3 月 25 日（月）　13:50〜16:20
協　賛：新学術領域「生命金属科学」
世話人：鈴木 道生（東大院農），神戸 大朋（京大院生命），澤井 仁美（長崎大院工）
座　長：鈴木 道生（東大院農），神戸 大朋（京大院生命），澤井 仁美（長崎大院工）

13:50　2S08A4p-01　環境中の硫黄循環を駆動するマルチ金属酵素 ……○三原 久明（立命大生命）

14:15　2S08A4p-02　黒いメラニンの生合成には亜鉛が不可欠である ……○神戸 大朋（京大院生命）

14:40　2S08A4p-03　バイオミネラリゼーションにおける有機基質の役割 ……○鈴木 道生（東大院農）

15:05　2S08A4p-04　重元素同位体比測定技術が解き明かす生命・食糧・環境 ……○有賀 智子（産総研･計量標準）

15:30　2S08A4p-05　驚異的な鉄代謝能力を持つヒザラガイの鉄濃縮・沈着メカニズムの解析
……○根本 理子（岡山大･院環境生命）

15:55　2S08A4p-06　鉄を摂取して健康になるための分子科学 ……○澤井 仁美（長崎大院工）

2S09B6p　物質生産技術の革新を目指した予知生合成科学
Forecasting Biosynthesis for innovation in material production technology

3 月 25 日（月）　13:50〜16:20
協　賛：学術変革領域研究（A）生体反応の集積・予知・創出を基盤としたシステム生物合成科学
世話人：勝山 陽平（東大院農），丸山 千登勢（福井県立大学）
座　長：勝山 陽平（東大院農），丸山 千登勢（福井県立大学）

13:50　はじめに ……勝山 陽平（東大院農）

13:52　2S09B6p-01　非天然化学反応を指向した微生物酵素の探索と遺伝子工学的改変 ……○加藤 俊介（阪大院工）

14:15　2S09B6p-02　キノコが生産するメレオライド類の構造多様化戦略 ……○南 篤志（北大院理）

14:38　2S09B6p-03　生物オミクス情報を利用した新規二次代謝生合成クラスの発見 …○梅村 舞子（産総研生物プロセス）

15:01　2S09B6p-04　タンパク質の構造ダイナミクスを予測可能とする物理学理論の開発
‥○新井 宗仁[1,2,3]，大岡 紘治[2]，劉 潤晶[1]，加藤 沙愛[1]，長井 駿[3]（[1]東大院総文，[2]東大教養，[3]東大院理）

15:24　2S09B6p-05　RiPPs アナログを用いた中分子創薬 ……○尾仲 宏康（学習院大理）

15:47　2S09B6p-06　Potentials of microbial synthetic biology for the production of fine and speciality chemicals
……○Eriko Takano（The University of Manchester）

16:17　終わりに ……丸山 千登勢（福井県立大学）

3月26日（火）9:30〜12:00

3S10A2a 天然物ケミカルバイオロジーと深層学習の融合による新規生物活性分子の探索と創出）
The discovery and development of novel bioactive molecules through the combination of natural products chemistry and deep learning

3月26日（火） 9:30〜12:00
共　催：学術変革領域研究（A）「天然物が織り成す化合物潜在空間が拓く生物活性分子デザイン」
世話人：上田 実（東北大院理）
座　長：塚野 千尋（京大院農），菊地 和也（阪大院工），齋藤 駿（慶大理工），上田 実（東北大院理），大上 雅史（東工大院情報）

9:30　3S10A2a-01　学術変革領域（A）「潜在空間分子設計」領域概要と研究計画 ……○菊地 和也[1,2]（[1]阪大院工，[2]阪大免フロ）
10:00　3S10A2a-02　放線菌が生産する熱ショック代謝物（HSM）のケミカルバイオロジー ……○齋藤 駿，荒井 緑（慶應義塾大院・理工）
10:30　3S10A2a-03　植物ホルモン類縁体ライブラリーを用いる天然物ケミカルバイオロジー ……○上田 実（東北大院理）
11:00　3S10A2a-04　天然物ケミカルバイオロジーを加速する深層学習技術基盤 ……○大上 雅史（東工大情報理工）
11:30　3S10A2a-05　アロタケタール類の単純化アナログの設計，立体異性体の系統的合成と PKC 結合活性 ……○塚野 千尋（京大院農）

3S11A3a SDGs に貢献する極限環境微生物の先端科学
Advanced Science of Extremophiles Contributing to SDGs

3月26日（火） 9:30〜12:00
協　賛：極限環境生物学会，東洋大学重点研究プログラム・バイオレジリエンス研究プロジェクト（BRRP）
世話人：伊藤 政博（東洋大生命科）
座　長：鳴海 一成（東洋大生命科），道久 則之（東洋大生命科）

9:30　3S11A3a-01　「SDGs に貢献する極限環境微生物の先端科学」シンポジウム開催にあたって ……○伊藤 政博（東洋大生命科）
9:35　3S11A3a-02　新たなフロンティア：高度好塩性古細菌が切り開く塩類集積土壌での持続可能な有用物質生産 ……○八波 利恵（東工大生命理工学院）
10:00　3S11A3a-03　南極産菌類の産業利用への挑戦 ……○辻 雅晴[1,2]（[1]旭川工高専物質化学工，[2]国立極地研究所）
10:30　3S11A3a-04　放射線抵抗性細菌由来 DNA 修復促進タンパク質の耐熱化 ……○久保 彩，鳴海 一成（東洋大BRRP）
11:00　3S11A3a-05　海洋から単離した細菌のリグニン断片分解代謝の解析と応用展開 ……○大田 ゆかり（群馬大食健康センター）
11:30　3S11A3a-06　環境浄化を目指したプラスチック分解菌の単離 ……○東端 啓貴（東洋大生命科）

3S12A4a 【BBB 連携シンポジウム】若手研究者の挑戦：環境とバイオテクノロジーから紡ぐ農芸化学の未来
The Challenges of Cross-disciplinary Young Researchers：Shaping the Future of Agricultural Chemistry through JST ACT-X “Environments and Biotechnology”.

3月26日（火） 9:30〜12:00
共　催：JST ACT-X「環境とバイオテクノロジー」領域
後　援：東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構（CRIIM）
世話人：髙田 啓（京産大・生命，ルンド大学・実験医科），岩間 亮（東大院・農生科・応生工，東大・微生物連携）
座　長：髙田 啓（京産大・生命，ルンド大学・実験医科）

9:30　「若手研究者の挑戦：環境とバイオテクノロジーから紡ぐ農芸化学の未来」シンポジウム開催にあたって ……野村 暢彦（ACT-X「環境とバイオテクノロジー」領域研究総括／筑波大学）
9:40　3S12A4a-01　微生物を対象とした翻訳研究の魅力と将来展望 ……○髙田 啓[1,2]（[1]京産大・生命，[2]ルンド大学・実験医科）
10:00　3S12A4a-02　先端ラマン・赤外分光技術で拓く１分子から微生物までの化学分析 ……○加藤 遼[1,2]（[1]徳島大ポストLED，[2]理化学研究所）
10:20　3S12A4a-03　有機化学研究室で生物を扱う ……○宇佐見 享嗣（名大高等研）
10:40　3S12A4a-04　野生イネ遺伝資源を用いた穂形態の多様性創出機構の解明に向けて ……○縣 歩美[1,2]（[1]名大院生命農学，[2]国立遺伝学研究所）
11:00　3S12A4a-05　マイクロ・ナノすきま構造を用いた長鎖 DNA の高速分析 ……○東 直輝（名大院工）
11:20　3S12A4a-06　真核微生物の生体膜機能を探る ……○岩間 亮[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携）
11:40　総合討論 ……髙田 啓（京産大・生命，ルンド大学・実験医科）

3S13B6a　医農がつくる栄養素動態学
Pioneering Nutrient Dynamics through the Convergence of Agriculture and Medicine

3 月 26 日（火） 9:30～12:00
協　賛：国際アミノ酸科学協会
世話人：永森 收志（慈恵医大），小林 彰子（東大院農），WIRIYASERMKUL Pattama（岩手大農）
座　長：永森 收志（慈恵医大），小林 彰子（東大院農）

9:30　3S13B6a-01　栄養素動態学概論 ……○永森 收志（慈恵医大）
9:32　3S13B6a-02　**A multi-hierarchical approach explores non-canonical transport systems for nutrients**
……○Pattama WIRIYASERMKUL[1,2,3]，Shushi NAGAMORI[1,2]
（[1]Cent. of SI Med, Res., Jikei Univ., [2]Dept. of Lab. Med., Jikei Univ., [3]Fac. of Agric., Iwate Univ.）
9:55　3S13B6a-03　消化管における胆汁酸吸収実態 ……○小林 彰子（東大院農）
10:18　3S13B6a-04　トランスポータータンパク質によるステロールとビタミンの恒常性維持 …○松尾 道憲（京女大家政）
10:41　3S13B6a-05　膜輸送体によるビタミン C・尿酸の体内動態制御
……○豊田 優[1,2]，宮田 大資[2]，窪田 優[2]，松尾 洋孝[1]，高田 龍平[2]
（[1]防衛医大分子生体制御学講座，[2]東大病院薬剤部）
11:05　3S13B6a-06　リアルワールドデータから見たビタミン D 研究の課題と将来性 ……○越智 小枝（慈恵医大）
11:30　3S13B6a-07　食と栄養がもつ治療上乗せ効果の可能性ー新たな異分野融合治療戦略の開拓
……○反町 典子（東大医科研）

3 月 26 日（火）13:50～16:20

3S14A2p　【BBB 連携シンポジウム】食品機能学の 40 年と想定もしていなかった最前線の知見
Forty Years of Functional Food Science and Unexpected Cutting-edge Knowledges

3 月 26 日（火） 13:50～16:20
共　催：日本フードファクター学会
世話人：村上 明（兵庫県立大環境人間），立花 宏文（九大院農）
座　長：村上 明（兵庫県立大環境人間），立花 宏文（九大院農）

13:50　3S14A2p-01　日本の食品機能学における研究成果を振り返り，未来を見つめる ……○村上 明（兵庫県大環境人間）
14:05　3S14A2p-02　授乳期のフラボノイド摂取が乳児の生体機能に与える影響
……○石坂 朱里[1]，藤原 なお[1]，向井 理恵[2]，西川 美宇[3]，生城 真一[3]，村上 明[1]
（[1]兵庫県大・環境人間，[2]徳島大・生物資源，[3]富山県大・工）
14:35　3S14A2p-03　食品機能実行因子としての miRNA ……○熊添 基文，立花 宏文（九大院農院 生機科）
15:05　3S14A2p-04　食用植物のナノ粒子の機能性評価 ……○山崎 正夫[1]，山崎 有美[2]，大島 達也[3]
（[1]宮崎大学農学部，[2]宮崎大学地域資源創成学部，[3]宮崎大学工学部）
15:35　3S14A2p-05　質量分析イメージング法による生体分子の可視化－基礎研究から商品開発まで－
……○財満 信宏[1,2]（[1]近大農，[2]アグリ技研）
16:05　3S14A2p-06　食品機能研究の今後の展望 ……○立花 宏文（九大院農）

3S15A3p　CO_2 固定能を有する微生物とそのデータの利活用によるカーボンニュートラルへの貢献とバイオものづくり産業の活性化に向けて
Acceleration of biomanufacturing by utilizing CO_2-fixing microorganisms and related data.

3 月 26 日（火） 13:50～16:20
後　援：一般財団法人バイオインダストリー協会（JBA） グリーンバイオ イノベーション フォーラム（GIF），
国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）
世話人：石井 正治（東大院農），加藤 愼一郎（NITE）
座　長：石井 正治（東大院農），加藤 愼一郎（NITE）

13:50　3S15A3p-01　はじめに：プロジェクトの概要について ……○石井 正治（東大院農）
13:55　3S15A3p-02　水素酸化細菌の生態と分離について ……○西原 宏史（茨城大農）
14:20　3S15A3p-03　微生物による CO_2 固定システムの多様性 ……○布浦 拓郎（海洋研究開発機構）
14:50　3S15A3p-04　微生物ビッグデータ・AI 技術を統合した酵素探索技術 ……○細川 正人（bitBiome(株)）
15:15　3S15A3p-05　MAG（metagenome assembled genome）解析について ……○森 宙史（遺伝研・情報系）
15:40　3S15A3p-06　CO_2 固定微生物に関する情報の集約について ……○市川 夏子（NITE-NBRC）
16:05　3S15A3p-07　最後に：CO_2 固定微生物利活用プラットフォームを介したバイオものづくり支援の取組
……○加藤 愼一郎（独立行政法人製品評価技術基盤機構）

3S16A4p　栄養感知の食理学
Nutrient sensing for dietology

3月26日（火）　13:50〜16:20
世話人：小幡 史明（理化学研究所）
座　長：小幡 史明（理化学研究所），丹羽 隆介（筑波大学）

13:50　**Introduction** ……Fumiaki Obata（RIKEN BDR）

13:53　3S16A4p-01　**Arrest of blood intake and subsequent amino acid dynamics in *Aedes aegypti***
……○Chisako Sakuma[1,] Yusuke Kato[1,2,] Hirotaka Kanuka[3,4,] Fumiaki Obata[1,2]
（[1]RIKEN BDR，[2]Grad. Sch. Biostudies，Kyoto Univ.，[3]Dept. Trop. Med.，Jikei Univ. Sch. Med.，[4]Ctr. Med. Entomol.，Jikei Univ. Sch. Med.）

14:17　3S16A4p-02　**The role of conditional trade-offs in lifespan determination in Drosophila melanogaster**
……○Piper Matthew, Mirth Christen（Monash University）

14:41　3S16A4p-03　**Gut and pancreatic hormones released after a meal regulate glucose metabolism via the vagal afferents – brain axis.** ……○Yusaku Iwasaki（Kyoto Pref. Univ.）

15:05　3S16A4p-04　**Regulatory mechanism of feeding behavior adapted to growth environment in crickets**
……○Hitomi Seike，Shinji Nagata（The Univ. of Tokyo）

15:29　3S16A4p-05　**Neural vitamin B1 sensing regulates food intake and preference**
……○Ken-ichiro NAKAJIMA[1,2,3]（[1]Nagoya Univ.，[2]NIPS，[3]JST-PRESTO）

15:53　3S16A4p-06　**Unraveling the neuroendocrine mechanisms of calcium homeostasis in "bone-less" insects**
……○Naoki Okamoto[1,] Yosuke Mizuno[2,] Ryusuke Niwa[1]
（[1]TARA, Univ. of Tsukuba，[2]Grad. Sch. Sci. Tech., Univ. of Tsukuba）

16:17　**Conclusion** ……Ryusuke Niwa（Univ of Tsukuba）

3S17B6p　酵母が先導する寿命研究
Cutting edge of yeast lifespan research

3月26日（火）　13:50〜16:20
世話人：水沼 正樹（広島大院統合生命科学），饗場 浩文（名大院創薬）
座　長：水沼 正樹（広島大院統合生命科学），饗場 浩文（名大院創薬）

13:50　はじめに ……水沼 正樹（広島大院統合生命）

13:53　3S17B6p-01　分裂酵母に学ぶ経時寿命の制御機構 ……○饗場 浩文（名大院創薬）

14:17　3S17B6p-02　分裂酵母の一生を見る ……○中岡 秀憲（京大院生命）

14:41　3S17B6p-03　清酒酵母の液胞酸性化から見る高発酵性とストレス耐性
……○中瀬 舞，浅井 拓也，明石 貴裕（白鶴酒造株式会社）

15:05　3S17B6p-04　ビール酵母の細胞死と寿命 ……○善本 裕之（キリンHD飲料未来研）

15:29　3S17B6p-05　酵母から哺乳類まで寿命を延ばす細菌 ……○伊藤 孝，吉田 稔（理研CSRS・ケミカルゲノミクス）

15:53　3S17B6p-06　出芽酵母と線虫の寿命を延長するメチオニン代謝物 ……○水沼 正樹（広島大院統合生命）

16:17　おわりに ……饗場 浩文（名大院創薬）

3月27日（水）9:30〜12:00

4S18A1a　アグリケミカルバイオロジー：レジリエンスの化学と生物
AgriChemical Biology：Chemistry and Biology of Resilience

3月27日（水）　9:30〜12:00
世話人：松田 一彦[1,2]（[1]近大農，[2]近大アグリ技研），浅見 忠男（東大院農）
座　長：松田 一彦[1,2]（[1]近大農，[2]近大アグリ技研），浅見 忠男（東大院農）

9:30　4S18A1a-01　ケミカルバイオロジー的アプローチによるレジリエンスの理解
……○長田 裕之[1,2]（[1]理研環境資源セ，[2]静岡県大薬）

9:55　4S18A1a-02　フェアリー化合物とレジリエンス ……○河岸 洋和（静大農）

10:20　4S18A1a-03　昆虫の化学調節とレジリエンス ……○松田 一彦[1,2]（[1]近大農，[2]近大アグリ技研）

10:45　4S18A1a-04　ホタテガイの麻痺性貝毒代謝機構とフグのサキシトキシン，テトロドトキシン結合蛋白質
……○山下 まり[1]，沼野 聡[1]，長岡 佑真[1]，工藤 雄大[2,1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]
（[1]東北大院農，[2]東北大学際研）

11:10　4S18A1a-05　植物寄生線虫のレジリエンス ……○伊藤 晋作（東京農大バイオ）

11:35　4S18A1a-06　植物ホルモンとレジリエンス ……○浅見 忠男（東大院農）

4S19A2a　生物変換を司る代謝機能の新基軸とその応用展開
Discovery of novel metabolic functions practical for bioconversion and their application

3 月 27 日（水） 9:30〜12:00
共　催：(一財）バイオインダストリー協会 新資源生物変換研究会
世話人：成廣 隆（産総研），向山 正治（日本触媒）
座　長：成廣 隆（産総研），向山 正治（日本触媒）

9:30　はじめに ……阪井 康能（京大院農）
9:35　4S19A2a-01　藻類の代謝工学による光合成バイオ生産への挑戦
……○蓮沼 誠久[1,2]（[1]神戸大先端バイオ，[2]神戸大科技イノベ）
10:10　4S19A2a-02　太陽光と CO_2 を直接原料とする藻類を活用したバイオものづくり ……○笠原 堅（ちとせ研究所）
10:45　4S19A2a-03　希少 / 非天然カロテノイド・アポカロテノイドの生合成工学 ‥○古林 真衣子（産総研･生物プロセス）
11:20　4S19A2a-04　Bio ものづくり革命を志向した「よろづセンサ」計画 ……○梅野 太輔（早大院工）
11:55　おわりに ……座長

4S20A3a　抗生か，共生か？微生物コミュニティを制御する情報分子としての天然物
Antibiotic or Symbiotic? Natural Products as Information Molecules Regulating Microbial Communities

3 月 27 日（水） 9:30〜12:00
後　援：新学術「ポストコッホ生態」
世話人：甲斐 建次（阪公大院農），西村 慎一（広島大院統合生命）
座　長：甲斐 建次（阪公大院農），吉村 彩（北大院薬），西村 慎一（広島大院統合生命）

9:30　4S20A3a-01　真菌への寄生を確立する青枯病菌の化学コミュニケーション ……○甲斐 建次（阪公大院農）
9:55　4S20A3a-02　細菌が放出する細胞外膜小胞が生産誘導する天然物に関する研究 ……○吉村 彩（北大院薬）
10:20　4S20A3a-03　酵母のグルコース飢餓時の排他的な生存戦略
……○小田 有沙[1]，田村 美樹[1]，金子 邦彦[2]，太田 邦史[1]，畠山 哲央[3]
（[1]東大院総合文化，[2]コペンハーゲン大学 ニールスボーア研究所，[3]東京工業大学地球生命研究所）
10:45　4S20A3a-04　光を使うのか？防ぐのか？微生物型ロドプシンと細胞内色素の関係
……○吉澤 晋[1,2]（[1]東大大海研，[2]東大院新領域）
11:10　4S20A3a-05　病害抑止的な土壌微生物叢をつくり出す魔法の薬の開発に向けて
……○清水 将文[1]，西岡 友樹[2]（[1]岐阜大応生，[2]産総研）
11:35　4S20A3a-06　分裂酵母のロバストな増殖を支える共生物質の探索と機能解析 ‥‥○西村 慎一（広島大院･統合生命）

4S21A4a　ペプチドが拓く健康科学の新しい世界
A new world of health science opened up by peptide

3 月 27 日（水） 9:30〜12:00
世話人：長岡 利（岐阜大・応用生物），松井 利郎（九大院農）
座　長：長岡 利（岐阜大・応用生物），松井 利郎（九大院農）

9:30　4S21A4a-01　コレステロール代謝改善ペプチド研究の新展開 ……○長岡 利（岐阜大･応用生物）
9:55　4S21A4a-02　大豆機能性成分：β-コングリシニンおよびそのペプチドの生理効果
……○中森 俊宏（不二製油グループ本社）
10:20　4S21A4a-03　GLP-1 産生消化管内分泌細胞が認識するペプチド構造 ……○比良 徹（北大院農）
10:45　4S21A4a-04　コラーゲンペプチド Pro-Hyp は特定の幹細胞マーカー発現線維芽細胞の増殖に影響する
……○淺井 智子[1]，織田 あやね[2]，佐藤 健司[2]（[1]奈女大生，[2]京大院農）
11:10　4S21A4a-05　コラーゲンペプチドの脳神経調節作用 ……○水重 貴文（宇大農）
11:35　4S21A4a-06　脳神経細胞でのペプチド作用 ……○松井 利郎（九大院農）

4S22B6a 【BBB 連携シンポジウム】モデル生物・線虫 *C. elegans* を用いた食品 / 栄養科学の新展開
Novel developments of food and nutritional sciences using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model organism

3 月 27 日（水） 9:30〜12:00
後　援：公益社団法人 日本ビタミン学会，公益財団法人 サントリー生命科学財団
世話人：河野 強（鳥取大院連農）
座　長：松本 晋也（京女大家政）

9:30		はじめに	河野 強（鳥取大院連農）
9:35	4S22B6a-01	*C. elegans* の寿命を指標とした機能性食品の探索：健康寿命への展望	○安田 佳代（東海大健）
10:00	4S22B6a-02	乳酸菌・食品成分の機能性を線虫モデルで探る	○小村 智美（兵庫県大環境人間）
10:25	4S22B6a-03	線虫モデルにおけるメイラード反応生成香気の抗老化作用およびその分子機構解明	○横山 壱成（日大生物資源）
10:50	4S22B6a-04	線虫を用いたビタミン生理学―未知なる分子機構の解明―	○美藤 友博（鳥取大院連農）
11:15	4S22B6a-05	遺伝子組換え線虫を用いた食品中の機能性分子探索に向けて	○河野 強（鳥取大院連農）
11:40		総合討論	松本 晋也（京女大家政）

講演番号：2S01A1a-01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:30～ A1 会場

ミニマルセルを用いた細菌の高次機能の再構築

Reconstruction of bacterial complex functions in a minimal cell

○柿澤 茂行（産総研）
○Shigeyuki Kakizawa (AIST)

ミニマルセルは、必須遺伝子のみを持つよう設計・作製された「最もシンプルな細菌」である。これにより生命の「基幹システム」の理解が進展すると期待されたが、驚くべきことに、約 3 割の遺伝子は機能未知であった。そこで我々は遺伝子ノックダウン系である CRISPRi をミニマルセルへと応用し、遺伝子の機能解析を行っている。これにより「生命とは何か？」といった生命科学における根源的な問いに迫りたいと考えている。またミニマルセルに遺伝子を追加することで、細菌が持つ高次機能の再構築を試みている。これまで、ウレアプラズマが持つ「ヒト細胞への接着能と病原性」および、スピロプラズマの「細胞のらせん形状と遊泳能」の再現に成功した。ミニマルセルを用いた研究の将来展望についても論議したい。

Minimal cell is the "simplest bacterium" that was designed and engineered to have only essential genes. This achievement was expected to advance our deeper understanding of life, but surprisingly, about 30% of the minimal cell genes were functional unknown. To tackle this problem, we applied a gene-knockdown system, CRISPRi, to the minimal cell to analyze gene functions. We are also trying to reconstruct complex functions of bacteria by adding genes to the minimal cell. So far, we have succeeded in reconstructing “adhesion and virulence to human cells” by expressing several Ureaplasma genes, and "spiral cell shape and swimming motility" by expressing several Spiroplasma genes. I also would like to discuss future prospects for research using the minimal cell.

mycoplasma, synthetic biology, genome

講演番号：2S01A1a-02
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A1 会場

接合伝達機構を介した核酸輸送による微生物制御に関する研究

Microbial Control Through Nucleic Acid Transport via Bacterial Conjugation

○岸田 康平（東北大・院生命）
○Kouhei Kishida (Tohoku Univ.)

接合伝達は供与菌細胞から受容細胞に DNA が伝達する現象であり、これまでに原核細胞だけでなく、真核細胞といった幅広い生物種の細胞への DNA の伝達が示されている。また、長鎖 DNA (>1 Mb)の伝達も可能であることが確認されている。これらの特徴を踏まえ、人類は接合伝達を用いた効率的な DNA 導入法を開発し、微生物を形質転換することで微生物を制御してきた。本発表では近年登場した接合伝達効率をさらに向上させる手法や、微生物群衆内の目的菌株への形質転換技術について、演者の研究成果と将来の展望も含めて紹介したい。

Bacterial conjugation is a phenomenon where DNA is transferred from donor bacterial cells to recipient cells. This process has been demonstrated not only in prokaryotic cells but also in eukaryotic cells as recipient cell. Additionally, it has been established that the transfer of large DNA fragment (>1 Mb) is possible. Humans have developed efficient DNA introduction methods using bacterial conjugation to alter and control bacteria. In this presentation, I would like to introduce recent advancements that further enhance the efficiency of bacterial conjugation, as well as techniques for transformation in targeted strains within microbial populations, including the results of my research and future prospects.

horizontal gene transfer, bacterial conjugation, genetic tool

講演番号：2S01A1a-03
講演日時、会場：3 月 25 日 10:30～ A1 会場

The potential of cell-penetrating peptides as biomolecules carriers and its application in bacterial manipulation

○Tetsushi Mori, Daichi Toyohara, Yasuhito Yokoi, Yugo Kawabuchi, Ernest Chandra, Go Inoue, Takahiro Muraoka (Tokyo Univ. Agric. and Tech.)

Techniques such as electroporation, conjugation and transduction are commonly practiced for the delivery of biomolecules into bacteria. However, these methods face setbacks due to low transformation efficiency and particularly with their applicability with novel or hard-to-transform bacteria. To overcome these limitations, we focus on cell-penetrating peptides (CPPs), as an alternate approach. CPPs are short peptides (<40 amino acid residues) that can naturally permeate the cellular membrane posing them as ideal carriers for the delivery of biomolecules including proteins and nucleic acids into bacteria.

In our efforts, to apply CPPs as an efficient biomolecule carrier against diverse bacterial strains, we first evaluated the structure and the abiotic factors that may affect its permeation efficiency. From our evaluation, using *E. coli* and bacteria from the Enterobacteriaceae family, we found that temperature and solution tonicity played an important role in CPP permeation. Structural wise, we successfully enhanced the permeation of CPPs by altering the length of the side chains of its amino acid residues. Based on the conditions above, optimization of CPP permeation in phylogenetically distinct bacteria were also subsequently performed.

Having optimized the permeation efficiency of CPPs in bacteria, CPP conjugated with protein nucleic acids (CPP-PNAs), were tested within a hard-to-transform bacterium, *Paenibacillus*, and a cyanobacteria strain, *Synechocystis* sp. PCC6803. Both attempts showed that CPP-PNA regulated protein translation resulting in successful elucidation of protein function and understanding metabolic pathways *in vivo*.

In summary, we believe that CPPs can serve as a powerful and alternate approach to efficiently deliver biomolecules into diverse bacteria allowing for functional analyses to be performed within bacteria.

Cell-penetrating peptides, biomolecule carrier, bacterial manipulation

講演番号：2S01A1a-04
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A1 会場

アルコールに対する大腸菌のストレス応答とその 1 細胞解析

Microscopic observations of alcohol-induced stress response in *Escherichia coli*

○加藤 節（広島大院統合生命）
○Setsu KATO (Hiroshima Univ.)

微生物の細胞は増殖する過程で様々なストレスを受ける。細胞自身の増殖に伴う栄養飢餓も一つのストレスとなり得るし、外界からの刺激や環境に存在するある種の低分子もまた増殖を阻害する要因になり得る。私たちの研究グループはこのような様々なストレス条件下で大腸菌細胞がどのようにして死んでいくのかに興味を持って研究を行ってきた。本発表では、大腸菌細胞がアルコールの添加という強いストレスを受けた時のストレス応答について１細胞レベルで観察した最近の研究成果を紹介する。これまでアルコールの添加は細胞膜に影響をもたらし細胞死を引き起こすと考えられてきた。私たちの研究グループは、1-ブタノールの添加条件下で大腸菌細胞は細胞質内に凝集体を形成し死に至ることを 1 細胞レベルでの解析から明らかにした。また、このような凝集体を形成する細胞の一部は propidium iodide 染色で陽性とならず、これらの細胞では細胞膜はダメージを受けず正常に保持されていることが示唆された。このような細胞の死に方がアルコール添加時に一般的であるのか、それともブタノール添加時に特異的なのかに興味を持っており、現在は異なる種類のアルコールを添加した時の細胞応答についても解析を行っている。

Microbial cells are exposed to various stresses during the process of proliferation. Nutrient starvation associated with the cell's own growth can be one stress, and external stimuli and certain small molecules present in the environment can also inhibit proliferation. Our research group has been interested in how *Escherichia coli* cells die under these various stress conditions. In this presentation, I will present our recent results on the stress response observed at the single-cell level when *E. coli* cells are exposed to different types of alcohol. It has been hypothesized that the addition of alcohol disrupts cell membrane homeostasis, leading to cell death. Our single-cell observation revealed that the addition of 1-butanol induced the formation of aggregation in the cytoplasm and cell death in *E. coli* cells. We also observed from propidium iodide staining that some of the cells that formed such aggregates were PI-negative, indicating that the cell membrane homeostasis was maintained normally in these cells. We are interested in whether such cell death is general or specific to the addition of alcohol or butanol, and are currently analyzing the cellular response to the addition of different types of alcohol.

E. coli, alcohol-induced stress, single cell

講演番号：2S01A1a-05
講演日時、会場：3 月 25 日 11:30～ A1 会場

Optoenergetic cell factory の創製とその産業応用

Development and application of optoenergetic cell factory

○原 清敬（静県大院食栄環）
○Kiyotaka HARA (Univ. Shizuoka)

微生物を用いたバイオものづくりにおいて、目的の有用物質を生産する微生物を自然界より探し出し、その機能を向上させる研究開発が行われている。また一方で、ひとつの微生物の基盤的な機能を向上させ、様々な有用物質生産の共通プラットフォーム細胞を創製し、目的とする有用物質ごとにその合成経路をインストールする研究開発も近年盛んに行われている。プラットフォーム細胞の基盤的な機能のひとつとして、エネルギー供給機能が挙げられ、その向上は、様々な有用物質生産において生産性の向上につながると考えられる。そこで我々は、プラットフォーム細胞の ATP 供給力を光によって向上させることを目指している。具体的には、光エネルギーをプロトン駆動力に変換可能な膜タンパク質である微生物ロドプシンを大腸菌や酵母に導入し、光エネルギーで細胞内の ATP 供給力を高めることが可能なプラットフォーム細胞の創製を行っている。実際に、この”Optoenergetic cell factory”とも呼べるプラットフォーム細胞を用いて複数の有用物質の生産性の向上を確認している。本講演では、これらの研究開発の進捗と産業応用のポテンシャルについてお話ししたい。

In microbial fermentative production, ATP regeneration, while crucial for cellular processes, conflicts with efficient target chemical production because ATP regeneration exhausts essential carbon sources also required for target chemical biosynthesis. To wrestle with this dilemma, we harnessed the power of microbial rhodopsin with light-driven proton pumping activity to supplement with ATP, thereby facilitating the bioproduction of various chemicals. We first demonstrated a photo-driven ATP supply and redistribution of metabolic carbon flows to target chemical synthesis by installing microbial rhodopsin in some organisms. Our concept exploiting the light-driven ATP supplier rhodopsin will become an essential common device for developing efficient cell factories to produce bulk and fine chemicals, and constructing a synthetic cell with optogenetic reprogrammed metabolisms.

ATP, rhodopsin, optogentetics

講演番号：2S02A2a-01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:30～ A2 会場

昆虫の食性とステロール化合物の獲得戦略

Feeding habit in insects for sterol requirements

○永田 晋治（東大院新領域）
○Shinji Nagata (GSFS, the Univ. of Tokyo)

昆虫は進化の過程で肉食性、植食性、雑食性など種ごとに異なる食性と摂食行動様式を獲得してきた。これは、生息域の環境、宿主となる餌に依存した生存戦略の一環である。そのため、昆虫にとって餌は、栄養分だけでなく、生活域を決定づけるマーカーである。つまり、餌中の化学物質が食性を決定づけている。一方、昆虫をはじめとする節足動物はステロール化合物を生合成できない。ステロール化合物のうちコレステロールは、脱皮ホルモンの生合成のための出発材料であるため、餌などから取り込まなくては正常な成長ができない。ところが、植物にはコレステロールとは構造的に異なる植物ステロールが含まれているものの、植食性昆虫は植物ステロールをコレステロールに酵素的に代謝す能力があるため、植物を食べることができる。このように、餌中のステロール化合物の代謝能は昆虫の食性を決定づける重要な因子であると考えられてきた。本シンポジウムでは、昆虫体内でのステロール化合物の代謝戦略について、国内で採集可能な様々な昆虫種を用いた我々の研究成果をもとに紹介する。さらに、無脊椎動物におけるステロール化合物の生合成能の進化的考察について我々の最近の成果も紹介する。

Insects have acquired various feeding habits throughout evolution, such as carnivores, herbivores, and omnivores. Then, insect survival strategies rely on their habitat environments and host diets. This indicates that host diets must be not only nutrients but also a determinant for their habitats. On the other hand, arthropods including insects cannot biosynthesize sterol compounds. As cholesterol is a starting material for molting hormone biosynthesis, it must be acquired from their diets or other resources for normal healthy growth. Because plants contain phytosterols, which are structurally different from cholesterol, herbivorous insects possess the ability to enzymatically convert phytosterols into cholesterol. Together, combination of dietary sterol compounds and sterol-metabolisms is an important factor in determining insect feeding habits. In this symposium, we present our recent findings on metabolic strategies of sterol compounds in insects using various domestic insect species. We also present our recent data on the evolutional aspects of the biosynthetic potential of sterol compounds in invertebrates.

Insect, Sterol, feeding behavior

講演番号：2S02A2a-02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:55～ A2 会場

鱗翅目害虫に対するリンゴ果実の防御応答

Defense Response of Apple Fruits to Lepidopteran Insect Pests

○吉永 直子[1]、大畑 勇統[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]青森産技セ)
○Naoko Yoshinaga[1], Yuto Ohata[1], Yoichi Ishiguri[2], Naoki Mori[1] ([1]Kyoto University, [2]AITC)

天然物化学は植物二次代謝産物の多くを同定し、植物が多様な化学物質で防御していることを明らかにしてきた。単に生産・貯蔵するだけでなく、植物は病害虫の加害に対応して防御物質を合成することも明らかになり、モデル植物ではその分子基盤まで解明されつつある。しかし木本植物でさらに果実における防御応答に関しては研究例がほとんどない。リンゴの難防除害虫であるモモシンクイガは、樹から切り離した果実では問題なく生育するが、樹上の果実では死亡率が高く、生き残った幼虫も発育が遅れるという特異な現象が起きている。分析の結果、幼虫が作る穴の周りには局所的に多様な防御化合物が誘導されていることが明らかになった。この一連の現象の分子基盤を解明することは、リンゴと害虫の間で行われている化学戦争を理解する上で重要であるだけでなく、リンゴの省農薬栽培を実現する手助けになると考えられる。モモシンクイガ以外の鱗翅目昆虫に対する防御活性も比較検討し考察する。

Natural product chemistry has identified many secondary metabolites in plants, revealing that plants defend themselves with a diverse array of chemical compounds. Beyond mere production and storage, it has become evident that plants synthesize defense substances in response to damage caused by pests and diseases. The molecular basis of this process is being unraveled in model plants. However, there is scarce research on defense responses in fruits of woody plants. The peach fruit moth (*Carposina sasakii* Matsumura), a challenging pest for apples, exhibits a peculiar phenomenon: while it thrives on picked fruits, it faces high mortality and delayed development on fruits on the tree. Analysis has revealed the localized induction of diverse defense compounds around the holes created by the larvae. Understanding the molecular basis of these phenomena is not only crucial for comprehending the chemical warfare between apples and pests but also holds promise for facilitating minimal pesticide cultivation for apple fruits. Additionally, defensive activities against lepidopteran insects other than the peach fruit moth are compared and discussed.

Carposina sasakii, defense responses, lepidopteran pests

講演番号：2S02A2a-03
講演日時、会場：3 月 25 日 10:20～ A2 会場

幼若ホルモンの分子作用機構の解明と創農薬

Elucidation of the molecular mechanism underlying juvenile hormone action and insecticide development

○粥川 琢巳（農研機構（生物研））
○Takumi Kayukawa (NARO (NIAS))

完全変態昆虫は，幼虫から幼虫への脱皮を繰り返して成長し，幼虫が十分大きくなると，幼虫から蛹，成虫へと変態する．幼若ホルモン（juvenile hormone，JH）は，アラタ体と呼ばれる 0.1mm ほどの非常に小さな器官で合成され，蛹や成虫への変態を抑制して幼虫形質を維持する．JH は，昆虫に普遍的かつ特徴的なホルモンであり，昆虫の繁栄に大きく貢献した要因の１つであることから，学術的な興味は元より創農薬の有望なターゲットとして注目されている．本講演では，私達の研究グループが行ってきた標的細胞内における JH シグナル経路（JH 受容→遺伝子発現→変態抑制）について紹介すると共に，その知見に基づいた創農薬について紹介する．また，現在行っているアラタ体における JH 生合成や変態抑制に関する新たな分子制御についても紹介する．

Holometabolous insects repeatedly molt from larva to larva, and when the larva grows large enough, they metamorphose from larva to pupa to adult. Juvenile hormone (JH) is synthesized in a very small organ called the corpora allata (about 0.1 mm) and maintains larval characteristics by repressing the larval-pupal and -adult metamorphosis. JH is a universal and unique hormone in insects that contributes significantly to their prosperity; hence, it is gaining interest for both academic research and pest management applications. In this presentation, I will introduce the molecular mechanism of JH signaling pathway (JH reception→gene expression→metamorphosis inhibition), and will also introduce pesticide discovery based on these findings. In addition, we will also present our ongoing research on the novel molecular regulations of JH biosynthesis and metamorphosis inhibition.

juvenile hormone, insect development, molecular mechanism

講演番号：2S02A2a-04
講演日時、会場：3 月 25 日 10:45～ A2 会場

カロテノイドによるトビバッタの体色発現

Expression of locust body color by carotenoids

○管原 亮平 (弘前大農生)
○Ryohei SUGAHARA (Hirosaki Univ.)



トビバッタは内部環境や外部環境に応答して、多様な体色多型を示す。今回は、群生相成虫の性成熟時や、老齢群生相幼虫が高温下で示す黄化のメカニズムについて紹介したい。ある種の Takeout 遺伝子を RNAi で発現抑制すると、上述の黄化がどちらも抑制された。また、高温下や高 JH タイターにさらすと、この黄化 Takeout 遺伝子の発現レベルは上昇した。一方、黒化を誘導するコラゾニンの注射は、本遺伝子の発現を抑制した。環境色もこの発現レベルに影響する。ただし、このような反応は若齢幼虫では見られず、老齢幼虫でのみ見られた。つまり、温度および個体群密度、環境色などの外部環境と、JH およびコラゾニン、発育ステージなどの内部環境が黄化 Takeout 遺伝子の発現を制御することで、体色を変化させているようである。この遺伝子の産物を組換えタンパク質として発現させた場合、カロテノイドの一種であるルテインと結合することが明らかになった。したがって、黄化 Takeout 遺伝子とルテインの結合体が発色を引き起こすと考えられる。また、バッタはルテインの他にアスタキサンチンを含んでいる。その由来についても考察したい。

The desert and migratory locusts display a wide range of body color polymorphism in response to both internal and external stimuli. I would like to focus on the phenomenon of yellowing in gregarious adults during sexual maturity and in gregarious nymphs during late instars under high temperatures. Suppression of a specific takeout gene by RNAi inhibited yellowing in adults and nymphs. The expression level of this yellowing takeout gene called the yellow protein of the takeout family (*YPT*), increased when locust nymphs were exposed to high temperatures or high juvenile hormone (JH) titers. Conversely, the injection of corazonin (Crz), which induces darkening, suppressed *YPT* expression. The background color of the rearing environment also influences this expression level. However, this response was observed only in late instar nymphs, not in early instar nymphs. Thus, the external and the internal environment collaborate to regulate *YPT* expression and subsequently alter body color. The recombinant protein of this gene product was found to bind lutein, a type of carotenoid, suggesting that the interaction between YPT and lutein leads to yellowing. In addition to lutein, the migratory locust also contains astaxanthin, and I would like to discuss its origin.

phase polyphenism, gene expression, RNAi

講演番号：2S02A2a-05
講演日時、会場：3 月 25 日 11:10～ A2 会場

昆虫の嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞による匂いセンシング技術の開発

Development of odor-sensing technology with sensor cells expressing insect olfactory receptors

○光野 秀文[1]、祐川 侑司[1]、櫻井 健志[2]、神﨑 亮平[1] ([1]東大先端研、[2]東農大農)
○Hidefumi Mitsuno[1], Yuji Sukekawa[1], Takeshi Sakurai[2], Ryohei Kanzaki[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric.)

昆虫は時々刻々と変化する環境中の多様な化学物質（匂い物質）を検知する嗅覚を備えている。哺乳類の鼻に相当する器官として触角を備え、そこで機能する嗅覚受容体を使って、匂い物質を検知している。一方、昆虫の嗅覚受容体は、哺乳類とは異なる昆虫特有の共受容体と共発現し、匂い物質で開口するイオンチャネルを構成している。われわれは、このような昆虫の嗅覚受容体と共受容体の機能に着目して、対象の匂い物質（対象臭）を検出するセンシング技術の開発を進めてきた。まず、センシング技術の一つとして、対象臭に蛍光応答を示す“センサ細胞”の作出技術を確立した。センサ細胞は、昆虫の嗅覚受容体と共受容体を、カルシウム感受性蛍光タンパク質とともに共発現させた Sf21 細胞系統である。性フェロモンや一般臭の受容体を発現させることで、性フェロモン成分やヒト体臭成分、カビ臭成分に蛍光応答を示すセンサ細胞を作出してきた。現在では、センサ細胞をガラス基板上に固定し計測することで、現場でカビ臭成分を検知できる“匂い検出キット”や、混合臭を蛍光パターンで識別できる“匂い識別センサ”を開発してきた。本講演では、昆虫の嗅覚の概説に加えて、センサ細胞による匂い検出キットや匂い識別センサの最新の成果を紹介する。

Insects have olfactory senses that can detect a variety of odorants in their environment. Insects detect odorants using olfactory receptors (ORs) that are expressed in their antennae, which correspond to the mammalian nose. However, unlike mammals, insect ORs are co-expressed with olfactory receptor co-receptor (Orco) and form ion channels that are opened by odorants. Focusing on the functions of insect ORs and Orco, we have been developing sensing technologies to detect target odorants. Initially, as a sensing technology, we established a technique to develop "sensor cells" that exhibited fluorescent responses to the target odorants. The sensor cells are Sf21 cell line co-expressing insect ORs and Orco along with fluorescent calcium indicators. By expressing ORs for sex pheromones or general odorants, we developed sensor cells that showed fluorescent responses to sex pheromones, human body odorants, or moldy odorants. By fixing sensor cells onto a glass surface and measuring them, we also developed an "odor detection kit" that can detect moldy odorants onsite and an "odor discrimination sensor" that can identify mixed odorants via fluorescent patterns. In this talk, the latest results of odor detection kits and odor discrimination sensors using sensor cells will be presented.

olfactory receptor, insect, biosensor

講演番号：2S02A2a-06
講演日時、会場：3 月 25 日 11:35～ A2 会場

アリと共生する昆虫の多様性
Biodiversity of ant guest insects

○丸山 宗利（九大博）
○Munetoshi Maruyama (Kyushu Uviv. Mus.)

アリは身近な昆虫だが、その巣のなかにアリ以外の昆虫が一緒に生活していることは、あまり知られていない。そのような昆虫のことを「好蟻性昆虫」といい、厳密には一生の一部あるいはすべてをアリの社会に依存する昆虫のことを指す。好蟻性はさまざまな分類群の昆虫に知られており、昆虫全体で多数回独立に進化している。日本では、アリヅカコオロギ（バッタ目）やシジミチョウ（チョウ目）、アリスアブ（ハエ目）などが代表的なものとして知られている。演者はハネカクシ科甲虫の好蟻性種を主な研究対象とし、世界各地で調査を行っている。ハネカクシ科は動物界最大の分類群で、大部分は自由生活種だが、非常に多くの好蟻性種を含み、好蟻性の多様性と進化を研究するうえで恰好の材料だからである。本講演では、日本の好蟻性昆虫を概観するとともに、海外の興味深い種について、化学生態学的な考察を交えつつ紹介したい。

While ants are commonly recognized insects, it is less widely acknowledged that insects beyond the ant realm cohabit within their nests. These insects are denoted as "myrmecophilous insects," precisely signifying insects reliant on ant societies for some or all phases of their life cycles. Myrmecophily is observed across diverse taxonomic groups, having independently evolved numerous times among insects. In Japan, ant crickets (Orthoptera), lycaenid butterflies (Lepidoptera), and myrmecophilous flies (Diptera) are notable exemplars of myrmecophilous insects. My primary research emphasis centers on myrmecophilous species within the beetle family Staphylinidae, leading me to conduct surveys globally. The family Staphylinidae, constituting the largest taxon in the animal kingdom, is predominantly composed of free-living species. Nevertheless, it encompasses a substantial number of myrmecophilous species, presenting an excellent subject for exploring the diversity and evolution of these intriguing creatures. In this presentation, I will provide a comprehensive overview of Japanese anteater species and showcase captivating specimens from various regions, accompanied by chemical ecological considerations.

insects, ants, myrmecophily

講演番号：2S03A3a-01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:30～ A3 会場

ビタミン A 代謝変動により非アルコール性脂肪肝炎を抑制させる玄米の効果について

Brown rice suppresses Nonalcoholic Fatty liver Disease via affecting Vitamin A metabolism

○山本 祐司（東京農大）
○Yuji Yamamoto (Tokyo Univ. of Agriculture)

肥満とならび現在日本でも罹患率が上昇している非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）はインスリン抵抗性と深く関連し、肝がんのリスク因子であることからその予防および治療法の確立が急がれている。本研究では、玄米摂取の NAFLD への予防・改善効果について検証し、そのメカニズムの解析を行った。Zucker fatty rat を、対照食群（Cont 群；AIN-93G コーンスターチ 53%）、白米食群（WR 群；AIN-93G のコーンスターチ を白米粉に置換）、または玄米食群（BR 群；AIN-93G のコーンスターチを玄米粉に置換）に分け飼育、解析した。その結果、玄米食群では肝臓中の総脂質量減少が観察され、NAFLD 抑制効果が示された。次に、脂肪酸のβ-酸化に関わる酵素である CPT1a などの遺伝子発現量を Real-time PCR 法にて測定した結果、Cont 群と比較して BR 群ですべての因子が有意に上昇していた。これらの遺伝子はレチノイン酸により制御されることから、レチノイン酸合成量の指標とし RARβの発現量を解析したところ BR 群で Cont 群と比較して有意に上昇していることが確認された。したがって、玄米摂取によって肝臓中のレチノイン酸生合成経路が活性化することで脂肪酸β酸化関連酵素の発現量が上昇したことで NAFLD が改善・抑制したと考察した。次に、上記の実験群に加えて糠群（N 群: AIN-93G のセルロースを糠に置換）を設定し同様の実験を行った。その結果、BR 群と同様に N 群でもレチノイン酸の生合成経路の活性化を介して脂肪酸β酸化経路に関連する酵素の遺伝子群の有意な上昇が認められた。このことから、糠中に含まれる成分が NAFLD の改善・抑制に関与することが示唆された。

In this study, we examined the preventive effects of brown rice on Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and analyzed its mechanism. Obese Zucker fatty rats were given either control diet (Cont; AIN-93G), white rice diet (WR; AIN-93G cornstarch replaced with white rice flour), or brown rice diet (BR; AIN-93G cornstarch replaced with brown rice flour). We observed a significant difference of liver lipid accumulation in BR group. Next, enzymes which are involved in ß-oxidation of fatty acids, were measured, and all factors were significantly elevated in the BR group compared to the Cont group. Since these genes are elevated via retinoic acid, we analyzed the retinoic acid synthesis and found a significant elevation in the BR group compared to the Cont group. Therefore, we hypothesized that brown rice consumption improved or suppressed NAFLD by activating the retinoic acid biosynthesis pathway.

Nonalcoholic Fatty liver Disease, Retinic acid, Brown Rice

講演番号：2S03A3a-02
講演日時、会場：3 月 25 日 10:00～ A3 会場

レポーターシステムを活用した熱産生脂肪細胞活性化因子の探索と機能評価

Screening of Thermogenic Adipocyte Activating Factors Using a Reporter System and Their Functional Evaluation

○後藤 剛[1,2]、川原﨑 聡子[1]、高橋 春弥[1]、井上 和生[1,2]（[1]京大院農、[2]京大・CPIER）
○Tsuyoshi Goto[1,2], Satoko Kawarasaki[1], Haruya Takahashi[1], Kazuo Inoue[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agricul. Kyoto Univ., [2]CPIER Kyoto Univ.)

褐色脂肪組織は高い熱産生機能を有し、体温の維持に重要な組織である。褐色脂肪組織を構成する褐色脂肪細胞の高い熱産生能は主にミトコンドリア内膜上に存在する脱共役タンパク質 1 (UCP1)の機能による。また、寒冷刺激などの特定の外部刺激に応じて、白色脂肪組織内に UCP1 を高発現し高い熱産生機能を有する褐色脂肪細胞様の脂肪細胞（ベージュ脂肪細胞）が発生することも明らかにされている。褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞（熱産生脂肪細胞）の高い熱産生機能は、肥満症の予防・改善において有力な標的として期待されている。本発表では、*Ucp1* 発現量を指標としたレポーターシステムの確立およびそれらを用いた熱産生脂肪細胞活性化因子の探索結果について、発表者らの以下の知見を中心に紹介する。

1. *Ucp1* 発現量を低侵襲的に検討可能なレポーターマウスの樹立
2. *Ucp1* レポーター細胞を用いた熱産生脂肪細胞活性亢進香気成分の探索

上記に加えて、現在 *Ucp1* レポーター細胞の更なる改良も試みており、本発表ではその結果も含めて紹介したい。

The high thermogenic capacity of brown adipocytes is mainly due to the function of uncoupling protein 1 (UCP1). It has also been shown that high thermogenic brown-like adipocytes (beige adipocytes), which express high levels of UCP1, arise in white adipose tissue in response to specific external stimuli such as cold exposure. In this presentation, we will present the results of our study about the establishment of *Ucp1* reporter systems and the screening of factors that activate thermogenic adipocytes (brown and beige adipocytes) using this system, focusing on the following findings: 1) Establishment of reporter mice that can be used to examine Ucp1 expression levels in a minimally invasive manner. 2) Search for aroma compounds that enhance thermogenic adipocyte activity using Ucp1 reporter cells.

In addition to the above, we are currently attempting to further improve Ucp1 reporter cells and will include the results in this presentation.

obesity, adipocyte, reporter system

講演番号：2S03A3a-03
講演日時、会場：3 月 25 日 10:30～ A3 会場

SREBP 活性の抑制と免疫系を介した臓器線維化抑制作用

Inhibition of SREBP activity and suppression of organ fibrosis via the immune system

○煙山 紀子（東京農大）
○Noriko Kemuriyama (Tokyo Univ. Agricul.)

臓器線維化は慢性的な臓器障害において共通して認められ、その制御は生活習慣病の進展予防に直結する重要戦略と位置付けられている。

Sterol regulatory element-binding proteins（SREBPs）は脂質合成を司る転写因子であり、過剰な活性化は臓器の脂肪蓄積に関与するため、これを制御する食品成分の探索は精力的に行われている。我々は、SREBPs が脂質合成系以外の遺伝子発現制御を有する可能性について研究を進めた。HepG2 を用いて SREBP-1 をノックダウンし、RNA-Seq.解析を実施した結果、SREBPs の新規標的として免疫に関わる受容体がヒットした。この受容体の欠損マウスを用いてコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食による非アルコール性脂肪性肝炎を誘発させたところ、野生型と比較して欠損マウスでは肝の脂肪化に差はみられず、肝線維化が特異的に抑制されることが明らかとなった。

以上より、SREBPs の活性化は脂質合成系だけでなく免疫系への干渉作用を持ち合わせ、生活習慣病における臓器線維化の進展へ直接的に関与する可能性が示唆された。本講演では、上記の研究をもとに、臓器線維化と食品成分への関わりについても考えてみたい。

Organ fibrosis is commonly observed in cases of chronic organ damage. Therefore, controlling it is important for preventing the progression of lifestyle-related diseases. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) are transcription factors that regulate lipid synthesis. Because excessive activation of SREBPs is associated with fat accumulation in organs, food factors that can regulate them are being explored. This study investigated the possibility that SREBPs have gene expression regulation beyond the lipid synthesis system. Knockdown of SREBP-1 using HepG2 and RNA-Seq. analysis identified a receptor involved in immunity as a novel target of SREBPs. In the murine nonalcoholic steatohepatitis induced by the choline-deficient l-amino acid-defined diet, both wild-type and receptor-deficient (KO) mice were used. KO particularly suppressed hepatic fibrosis, but not hepatic steatosis and inflammation. These findings suggest that the activation of SREBPs may interfere with both the lipid synthesis system and the immune system, and it could directly contribute to the development of organ fibrosis in lifestyle-related diseases. In this presentation, we will discuss the relationship between organ fibrosis and dietary factors based on the aforementioned studies.

SREBP, immune system, organ fibrosis

講演番号：2S03A3a-04
講演日時、会場：3 月 25 日 11:00～ A3 会場

NAD+代謝制御酵素の発現調節を介した脂肪細胞の質的制御

Regulation of adipocytes via modulation of NAD+ biosynthesis enzyme.

○三谷 塁一 1,2 (1 信大農、2 信大院農学専攻・食品生命)
○Takakazu Mitani1,2 (1Fac. Agr., Shinshu Univ., 2Dep. Agr, Grad. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD+）は生体内の様々な酸化還元反応の補酵素として機能する。脂肪組織中の NAD+量の減少は、体脂肪量の増加や耐糖能の低下を惹起することが知られており、NAD+量が減少する原因として、慢性的な高脂肪食摂取や老化が NAD+合成経路の律速酵素である Nicotinamide phosphoribosyltransferase（NAMPT）の発現量を減少することが挙げられている。このことから NAMPT の発現制御を理解することは肥満関連疾患の予防と改善に重要であると考えられる。本研究では、NAMPT の発現制御に着目し、脂肪細胞における NAMPT の発現制御と脂質形成について解説する。また、脂質代謝の制御は食品成分と密接な関係にあることから、食品成分が NAMPT の発現制御を介して NAD+量の増加と脂質形成に及ぼす影響についても紹介する。さらに、我々はこれまでに、食品成分の機能性発現メカニズムをその標的タンパク質の同定を足がかりして明らかにしてきた。今回では、大豆イソフラボンであるゲニステインの新規標的タンパク質と NAMPT の発現制御の関係性について最新の研究結果を含めて紹介する。

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) functions as a cofactor in several redox reactions in vivo. A decrease in the amount of NAD+ in adipose tissue are known to cause an increase in body fat mass and impaired glucose tolerance, and high-fat diets and aging have been implicated as causes of reducing NAD+ levels by decreasing the expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), a rate-limiting enzyme in the NAD+ synthesis pathway. Therefore, understanding the regulation of NAMPT expression is important for the prevention and amelioration of obesity-related diseases. In this study, we focus on the regulation of NAMPT expression and describe the regulation of NAMPT expression and lipogenesis in adipocytes. Since the regulation of lipid metabolism is related to food components, we will also present the effects of increased NAD+ levels via the regulation of NAMPT expression by food components on lipogenesis and lipid metabolism. In addition, we have been elucidating the mechanisms of functional expression of food components by using the identification of their target proteins. We will show the relationship between a novel target protein of genistein, a soy isoflavone, and the regulation of NAMPT expression, including latest research results.

NAMPT, isoflavone, adipocyte

講演番号：2S03A3a-05
講演日時、会場：3 月 25 日 11:30～ A3 会場

脂質代謝改善作用をもつ食品由来成分の探索

Search for food-derived ingredients that improve lipid metabolism

○井上 順（東農大）
○Jun INOUE (Tokyo Univ. of Agric.)

我々は、食品によるメタボリックシンドロームの予防・改善を目指し、機能性を持つ食品成分の探索を行ってきた。本講演では脂質代謝関連遺伝子の発現を制御する食品成分の探索とその作用機構を中心に、我々が行ってきた食品の機能性研究について紹介させていただく。

SREBP は脂質代謝を包括的に制御する転写因子であり、その活性上昇は脂肪酸・コレステロール合成促進につながる。SREBP は II 型糖尿病を発症しているマウスの肝臓では過剰に活性化しており、その活性を抑制することで症状が改善することから、肥満や糖尿病の治療・予防の分子標的として期待されている。我々は SREBP の標的遺伝子として脂肪酸合成酵素（FAS）遺伝子を用い、SREBP 活性を抑制する小分子化合物を食品由来の単一精製標品を対象として探索を行った。その結果多くの成分の同定に成功し、さらにそれらが実際に SREBP 活性を抑制していることを明らかにした。スルフォラファン（SFaN）はブロッコリー由来の成分であり、反応性の高いイソチオシアネート基をもつ。SFaN は前駆体 SREBP タンパク質のプロテアソームを介した分解を促進することで SREBP 活性を低下させた。また、肥満モデルマウスへの投与は抗肥満作用を示した。

また、農産物やその廃棄部位に含まれる機能性成分の探索を行っており、LDL 受容体発現を上昇させる成分としてサクランボ軸に含まれるクリシン-7-グルコシドを見出し、AMPK の活性化を介して LDL 受容体発現を上昇させることを明らかにした。

本研究により遺伝子発現レベルを変化させる成分を網羅的に探索することで、食品成分の新たな機能を見出すことができた。今後、より詳細な作用機構を解明することで、抗生活習慣病効果を有する新たな機能性食品開発への応用が期待される。

Using the fatty acid synthase (FAS) gene promoter as an evaluation system, we searched for food components that inhibit SREBP activity and succeeded in identifying several components. Sulforaphane (SFaN) is an isothiocyanate derived from broccoli. SFaN decreased SREBP activity by promoting proteasome-mediated degradation of the precursor SREBP protein. In addition, administration of SFaN to obese mouse models showed anti-obesity effects. We also found chrysin-7-glucoside in cherry peduncles as a component that increases LDL receptor expression via activation of AMPK. By comprehensively searching for components that alter gene expression levels through this study, we were able to discover new functions of food components.

Lipid metabolism, SREBP, Sulforaphane

講演番号：2S04A4a-01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:35～ A4 会場

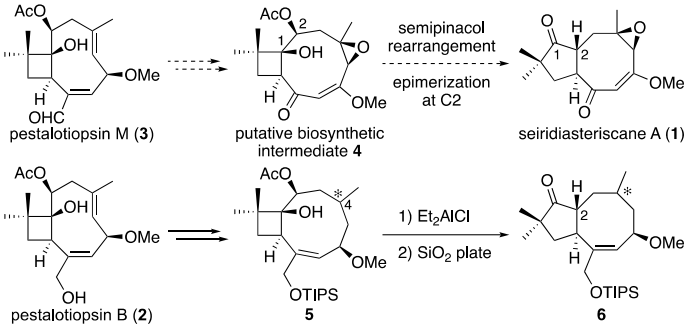
天然物の成り立ちをひもとく有機合成化学

Seeking clues to elucidate the biosynthetic mechanism through organic synthesis

○榎本 賢（東北大院農）
○Masaru Enomoto (Tohoku Univ.)

天然物化学研究における有機合成化学の役割の一つとして，詳細な生物活性試験への標品供給や提唱構造の確認などとともに，生合成経路の妥当性の検証という点が含まれる。

Seiridiasteriscane A (**1**) は橋本らによりサンシュユ由来の糸状菌の培養液から単離・構造決定されたセスキテルペノイドである [1]。同じ培養液から **1** とともに pestalotiopsin B (**2**)や M (**3**)が単離されたこと，また 2-*epi*-**1** が精製過程において確認されたことから，**4** がセミピナコール転位を起こし，生じたケトン（即ち 2-*epi*-**1**）の C2 位がエピマー化することによって **1** が生合成されると提唱されていた。演者らは **2** からモデル化合物 **5** を調製し，Et_2AlCl で処理するとセミピナコール転位が収率よく進行すること，および生じたケトンを SiO_2 プレートに吸着させて 48 時間室温にて処理することで C2 位のエピマー化が進行することを見出した [2]。



本講演ではこの他に，我々のグループによる生合成を模倣した天然物合成についても紹介したい。

Seiridiasteriscane A (**1**) is a novel sesquiterpenoid isolated from the culture broth of a filamentous fungus by Hashimoto and coworkers.[1] Since several caryophyllenes, such as pestalotiopsins B (**2**) and M (**3**), were co-isolated with **1**, the biosynthetic pathway of **1** was deduced to involve a semipinacol-type rearrangement of putative biosynthetic intermediate **4**, which could potentially be derived from **3**, followed by epimerization at the C2 position of the resulting ketone (*i.e.* 2-*epi*-**1**). In support of this proposal, Hashimoto and coworkers indicated the presence of 2-*epi*-**1** in a crude sample of **1** although its isolation in a pure state was unsuccessful. To gain further supportive evidence for the proposed biosynthetic pathway, acetate **5** was designed as a model substrate and prepared from **2** by a four-step sequence. Upon exposure to Et_2AlCl, each epimer of **5** underwent a smooth semipinacol rearrangement to afford the corresponding 5,8-bicyclic ketone (*i.e.* 2-*epi*-**6**). In addition, the partial epimerization of the resulting *cis*-fused ketone to **6** was induced by prolonged adsorption onto a silica gel plate.[2]

A bioinspired synthesis of natural product in our group will also be presented in this symposium.

References: 1) M. Hashimoto *et al. Tetrahedron* **2020**, *76*, 131197; 2) M. Enomoto *et al. Biosci, Biotechnol. Biochem.* **2021**, *85*, 1621.

Natural Products, Organic Synthesis, Biomimetic Synthesis

講演番号：2S04A4a-02
講演日時、会場：3 月 25 日 10:03～ A4 会場

テルペノイド研究の加速を目指した有機合成化学研究

Synthetic organic chemistry research accelerating terpenoid investigations

○中山 淳（阪公大院理）
○Atsushi NAKAYAMA (Osaka Metropolitan Univ.)

自然界に普遍的に存在するテルペノイドは C5 単位のイソプレンユニットが連結して直鎖状炭素鎖を形成したのちに、環化酵素による骨格構築や、酸化酵素等に修飾を施され、生合成されている。その結果、8 万種類を超える多様性を持つ一群を形成している。天延テルペノイドには、顕著な生物活性や、有用な物性も示すものも数多く含まれており、その有用性や科学的重要性から、現在まで様々な研究が展開されている。有機合成はテルペノイドの科学研究を行う上で強力なツールとして利用されている。我々は、化学合成による天然及び擬天然テルペノイドの供給だけでなく、関連する生命科学研究の一助となる化合物全合成や反応開発を行っている。その中から、新たなテルペノイド生合成中間体の全合成、生合成研究に利用可能な基質合成や反応開発、そして、生体触媒を利用したテルペノイド合成法に関する最近の成果を発表する。

Terpenoid is a universally diverse group in nature. The structural diversity attributed to the condensation of the C5 isoprene unit to give a straight carbon chain and subsequent sequential enzymatic cyclization, cationic rearrangement, and modification by the oxidative enzyme such as P450 give a wide variety of compounds exceeding 80,000 molecules. Extensive scientific research has been conducted because of their beneficial biological activities and properties for humans (and their scientific importance). In the research, synthetic organic chemistry has played an important role and has been used as a powerful tool for life science. We engage in the chemical synthesis of natural and pseudo-natural terpenoids, supplying the ingredients for biosynthesis and developing useful organic reactions. In this symposium, we introduce our recent efforts for the total synthesis of a novel key intermediate for the biosynthesis of terpenoids, reaction development for supplying deuterium substrate, and chemo-enzymatic synthesis toward terpenoids.

total synthesis, terpenoid, enzyme

講演番号：2S04A4a-03
講演日時、会場：3 月 25 日 10:31～ A4 会場

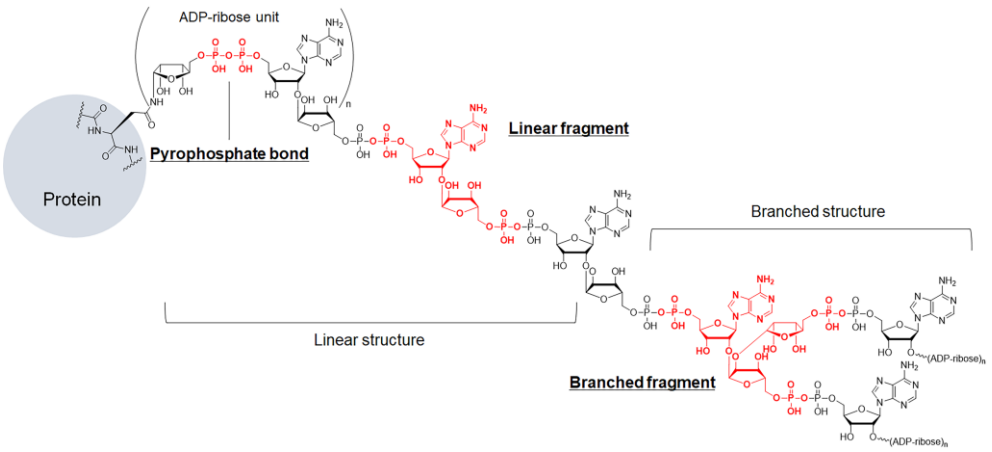
ADP-リボース鎖分子の自在化学合成のための効率合成法の開発

Development of efficient methods for tailored chemical synthesis of ADP-ribose chain molecules

○田中 秀則（岐阜大 iGCORE）
○Hide-Nori Tanaka (iGCORE, Gifu Univ.)

ポリ ADP-リボシル化は、DNA 損傷修復、転写制御、細胞死などの幅広い生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たす翻訳後修飾である。本翻訳後修飾によって生じる ADP-リボース鎖は、ADP-リボース同士が 1,2-*cis* グリコシド結合を介して繋がった生体高分子であり、20 から 50 ユニット毎に分岐構造を有する。分子レベルでの ADP-リボース鎖機能の解明が望まれているが、構造不均一のため、天然から構造均一な研究試料を供給することができない。そこで本研究では、ADP-リボース鎖分子の自在化学合成の基盤となる、①ADP リボース鎖の直鎖型および分岐型フラグメントの効率合成法の開発、②それらフラグメント間を繋ぐピロリン酸結合の効率形成法の開発に取り組んだ。本シンポジウムで詳細を報告する。

Poly(ADP-ribosylation) is a post-translational modification (PTM) that plays an important role in a wide range of biological processes including DNA damage repair, transcriptional regulation, and apoptosis. The ADP-ribose chain produced by this PTM is a biopolymer elongated through 1,2-*cis* glycosidic bond between ADP-riboses, possessing a branched structure every 20–50 units. Molecular-level elucidation of the chain functions has been strongly desired. However, obtaining structurally well-defined samples is limited by its heterogeneity. For tailored chemical synthesis of ADP-ribose chain molecules, we herein report development of the following efficient methods; 1) synthesis of both liner and branched fragments of the ADP-ribose chain; 2) pyrophosphate formation for fragment coupling.



ADP-ribose chain, Glycosylation, Pyrophosphate formation

講演番号：2S04A4a-04
講演日時、会場：3 月 25 日 10:59～ A4 会場

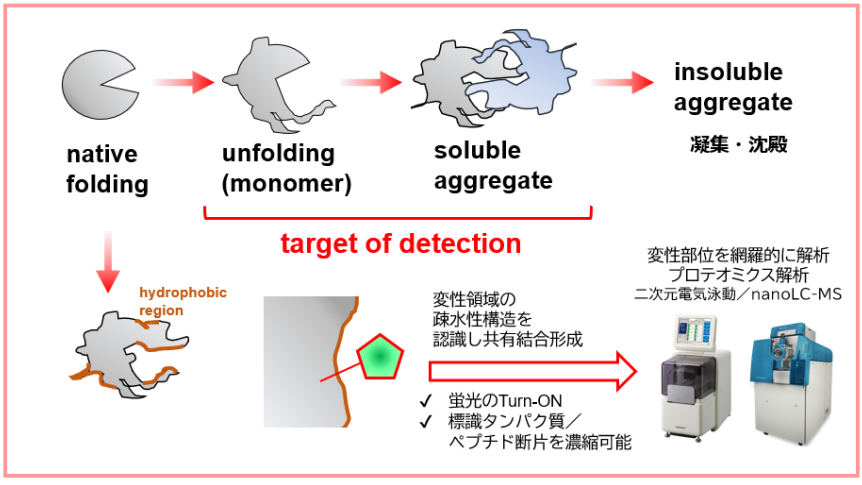
生物活性分子の標的同定を指向したタンパク質熱変性の可視化プローブ開発

Visualizing Protein Thermal Denaturation for Target Identification of Bioactive Molecules

○佐藤 伸一（東北大学際研）
○Shinichi Sato (FRIS, Tohoku Univ.)

タンパク質変性の検出には、これまで、タンパク質の変性領域に結合し、蛍光の輝度が向上する低分子プローブとして、SYPRO® Orange や PROTEOSTAT®といった試薬が開発されている。今回、演者は、共有結合によって、変性部位と不可逆的な結合を形成する化学プローブを開発した。反応前は無蛍光性の分子であり、変性タンパク質と共有結合を形成したときにのみ、蛍光を発するという特徴を有している。また、プローブは共有結合で不可逆的に変性部位と結合するため、トリプシンなどの酵素消化後もペプチド断片に結合した状態で質量分析により解析され、どのタンパク質のどの部位でどの程度変性が起きていたかを解析することが可能であり、部位レベルでのタンパク質変性の解析を可能にする。
一方、生物活性分子（＝リガンド）の添加によって結合タンパク質の熱変性に対する抵抗性が変化することが知られており、リガンド結合タンパク質の同定技術への応用が注目されている。そこで本技術を熱変性の初期過程を捉える手法として応用した。本講演では、プローブ性能の詳細と、リガンド結合タンパク質の熱変性抵抗性変化を観測した事例について紹介したい。

This study introduces a novel chemical probe designed for detecting protein denaturation. This probe forms covalent bonds with denatured protein regions, becoming fluorescent only upon covalent bonding. The advantage lies in the irreversible binding of the probe, allowing mass spectrometry analysis even after enzymatic digestion, enabling site-level analysis of protein denaturation. The technology was also applied to monitor the initial stages of thermal denaturation in ligand-bound proteins, presenting a promising method for target identification of bioactive molecules.



protein denaturation, chemical probe, target identification

講演番号：2S04A4a-05
講演日時、会場：3 月 25 日 11:27～ A4 会場

凝集体形成を利用した Activatable 型ラマンプローブによる酵素活性イメージング

Activatable Raman probes utilizing enzyme-induced aggregate formation for selective ex vivo imaging

○神谷 真子（東工大生命理工）
○MAKO KAMIYA (Dep. of Life Sci. Tech., Tokyo Tech)

Detecting multiple enzyme activities simultaneously with high spatial specificity is a promising strategy to investigate complex biological phenomena, and Raman imaging would be an excellent tool for this purpose due to its high multiplexing capabilities. We previously developed activatable Raman probes based on 9CN-pyronins [1], but specific visualization of cells with target enzyme activities proved difficult due to leakage of the hydrolysis products from the target cells after activation. Here, focusing on rhodol bearing a nitrile group at position of 9 (9CN-rhodol), we established a novel mechanism for Raman signal activation based on a combination of aggregate formation (to increase local dye concentration) and the resonant Raman effect along with the bathochromic shift of the absorption, and utilized it to develop Raman probes. We selected the 9CN-rhodol derivative 9CN-JCR as offering a suitable combination of increased SRS signal intensity and high aggregate-forming ability, resulting in good retention in target cells after probe activation. By using isotope-edited 9CN-JCR-based probes, we could simultaneously detect β-galactosidase, γ-glutamyl transpeptidase and dipeptidyl peptidase-4 activities in live cultured cells, and distinguish cell regions expressing target enzyme activity in Drosophila wing disc and fat body ex vivo [2].

[1] *J. Am. Chem. Soc.* 142, 20701–20707 (2020); [2] *J. Am. Chem. Soc.* 145, 16, 8871–8881 (2023).

Raman imaging, Enzyme activities

講演番号：2S05B6a-01
講演日時、会場：3 月 25 日 09:30～ B6 会場

農芸化学と生物鉱学の融合

Fusion of BIOre with agrochemistry

○若井 暁（海洋研・超先鋭）
○Satoshi Wakai (JAMSTEC)

大規模な金属鉱床が存在する深海海底下にも著量の微生物が生息している。これまで、金属鉱床の成因は無機化学的・非生物的に説明できるとされてきたが、鉱床の初期生成プロセスに微生物反応が寄与していることが近年明らかにされている。我々は、単純なバイオミネラリゼーションとしての鉱物核形成に留まらず、その後の鉱物の溶解・沈殿反応にも微生物機能が寄与していると考えており、この思想に基づいて『生物鉱学』という新しい学問分野を創成した。他方、金属鉱床の成因に対する微生物機能の理解には異分野融合型のアプローチが欠かせない。日本農芸化学会は、多様性に富んだ学際的な学会であり、基礎研究から応用研究まで様々な立ち位置で研究している研究者（学生含む）が参画している。本学会では、以前から金属汚染環境の浄化や鉱石からの有用金属回収に微生物機能を利用する研究発表等がなされており、学際的分野を取り扱う学会母体として重要な位置付けにあると考えている。私は、『生物鉱学』の醸成のためには、深海を物理的かつ哲学的に掘り起こして耕す必要があると考えている。本発表では、新たな異分野融合の種を巻くことを目指し、生物鉱学の概念について紹介する。

Significant amounts of microorganisms also inhabit the deep-sea seafloor where large metal deposits exist. Although it has been believed that the formation of metal deposits can be explained inorganically and non-biologically, it has recently become clear that microbial reactions contribute to the initial formation process of deposits. Our contention posits that microbial functionalities contribute not merely to mineral nucleation in the context of simplistic biomineralization but extend to subsequent mineral dissolution and precipitation reactions, culminating in the establishment of a nascent field termed 'BIOre.' However, a comprehensive understanding of microbial contributions to metal deposit formation mandates an interdisciplinary methodology. The Japanese Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (JSBBA) stands as an exceedingly diverse and interdisciplinary consortium, with researchers engaged in investigations spanning diverse perspectives, from fundamental research to applied endeavors. Our challenge constitutes a veritable physical and philosophical exploration and cultivation of the abyssal realms, seeking to comprehend the enigmatic occurrences beneath the inscrutable depths of the sea floor. This presentation will introduce the concept of 'BIOre' with the aim of seeding a new fusion of different disciplines.

microbiome, ore, biominelarization

講演番号：2S05B6a-02
講演日時、会場：3 月 25 日 09:45～ B6 会場

海底熱水鉱床の初期生成プロセスにおける微生物活動の重要性

Microbial sulfate reduction plays an important role at the initial stage of subseafloor sulfide mineralization

○野崎 達生[1,2,3,4] ([1]海洋機構資源、[2]東大院工、[3]神大院理、[4]オタワ大院理)
○Tatsuo Nozaki[1,2,3,4] ([1]JAMSTEC, [2]Univ. of Tokyo, [3]Kobe Univ., [4]Univ. of Ottawa)

1977 年のガラパゴス海嶺における海底熱水噴出孔の発見以来，世界で 700 を超える海底熱水サイトが報告されている．日本近海では 1986 年の伊平屋小海嶺東方なつしま 84-1 海丘における低温熱水湧水域の発見を端緒に，沖縄トラフおよび伊豆・小笠原海域から 30 を超える熱水サイトが発見されている．海底熱水鉱床と聞くと 300 度を超える高温の熱水が噴出するイメージから，生物の生息限界温度（122 度）より高温の無機化学的・熱力学的反応が支配する無生物の世界を想像する．したがって鉱床学者も含め，海底熱水鉱床生成における微生物活動の寄与はマイナーであるというのが通説である．しかし，中部沖縄トラフの掘削コアおよびチムニー中の黄鉄鉱粒子の局所硫黄同位体比組成($\delta^{34}S$) を二次イオン質量分析装置（SIMS）で分析した結果, 鉱床中の黄鉄鉱組織は鉱化作用に伴って『フランボイダル⇒コロフォーム⇒自形』に変化し，フランボイダル黄鉄鉱のみ-31.5‰の極めて低い$\delta^{34}S$ を示した．このような低い$\delta^{34}S$ は微生物硫酸還元プロセスでしか作り出せず，フランボイダル黄鉄鉱は黄銅鉱や閃亜鉛鉱などの他の硫化鉱物にしばしば置換されているため，海底下における初期鉱化作用に微生物活動が大きく寄与しており，鉱床の生成を誘発・加速させていることが明らかとなった．過去の海底熱水鉱床である黒鉱鉱床からも同様の結果が得られているので，本発表で紹介する．

From the first discovery of the seafloor massive sulfide (SMS) deposit at Galapagos Ridge in 1977, more than 700 SMS deposits have been reported from all over the world. Due to vivid images of vigorous hydrothermal discharge higher than 300℃ (122℃ is the highest record of the microbial habitats), we tend to consider that the seafloor sulfide mineralization processes are mainly controlled by abiotic and thermochemical processes and contribution of the microbial activity is minor. However, based on the results of *in-situ* sulfur isotope ($\delta^{34}S$) analysis using SIMS on pyrite (FeS_2) grains in the drill core and chimney samples of Okinawa Trough, pyrite grains texturally changed from framboidal to colloform to euhedral, and only framboidal pyrite has extremely low $\delta^{34}S$ down to -31.5‰. Such a low $\delta^{34}S$ can be produced only by microbial sulfate reduction and framboidal pyrite was often replaced by other sulfide minerals such as chalcopyrite ($CuFeS_2$) and sphalerite ((Zn,Fe)S). Thus, microbial activity induced and accelerated the initial stage of subseafloor sulfide mineralization. In this presentation, we also introduce our recent $\delta^{34}S$ data obtained from the Kuroko-type VMS deposit on land (i.e., ancient SMS deposit).

seafloor hydrothermal deposit, sulfur isotope, microbial sulfate reduction

講演番号：2S05B6a-03
講演日時、会場：3 月 25 日 10:18～ B6 会場

深海バイオリソースを統合した生物鉱学カルチャーコレクション構想

Deep-sea bioresources and BIOre Culture Collection

○澄田 智美 (海洋研究開発機構)
○Tomomi Sumida (JAMSTEC)

「生物鉱学の創成」B 班では、『微生物による鉱物の溶解・沈殿プロセス』を解明するために、海底熱水鉱床の形成プロセスに関わる硫黄代謝微生物種の同定及び各種微生物の硫黄酸化還元能力の定量的リスト化に取り組んでいる。その中で、発表者は生物鉱学カルチャーコレクション整備に関与している。発表者が所属する海洋研究開発機構（JAMSTEC）では、研究船や探査機を用いて様々な海域・深度からサンプルを採取し研究を行っているが、その研究過程で得られた深海由来試料は様々な研究分野に対しても非常に重要なバイオリソースとなり得る。そこで JAMSTEC では深海微生物の産業利用への促進を目指して、深海バイオリソース（深海堆積物及び単離された深海微生物)の整備と外部機関への提供に取り組んでいる。この深海バイオリソースにおいて、本研究領域の研究過程で得られた新規微生物群に関しては、微生物コレクションの一部として管理されるだけではなく、微生物の持つ機能情報も付随した生物鉱学カルチャーコレクションとして整備することにより、従来の深海バイオリソースから拡張したバイオ資源データベースとしての構築を目指している。本発表では、これら深海バイオリソース整備の取り組みに関して紹介する。

Group B of "Creation of the BIOre (Biology+Ore)-concept" is working on the “Quantitative analysis of mineral dissolution and precipitation processes by sulfur metabolism of microorganisms” involved in the formation process of hydrothermal deposit. Among them, this presentation will introduce the concept of a BIOre Culture Collection. Deep-sea microorganisms are precious biological resources that have developed unique survival strategies different from terrestrial microorganisms and are considered a source of various innovations. JAMSTEC provides its deep-sea bioresources (deep-sea sediments and deep-sea microorganisms) to private companies and academic institutions in Japan to support the creation of new businesses through Open Innovation. In this Group B, new microorganisms obtained in this research are not only managed as part of the microorganism collection, but also maintained as the BIOre culture collection that includes information on the functions of the microorganisms, and aim to expand the deep-sea bioresource.

deep-sea bioresource, microorganism, culture collection

講演番号：2S05B6a-04
講演日時、会場：3 月 25 日 10:51～ B6 会場

海洋環境における微生物―鉱物反応およびガルバニック腐食反応の速度論的考察

Kinetic investigation of mineral - microbe and galvanic interactions in marine environment

○淵田 茂司（東京海洋大）
○Shigeshi Fuchida (TUMSAT)

水環境や土壌環境には様々な微生物が生息しており，それらを介した化学反応は周辺の物質移動に大きく寄与する。これまで様々な環境に生息する鉄やマンガン，硫黄などの無機元素を代謝に用いる多種の微生物が見つかっており，それぞれ酸化還元反応を介した鉱物の生成(バイオミネラリゼーション)，溶解(バイオリーチング)，腐食(バイオコロージョン)を誘発することが知られている。これらの反応は，微生物が関与しない無生物系と比べて，その反応速度は著しく大きくなり，生成する固体沈殿物の化学組成や結晶構造が大きく変化する。現在取り組んでいる学術変革領域研究 B「生物鉱学の創成(BIOre)」では，特に海洋に生息する微生物に着目し，微生物－鉱物間で生じる化学反応機構を解明するために反応速度論による解析を行っている。本発表では，室内実験や地球化学モデリングで得られたこれまでの成果を紹介するとともに，実際の海底熱水鉱石中で生じるガルバニック腐食反応についても触れる。

Various microbes live in water and soil environments and contribute to various chemical reaction. Previous researchers have isolated many kinds of iron, manganese, and sulfur bacteria from various environments and found that it causes biomineralization, bioleaching, and biocorrosion reactions. These microbes increase the reaction rate and forms different chemical and morphological compounds from inorganic products. We focus on the mineral–microbe interactions in marine environments and address to clear the reaction mechanisms by kinetic investigation. In this presentation, I introduce results related to these topics obtained by laboratory experiments and geochemical modeling and also galvanic reactions caused between different sulfide mineral couplings in natural hydrothermal ore.

Geochemical kinetic modeling, biomineralization, galvanic interaction

講演番号：2S05B6a-05
講演日時、会場：3 月 25 日 11:24～ B6 会場

金属資源開発における陸上・海洋微生物の可能性と展望

Potential and future prospects of terrestrial/marine microorganisms in metal mineral processing

○小山 恵史[1]、淵田 茂司[2]、牧田 寛子[2]、所 千晴[1,3] ([1]早稲田大、[2]東京海洋大、[3]東大)
○Keishi OYAMA[1], Shigeshi FUCHIDA[2], Noriko MAKITA[2], Chiharu TOKORO[1,3] ([1]Waseda Univ., [2]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology, [3]The Univ. of Tokyo)

微生物は医療や食品等様々な分野において利用されているが、これは金属資源開発においても例外ではない。採掘された金属鉱物に土着する鉄・硫黄代謝バクテリアを活性化させることで金属鉱物の溶解を促すバイオリーチング等の技術は太古の時代から利用されているものの、系統的に理解され始めたのはここ 100 年の話であり、最近も注目を集め続けている。また、資源開発に伴って排出される鉱山廃水の処理にも微生物の代謝活動が利用され、パッシブトリートメントと呼ばれる自然回帰型坑廃水浄化システム等のプロセス中において微生物による鉱物化反応（バイオミネラリゼーション）が重要な役割を担っている。これら一連の技術は主に陸上鉱山における資源開発活動の中で議論されてきたが、近年の資源枯渇の懸念に伴い、その対象を海底資源にも移しつつある。海底資源開発を検討する上では、従来対象としていた陸上微生物だけではなく海洋微生物がそのプロセスに関与することを考慮しなければならないが、海洋微生物の金属資源開発における利用研究例は極めて少なく知見が乏しい。本発表では、著者の陸上性微生物を用いた金属資源開発に関わる長年の研究内容を踏まえつつ、海底資源開発を対象とした海洋微生物利用の可能性とその将来展望を、予備調査試験の結果とともに報告する。

Microorganisms have been utilized in various industry such as medical treatment and food supply, and metal mineral processing is no exception. The systematic understanding of bioleaching, which promotes the dissolution of metal minerals by activating iron and sulfur-metabolizing microorganisms, began about a century ago and still attract attention today. Besides, microbial activities are also employed in the treatment of mine wastewater discharged during mineral processing, and microbiological mineralization reactions (biomineralization) play a crucial role in a water purification system. While these technologies have mainly been discussed in the terrestrial mining activities, concerns about recent resource depletion have led to a shift in focus towards marine resources. When considering marine resource development, it is essential to take into account not only terrestrial but also marine microorganisms, whereas there is limited knowledge regarding the use of marine microorganisms in mineral processing field. In this presentation, the author will report on the potential and future prospects of utilizing marine microorganisms in marine resource development, along with the results of preliminary experiments.

Terrestrial/marine microorganisms, Mineral processing, Marine resource development

講演番号：2S06A2p-01
講演日時、会場：3 月 25 日 13:53～ A2 会場

アミノ酸の生理機能
Physiological functions of amino acids

○畑澤 幸乃（味の素株式会社）
○Yukino Hatazawa (AJINOMOTO CO., INC.)

アミノ酸はタンパク質の基本単位であり、分子内にアミノ基（-NH2）とカルボキシル基（-COOH）を有する化合物である。タンパク質を構成するアミノ酸は 20 種類存在し、うち 9 種類が人体では合成できないため必須アミノ酸とよばれ、食事などから摂取する必要がある。アミノ酸は体蛋白質の材料であるだけでなく、特定のアミノ酸によるシグナルを介した生理機能を発揮することが知られている。例えば、必須アミノ酸のうち特に分岐鎖アミノ酸（BCAA）は骨格筋において筋力増加や運動能力の向上作用があることが知られている。
他にも、アミノ酸及びその代謝物には、睡眠の質の改善作用や免疫力向上作用、腰や膝の痛みなどの不快感の改善作用など、加齢に伴う不具合に対して有効であることが示されている。
本発表では、アミノ酸の多様な機能についてヒトへの健康効果を中心に紹介する。

Amino acids are the basic units of proteins. They are compounds that have an amino group (-NH2) and a carboxylic group (-COOH) in their molecules.
There are 20 types of amino acids which make up the protein, and 9 of them are called essential amino acids because they cannot be synthesized in the human body, so they need to be taken from diet. Amino acids are known not only to be materials for body proteins, but also to exert physiological functions through signals by specific amino acids.
For example, branched-chain amino acids (BCAA) among essential amino acids are known to increase muscle strength and improve exercise capacity in skeletal muscle.
Amino acids and their metabolites have also been shown to be effective against age-related failures, including improving sleep quality, enhancing immunity, and improving discomfort such as pain in the lower back and knee.
In this presentation, we introduce the diverse functions of amino acids with a focus on their health effects on humans.

Amino acids, BCAA

講演番号：2S06A2p-02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:17～ A2 会場

酵母におけるプロリン資化抑制機構の解明-プロリンを含まないワイン・ビール製造への挑戦-

Regulations and functions of proline utilization in yeast Saccharomyces cerevisiae

○西村 明[1,2]、高木 博史[2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]奈良先端大・研推)
○Akira Nishimura[1,2], Hiroshi Takagi[2] ([1]Division of Biological Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, [2]Institute for Research Initiatives, Nara Institute of Science and Technology)

アミノ酸の一種であるプロリンはタンパク質の構成成分としてだけでなく、細胞内に遊離した状態で多彩な機能を発揮するため、様々な分野で注目されている。特に食品・発酵分野において、プロリンは甘味（低濃度の場合）や苦み（高濃度の場合）を呈し、味に直接的な影響を与えるため、興味が持たれている。プロリンは酒類の原料（ブドウや麦芽）に最も多く含まれているアミノ酸であるが、発酵中の酵母*Saccharomyces cerevisiae*はプロリンをほとんど利用することができず、発酵後も多量に残存する。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインやビールの酒質を低下させる。このため、原料中のプロリンを効率よく消費するプロリン資化性酵母が産業的に求められている。

我々はプロリン要求性株を利用した独自のスクリーニング系から、アルギニンを含む塩基性アミノ酸がプロリンを細胞内に取込むトランスポーターPut4を細胞膜から除去することで、プロリン消費を強く阻害することを発見した。この機構を詳細に解析した結果、アルギニンのトランスポーターCan1がトランスポーターとして働くのではなく、細胞外の塩基性アミノ酸のレセプター（このようなトランスポーターはトランスセプターと呼ばれる）として機能することにより、プロリン資化を抑制することを見出した。これら経路に関係する遺伝子に変異を導入した酵母は発酵環境においても若干のプロリン消費が可能となった。しかし、実用レベルまでプロリン消費が可能な菌株の構築には至っておらず、他のアプローチも必要になっている。近年、自然界の野生酵母が窒素源応答に関わる遺伝子群に変異を有しており、窒素源の資化性に多様性があることがわかってきた。そこで、我々は野生酵母コレクション（Phaff Yeast Culture Collection）を用いて、ワインやビールの発酵モデル培地でもプロリンを有意に消費する野生酵母（プロリン資化性酵母）の取得にも取り込んでいる。本講演では、プロリン資化抑制機構の詳細を紹介すると共に、プロリン資化抑制機能の意義についても議論したい。

The quality of alcoholic beverages strongly depends on the metabolic characteristics of the yeast cells being used. Grape must and malt, the ingredients of alcoholic beverages, contain a high concentration of proline, an amino acid that can potentially be a useful nitrogen source. However, *Saccharomyces cerevisiae* cannot utilize proline during fermentation. Here, I review and discuss recent discoveries about the inhibitory mechanisms and roles of proline utilization in yeast. The information can help in developing novel yeast strains that can improve fermentation and enhance the quality and production efficiency of wine and beer.

Proline, Fermentation, Transceptor

講演番号：2S06A2p-03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:41～ A2 会場

筋萎縮時の統合的メタボローム解析から見えてきたアミノ酸異化産物ポリアミンの代謝変動と筋量制御

Metabolic changes in the amino acid catabolite polyamine and regulation of muscle mass revealed by integrated metabolomic analysis during muscle atrophy

○大藪 葵、亀井 康富（京都府立大学生命環境科学研究科）
○Mamoru OYABU, Yasutomi KAMEI (Kyoto Prefectural University)

アミノ酸やアミノ酸代謝物は、単に栄養素や臓器・組織の材料として利用されているだけでなく、生体内外の環境変化に応じてさまざまな生理機能を発揮する。我々は、アミノ酸の貯蔵庫であり、人体最大の組織である骨格筋に着目し、加齢や不活動、飢餓、がんなどの疾患において「なぜ骨格筋が衰えるのか？」という疑問を晴らし、より良い未来に向けた健康寿命延伸を目指した研究に取り組んでいる。超高齢社会を迎えた我が国では、加齢に伴う筋萎縮（サルコペニア）を予防・治療することは、早急に対策を講じるべき喫緊の課題であり、また、がんや糖尿病における筋萎縮においては、疾患そのものとは独立して個体の寿命に影響することが明らかになってきた。

我々はこれまでに、転写因子である FoxO1 が筋萎縮を強力に誘導する因子であることを発見した。筋萎縮時の骨格筋内遺伝子発現変化に関しては解析が進んでいるものの（Oyabu et al, 2022, ***FASEB Journal***）、骨格筋内代謝産物の変化に関してはほとんど解析が進んでいない。そこで我々は最近、筋萎縮時には骨格筋内代謝産物がダイナミックな変動を示すことを統合的メタボローム解析により明らかにし、これらの筋萎縮関連代謝産物を「アトロメタボライト（Atrophy：萎縮+Metabolite：代謝産物）」と独自に命名した。本演題では、健康寿命延伸の鍵である骨格筋における質的・量的変化の分子機構、特に、アミノ酸代謝産物ポリアミンと筋量制御に関する新たな知見を紹介したい。

Skeletal muscle wasting leads to reduced physical activity, weakness and increased morbidity from several diseases. In our super-aged society, the prevention and treatment of age-related muscle wasting (sarcopenia) is an urgent issue that needs to be addressed. In addition, muscle wasting in diseases such as cancer and diabetes has been shown to affect the lifespan of individuals independently of the disease itself. We have previously generated skeletal muscle-specific FoxO1 overexpressing mice and found that FoxO1 is a robust inducer of muscle atrophy. Although changes in the transcriptome have been analyzed during muscle atrophy (Oyabu et al, 2022, *FASEB Journal*), changes in skeletal muscle metabolites have been largely unexplored. We have recently shown that skeletal muscle metabolites undergo dynamic and specific changes during muscle atrophy. We have termed these metabolites modulated by muscle atrophy as 'atrometabolites' (atrophy + metabolite). In this symposium, we would like to present recent findings on atrometabolite and muscle mass regulation.

Polyamine, Skeletal muscle, Amino acids/amino acid metabolites

講演番号：2S06A2p-04
講演日時、会場：3 月 25 日 15:05～ A2 会場

多能性幹細胞の維持および分化におけるメチオニンの役割

Role of methionine in the maintenance and differentiation of pluripotent stem cells

○白木 伸明（東工大）
○Nobuaki Shiarki (Tokyo Tech)

ES（embryonic stem）/iPS（induced pluripotent stem）細胞といった多能性幹細胞は，分化した細胞とは異なる代謝調節機構を持っており，その特殊な代謝状態こそが幹細胞の未分化性維持や自己複製能などに重要であることがわかってきた．多能性幹細胞から目的の細胞を効率よく分化させるためには，その代謝状態に合わせた最適な細胞分化培養液が必要であり，この培養液はアミノ酸・糖・ビタミン・ミネラルなどの栄養素を含む基礎培地と，成長因子およびシグナル阻害薬から構成される．我々は，これまでに必須アミノ酸の一つであるメチオニンおよびその代謝物であり生体内のさまざまなメチル化反応の基質となる S-アデノシルメチオニン（SAM）がエピジェネティック制御を介して，幹細胞の未分化性維持に寄与することを明らかにしてきた(***Cell Metab***. 2014, ***Stem Cells*** 2023)．本講演では、ヒト多能性幹細胞の分化および機能維持におけるメチオニン代謝の役割を紹介すると共に、最近見出した幹細胞におけるメチオニン代謝と亜鉛代謝との相互制御について報告する(***Cell Rep***. 2022)。さらに、上記の知見を利用したアミノ酸代謝を考慮した新規膵臓分化誘導方法について紹介し、皆様とアミノ酸による幹細胞制御について議論させて頂きたい。

Pluripotent stem cells such as ES/iPS cells have a different metabolic regulation mechanism from differentiated cells, and their special metabolic state is important for maintaining pluripotency and self-renewal ability. A specialized culture medium that aligns with their metabolic state is necessary to effectively differentiate these stem cells into specific target cells. This medium includes essential nutrients like amino acids, sugars, vitamins, minerals, growth factors, and signal inhibitors. We've discovered that methionine, an essential amino acid, and its metabolite S-adenosylmethionine (SAM), involved in various methylation reactions in the body, play a significant role in maintaining stem cell differentiation through epigenetic regulation. In this presentation, I'll discuss the importance of methionine metabolism in the differentiation and functional maintenance of human pluripotent stem cells. I will also share our latest findings on the interaction between methionine and zinc metabolism in stem cells. Additionally, we will introduce a new method for inducing pancreatic differentiation, considering amino acid metabolism, based on these insights.

pluripotent stem cell, methionine, differentiation

講演番号：2S06A2p-05
講演日時、会場：3 月 25 日 15:29～ A2 会場

タンパク質栄養状態の悪化による脂肪肝形成機構

Mechanisms underlying the lipid accumulation in the liver under protein deprivation

○豊島 由香、吉澤 史昭（宇大学術院）
○Yuka Toyoshima, Fumiaki Yoshizawa (Utsunomiya Univ.)

タンパク質の摂取不足によってタンパク質栄養状態が悪化すると、肝臓に過剰な中性脂肪（TG）が蓄積して、脂肪肝が形成される。このことは、古くからヒト、サル、ラットなどで報告されていた。そしてこの現象は、肝臓からの TG 放出低下が主な原因となって起こると考えられてきた。しかし近年、肝臓における TG の合成と分解調節の変化も重要な原因の一つであることを示す研究成果が報告されている。

私たちは、成長期のラットに低タンパク質食を与えると肝 TG 量が増加すると共に、体内のインスリン感受性が上昇することを見出した。またこのインスリン感受性の上昇は、主に肝臓におけるインスリン受容体基質（IRS）−2 と翻訳開始抑制因子 4E-BP1 量の増加を介したインスリンシグナルの増強によって起こることを示した。インスリンには脂質合成を促進する働きがあることから、タンパク質が不足すると、肝臓におけるインスリンシグナルの増強を介してインスリンの脂質合成促進活性が上昇し、肝 TG 量が増加すると予想した。実験の結果、低タンパク質食を摂取させたラットの肝臓では、インスリン刺激の有無に関わらず、脂質合成が促進して TG 量が増加することが示された。さらに、肝臓における IRS-2 や 4E-BP1 量の増加がインスリン作用とは独立して脂肪肝形成に直接的に寄与しているのでないかと考え、これらの因子がタンパク質摂取不足によって誘導される脂肪肝形成に果たす役割を明らかにするために、アデノウイルスやゲノム編集などの遺伝子導入技術によって作出したモデルラットを用いて実験を行っている。本講演では、最近の私たちの研究成果の紹介に加えて、なぜタンパク質栄養状態が悪化すると動物は肝臓に過剰な TG を蓄積させるのかについても議論したい。

Protein deprivation is known to induce fatty liver in human and animals. The precise mechanisms, however, remain unclear. Several groups including ours have shown that a low-protein diet increases insulin sensitivity in rats and mice. We examined insulin signaling in the target tissues of rats and found that the low-protein diet increased the amounts of insulin receptor substrate (IRS)-2 and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1(4E-BP1) in rat liver. Here, I introduce our recent studies as for the role of IRS-2 and 4E-BP1 and discuss the physiological importance for the development of fatty liver under protein deprivation.

protein, liver, insulin

講演番号：2S06A2p-06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:53～ A2 会場

血中アミノ酸プロファイルが臓器特異的な脂質代謝を制御する

Blood amino acid profiles regulate tissue-specific lipid metabolism

○伯野 史彦（東大院農）
○Fumihiko Hakuno (The Univ. of Tokyo)

動物の組織には、体の栄養状態の変化をモニターし、体代謝を制御する機構が備わっている。最近我々は、低タンパク質食を成長期のラットに給餌すると、成長遅滞が引き起こされると同時に、肝臓・筋肉に中性脂肪が蓄積することを明らかにした。続いて、どのアミノ酸がそれぞれの表現型の発現に重要な役割を果たしているかを調べたところ、アルギニンのみを対照食の 1/3 量まで減少させた低アルギニン食を給餌すると脂肪肝が形成され、リジンのみが不足した低リジン食を給餌すると筋肉への脂肪交雑が、必須アミノ酸を一つでも不足した低必須アミノ酸食を給餌したラットでは成長遅滞が誘導された。このように、それぞれの表現型には異なるアミノ酸が関与していることが明らかとなった。さらに、低アルギニン食や低リジン食を給餌したラットの血中アミノ酸濃度を模倣したアミノ酸組成の培地で肝臓や筋肉の細胞を培養すると、対照培地で培養した場合と比べて、肝細胞での新規脂質合成量の増加、筋管細胞への脂肪取り込みの促進が認められた。これらの結果は、複数の血中アミノ酸濃度のバランスをそれぞれの組織細胞がモニターして、細胞自律的に脂肪を蓄積する機構が存在することを示している。また、尿素回路に含まれるオルニチンが脂質・糖質代謝の制御遺伝子の転写を誘導するという新たなアミノ酸シグナル経路（オルニチンシグナル）の同定にも成功しており、血中のアミノ酸濃度のバランスによって細胞内の特定の代謝産物の量が変化し、代謝遺伝子の発現を調節することによって体の代謝を臓器特異的に制御する未知のメカニズムが存在する可能性が示された。

We have previously reported that rats fed a low-protein diet showed growth retardation and accumulation of triglycerides in the liver and muscles. Furthermore, we found that a low arginine diet lacking only arginine induced fatty liver formation, while a low lysine diet induced fatty muscle formation, suggesting that different amino acids are involved in each phenotype. In addition, when liver and muscle cells were cultured in a medium with an amino acid composition that mimicked the blood amino acid concentration of rats fed a low arginine or low lysine diet, there was an increase in *de novo* lipid synthesis in liver cells and an increase in fat uptake into myotube cells compared to when cultured in a control medium. These results indicate the existence of a cell-autonomous fat accumulation mechanism by which each tissue cell monitors the balance of multiple blood amino acid concentrations.

amino acid profile, lipid accumulation, ornithine

講演番号：2S07A3p-01
講演日時、会場：3 月 25 日 13:55～ A3 会場

海から発見された微生物が活躍するバイオプラスチックの合成と分解研究

Synthesis and degradation of bioplastics by microorganisms isolated from marine environments

○山田 美和（岩大農）
○Miwa YAMADA (Iwate Univ.)

多岐に渡る地球規模の環境問題解決が求められている現状の中、本講演では、海洋環境で深刻な問題となっているプラスチックごみの蓄積やマイクロプラスチックの拡散に焦点を当てる。これらの問題解決策の一案として、①海の植物・海藻を原料としたバイオプラスチック・ポリヒドロキシアルカン酸（PHA)の微生物合成と、②海洋生分解性を有するバイオプラスチックであるポリアミド 4（PA4）の微生物酵素による分解について話題提供する。①については、褐藻類を構成する主な糖質であるアルギン酸を単一炭素源として PHA を合成できる *Cobetia* 属細菌［*Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3)]発見の経緯や、応用の可能性と課題について紹介する(1-3)。②について、近年我々は、新たな PA4 分解菌を土壌と海洋から単離し、両菌における PA4 分解酵素の特定に成功した(4, 5)。PA4 分解酵素の報告は世界初であり、PA4 の生分解機構に対して酵素レベルの視点で迫ることが可能となった。本成果についても、基礎研究にとどまらず、今後の応用への可能性を含めてお話したい。

Accumulation of plastic wastes and proliferation of microplastics are serious problems in the marine environment. As possible solutions to these problems, we have been researched (i) microbial synthesis of polyhydroxyalkanate (PHA) from seaweeds and (ii) microbial enzymatic degradation of polyamide 4 (PA4) with marine biodegradability. Firstly, I would like to introduce the discovery of *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3), which can synthesize PHA from alginate, one of the major carbohydrates constituting brown algae, and its potential applications (1-3). Subsequently, I would like to also introduce isolation of novel PA4-degrading microorganisms from soil and marine environments and identification of PA4-degrading enzymes (4, 5).

Reference

1. H. Moriya et al., Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol. 8, 974 (2020)
2. A. Matsumoto et al., The Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 68, 207 (2022)
3. Y. Umebayashi et al., The Journal of General and Applied Microbiology, Vol. 69, 53 (2023)
4. Y. Sasanami et al., Polymer Degradation and Stability, Vol. 197, 109868 (2022)
5. Y. Saito et al., Polymer Degradation and Stability, Vol. 215, 110446 (2023)

polyhydroxyalkanoates, polyamide 4, nylon

講演番号：2S07A3p-02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:23～ A3 会場

微生物合成プラスチックと化学合成生分解性プラスチックの環境分解性の差異

Differences in environmental degradability between microbially and chemically synthetic biodegradable plastics

○鈴木 美和[1]、石井 俊一[2]、権田 昂平[3]、鹿島 裕之[2]、鈴木 志野[4]、植松 勝之[5]、新井 隆弘[5]、橘 熊野[1,3]、岩田 忠久[6]、粕谷 健一[1,3] ([1]群大食健セ、[2]海洋機構、[3]群大院理工、[4]JAXA、[5]マリンワークジャパン、[6]東大院農)

○Miwa SUZUKI[1], Syun-ichi ISHII[2], Kouhei GONDA[3], Hiroyuki KASHIMA[2], Shino SUZUKI[4], Katsuyuki UEMATSU[5], Takahiro ARAI[5], Yuya TACHIBANA[1,3], Tadahisa IWATA[6], Ken-ichi KASUYA[1,3] ([1]GUCFW, [2]JAMSTEC, [3]Gunma Univ., [4]JAXA, [5]Marine Work Japan, [6]The Univ. of Tokyo)

生分解性プラスチック上の微生物叢（プラスティスフィア）を構成する一部の微生物が、生分解性プラスチックの分解および代謝に関与していると推定されている。本講演では、海洋において、微生物合成プラスチックであるポリ(3-ヒドロキシブチレート-*co*-3-ヒドロキシバリレート)(PHBV)と化学合成生分解性プラスチックであるポリ(ブチレンスクシネート-*co*-アジペート)(PBSA)に形成されたプラスティスフィアに着目し、マルチメタオミクス解析を通して、それぞれの海洋分解機構を明らかにする。

解析の結果、PHBV プラスティスフィア内ではガンマプロテオバクテリアに属する 5 つのメタゲノムアッセンブリーゲノム(MAG)が、PBSA プラスティスフィア内では 2 つの MAG が高い生物活性を示した。5 つの PHBV 由来の MAG が有する菌体外 P(3HB)デポリメラーゼ遺伝子(*exphaZ*)を解析したところ、海洋性 *exphaZ* だけでなく、陸性 *exphaZ* も高発現であることがわかった。PBSA 由来の 1 つの MAG は 14 種類のポリエステル加水分解酵素遺伝子を有し、そのうち 2 種が高発現であった。一方の MAG では、アルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が高発現であり、分解物である 1,4-ブタンジオールを代謝していることが示唆された。このことから、2 つの PBSA 由来の MAG は協調的に機能し、PBSA を生分解していると推定された。

Previous studies indicate that the plastispheres on biodegradable plastics would be involved in the degradation and metabolism of biodegradable plastics. Here, we focused on the plastispheres established on PHBV and PBSA in the ocean and analyzed them using multi-meta-omics approaches.

The multi-meta-omics analysis showed that 5 metagenome-assembled genomes (MAGs) were actively functioning within the PHBV plastispheres, while only two MAGs showed high biological activity within PBSA plastispheres. Extracellular P(3HB) depolymerase gene (*exphaZ*) analysis of the five PHBV-derived MAGs showed that not only marine-*exphaZ* but also terrestrial *exphaZ* are highly expressed in PHBV plastisphere. One PBSA-derived MAG had 14 different polyester-degrading enzyme genes, and 2 genes were highly expressed. The alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase genes in another PBSA-derived MAG were highly expressed. These suggest that MAGs function cooperatively in the metabolization of PBSA.

Biodegradable plastics, Plastisphere, Multi-meta-omics analysis

講演番号：2S07A3p-03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:51～ A3 会場

物性と海洋生分解性を両立した進化型ポリ乳酸 LAHB の研究ストーリー

Development of evolved lactate-based polyester LAHB bearing both usuful material properties and ocean biodegradability

○高 相昊[1]、田口 精一[1,2] ([1]神戸大院科技イノベ、[2]神戸大先端バイオ)
○Sangho Koh[1], Seiichi Taguchi[1,2] ([1]Kobe Univ. STIN, [2]Kobe Univ. EGBRC)

海洋プラごみ問題の解決策の一つとして、生分解性を備えたプラスチック素材への関心が急速に高まっている。しかし、汎用プラに要求される「物性」と「生分解性」は、まさに “トレードオフ” の関係にある。例えば、ポリ乳酸 (PLA) は透明性に優れているが、海水中では全く分解されない。一方、微生物によって生合成されるポリヒドロキシ酪酸 (PHB) は、海洋生分解性に優れているが、不透明・硬質という物性面での欠点がある。これら両ホモポリマーのトレードオフを解決するのが、LA (乳酸, lactate) と 3HB (酪酸, 3-hydroxybutyrate) ユニットとの共重合体である進化型ポリ乳酸「LAHB」である。これまでに我々は、“乳酸重合酵素” の創出 (S. Taguchi *et al.*, *PNAS*, 2008) を契機に、大腸菌を用いた LAHB の生合成システムを確立してきた。LAHB の優れたところは、土壌・河川・海洋などの自然環境で良好な生分解性を示し、乳酸分率の調節によって物性と生分解性を「制御」できる点にある。これにより、用途に応じて硬軟多様な LAHB ポリマーのテイラーメイド生産を実現してきた。最近では、海洋生分解性 PHBH™ ポリマー産業菌である水素酸化細菌 *Cuprividius necator* への宿主移行によって、これまでの生産性を底上げでき、良好な海洋生分解性に加えて、強靭性を備えた超高分子量型の LAHB として機能拡張でき、さらに PLA の “モディファイアー (改質剤)” としての用途展開を進めている。本シンポジウムでは、LAHB の研究開発ストーリーの変遷と最先端の研究成果を紹介する。なお、本研究の一部は NEDO（JPNP20005, JPNP18016）によって支援された。

Poly-L-lactate (PLLA) is the most popular bio-based plastic and has been widely produced all over the world. Although PLA has high transparency, its physical properties and biodegradability need to be improved for more application. In 2008, for the first time, we succeeded in producing biodegradable LA-based polyester, P(LA-*co*-3HB), termed LAHB, using recombinant *Escherichia coli* and our newly developed lactate (LA)-polymerizing enzyme (LPE). LAHB exhibits distinct physical properties and excellent biodegradability compared with those of PLA and P(3HB) homopolymers. Recently, we successfully established a tailor-made LAHB production platform based on *Cuprividius necator*. The engineered *C. necator* produced ultra-high molecular weight (uhmw-) LAHB in large amounts, and uhmw-LAHB is a promising “modifier” for improving PLA processability and impact resistance. These biodegradable LAHB-based modifiers may therefore be effectively used to improve the material properties of PLA.

Biodegradable plastic, Polylactide, *Cupriavidus necator*

講演番号：2S07A3p-04
講演日時、会場：3 月 25 日 15:19～ A3 会場

実海域における生分解性プラスチックの分解に寄与する生分解菌叢の特定とそれに紐付く分離株の解析

Evaluation of the microbiome contributing to the biodegradation of biodegradable plastics in marine and analysis of linked bacterial isolates

○楠屋 陽子 (製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター)
○Yoko Kusuya (NBRC, NITE)

海洋ごみの問題解決に資する海洋生分解性プラスチック（生プラ）の社会実装促進において、その評価試験法開発・国際規格化・認証制度構築は喫緊に求められる取り組みであり、実海域生分解の実態把握はそのために必要不可欠である。私たちは実海域中の微生物による分解･資化の実態把握と関連するデータの収集を行っている。岩手･島根･広島･鹿児島の 4 地域の沿岸に、上市済みの生プラ（PHBH、PBSA、PCL）を一定期間浸漬する実海域試験を 6 回（2021 年 2 月～2023 年 1 月の間にそれぞれ 2～3 ヶ月間）実施し、生プラの崩壊度や環境データの取得に加えて、表面に付着したバイオフィルムの菌叢解析と株の収集を行った。菌叢解析の結果、浸漬した時期や場所、素材によって特徴的な菌種と、全ての地域で年間を通じて存在する菌種が確認された。また、高頻度で検出された菌種の中で崩壊度と正の相関を示す菌種を抽出し、収集した菌株の中からそれらに該当する菌株を選抜、LC-MS/MS や HS-GC/BID 等を用いて、それら菌株のプラスチック生分解能を分析することで、実海域での生プラ分解に主として寄与する菌種を特定した。本発表では、得られた菌叢データの詳細と分離した菌株の性状について報告する。この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務（JPNP20008）の結果得られたものである。

We immersed biodegradable plastics (PHBH, PBSA, and PCL) in the costal sea of Iwate, Shimane, Hiroshima, and Kagoshima for two to three months between February 2021 and January 2023. The degree of degradation of the plastics and environmental data such as sea water temperature were measured, and subsequent analysis of the bacterial flora and isolated strains present on their surfaces were performed. The microbiomes differed according to the season and location of immersion, but there were groups commonly detected throughout the year at all locations. The bacterial species detected at high frequencies and showing a positive correlation with the degree of degradation were focused, and the corresponding isolated strains were selected. By further LC-MS/MS, HS-GC/BID and other analysis of the biodegradation ability of PHBH, PBSA, and PCL of the selected strains, we identified the bacterial species that contribute to the degradation of biodegradable plastics.

biodegradable plastics, marine microorganisms

講演番号：2S07A3p-05
講演日時、会場：3 月 25 日 15:47～ A3 会場

環境移送技術を用いた、サンゴ礁生態圏の研究促進

Promote research on coral reef ecosystem using biosphere transfer technology

○高倉 葉太（株式会社イノカ）
○Yota Takakura (Innoqua Inc.)

弊社のコア技術である環境移送技術は，AI/IoT デバイスを用いて，水質（30 以上の微量元素の溶存濃度）をはじめ，水温・水流・照明環境・微生物を含む生物同士の関係性など，多岐に渡るパラメーターを制御することで，任意の水環境をモデル化して水槽内に再現する技術である．さらには，使用する海水を天然海水ではなく，人工的に生成した海水を使用することにより，実験や解析に適した「標準的」かつ「安定・均一」な環境を，立地を選ばずに構築することが可能としたものである．これにより，従来の飼育技術では安定させることが出来なかった水槽内の環境を，自然界の理想的な環境に限りなく近い形で維持することが可能となり，これまで飼育が難しかった多くのサンゴ種の飼育を可能とした．現在では本技術を活用し，複数のメーカーと共に，日焼け止めクリームがサンゴ生体に及ぼす影響評価実験を，複数のサンゴに対し濃度や成分などの条件を変更してシミュレーションを行い，比較実験を開始している．

Our core technology, biosphere transfer technology, uses AI/IoT devices to control a wide range of parameters, including water quality (dissolved concentration of more than 30 trace elements), water temperature, water flow, lighting environment, and relationships among organisms including microorganisms, in order to model and reproduce an arbitrary water environment in an aquarium. Furthermore, by using artificial seawater instead of natural seawater, it is possible to create a standard and stable environment suitable for experiments and analysis, regardless of the location. This technology makes it possible to maintain an environment in the tank that is as close as possible to the ideal environment in nature, which could be more stabilized than conventional rearing techniques, and enables the rearing of many coral species that were previously difficult to keep. Currently, using this technology, we are working with several manufacturers to conduct simulation experiments to evaluate the effects of sunscreen cream on coral organisms by changing the concentration, ingredients, and other conditions for multiple coral species.

Coral reef, Core technology, Biodiversity

講演番号：2S08A4p-01
講演日時、会場：3 月 25 日 13:50～ A4 会場

環境中の硫黄循環を駆動するマルチ金属酵素

A multi-metal enzyme driving sulfur cycling in the environment

○三原 久明（立命大生命）
○Hisaaki Mihara (Ritsumeikan Univ.)

硫黄還元細菌は、元素状硫黄を最終電子受容体として利用する嫌気呼吸（硫黄呼吸）によって生育し、環境中の生物地球化学的硫黄循環に関与する。硫黄呼吸では、不溶性の元素状硫黄（主に S_8 と考えられている）が硫化水素イオンに変換されるが、その分子機構についてはまだ未解明な点が多く残されている。硫黄還元細菌の一種である *Geobacter sulfurreducens* PCA のゲノム上には 100 種を超えるシトクロム *c*（Cytc）様タンパク質遺伝子が存在する。それら Cytc 様タンパク質は、細胞外の様々な最終電子受容体［鉄(III)、マンガン(IV)、ウラン(VI)、フマル酸、硫黄など］を利用した嫌気呼吸に関与すると予想されているが、それらの機能と構造のほとんどは未知のままである。近年、いくつかの細菌において、1 サブユニット中にヘムを複数有するマルチヘム Cytc が、亜硝酸還元、ヒドロキシルアミン酸化、ヒドラジン酸化、亜硫酸還元などの触媒活性を有する酵素として機能することが見いだされ、これら酵素は硫黄や窒素の生物地球化学的物質循環に重要な働きを担うと考えられている。我々は、*G. sulfurreducens* PCA より、サブユニット当たり 5 つのヘムと 1 つのセレノシステイン残基を有する新奇マルチヘム Cyt c 様セレンタンパク質を発見し、これが本菌の異化的元素状硫黄還元を担うポリスルフィド（$^{-}S\text{-}S_n\text{-}S^{-}$）還元酵素であることを明らかにした。本講演では、我々の最近の研究を中心に、マルチヘム Cytc について紹介したい。

Sulfur-reducing bacteria play a vital role in the anaerobic respiration and biogeochemical sulfur cycle. Despite their importance, many aspects of their molecular mechanisms remain unclear. The genome of *Geobacter sulfurreducens* PCA contains over 100 cytochrome *c* (Cytc)-like protein genes, with functions anticipated in anaerobic respiration using various electron acceptors. However, the details of these proteins' functions and structures are largely unknown. Recent discoveries in certain bacteria reveal that multi-heme Cytc enzymes with multiple hemes in a single subunit function as catalysts in processes like nitrite reduction and sulfur cycling. These enzymes are considered essential for environmental sulfur and nitrogen cycles. We discovered a novel pentaheme cytochrome *c* selenoprotein polysulfide reductase that is involved in dissimilatory sulfur reduction in *G. sulfurreducens* PCA. In this presentation, I would like to highlight our recent research on polysulfide reductase and discuss other multiheme Cytc enzymes.

sulfur, heme, bacteria

講演番号：2S08A4p-02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:15～ A4 会場

黒いメラニンの生合成には亜鉛が不可欠である

Zinc plays an essential role in eumelanin biosynthesis

○神戸 大朋（京大院生命）
○Taiho Kambe (Kyoto Univ.)

メラニン色素は、紫外線から肌を守る重要な役割を果たす。メラニンは、黒～黒褐色を示すユーメラニンと赤褐色～黄色を示すフェオメラニンに分類され、どちらも色素細胞のメラノソームでの酵素反応を経て生合成される。その過程では、３つのチロシナーゼ酵素、すなわち、チロシナーゼ（TYR）、チロシナーゼ関連タンパク質 1 および 2（TYRP1、TYRP2）が必須の役割を果たすことが知られている。この中で、TYR は解析が進展しており、70 年以上前から銅酵素として機能すること、その活性発現には TGN に局在する銅トランスポーターが不可欠な役割を果たすことが明らかにされていた。この TYR との高い相同性から、TYRP1 と TYRP2 も銅酵素であると長らく信じられてきた。最近、我々は TYRP1 が活性を有するためには、初期分泌経路で機能する亜鉛トランスポーターから亜鉛が供給されることが必要不可欠であることを発見し、TYRP1 は銅ではなく亜鉛に依存した酵素であることを明らかにした。TYRP1 に亜鉛が供給されないよう改変した色素細胞では、黒いメラニンが生合成されず、薄茶色のメラニンしか生合成されない。本発表では、この TYRP1 の亜鉛依存性について、我々の解析結果を紹介するとともに、TYR 酵素群がどのように銅と亜鉛を区別するのかについて、金属トランスポーターと細胞内金属動態の観点から議論したい。

Cutaneous melanin pigment plays a critical role in protection against harmful effects of solar radiation. Melanin is biosynthesized in melanosomes, which requires tyrosinase family proteins consisting of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 and 2 (TYRP1 and TYRP2). Among them, TYR has been biochemically well characterized. It requires two copper ions for its activity, which are supplied by the TGN-resident copper transporter ATP7A. Because TYRP1 and TYRP2 have a homologous structure to TYR, both TYRPs have been thought to be copper enzymes. However, that has not been well characterized. Recently, we have shown that TYRP1 requires zinc for its functions, which are mediated by the early secretory pathway-resident zinc transporters. Notably, in the cells and medaka fish lacking these zinc transporters, melanin biosynthesis is impaired, and thus black melanin changed to the brownish melanin. Here, I will present how TYRP1 acquires zinc for melanin biosynthesis, overviewing how TYR, TYRP1, and TYRP2 cooperatively contribute to melanin biosynthesis.

Melanin, Zinc, Transporter

講演番号：2S08A4p-03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:40～ A4 会場

バイオミネラリゼーションにおける有機基質の役割

Functional analyses of organic matrices in biomineralization

○鈴木 道生（東大院農）
○Michio SUZUKI (The Univ. of Tokyo)

アコヤガイの貝殻は、内側に宝石の真珠と同じ構造を有する扁平状の炭酸カルシウムを含む真珠層、外側に柱状の炭酸カルシウムから成る稜柱層、蝶番部に存在する炭酸カルシウムナノファイバーを含む靭帯と複数の複雑な微細構造により構成されている。これらの微細構造の形成において、炭酸カルシウムのサイズ、形態、多形、方位、結晶欠陥などの特徴が全く異なっており、貝類は有機基質や微量元素、イオン濃度などを生体内外で調整することで緻密に作り分けることが可能である。発表者はこれまで特に貝殻内に存在する有機基質に着目して研究を進めており、有機基質の構造と機能がどのように貝殻微細構造を形成に寄与するのか明らかにすることを目的に研究を進めてきた。真珠層には炭酸カルシウムの脱灰共に溶出する可溶性成分に含まれる炭酸脱水酵素である nacrein が、その後の不溶性成分から変性剤で溶出され有機基質の枠組みを主に形成する Pif、有機基質の架橋を行う tyrosinase、変性剤でも可溶化しない不溶性成分として有機基質の骨格を構成するキチン、MSI60、NU-5 などが主に含まれることが知られている。この中で Pif 関連タンパク質は貝殻の基質タンパク質として、有機物間相互作用と炭酸カルシウムとの相互作用の両方の機能を持ち真珠層以外の多くの貝殻微細構造に含まれることが分かってきた。核磁気共鳴を用いた解析により、固体表面で Pif の繰り返し配列が伸長し結合することが判明した。また、有機基質の骨格を形成するキチンはキチン分解酵素による作用でナノファイバー化することで欠陥の誘導や有機膜の薄膜化を実現していることが示された。以上のように、貝殻内には多くのタンパク質が存在し、様々な役割分担をして貝殻微細構造を形成していると言える。

The shell of *Pinctada fucata* contains nacre with aragonite plates, prism calcite and ligament aragonite nanofibers. These layers consist of various microstructures regulated by organic matrices, trace elements and ion concentrations. The soluble fraction of nacre contains the carbonic anhydrase of nacrein. The insoluble fraction contains Pif that binds to both organic matrices and calcium carbonates. NMR analyses showed the repeat sequence of Pif extended to attach the surface of aragonite crystals. On the other hand, chitin was identified from the insoluble scaffolds. Chitin degradation enzymes made the thin membrane and induced the defects of crystals.

From these discoveries, various organic matrices play important roles in the formation of shell microstructures.

biomineralization, calcium carbonate, Pinctada fucata

講演番号：2S08A4p-04
講演日時、会場：3 月 25 日 15:05～ A4 会場

重元素同位体比測定技術が解き明かす生命・食糧・環境

Application of measurement techniques of heavy element isotope ratios to the fields of life, food, and environmental sciences

○有賀 智子（産総研・計量標準）
○Tomoko ARIGA (AIST/NMIJ)

地球惑星科学の分野では，地球・宇宙物質の起源を明らかにする目的で重元素の同位体比測定が盛んに行われてきた。重元素の同位体比は物質の起源を反映するだけでなく，自然界における種々の化学反応を経ることによっても変化するため，元素の供給源と化学反応の履歴を追跡する化学トレーサーとしても有用であることが知られている。そのため生命や食品，環境を対象とする各研究分野でも利用が進んでいる。ストロンチウム（Sr）には 4 種類の安定同位体が存在し，そのうち ^{87}Sr は ^{87}Rb の β 壊変によって生成するため，^{87}Sr/^{86}Sr の値は地質年代が古いほど高い値を取ることが知られている。農産物中の ^{87}Sr/^{86}Sr 同位体比は作物の生育・栽培環境の ^{87}Sr/^{86}Sr 同位体比を反映することから，近年の研究で ^{87}Sr/^{86}Sr 同位体比は農産物の産地判別指標として有用であることが示唆されている(1)等。また，鉄（Fe）の同位体比 ^{56}Fe/^{54}Fe は Fe(III)の Fe(II)への還元反応を経ることで低い値に変化することが知られている。植物による Fe の吸収・輸送の過程において Fe(III)の還元反応が起きることから，^{56}Fe/^{54}Fe 同位体比は植物の Fe 吸収・輸送機構の検証のために用いられている(2)等。

本発表では，重元素同位体比測定が生命・食品・環境分野の研究に活用された例を紹介すると共に，発表者が取り組んでいる多重検出器型誘導結合プラズマ質量分析計を用いた Sr 同位体比測定技術の高度化に関する研究について紹介する。

In the field of earth and planetary science, the measurements of isotope ratios of heavy elements have been actively conducted with the aim of clarifying the origins of materials on Earth and in space. Isotope ratios of heavy elements reflect the origin of materials. Moreover, these ratios change through various chemical reactions in nature. This change is useful as a chemical tracer for tracking the source of elements and the history of chemical reactions. Therefore, the measurements of isotope ratios of heavy elements have been performed in various research fields, such as life, food, and environmental sciences in recent years. In this presentation, I will introduce such application examples and as well as our research on the development of techniques for high-precision measurement of Sr isotope ratios using a multicollector inductively coupled plasma mass spectrometer.

(1) E.N. Epova *et al.*, *Food Chem.*, **294**, 35 (2019); (2) C. Liu *et al.*, *Chem. Geol.*, **524**, 323 (2019)

Isotope ratio, Inductively coupled plasma mass spectrometry, Geographical origin

講演番号：2S08A4p-05
講演日時、会場：3 月 25 日 15:30～ A4 会場

驚異的な鉄代謝能力を持つヒザラガイの鉄濃縮・沈着メカニズムの解析

Analysis of iron accumulation and deposition mechanisms in the incredible iron-metabolizing chitons

○根本 理子（岡山大・院環境生命）
○Michiko Nemoto (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

ヒザラガイは歯舌と呼ばれる摂餌器官を持ち、その歯冠部に磁鉄鉱（Fe_3O_4）を沈着させる。磁鉄鉱の歯を形成するため、ヒザラガイは数日間で歯舌の組織重量（g）当たり 100 mg 以上の鉄を濃縮・沈着する。真核生物でこれほど多量の鉄を細胞内に濃縮し、硬組織として細胞外に沈着させる例はヒザラガイ以外でほとんど知られていない。ヒザラガイの鉄濃縮・沈着機構を明らかにすることができれば、体内の過剰鉄により引き起こされるがんや神経変性疾患の治療に応用できる可能性がある。また、その仕組みを利用した環境に優しい、磁鉄鉱合成法の開発にもつながる。ヒザラガイによる鉄濃縮・沈着機構を明らかにするため，まず、歯舌への鉄輸送を担っていると考えられる歯舌組織中のフェリチンの分離・同定を行った。その結果、シグナル配列を持ち、血リンパ中に分泌される分泌型フェリチンが主要なフェリチンとして同定された。次に、歯冠部への鉄沈着に関与するタンパク質を明らかにするため、歯舌組織のプロテオーム解析を行なった。その結果、磁鉄鉱の沈着した歯冠部に特異的に含まれるタンパク質として 22 個のタンパク質が同定された。このうち、既知のタンパク質に相同性を示さない機能未知の新奇タンパク質について，現在機能解析を進めている。

Chitons have a feeding organ called a radula and deposit magnetite (Fe_3O_4) on the cusp of their teeth. To form magnetite teeth, chitons accumulate and deposit more than 100 mg of iron per gram of tissue weight of the radula in a few days. Chitons are the only known eukaryotic organism that concentrates and deposits such a large amount of iron. Elucidation of the mechanism of iron accumulation and deposition in chitons could be applied to the treatment of cancer and neurodegenerative diseases caused by excess iron in the body. It would also lead to the development of an environmentally friendly method of magnetite synthesis using this mechanism. In order to elucidate the mechanism of iron accumulation and deposition by chitons, we first isolated and identified ferritin in the radular tissue. As a result, secreted ferritin, which has a signal sequence and is secreted into the hemolymph, was identified as the major ferritin. Next, a proteomic analysis of the radular tissue was performed to clarify the proteins involved in iron deposition in the cusp. As a result, 22 proteins were identified as magnetite-deposited cusp-specific proteins. Among these proteins, we are currently performing a functional analysis of a novel protein of unknown function that has no homology to known proteins.

biomineralization, chiton, iron

講演番号：2S08A4p-06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:55～ A4 会場

鉄を摂取して健康になるための分子科学

Molecular Science for Good Health by Iron Uptake

○澤井 仁美（長崎大院工）
○Hitomi Sawai (Nagasaki Univ.)

鉄はすべての生物の生命維持に必須の金属元素である。生物は体内で鉄そのものをつくることができないため、食餌や土壌を通して体外から体内に取り込み、運搬・濃度感知・貯蔵を経て、多種多様な重要酵素の機能を制御している。鉄は錯体やイオンの形態で蛋白質中に存在し、その特異な化学反応性（酸化還元・配位子結合など）を活用して、蛋白質のみでは不可能な反応を可能にしている。ヒトの体内には体重 1kg あたり約 70mg の鉄が存在しているが、もとは食物に含まれる鉄を小腸で吸収して獲得したもので、腸管細胞内での運搬・貯蔵を経て、血液を介して各臓器に運ばれ、必要に応じて造血のために利用されている。このような鉄の生体内動態の制御機構を化学的に理解する上で重要なことは、還元鉄（Fe^{2+}）は比較的溶解度が高い形態であるが活性酸素種の産生を促すため細胞毒性を示し、酸化鉄（Fe^{3+}）は難溶だが反応性が低いという性質である。生物は「栄養」にも「毒」にもなる鉄を巧みに利用するために様々な蛋白質を進化させており、それらの蛋白質の制御機構を分子科学の観点で理解することは、鉄を正しく摂取して健康を維持するための新たな道標となると考え、本講演にて紹介する。

Iron is essential to support life. Because all living organisms cannot produce iron themselves within their bodies, so iron is taken into the body from outside the body through food or soil via transport, sensing, and storage, it controls the functions of a wide variety of important enzymes. Iron exists in proteins in the form of complexes and ions, and its unique chemical reactivity (oxidation-reduction, ligand bonding, *etc.*) is utilized to enable reactions that are impossible with proteins alone. Approximately 70 mg of iron exists in the human body per 1 kg of body weight. It is originally obtained by absorbing iron contained in food in the small intestine, and after being transported and stored in intestinal cells, it is transferred to the bloodstream. It is important to understand the regulatory mechanism of the dynamics of iron chemically, because reduced iron is a relatively highly soluble form, but it promotes the production of reactive oxygen species and is therefore cytotoxic. Iron oxide is poorly soluble but has low reactivity. Living organisms have evolved a variety of proteins to utilize iron, which can be both “nutrient” and “poison”. Understanding the regulatory mechanisms of these proteins from a molecular science perspective will help us properly use iron.

Iron, Molecular science, Protein structures

講演番号：2S09B6p-01
講演日時、会場：3 月 25 日 13:52～ B6 会場

非天然化学反応を指向した微生物酵素の探索と遺伝子工学的改変

Genome Mining and Genetic Engineering for the Discovery of Microbial Enzymes Catalyzing Abiotic Chemical Transformation

○加藤 俊介（阪大院工）
○Shunsuke Kato (Osaka Univ.)

昨今の著しいバイオテクノロジーの発展に伴い、酵素や微生物を用いた物質変換（バイオプロセス）は、従来の化学合成プロセスを補完・代替する次世代の反応技術として注目を集めている。我々は、これらバイオプロセスの有用性を非天然の物質変換へと拡張することをめざし、非生物学的な有機化学反応を触媒する酵素の開発に取り組んでいる。本講演では特に、スチレンのシクロプロパン化反応を触媒するヘム依存性酵素の開発について紹介する。

まず初めに我々は、多様なヘム依存性酵素（グロビン、シトクロム P450、ペルオキシダーゼ等）から構成される遺伝子ライブラリを調製し、独自のタンパク質精製系を用いた酵素スクリーニングを実施した。その結果、目的のシクロプロパン化反応に対して優れた触媒活性と立体選択性を示す酵素の同定に成功した。例えば、硫黄酸化細菌 *S. novella* 由来のグロビンは、高い触媒活性（$k_{cat} = 4.9\times10^4$ min^{-1}, $K_M = 3.4$ mM）を示し、目的のシクロプロパン生成物のうちトランス体を立体選択的（>96% de, >98%ee）に与えることが判明した。一方で、放線菌 *S. roseum* 由来のグロビンは、興味深いことに熱力学的に不利なシス体を立体選択的（>96% de, >98% ee）に与えることが明らかとなった。

また、上記の研究に加えて、近年我々は NHC ラジカル反応を触媒する FAD/ThDP 依存性酵素の同定にも成功したので、本講演で合わせて紹介したい。

One of the main challenges associated with biocatalysis is to expand the catalytic repertoire of enzymes to meet the requirements of synthetic chemistry. In this presentation, we will talk about our recent progress about the discovery of novel enzymes which promote a series of abiotic chemical transformations, particularly transition metal-catalyzed cyclopropanation reactions.

We fist constructed a gene library which includes a variety of heme-dependent enzymes, such as globins, cytochromes P450s, and peroxidase. The library was then subjected to the screening based on our previously reported purification systems. After the screening, several promising enzymes with outstanding catalytic activity and stereo-selectivity were successfully identified, which finally realized stereo-divergent synthesis of cyclopropanes from simple styrene.

In addition, our group recently discovered a unique FAD/ThDP-dependent enzyme which promotes biocatalytic NHC radical reactions. The details will be also included in this presentation.

biocatalysis, enzyme, hemoprotein

講演番号：2S09B6p-02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:15～ B6 会場

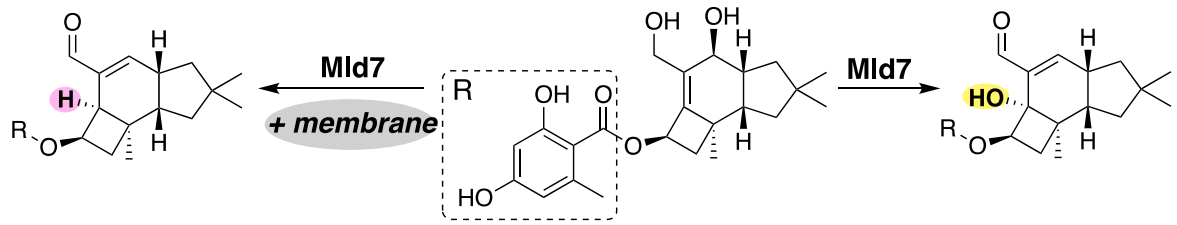
キノコが生産するメレオライド類の構造多様化戦略
Structural diversification mechanism of mushroom-producing melleolides

○南 篤志（北大院理）
○Atsushi Minami (Hokkaido Univ.)

Melleolide 類は，キノコが生産する代表的なセスキテルペンの一種である。コンパクトな 5-6-4 環性骨格に複数の酸素官能基やオルセリン酸が導入された特徴的な化学構造を有しており，70 種類以上もの類縁体が単離されている。麹菌を宿主としたバイオ合成，組み換え酵素を用いた in vitro 解析などを用いてその生合成経路を解明したところ，１）当初は予期していなかった短鎖脱水素酵素・還元酵素（SDR）ファミリーに属する酵素による C5 位水酸基の立体反転，２）フラビン依存性酸化酵素が触媒する酸化反応を起点とした二重結合の移動が melleolide 類の構造多様性を創出する上で鍵となっていることを明らかにした。後者については，「細胞膜との相互作用の有無により，反応で利用される求核剤が変化する」という興味深い反応であることも実験的に証明した（**Scheme 1**）。本シンポジウムでは生合成経路の詳細を発表するとともに，遺伝子情報に基づいた melleolide 類の構造予測の可能性についても議論したい。

Melleolides, which consist of more than 70 derivatives, possess intact protoilludane skeletons (5-6-4 tricyclic ring system) with multiple hydroxy groups and an orsellinic acid moiety. To elucidate their characteristic structural diversification mechanism, we conducted biosynthetic studies through heterologous expression and in vitro enzymatic reactions. The biosynthesis involves following reactions (**Scheme 1**); 1) the cytochrome P450 catalyzing stepwise hydroxylation and a stereochemical inversion process at C5 position and 2) an oxidation-triggered double-bond shift accompanying dehydration and acyl-group-assisted substitution with two different nucleophiles. In particular, the product distribution in the latter reaction is regulated by the interaction with the cell membrane. The details will be discussed in this symposium.

Scheme 1. 細胞膜との相互作用により制御されるフラビン依存性酸化酵素（Mld7）の反応



melleolides, structural diversification, mushroom

講演番号：2S09B6p-03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:38～ B6 会場

生物オミクス情報を利用した新規二次代謝生合成クラスの発見

Discovery of novel secondary metabolite biosynthetic class using biological omics data

○梅村 舞子（産総研生物プロセス）
○Maiko Umemura (AIST)

微生物は生理活性を有する様々な二次代謝産物を産生するため、医農薬品の貴重なリソースとして長く研究されてきた。21 世紀に入ってからは、シークエンシング技術のハイスループット化に伴い、微生物ゲノム情報から新規二次代謝生合成経路とその化合物を同定する研究が展開されている。その中で我々は、生物オミクス情報を有機的に組み合わせて情報解析することで、機能している二次代謝遺伝子クラスターを機能モチーフ情報を用いずに同定する手法を開発し、糸状菌においてそれまで知られていなかった、翻訳後修飾経路によるペプチド化合物の生合成経路を見出すことに成功した。この経路の発見により、これまで生合成経路の分かっていなかったカビ毒 phomopsin や victron が同じ生合成クラスの化合物であることが分かっただけでなく、ゲノムマイニングにより推定した同生合成クラスの遺伝子クラスター情報から新規環状ペプチドを見出すなど、糸状菌によるペプチド化合物生合成に関する新たな知見につながった。本講演では、本生合成クラスおよび化合物の特徴や性質について述べるとともに、最近新たに取り組んでいる機械学習を利用した新規二次代謝生合成遺伝子クラスターの生成（設計）技術についてご紹介する。

Bacteria and fungi are rich repository of bioactive compounds as they produce thousands of different secondary metabolites with complex chemical structures. According to the development of the next generation sequencing technologies in the 21st century, genome mining of secondary metabolite biosynthetic pathways from microorganisms became one of the major methodologies to find novel bioactive compounds. We developed the new bioinformatics algorithm to analyze genome sequences in combination with transcriptomic data, which allows us to detect functional gene clusters without using any sequence motif information. By using this method, we successfully identified the biosynthetic pathway of the cyclic peptide ustiloxin in the filamentous fungi *Aspergillus flavus*, which turned out to be the first example of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide (RiPP) biosynthetic pathway in *Ascomycetes*. This class of pathway is widely conserved but highly diverse in fungi. In this presentation, the features of this biosynthetic class and the possibility of application will be described.

natural compound biosynthesis, fungal cyclic peptide, bioinformatics

講演番号：2S09B6p-04
講演日時、会場：3 月 25 日 15:01～ B6 会場

タンパク質の構造ダイナミクスを予測可能とする物理学理論の開発

Development of physical theories for predicting protein conformational dynamics

○新井 宗仁[1,2,3]、大岡 紘治[2]、劉 潤晶[1]、加藤 沙愛[1]、長井 駿[3]([1]東大院総文、[2]東大教養、[3]東大院理)
○Munehito Arai[1,2,3], Koji Ooka[2], Runjing Liu[1], Sae Kato[1], Shun Nagai[3] ([1]Dept. Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Col. Arts and Sci., Univ. of Tokyo, [3]Dept. Phys., Univ. of Tokyo)

多くのタンパク質は、特定の立体構造へとフォールディングした後、構造をダイナミックに変化させることによって機能を発揮する。このようなタンパク質の構造ダイナミクスを理論的に予測可能とすることは、タンパク質のフォールディング問題を解決するだけでなく、有用酵素の開発などにも直結しうる。近年、AlphaFold によってタンパク質の立体構造は正確に予測可能になったが、タンパク質が特定の構造へと折りたたまれていく過程の正確な予測は長年の未解決課題だった。この問題を解決しうる有望な統計力学理論として Wako-Saitô-Muñoz-Eaton（WSME）モデルがあり、タンパク質の天然構造を指定すると、その形へとフォールディングしていく経路を示す地図（自由エネルギー地形）を描くことができる。しかし、WSME モデルは小型タンパク質にしか適用できないという問題があった。そこで我々はこの理論を大幅に拡張し、小型から大型まで、あらゆるタンパク質のフォールディング過程を予測可能な新たな理論（WSME-L モデル）を開発した。この理論はジスルフィド結合の形成を伴うフォールディング反応にも適用できる。さらに現在、結合反応や酵素反応にも適用可能な理論への拡張を行っている。本研究の成果は、タンパク質のフォールディング反応機構の解明だけでなく、フォールディングしやすいタンパク質の開発や、酵素反応を効率化させた変異体の理論的設計などにも応用可能と期待される。

Many proteins fold into a specific structure and then perform their functions through conformational changes. Accurate prediction of protein conformational dynamics will solve the protein folding problem and can be applied to the design of useful enzymes. Recently, protein native structures can be accurately predicted using AlphaFold, but the accurate prediction of protein folding processes remains unsolved. A promising theory that could solve this problem is a statistical mechanical model called the Wako-Saitô-Muñoz-Eaton (WSME) model. Given a native protein structure, the model provides a map (free energy landscape) showing folding pathways and intermediates. However, the application of the model has been limited to small proteins. Here, we have developed a new theory (WSME-L model) that can predict the folding processes of any protein, from small to large, even including disulfide bond formation. Furthermore, we are currently extending the theory to include binding and enzymatic reactions. Our method will be useful for the theoretical design of foldable proteins and enzymes with high catalytic efficiency.

protein folding prediction, conformational dynamics, enzyme dynamics

講演番号：2S09B6p-05
講演日時、会場：3 月 25 日 15:24～ B6 会場

RiPPs アナログを用いた中分子創薬

Development of middle-molecular drugs based on RiPP analogues

○尾仲 宏康（学習院大理）
○Hiroyasu Onaka (Gakushuin Univ.)

中分子化合物は分子量 1,000～3,000 程度の化合物を指し、ペプチドなどがその範疇に入る。このサイズの化合物を薬に利用するといくつかの利点が得られるため、近年中分子創薬が次世代の創薬手法として注目を集めている。中分子化合物は抗体に匹敵するターゲット認識を付与できるが、発酵生産や有機合成によって生産するため、低分子化合物並みに安価で提供することができる。私たちは放線菌が生産するチオペプチドの一種であるラクタゾールをベースに、様々な類縁体を創製し、創薬に利用できるリード化合物の創出を目指している。

チオペプチドは 10～20 残基からなるペプチド化合物であり、一部のアミノ酸は翻訳後修飾を受けて、アゾール環やデヒドロアラニンを形成している。また、大環状構造をとり、その要の部分にはピリジン環を有している。これらの翻訳後修飾構造は分子の構造安定性に寄与するため、重要である。チオペプチドは RiPPs に属し、前駆体ペプチドがあらかじめ遺伝子としてゲノム内にコードされており、リボソームによって翻訳後に修飾を受けて生合成される。そのため前駆体ペプチド遺伝子の改変により様々なチオペプチド類縁体を作ることができ、これらは発酵生産によって大量調製することが可能である。本講演ではラクタゾールをベースとした中分子創薬について概説したい。

Medium-molecular compounds have a molecular weight ranging from 1,000 to 3,000, which includes peptides. Medium-molecular weight compounds can provide target recognition similar to that of antibodies. They can also be produced through fermentation, making them cost-effective like low-molecular weight compounds. The objective is to create different analogs based on lactazoles, a type of thiopeptide produced by actinomycetes, to develop lead compounds for drug discovery. Thiopeptides are peptide compounds composed of 10-20 residues. Some amino acids undergo post-translational modification to form azole rings and dehydroalanine, resulting in a macrocyclic structure with a pyridine ring. These modifications enhance the structural stability of the molecule. Thiopeptides are a type of RiPPs. The precursor peptides are encoded as genes in the genome and are translated by ribosomes. Finally, post-translational modification was carried out. Therefore, various thiopeptide analogs can be produced by modifying the precursor peptide gene, and these can be prepared in large quantities by fermentation production. I would like to give an overview of lactazole-based middle-molecular drug development.

thiopeptide, biosynthesis, Streptomyces

講演番号：2S09B6p-06
講演日時、会場：3 月 25 日 15:47～ B6 会場

Potentials of microbial synthetic biology for the production of fine and speciality chemicals
○Eriko Takano (The University of Manchester)

The Takano group aims to design and construct micro-organisms with new functionalities by exploiting synthetic biology for metabolic engineering in the context of chemical production. The target chemicals can be exploited as pharmaceuticals, e.g., antibiotics (Breitling et al., *FEMS Microbiol Lett*. 2021), or as signalling molecules in an engineered microbiome (Connolly et al., *Nat. Prod. Rep*. 2022). As a first step towards re-engineering the biochemical pathways for enhanced productivity and diversity, we are developing tools for the various steps of the "Design/ Build/ Test/ Learn" cycle of microbial synthetic biology.

We are expanding our collection of "Design" tools: computational tools for the detection and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters, and to enrich our library of parts and building blocks for pathway engineering (Del Carratore et al., *Commun Biol* 2019). We "Build" enzyme libraries with the aim to understand the interchangeability of biosynthetic parts and have designed and assembled pathways using these parts (Cummings et al., *PLOS Biol,* 2019). We "Test" and debug our engineered microbes using high-resolution MS analysis, (Nitta et al., *Front Bioeng Biotechnol* 2020). In the final step, we close the design cycle and "Learn" the rules for efficient design (Jervis et al., *ACS Synth Biol* 2018).

By exploiting these new tools in an integrated Design/Build/Test/Learn cycle, the Manchester Synthetic Biology Research Centre, SYNBIOCHEM, provides a platform for the high-throughput engineering of fine and speciality chemicals production in microbial systems (Carbonell et al., *Communications Biology* 2018; Robinson et al., *Metab Eng* 2020; Yiakoumetti et al., *Front. Bioeng. Biotechnol* 2023). This DBTL cycle is further exploited for developing antibiotic high-producer strains of actinomycetes (Del Carratore et al., *mSystems* 2021; Hanko et al., *Curr. Opin. Biotechnol* 2022) and signalling molecules in engineered *Streptomyces* microbiomes (Connolly et al., *Nat. Prod. Rep*. 2022).

synthetic biology, fine chemicals, microbial

講演番号：3S10A2a-01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A2 会場

学術変革領域（A）「潜在空間分子設計」領域概要と研究計画

Overview of Latent Chemical Space Based on Diverse Natural Products for Bio-active Molecular Design

○菊地 和也[1,2] ([1]阪大院工、[2]阪大免フロ)
○Kazuya Kikuchi[1,2] ([1]Osaka Univ. Grad.School Engineering, [2]Osaka Univ. IFReC)

天然物（第１）と合成化合物ライブラリー（第２）という２つの化合物リソースを活用した生物活性分子の発見・同定は、化学と生物学の融合分野であるケミカルバイオロジー研究推進の駆動力となってきた。本領域では、これらに続く第３のリソースを提案する。この第３のリソースは、天然物の生物活性データを基に深層学習技術によって構築される化合物潜在空間（Latent Chemical Space）からバーチャルに創成され、強固な有機合成技術で実空間に具現化されるものである。この実現に向け、ケミカルバイオロジー、情報科学、有機合成の３班構成による「サイバー生物活性分子デザインラボ」を始動する。この第３のリソースから創出される化合物を起点とし、新しい生命機能解明や医薬・農薬シーズに結び付く画期的分子を高効率に開発できる生物活性分子デザイン法の新学理構築を目指す。

The discovery and identification of biologically active molecules using two compound resources, natural products (first) and synthetic compound libraries (second), has been a driving force in promoting chemical biology research, a field that integrates chemistry and biology. In this area, we propose a third resource to follow these two. This third resource will be virtually generated from the Latent Chemical Space, which is constructed by deep learning technology based on biological activity data of natural products, and will be realized in real space using robust organic synthesis technology. To achieve this, the Cyber Bioactive Molecular Design Laboratory will be launched, consisting of three groups: Chemical Biology, Information Science, and Organic Synthesis. The goal is to construct a new science of bioactive molecular design method that can efficiently develop innovative molecules that lead to the elucidation of new biological functions and seeds for pharmaceuticals and agrochemicals, starting from the compounds created from this third resource.

Chemical Biology, Latent Chemical Space, Natural Product Chemistry

講演番号：3S10A2a-02
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A2 会場

放線菌が生産する熱ショック代謝物（HSM）のケミカルバイオロジー

Chemical biology of heat shock metabolites (HSM) produced by actinomycetes

○齋藤 駿、荒井 緑（慶應義塾大院・理工）
○Shun Saito, Midori Arai (Grad. Sch. Sci. Tech., Keio Univ.)

近年、放線菌の二次代謝物生合成遺伝子の多くは、通常の培養条件下では発現しない休眠遺伝子と考えられている。そのためこれらの活性化方法は、新規生物活性分子の取得を推進し、化合物潜在空間を拡充させることができる。これまでの放線菌の代謝物解析においては、その多くが土壌環境中に生息していることから、常温（約 30 ℃）で培養することが定石であった。一方我々は、放線菌を高温（45 ℃）培養することにより、代謝系を撹乱・覚醒させ、前例のない新規物質の取得を試みてきた。これまでに、研究室保有の放線菌 3,160 株から、高温でも生育可能な放線菌を探索したところ、57 株を取得することに成功した。さらに、これらの代謝物の差異解析を行ったところ、約 6 割において常温では生産されない高温培養特異的代謝物が検出された。我々はこのような代謝物を「熱ショック代謝物（Heat Shock Metabolites（HSM））」と命名した。本講演では、これまでに我々が発見した HSM、及び、それらの創薬やケミカルバイオロジーへの応用について紹介する。一方、このような休眠遺伝子の活性化により産生された代謝物には生理機能が存在することが予想されるが、その多くの機能性は明らかにされていない。我々が発見した HSM においては、放線菌の高温耐性に関与する結果が得られてきているため、HSM の生理的意義やその作用機序についても議論したい。

In recent, many of the secondary metabolite biosynthesis genes in actinomycetes are considered to be silent genes that are not expressed under normal culture conditions. Therefore, these activation methods can promote the acquisition of novel biologically active molecules and expand the chemical latent space. We have attempted to obtain unprecedented substances by cultivating actinomycetes at high temperature to disturb and awaken their metabolic systems. The differential analysis of these metabolites revealed that approximately 60% of the actinomycetal strains produced metabolites specific to high-temperature culture that are not detected at normal temperature. We named these metabolites "Heat Shock Metabolites (HSM)". In this presentation, we will introduce the HSMs we have discovered and their applications to drug discovery and chemical biology. Furthermore, we will also discuss the physiological significance of HSMs and their mode of action, since the results have been obtained that they are involved in thermotolerance of actinomycetes.

Actinomycetes, Heat shock metabolite (HSM), Silent biosynthetic gene

講演番号：3S10A2a-03
講演日時、会場：3 月 26 日 10:30～ A2 会場

植物ホルモン類縁体ライブラリーを用いる天然物ケミカルバイオロジー

Natural Products Chemical Biology Using Chemical Library of a Plant Hormone Analogues

○上田 実（東北大院理）
○Minoru UEDA (Tohoku University)

植物ホルモンは、植物のほとんどの生理機能を調節する生物学的に活性な天然産物である。そのため、植物ホルモンは多種多様な生物学的応答を制御することができる。植物ホルモン(3*R*, 7*S*)-jasmonoyl-L-isoleucine（JA-Ile）は 「天然 PROTAC 分子」として働き、F-box タンパク質 COI1 と転写抑制因子 JAZ との間のタンパク質-タンパク質相互作用を誘導し、遺伝子発現を制御する。シロイヌナズナでは、1 つの COI1 タンパク質と 13 の JAZ タンパク質（JAZ1-13）が存在し、これらの組み合わせにより 13 の共受容体サブタイプが生じる。今回の講演では、望む植物応答を選択的に活性化するためのサブタイプ選択的な分子接着剤の開発を中心に紹介する。

我々は過去に、2/13 の受容体サブタイプ（COI1-JAZ9&10）に選択的な合成分子接着剤の開発を報告した。今回、JA-Ile のミミック天然物である coronatine（COR）の立体異性体ライブラリーを構築し、受容体サブタイプに対する選択性をスクリーニングした。この化合物スクリーニングから、単一の受容体サブタイプ（COI1-JAZ9）に特異的な合成分子接着剤を開発した。この合成分子接着剤を用いて、冗長性の高い共受容体ファミリーにおいて、単一サブタイプ（COI1-JAZ9）に特異的に誘導されるシグナル伝達経路の解明と制御に初めて成功した。

Plant hormones are biologically active natural products that regulate most physiological functions in plants. There are from a dozen to more than 100 different receptor subtypes for a single plant hormone in individual plants, thus plant hormones can regulate a wide variety of biological responses. A plant hormone(3*R*, 7*S*)-Jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile) acts as a "natural PROTAC molecule" and induces a protein-protein interaction between the F-box protein COI1 and the transcriptional repressor JAZ, to regulate gene expressions. In *Arabidopsis thaliana*, there is one COI1 protein and 13 JAZ proteins (JAZ1-13), which in combination give rise to 13 co-receptor subtypes. The goal of our study is to develop a molecular glue of subtype selectivity to selectively activate the desired plant responses.

Previously, we reported the development of synthetic molecular glue selective for 2/13 receptor subtypes (COI1-JAZ9&10). Currently, we have constructed a library of stereoisomers of coronatine (COR), a mimic natural product of JA-Ile, and screened their selectivity for receptor subtypes. From this chemical screening, we developed the synthetic molecular glue specific to a single receptor subtype (COI1-JAZ9). Using this synthetic molecular glue, we also succeeded for the first time in elucidating and regulating a single subtype (COI1-JAZ9) specifically induced signaling pathway in a severely redundant co-receptor family.

plant hormone, jasmonates, chemical library

講演番号：3S10A2a-04
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A2 会場

天然物ケミカルバイオロジーを加速する深層学習技術基盤

Accelerating natural product chemical biology with deep learning technology platform

○大上 雅史（東工大情報理工）
○Masahito Ohue (Tokyo Tech)

天然物ケミカルバイオロジーの発展によって、天然物から革新的な生物活性分子が見出されてきた。これら天然物の多くは経口医薬品に関するリピンスキーの Rule-of-Five 則を満たさず、Rule-of-Five の外の空間、すなわち Beyond Rule-of-Five に位置する。従来の情報科学・深層学習技術はこの Beyond Rule-of-Five 化合物に対して充分な性能を持っておらず、より多様な化学構造・モダリティを扱える計算技術が必要である。本講演では、最新の深層学習技術を中心に、広大なケミカルスペースを自在に探索するための羅針盤とも言える情報科学技術の研究成果を紹介する。AI 分子生成モデルによる化合物設計や、AlphaFold を活用した標的結合ペプチド設計、自由エネルギー摂動法シミュレーションによる精密な天然物誘導体の設計などの事例から、Beyond Rule-of-Five 空間に眠る革新的天然物の発見・機能解明に向けて、天然物ケミカルバイオロジー研究に情報科学がどのように貢献できるか議論できれば幸いである。

With the advancement of natural product chemical biology, many innovative bioactive molecules have been discovered from natural products. However, many of these natural products do not conform to Lipinski's "Rule-of-Five," placing them in the Beyond Rule-of-Five chemical space. Current computer science and deep learning technologies struggle to sufficiently analyze compounds in this Beyond Rule-of-Five space, necessitating the development of computational techniques capable of handling more diverse chemical structures. Here, I will introduce the research achievements in computer science technology as a compass for exploring the vast chemical space, focusing on the latest deep learning technologies. Through examples such as molecular design using generative AI, target-binding peptide design using AlphaFold AI, and precise natural product derivative design using free energy perturbation simulations, we will discuss how computer science can contribute to the discovery and functional elucidation of natural products in the Beyond Rule-of-Five chemical space in the field of natural product chemical biology.

deep learning, molecular simulation, in silico molecular design

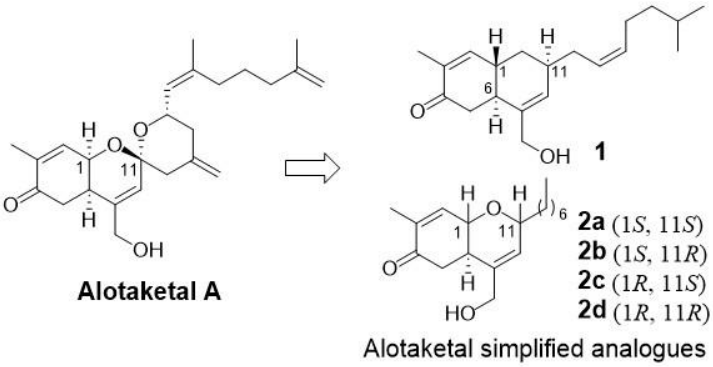
講演番号：3S10A2a-05
講演日時、会場：3 月 26 日 11:30～ A2 会場

アロタケタール類の単純化アナログの設計、立体異性体の系統的合成と PKC 結合活性

Design, synthesis, and PKC binding activity of simplified alotaketal analogs

○塚野 千尋（京大院農）
○Chihiro Tsukano (Kyoto Univ.)

セリンスレオニン特異的リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) は、がんやエイズなどの難治性疾患の治療標的として注目されている。最近、榊原（慶大理工）らと共同で機械学習モデルを用いた PubChem データベースのスクリーニングにより、海綿由来のアロタケタール類 [1] が新規 PKC リガンド候補化合物であると予測した。実際にアロタケタールの単純化アナログ **1** を設計・合成したところ、PKC アイソザイム C1 ドメインに対して結合することが明らかとなった [2]。さらに、1 位および 11 位炭素の立体配置が PKC アイソザイム結合能に与える影響を明らかにすることを目的として、スピロケタール構造を簡略化した単純化アナログ **2a**-**2d** を設計して合成した [3]。本講演では、アナログ **2a**-**2d** の系統的合成、および、それらの PKC アイソザイム C1 ドメインに対する結合試験の結果について、その詳細を紹介する。



Protein kinase C (PKC), a serine/threonine kinase, has garnered attention as a potential therapeutic target for diseases such as cancer and AIDS. Recently, we utilized a machine learning model to screen the PubChem database and identified alotaketals[1] as potential candidates for novel PKC ligands. Subsequently, we designed and synthesized a simplified analogue **1** of alotaketals A, and found its binding ability to the PKC isozyme C1 domain.[2] To further elucidate the impact of stereo configuration on isozyme selectivity, analogues **2a**-**2d**, were designed, synthesized, and evaluated, featuring a simplified spiroketal structure.[3] This presentation will introduce the details of these studies.

1) Forestieri, R. Merchant, C. E.; de Voogd, N. J.; Matainaho, T.; Kieffer, T. J.; Raymond J. Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5166–5169.
2) Maki, J.; Oshimura, A.; Tsukano, C.; Yanagita, R. C.; Saito, Y.; Sakakibara, Y.; Irie, K. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 6693–6696.
3) Okuda, S.; Tsukano, C.; Irie, K. *Org. Lett.* **2023**, *25*, 805–809.

structure activity relationship, alotaketals, protein kinase C (PKC)

講演番号：3S11A3a-01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A3 会場

「SDGs に貢献する極限環境微生物の先端科学」シンポジウム開催にあたって
In holding a cutting-edge scientific symposium on extremophiles contributing to SDGs

○伊藤 政博（東洋大生命科）
○Masahiro Ito (Toyo Univ.)

微生物は、増殖が速く、環境適応能力に優れ、極限環境（熱水、強酸性、強アルカリ性、飽和食塩水、高濃度環境汚染物質、 超高圧、超高温など）下で生存できる極限微生物が近年の研究で多数発見されている。 このような極限環境で生き抜いている極限環境微生物が持つ特殊な能力や酵素を新たな生物資源として産業的に利用しようとする研究が盛んにおこなわれ、バイオテクノロジー分野のみならず産業界で果たす役割が年々拡がっている。今回のシンポジウムでは、注目され続けている極限環境微生物について取り上げ、この分野で活躍される若手・女性研究者に登壇いただき、極限環境微生物の先端技術と知見を社会に還元し SDGs が掲げる目標に貢献する研究テーマを取り上げて議論を深めたいと考えている。本シンポジウムは、極限環境生物学研究のシンポジウムということで国内の極限環境生物学会の協賛をいただいて実施したいと考えている。

Microorganisms, known for their rapid reproduction and exceptional environmental adaptability, include extremophiles that can survive in harsh conditions such as hydrothermal vents, strong acids, strong alkaline, saturated brine, high environmental pollutants, extreme pressure, and high temperatures. Recent research has discovered many such extremophiles. Studies are being conducted to industrially utilize the unique abilities and enzymes of these extremophiles thriving in extreme environments. Their role in biotechnology and industrial fields is expanding yearly. This symposium focuses on extremophiles, which continue to attract attention. It aims to feature young and female researchers active in this field, discussing cutting-edge technologies and knowledge of extremophiles and how these contribute to the goals set by the Sustainable Development Goals (SDGs). This symposium is planned with the sponsor of the Japanese Society for Extremophiles, emphasizing its focus on extremophile biology research.

extremophiles, Sustainable Development Goals (SDGs), Biotechnology

講演番号：3S11A3a-02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:35～ A3 会場

新たなフロンティア：高度好塩性古細菌が切り開く塩類集積土壌での持続可能な有用物質生産
New frontiers: Sustainable production of valuable substances in salt-affected soils by extremely halophilic archaea
○八波 利恵（東京工業大学）
○Rie Yatsunami (Tokyo Tech)

現在，気候変動や不適切な灌漑により，“塩類集積土壌（土壌表層に塩類が集積した土壌）”が毎年世界で数 100 万ヘクタール発生している。この土壌は，多量の塩（特にナトリウムイオン）と重金属（銅，ニッケル，カドミウムなど）により植物の生育障害が起こり，砂漠化へと進行する。そのため，地球規模で大きな問題となっている。

高度好塩性古細菌は，高濃度の塩を好み，塩化ナトリウム濃度が 2.5-5.2 M の環境で生育する。また本菌は重金属耐性も有することが知られているため，塩類集積土壌でも良好に生育すると考えられる。これより，本菌による有用物質の生産は，これまで不毛の地とされてきた塩類集積土壌を新たな産業の場に変革する可能性が考えられる。当研究室では，これまでに高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* による有用物質生合成に関する研究を進めてきた。*H. japonica* は高い抗酸化活性を有するカロテノイド，バクテリオルベリンを合成し，その生合成経路が解明された。また，本菌菌体内に極めて短い分岐をもつ高重合度グルカンの存在も明らかにされた。本講演では，これまでの研究成果を踏まえ，*H. japonica* によるカロテノイド，高重合度グルカンおよびポリヒドロキシアルカン酸（PHA）の生合成経路と今後の展望について紹介する。

Currently, due to climate change and improper irrigation, 'Salt-affected soils' (soils with salt accumulation in the surface layer) are occurring annually on millions of hectares worldwide. This soil, affected by substantial amounts of salt (especially sodium ions) and heavy metals (copper, nickel, cadmium, etc.), leads to plant growth disorders and progresses to desertification. Extreme halophilic archaea thrive in high-salt environments, with a preference for salt concentrations ranging from 2.5 to 5.2 M sodium chloride. Additionally, these archaea are known for their resistance to heavy metals, suggesting their potential for robust growth in saline-affected soils. Thus, it is anticipated that the utilization of these archaea for the production of valuable substances could turn the previously barren saline-affected soils into a new industrial opportunity.

We have been conducting research on the biosynthesis of valuable substances by the extreme halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. In this presentation, based on our previous research findings, we will introduce the biosynthetic pathways of carotenoids, highly branched α-glucan, and polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *H. japonica*, along with future prospects.

Salt-affected soils, Extremely halophilic archaea, *Haloarcula japonica*

講演番号：3S11A3a-03
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A3 会場

南極産菌類の産業利用への挑戦

The challenge of developing new research fields using Antarctic fungi

○辻 雅晴[1,2] ([1]旭川工業高等専門学校、[2]国立極地研究所)
○Masaharu TSUJI[1,2] ([1]National Institute of Technology (KOSEN), Asahikawa College, [2]National Institute of Polar Research (NIPR))

南極域の中でも特に環境の厳しい大陸性南極は、冬季には-90℃を下回ることもある極度の乾燥と低温に晒された地球上で最も過酷な環境の 1 つである。このように世界で最も過酷な環境の 1 つである大陸性南極からは 300 種以上の菌類が報告されている。

筆者は、南極の昭和基地がある東オングル島と、そこから約 60 km 離れたスカルブスネス露岩域の 2 地点における菌類の多様性調査を行った。その結果、2013 年から 2022 年までの 10 年間で、昭和基地周辺から報告した菌類の種数は 16 種から 77 種へと約 4.8 倍まで増加した。これは南極の中でも特に環境が厳しい大陸性南極から報告されている菌類の約 1/4 を占めており、南極産菌類の分野で世界トップクラスの成果を残している。

これらの南極産菌類は、氷点下でも成長が可能なことから、新たな微生物資源として期待されている。しかし日本では、南極産菌類を利用した産業利用の例は無かった。

本講演では、筆者による南極・昭和基地周辺における菌類調査、さらにこれらの菌類を利用した酪農排水処理、酒類の醸造、油脂生産など産業利用を挑戦についてお話ししたい。

The continental Antarctic, one of the harshest environments on Earth, is subjected to extreme dryness and cold temperatures that can fall below -90°C in winter. More than 300 species of fungi have been reported from continental Antarctica.

We conducted a survey of fungal diversity at two sites in Antarctica: East Ongul Island, where the Syowa Station is located, and the Scarvsnes ice-free area, about 60 km away from the Syowa Station. As a result, the number of fungal species reported from near the Syowa Station increased from 16 to 77 over a 10-year period from 2013 to 2022, an increase of approximately 4.8-fold. This represents about 1/4 of the fungi reported from continental Antarctica, where the environment is particularly harsh, and is a world-class achievement in the field of Antarctic fungi.

Since these Antarctic fungi can grow even at sub-zero temperatures, they are expected to become a new microbial resource. However, they were not yet being applied use in Japan.

In this symposium, I would like to talk about fungi surveys near the Syowa Station and the challenges of using these fungi for applied applications such as dairy wastewater treatment, sake brewing, and bio-diesel production.

Antarctic fungi, Bio prospecting, applied research

講演番号：3S11A3a-04
講演日時、会場：3 月 26 日 10:30～ A3 会場

放射線抵抗性細菌由来 DNA 修復促進タンパク質の耐熱化

Enhancing the thermostability of DNA repair promoting protein from a radio-resistant bacterium

○久保 彩、鳴海 一成（東洋大・生命）
○Aya Kubo, Issay Narumi (Life Sci., Toyo Univ.)

Deinococcus radiodurans は独自の DNA 修復機構をもつ放射線抵抗性細菌である。当該機構の中心的な役割を担う PprA は DNA の二本鎖切断部位に結合・保護する働きをもつ。PprA はまた T4 DNA ligase の反応を促進するなど産業利用への応用が期待できる特徴をもつ。そこで本研究では安定性向上のため耐熱性 PprA の獲得および機能解析を目的とした。初めに部位特異的変異導入法により作製した変異 PprA を熱処理後に直鎖状二本鎖 DNA と反応させ、アガロースゲルシフトアッセイにより耐熱性を比較した。結果、野生型は 90°C、30 分間の熱処理により DNA 結合能を失うが、2 時間以上の熱処理でも結合能を維持し続けている 2 つの変異体を取得した。これらの変異体は野生型よりも長期保存性が高く、野生型と同程度まで TA クローニング効率を向上させることも明らかになった。さらに、PprA を発現する高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、DNA 二本鎖切断を誘導するアルキル化剤であるマイトマイシン C への耐性が向上した。今後は好熱菌内での分子進化によるさらなる耐熱性 PprA の獲得および高温条件下での各種酵素への補助機能の有無を調べていく予定である。

Deinococcus radiodurans is a radiation-resistant bacterium with a unique DNA repair mechanism. The PprA protein plays a key role in this mechanism by binding to DNA double-strand breaks (DSB) and stimulating the ligation activity of T4 DNA ligase. Since PprA has potential applications in DNA engineering, we aim to increase its thermostability. To achieve this, we performed site-directed mutagenesis to generate PprA-variants and assessed the thermostability using an electron mobility shift assay with linear plasmid DNA after heating it at 90°C. Our results showed that two PprA variants retained their DNA binding activity after heating for two hours, while the wild type (WT) lost it in just 30 min. The mutants also maintained their activity for 30 days after purification, whereas WT was inactivated after just two days. Furthermore, the mutants could stimulate TA-cloning efficiency to the same extent as WT. To confirm the resistance to mitomycin C, a DNA cross-linking agent that induced DSB, we generated *pprA*-expressing *Thermus thermophilus* strains. The mutated PprAs were found to increase the survival of strains compared to WT or strains without PprA. Our future plans include investigating the molecular evolution of PprA in *T. thermophilus* to generate more thermostable variants and to determine whether PprA can enhance enzyme activities under high-temperature conditions.

thermostability, modification, radioresistant

講演番号：3S11A3a-05
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A3 会場

海洋から単離した細菌のリグニン断片分解代謝の解析と応用展開

Analysis of lignin-fragment degrading metabolism in bacteria isolated from the marine sunken-wood and its application

○大田 ゆかり (群馬大食健康センター)
○Yukari Ohta (The Univ. of Gunma)

植物の主要成分の１つであるリグニンの主要分子内結合の切断は，リグニンの生分解における最も重要なステップである。エーテラーゼ系と呼ばれる酵素カスケード反応によるリグニン断片内主要結合の特異的切断は，スフィンゴモナス目細菌が担うリグニン生分解の特徴的な反応の１つである。活性なエーテラーゼ系を持つ細菌には，エーテラーゼ系の最終反応生成物を代謝するための必須遺伝子を欠く株が複数存在する。海洋沈木から単離した *Novosphingobium* sp. MBES04 株はその一例であるが，本菌株がエーテラーゼ系を保有する生理的意義や関連する代謝の制御は不明であった。我々は，本菌株がリグニンに接触した際の遺伝子応答に基づき，エーテラーゼ系による代謝の意義をリグニン断片の存在を感知するためのセンサーと位置付けた。今後，スフィンゴモナス目細菌と植物成分間の相互作用の更なる理解を通じて，リグニンから再生可能な化学物質を生産するための細胞の代謝工学の進展，植物根圏での微生物ー植物間コミュニケーションに関する新知見に繋がることが期待される。

また本講演では，海洋沈木から単離した細菌による植物成分分解酵素の一例として，*Sphingobium* 属細菌の非分泌性フェルラ酸エステラーゼについても併せて紹介したい。

Cleavage of the major intramolecular bonds of lignin, one of the major components of plants, is the most important step in lignin biodegradation. Specific cleavage of the major bonds of lignin fragments by an enzymatic cascade called the etherase system is one of the characteristic reactions in lignin biodegradation that is carried out by *Sphingomonadales* bacteria. Some strains of bacteria with active etherase systems lack the essential genes for metabolizing the major reaction products of the etherase system. *Novosphingobium* sp. strain MBES04, isolated from marine sunken wood, is one such example, but the physiological significance of this strain possessing an etherase system and the regulation of related metabolism were unknown. By investigating the genetic response of this strain when it comes into contact with lignin, we positioned the significance of metabolism by the etherase system as a sensor for sensing the presence of lignin fragments. Further understanding of the interactions between plant components and *Sphingomonadales* strains is expected to lead to metabolic engineering of cells to produce renewable chemicals from lignin and to elucidation of microbe-plant communication in the plant rhizosphere. In this talk, I will also introduce a non-secretory ferulic acid esterase from *Sphingobium* sp. as an example of a bacterial plant-degrading enzyme isolated from a marine sunken wood.

lignin, Sphingomonadales, etherase system

講演番号：3S11A3a-06
講演日時、会場：3 月 26 日 11:30～ A3 会場

環境浄化を目指したプラスチック分解菌の単離

Isolation of plastic-degrading bacteria for environmental purification

○東端 啓貴（東洋大生命）
○Hiroki Higashibata (Toyo Univ.)

マイクロプラスチックによる海洋汚染が、海洋生物、鳥類、人間などへ深刻な悪影響を及ぼす可能性があるとして、近年、世界中で注目されている。最近、雲水中にもマイクロプラスチックの存在が確認され、雨水を介した肺への取り込みや水源の汚染が懸念されており、また、ヒトの血液中からもマイクロプラスチックが検出されている。世界で生産される約 4 億トン/年のプラスチックのうち、再利用されるプラスチックは全体の 2 割にも満たない。年間およそ 800 万トンのプラスチックが海洋へと流れ出ていると考えられている。19 世紀後半に発明されたプラスチックのこれまでの（2017 年までの）累計生産量は、83 億トンと見積もられ、リサイクルされなかった廃プラスチックは 57 億トンにのぼると言われている。そこで、廃プラスチックを生物圏の炭素循環に組み込み、持続可能な循環型社会実現の一助とすることを目的として、様々な環境からのプラスチック分解菌の単離を試みた。ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレートなどを単一炭素源に集積培養を行い、合計 400 株ほどの単離菌を得た。本講演では、これら単離菌のポリエチレン分解能について紹介したい。

Marine pollution by microplastics has been attracting worldwide attention in recent years because of its potentially serious adverse effects on marine organisms, birds, and humans. Recently, the presence of microplastics in cloud water has been confirmed, raising concerns about uptake into the lungs via rainwater and contamination of water sources. Microplastics have also been detected in human blood. Of the approximately 400 million tons of plastic produced worldwide each year, less than 20% is reused. It is believed that approximately 8 million tons of plastic are released into the ocean each year. 8.3 billion tons of plastics invented in the late 19th century have been produced so far (up to 2017), with an estimated 5.7 billion tons of waste plastic that has not been recycled. Therefore, we attempted to isolate plastic-degrading bacteria from various environments with the aim of incorporating waste plastics into the carbon cycle of the biosphere and helping to realize a sustainable, recycling-oriented society. Enrichment culture was performed using polyethylene, polystyrene, polypropylene, polyethylene terephthalate, etc. as a single carbon source, and a total of about 400 isolated strains were obtained. In this presentation, I would like to introduce the polyethylene degradation of these isolates.

Plastic-degrading bacteria, Microplastic, Environmental purification

講演番号：3S12A4a-01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:40～ A4 会場

微生物を対象とした翻訳研究の魅力と将来展望

The fascination and future prospects of “translation” research in microbiology

○髙田 啓[1,2] ([1]京産大・生命、[2]ルンド大学・実験医科)
○Hiraku Takada[1,2] ([1]Kyoto Sangyo Univ., [2]Lund Univ.)

ゲノム DNA にコードされた遺伝情報を正しく読み写し、生物機能を担うタンパク質の発現を保証することは、すべての生命にとって必須なプロセスである。特に、その最終段階である翻訳反応はその主役であるリボソームを含め１００種類以上の因子によって塩基配列をアミノ酸配列へと変換する非常に複雑な反応であり、そのエラー率は DNA 複製・転写反応と比べ高い。またリボソームの生合成を含め、翻訳反応の駆動は細胞内の最大のエネルギー消費過程であり、リボソームの動態は生命の生き様を写す鏡とも言える。さらに、医療分野で用いられる抗菌薬の約３０％はリボソームが標的であることも特筆すべき点である。この曖昧で大食漢、そして脆弱性を秘めた超巨大複合体・リボソームを生命はどのようにハンドリングしているのか？ 遺伝学・生化学的解析を中心に、私がこれまでモデル微生物である枯草菌を用いて行ってきた研究を紹介する。また、このバイオマシーンをデザイン・操作することで、微生物ものづくりに応用展開していくのか、その将来展望に関して議論したい。

Transcription and translation of genetic information encoded in genomic DNA are critical for the expression of proteins that play a central role in biological processes across all forms of life. The final stage of the central dogma, known as "translation," is an intricate process involving over 100 factors, including the essential player ribosome, which converts mRNA nucleotide sequence into amino acid sequence. Translation has a higher error rate than DNA replication and transcription, and it is the most energy-consuming process in the cell, including the biogenesis of ribosome. The dynamics of ribosome can also serve as a reflection of the way of life in a cell. Notably, about 30% of antibiotics used in medicine target ribosome. In this talk, I am pleased to present my research using the model microorganism *Bacillus subtilis* to explore genetically and biochemically how bacteria handle the resource-intensive, ambiguous, and fragile supercomplex ribosome. Moreover, I am looking forward to discussing potential avenues for further research and advancement in this field, with a specific focus on exploring another aspect of the ribosome as a bio-machine capable of producing what we would require.

translation, ribosome, Bacillus subtilis

講演番号：3S12A4a-02
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A4 会場

先端ラマン・赤外分光技術で拓く 1 分子から微生物までの化学分析
Advanced Raman and Infrared Spectroscopy toward chemical analysis of single molecules and microorganisms

○加藤 遼[1,2] ([1]徳島大ポスト LED、[2]理化学研究所)
○Ryo Kato[1,2] ([1]Tokushima Univ., [2]RIKEN)

生体内における分子の機能は，生体分子の化学構造変化や生体分子間の相互作用によって発現・維持している．また，生体内で起こる生命現象や生物の生存戦略には細胞内の分子組成が密接に関連している．我々は，分子の化学構造情報や分子振動情報を直接計測できる振動分光学的手法（ラマン分光や赤外分光）に立脚した先端的な光計測技術の開発をこれまでに行ってきた．振動分光法は，蛍光標識等の処理を必要とせずに，細胞内の分子組成の同定や分子構造を直接観察できる．

本シンポジウムでは，これら先端的な振動分光学法について紹介すると共に，近年我々が精力的に進めている生体 1 分子や微生物計測への応用を中心に報告する．具体的には，1 分子検出感度を有するナノスケールラマン分光法を用いた生体 1 分子機能・構造解析について議論する．加えて，「環境とバイオテクノロジー」領域内での異分野融合研究である，超解像赤外分光顕微鏡による単一細胞解析手法や光合成微生物のバイオフィルムの組成分析に関する研究も報告する．本講演を通して，1 分子から 1 細胞レベルでの化学構造・組成分析が可能な先端光計測手法の，農芸化学分野における重要性や今後の将来展開についても議論する．

Molecular functions in the living system are associated with the structural changes of biomolecules and their intermolecular interactions. The molecular compositions in cells are also intimately linked to biological phenomena and the survival strategies of microorganisms. We have developed advanced technologies based on vibrational spectroscopy (such as Raman and infrared spectroscopy) that directly measure molecular vibrational information. Vibrational spectroscopy allows for the direct observation of molecular compositions within cells without labeling.

In this symposium, I will introduce these cutting-edge vibrational spectroscopic methods and our recent applications on biochemical analysis of single biomolecules and microorganisms. I will discuss biochemical analysis of single molecules using nanoscale Raman spectroscopy, which possesses single molecular sensitivity. Further, I will also show interdisciplinary research started in JST ACT-X, such as single cell analysis and visualization of molecular components in photosynthetic microbial biofilms using super-resolution infrared microscopy. Our demonstration could reflect significance of interdisciplinary research based on our advanced optical spectroscopy in the single molecule to the single-cell level.

Raman spectroscopy, Infrared spectroscopy, super-resolution microscopy

講演番号：3S12A4a-03
講演日時、会場：3 月 26 日 10:20～ A4 会場

有機化学研究室で生物を扱う
Studying living organisms in an organic chemistry laboratory

○宇佐見 享嗣 (名大高等研)
○Atsushi USAMI (Nagoya Univ.)

現在、我々の身の回りに存在する機能性分子の多くは、フラスコ内生産によって合成されている。代表的機能性分子には、エレクトロニクスやエネルギー貯蔵、ヘルスケアに利用され、我が国が世界トップレベルにあるナノカーボン材料が挙げられる。近年、ナノカーボン材料に官能基を付与することで新たな物性や機能の発現が見出され、将来の材料産業や生物医療への応用に向けた基礎研究が活発化している。しかし、位置立体選択性や官能基特異性が求められる分子の合成には多段階化に伴うコストと廃棄物問題が深刻となり、喫緊の課題として新たな反応や反応システムの開発が依然として強く求められている。一方、生体触媒（酵素）による高選択的な化学反応は、フラスコ内生産とは一線を画す反応として生合成や異物代謝分野で独自に発展・進化してきた。そのため、これら生物機能は有機合成化学とは異なる分野として捉えられていることから積極的な利用が立ち遅れ、生体触媒による非天然由来分子の合成や変換は極めて野心的かつクレイジーなテーマである。本発表では、この生物機能を今まさに求められている新物質創製や材料設計に応用した研究を紹介する。

Many of the functional molecules that surround us today are synthesized by in-flask production. Representative functional molecules are nanocarbon materials, which are used in electronics, energy storage, and healthcare, positioning Japan as a frontrunner. Recent years have discovered the development of novel properties and functions by introducing functional groups to nanocarbon materials, and fundamental research for future materials industries and biomedicine is accelerating. However, the burgeoning issues of cost and waste stemming from the intricate multi-step production of molecules necessitating regio- and stereo-selectivity and functional group specificity have reached a critical juncture. The exploration and establishment of pioneering reaction systems constitute indispensable challenges. On the other hand, highly selective reactions by biocatalysis (enzyme) have developed independently in the fields of biosynthesis and xenobiotic metabolism. Therefore, the active utilization of these biological functions for non-naturally occurring molecules has lagged behind, and this topic is a tremendously ambitious and crazy one. In this presentation, the selective functionalization of non-naturally occurring molecules by biotransformation will be reported.

nanocarbon, insect, biotransformation

講演番号：3S12A4a-04
講演日時、会場：3 月 26 日 10:40～ A4 会場

野生イネ遺伝資源を用いた穂形態の多様性創出機構の解明に向けて

Toward the elucidation of the mechanism for generating diversity in the panicle morphology using the wild *Oryza* genetic resources

○縣 歩美[1,2] ([1]名大院生命農学、[2]国立遺伝学研究所)
○Ayumi Agata[1,2] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya U, [2]National Institute of Genetics)

野生イネは多様な環境に生息し生存・繁殖を最適化してきたため、その形態的・遺伝的多様性は植物が示す多様な繁殖戦略を理解するのに適した材料である。特に子孫の数を直接決定する穂形態は、繁殖の最適化において最も重要な要素である。例えば、一年生型の野生イネは一年で枯れてしまうため、種子生産にエネルギーを投資し大きな穂をつける。逆に、多年生型は葉や茎に大量のエネルギーを使い、小さな穂をつける傾向にある。このような生き様の違いが、繁殖戦略、すなわち穂形態の進化を促してきた。したがって、穂形態の多様化を支える遺伝基盤を明らかにすることにより、野生種の繁殖戦略の進化の一端を理解できると考えられる。これまでに我々は、国立遺伝学研究所が保有する野生イネを用いた大規模な穂の形質調査を実施した。その結果、野生種は小さな穂をつけるものが多いが、驚いたことに、野生種にもかかわらず栽培種に引けを取らないばかりか、より大きな穂をつけるものも存在することが明らかになった。この結果は、栽培化というボトルネックを経ていない野生種には、栽培種では機能していない穂形態の多様性創出機構が存在することを意味している。したがって、栽培化の過程で選抜されてこなかった未利用有用形質や遺伝子を同定し、栽培イネの穂形態の新奇制御方法が提案できる可能性がある。本シンポジウムでは、野生イネ遺伝資源が示す多様性を用いて分子遺伝学的手法により、穂形態多様化の分子基盤を解明する試みについて紹介する。

Because wild *Oryza* inhabits diverse environments and has optimized its reproduction, its morphological and genetic diversity is suitable for understanding the diverse reproductive strategies exhibited by plants. Panicle morphology, which directly determines the number of offspring, is the most critical factor in optimizing reproduction. Clarifying the genetic basis underlying panicle morphology diversification may help us understand part of the evolution of reproductive strategies in wild species. Recently, we have conducted large-scale phenotyping on panicle traits using wild *Oryza* genetic resources owned by the National Institute of Genetics. We found that wild *Oryza* shows diverse panicle morphology within species. In this talk, I will present our research to elucidate the molecular basis of panicle morphology diversification using the diversity exhibited by wild *Oryza* genetic resources.

wild *Oryza* genetic resources, panicle morphology, diversity

講演番号：3S12A4a-05
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A4 会場

マイクロ・ナノすきま構造を用いた長鎖 DNA の高速分析

Analysis of large DNA molecules using micro/nanogap structures

○東 直輝（名大院工）
○Naoki Azuma (Nagoya Univ.)

DNA 分子の長さ分析は遺伝子解析のための基本工程の一つである．この方法は人体や環境中の細菌やウイルスの遺伝子型の判別や遺伝子の伝播経路の特定に用いられており，分析の高速化・高感度化が必要とされる．一般的なゲルの網目構造を分子ふるいとして用いるゲル電気泳動法では，検出に多くの DNA 分子が必要な上に，分析時間も長い．特に，細菌の DNA のような 10^5 塩基対以上の長鎖 DNA の長さ分析には数日を要する．これは，長鎖 DNA 分子が通常ランダムコイル状をしており，ゲルの網目構造内を泳動する際に大きく変形することが原因である．すなわち，長鎖 DNA 一分子特有な大きな変形を制御することが分析の高速化のポイントであると考えられる．我々はこれまでに，マイクロ・ナノスケールのすきまや構造を用いて DNA 分子を制御することで長さを分析する方法を開発し，高速で高感度な分析を実現できる可能性を示してきた．本発表では，これまでに開発した DNA 分析法を紹介するとともに，様々な応用への展開について議論したい．

Length analysis of DNA molecules is one of the fundamental processes for the genetic analysis. This method is utilized to identify the genotype of bacteria and viruses, and to identify the gene transfers, requiring faster and more sensitive analysis. Gel electrophoresis, which uses the mesh structure of the gel as a molecular sieve matrix, requires a large number of DNA molecules and a long analysis time. In particular, length analysis of large DNA molecules, which are larger than 10^5 base pairs, requires several days. This is because a large DNA molecule has a random-coiled shape and deforms greatly when it migrates in the gel structure. Therefore, the control and manipulation of the large deformation of large DNA molecule are the key points to realize faster analysis. We have developed the methods for length analysis by controlling and manipulating large DNA molecules using micro- and nano-scale gaps and structures, and have shown the possibility of high-speed and high-sensitivity DNA analysis. In this presentation, we would like to introduce the DNA analysis methods and discuss their applications.

DNA analysis, Micro/Nanofluidics, Micro/Nanofabrication

講演番号：3S12A4a-06
講演日時、会場：3 月 26 日 11:20～ A4 会場

真核微生物の生体膜機能を探る

Exploring functions of biological membranes in eukaryotic microorganisms

○岩間 亮[1,2] ([1] 東大院・農生科・応生工、[2] 東大・微生物連携)
○Ryo IWAMA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

脂質分子には極めて多様な分子種が存在し、生体膜の主要構成成分や細胞内でエネルギー源として使用されるなど、細胞の主要な構成要素の 1 つとなっている。特に、生体膜は細胞と外界、あるいは細胞質と細胞内小器官を区画化する重要な役割を果たす。これまでに、脂質生合成経路や脂質動態に関する研究は、酵母や哺乳動物細胞などのモデル生物を中心に精力的に進められてきたが、非モデル生物における知見はまだ多くない。真核微生物の一種である糸状菌は、長い糸状の細胞形態を特徴とし、その細胞形態から動植物へ侵入する病原菌となる種や、糸状細胞の先端に活発に小胞輸送を行う性質を利用した酵素製剤製造・食品製造に使われる種が存在する。これまでに、我々の研究グループは、糸状菌の生活環における詳細な脂質組成変動を解析するとともに、生体膜脂質組成を人為的に変化させることで糸状菌の形態形成に影響を与えることを見出してきた。本発表では、生体膜を中心とした脂質分子の制御を介した真核微生物の有用形質の制御の可能性を議論するとともに、先端計測技術を分野横断的に生体膜・脂質研究に取り入れることで拓ける発展性についても議論したい。

Lipid molecules are a diverse group of biomolecules that are the primary components of cell membranes and are used for energy storage within cells. In particular, biological membranes play important roles in separating cells from their environment and intracellular organelles from the cytoplasm. Although studies on lipid biosynthesis pathways and lipid dynamics have been intensively conducted mainly in model organisms such as yeast and mammalian cells, it remains limited in non-model organisms. Filamentous fungi, one of the eukaryotic microorganisms, are characterized by long filamentous cell morphology. Some species are pathogens that invade plants and animals, while others are used in the production of enzymes and foods because of their property of active vesicular transport to the hyphal tip. Our research group has analyzed detailed lipid composition variation in the life cycle of filamentous fungi. In addition, we found that artificially altering the lipid composition of biological membranes can affect the morphogenesis of filamentous fungi. Here, I will discuss the regulation of lipid molecules in biological membranes to control useful traits of eukaryotic microorganisms. Furthermore, I will also discuss how advanced measurement techniques can be used in studies of biological membranes and lipids.

lipid, biological membrane, filamentous fungi

講演番号：3S13B6a-01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ B6 会場

栄養素動態学概論
Introduction to Nutrient Dynamics

○永森 收志 (慈恵医大)
○Shushi Nagamori (The Jikei Univ.)

多くの研究者らの努力により、生体における様々な栄養素の役割について多くのことが明らかになってきた。一方で栄養素の吸収、分布、排出については、一部栄養素の定量分析が容易でないこと、動態を制御する生体膜や膜輸送体が研究対象として扱いにくいことなどから、研究が進んでいなかった。ところが近年、分析・解析手法が著しく進歩したことで、栄養素の分子動態解明が可能になりつつある。本シンポジウムでは、農学と医学の領域にて生体における栄養素およびその関連分子の動きに着目してきた異能な研究者らが最新の成果を報告・討議することで、医農による「栄養素動態学」の確立を進める。「栄養素動態学」では、栄養素が体内でどのように吸収、分布、代謝、排泄されるかを研究し、その制御を可能にすることにより、機能性食品開発や臨床での応用を目指す。

Through the diligent efforts of many researchers, significant progress has been made in understanding the roles of various nutrients in living organisms. However, research on nutrient absorption, distribution, and excretion has been less advanced due to difficulties such as the ease of quantitative analysis of certain nutrients and the challenging nature of studying biological membranes and membrane transporters that regulate these processes. Recently, however, significant advancements in analytical and diagnostic methodologies have begun to enable the elucidation of the molecular dynamics of nutrients. Here, INOU researchers focusing on the movement of nutrients and related molecules in living organisms within agriculture and medicine will report and discuss their latest findings, thereby advancing the establishment of 'Nutrient Dynamics' through a collaborative approach in agricultural and medical sciences. 'Nutrient Dynamics' studies how nutrients are absorbed, distributed, metabolized, and excreted within the body, with the aim of enabling the regulation of the nutrient ADME to facilitate the development of functional foods and clinical applications.

transporter, ADME, multiomics

講演番号：3S13B6a-02
講演日時、会場：3 月 26 日 09:32～ B6 会場

A multi-hierarchical approach explores non-canonical transport systems for nutrients
○Pattama WIRIYASERMKUL[1,2,3], Shushi NAGAMORI[1,2] ([1]Cent. of SI Med, Res., Jikei Univ., [2]Dept. of Lab. Med., Jikei Univ., [3]Fac. of Agric., Iwate Univ.)

Nutrients are essential for numerous cellular activities of all organisms. In particular, micronutrients are vital micromolecules for the body although are required in small amounts. The impact of macronutrients and micronutrients in health and diseases has gained a high impact. However, studies of their absorption mechanisms and dynamics are largely unknown. Limitations include the lack of a state-of-the-art strategy for the identification of transporters, the complexity of multiple transporters that may coordinate the transport of a single nutrient, and the difficulty in the detection of trace amounts in cases of micronutrients. Here, we introduced a unique multi-hierarchical approach to investigate transport systems for micronutrients under physiological conditions. The strategy combines multi-omics to analyze metabolites, genes, and proteins, synthetic biochemistry to characterize the transporters, and *ex vivo* transport analyses to reveal the physiological significance of the transporters. As a paradigm, we identified transport systems for D-amino acids, micronutrients which have been found to be a biomarker for kidney diseases. We discovered the coordinate functions of two transport systems, one is amino acid transporter ASCT2, and another is monocarboxylate transporters SMCTs which are non-canonical transporters. Our study sheds light on the importance of non-canonical substrate transport and provides a framework for analyzing nutrient dynamics in general and especially investigating multiple transport systems for micronutrients under physiological conditions and in multifactorial diseases.

nutrient, amino acid, transporter

講演番号：3S13B6a-03
講演日時、会場：3 月 26 日 09:55～ B6 会場

消化管における胆汁酸吸収実態

Bile acid absorption in the gastrointestinal tract

○小林 彰子（東大院農）
○Shoko Kobayashi (The Univ. of Tokyo)

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成されて腸管に分泌された後、小腸下部に発現する Apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) により 95%以上が再吸収され、肝臓で再利用される。ASBT による胆汁酸の再吸収の阻害は、肝臓でのコレステロールから胆汁酸への合成を促進し、血中コレステロール濃度を低下させるため、これにより ASBT は脂質異常症の予防および治療ターゲットとされる。我々は小腸上皮吸収モデル細胞 Caco-2 および ASBT 発現細胞を用いた検討により、胆汁酸の再吸収抑制成分として、紅茶に含まれるポリフェノールの 1 種 teaflavin-3-gallate および theaflavin-3'-gallate を報告した [1)]。一方、Caco-2 単層膜における胆汁酸の吸収機作を速度論的に解析したところ、Caco-2 単層膜には ASBT 以外の胆汁酸を基質とするトランスポーターの存在が示唆された。

本講では Caco-2 における胆汁酸輸送機作の解析、およびこれらの検討により新たに見出されたトランスポーターの消化管における分布についても論じる。

1) Takashima Y et al., *J Agric Food Chem*, 2021, 69 (33), 9585–9596.

Over 95% of intestinal bile acid is reabsorbed through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) in the terminal ileum and returned to the liver (enterohepatic circulation). Inhibiting ASBT has been identified as a potential strategy to reduce plasma cholesterol levels. We screened polyphenols that inhibit bile acid re-absorption using Caco-2 cell monolayers and ASBT-transfected COS 7 cells. Theaflavin 3-gallate and theaflavin 3'-gallate, polyphenols in black tea, were identified as active compounds[1)]. On the other hand, the kinetic analyses of the bile acid uptake in Caco-2 cells showed biphasic transport. It was suggested that other bile acid transporters besides ASBT could exist in Caco-2 cells.

bile acid, transporter, apical sodium-dependent bile acid transporter

講演番号：3S13B6a-04
講演日時、会場：3 月 26 日 10:18～ B6 会場

トランスポータータンパク質によるステロールとビタミンの恒常性維持

Homeostasis of sterols and vitamins by transporter proteins

○松尾 道憲（京女大家政）
○Michinori Matsuo (Kyoto Women's Univ.)

ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターは、ATP 加水分解のエネルギーを利用して様々な基質を輸送する。ABCG1 のホモ二量体（ABCG1/ABCG1）と ABCA1 は、コレステロールを輸送することで高密度リポタンパク質（HDL）形成に関与するとともに、ビタミン E の輸送にも関与する。ABCG5 と ABCG8 のヘテロ二量体（ABCG5/ABCG8）は、小腸と肝臓の頂端膜側に発現し、コレステロールと植物ステロールを体外へ輸送するとともに、ビタミン K の輸送にも関与する。一方、Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1)はコレステロール、ビタミン E とビタミン K を輸送し、小腸でそれらの吸収に働く。

本シンポジウムでは、トランスポータータンパク質がコレステロールや脂溶性ビタミンなどの脂溶性物質を輸送し、それらの脂溶性物質の恒常性維持に働く機能について紹介する。

ATP-binding cassette (ABC) proteins transport substrates using energy of ATP hydrolysis. A homodimer of ABCG1 and ABCA1 transport cholesterol and are involved in high-density lipoprotein (HDL) formation, and transport vitamin E. A heterodimer of ABCG5 and ABCG8 limits cholesterol absorption in the intestine and increases cholesterol excretion in the liver by transporting cholesterol to the bile. ABCG5/ABCG8 transports cholesterol as well as plant sterols, such as sitosterol, and vitamin K. Niemann–Pick C1-like 1 (NPC1L1) transport cholesterol, vitamin E, and vitamin K, and are involved in the absorption of them in the intestine.

In this symposium, I will talk about transporter proteins involved in the homeostasis of hydrophobic compounds, such as sterols and fat-soluble vitamins.

sterol, vitamin, transporter

講演番号：3S13B6a-05
講演日時、会場：3 月 26 日 10:41～ B6 会場

膜輸送体によるビタミン C・尿酸の体内動態制御

Recent advances in the research on transporters involved in vitamin C and urate handling

○豊田 優[1,2]、宮田 大資[2]、窪田 優[2]、松尾 洋孝[1]、高田 龍平[2] ([1]防衛医大分子生体制御学講座、[2]東大病院薬剤部)
○ Yu Toyoda[1,2], Hiroshi Miyata[2], Yu Kubota[2], Hirotaka Matsuo[1], Tappei Takada[2] ([1]Dept. Integrative Physiol. Bio-Nano Med., Natl. Defense Med. Col., [2]Dept. Pharm., The Univ. of Tokyo Hosp.)

ヒトにとって、ビタミン C（VC）は必須栄養素であり、尿酸はプリン体の最終代謝産物です。両物質は、生体内に豊富に存在する水溶性抗酸化物質でもあり、生体内ではもっぱらアニオンとして存在しています。そのため、受動的に細胞膜を通過できず、これらの体内動態制御には膜輸送体が必須であると考えられてきました。ところが、その分子実体には依然として不明な点が多いのが現状です。近年私たちは、血液中から脳への VC 供給に着目し、培養細胞を用いた *in vitro* 実験や作出したノックアウトマウスを用いた *in vivo* 解析を組み合わせることで、SLC2A12 が脈絡叢上皮細胞から脳脊髄液中への VC 排出を担う生理的に重要な輸送体であることを見出し、VCEP と命名しました。この知見は、哺乳類における排出型 VC 輸送体に関する最初の発見であり、VC の体内動態制御機構や生理的役割のさらなる解明につながるものと期待されます。また、取込み型 VC 輸送体として知られていた SVCTs が尿酸輸送体としての機能も有することが明らかとなってきました。本発表では、これら最新の知見について紹介させていただきます。

In humans, vitamin C (VC, also known as ascorbic acid) is a vital nutrient; uric acid is the end product of purine metabolism. These water-soluble antioxidant molecules abundant in our body exist as corresponding anion forms in physiological conditions; therefore, VC and urate cannot passively penetrate cellular membranes, indicating the presence of transporter proteins involved in their handling. However, already-identified transporters do not provide a comprehensive picture of VC- and urate-handling system, which requires further investigation for latent machineries. Recently, we identified SLC2A12 (which was identified as a urate transporter in our previous study) as a physiologically important VC efflux protein (VCEP) expressed in the choroid plexus, where the VCEP regulates VC supply from blood into the brain. These findings, achieved by unraveling the long-standing mystery in VC handling, improve our understanding of VC regulation and the physiological impact of VC in our body. Also, our recent studies revealed that urate is a substrate of sodium-dependent VC transporters (SVCTs, physiologically important VC importers). In this presentation, we would like to show such recent progresses on the research for nutrient transporters.

References [PMID]: *PNAS*, 2020 [32690690]; *iScience*, 2022 [35106468]; *JBC*, 2023 [37390985]

Transporter, Vitamin C, Uric acid

講演番号：3S13B6a-06
講演日時、会場：3 月 26 日 11:05～ B6 会場

リアルワールドデータから見たビタミン D 研究の課題と将来性

Challenges and opportunities in vitamin D research from the viewpoint of real-world data

○越智 小枝（東京慈恵会医科大学)
○Sae Ochi (The Jikei University School of Medicine)

ビタミン D は骨形成だけでなく、感染症や自己免疫疾患、うつ病、不妊など多様な疾患において重要な役割を果たすことが知られている。その多くが健康長寿に直接かかわる病態であり、超高齢化社会を迎えた現代においては、ビタミン D 不足の解消による健康寿命の延伸は益々重要性を増すと予測される。

しかしそれにもかかわらず、ビタミン D 不足「パンデミック」とも呼ばれる世界的なビタミン D 不足の蔓延は未だ解決されていない。これを解決するためには基礎研究と疫学・臨床研究という両者のアプローチが融合することが必要である。

現在ビタミン D とその核内受容体についての分子メカニズム解明が進む一方で、ビタミン D 充足度を判定する生体マーカーは未だ乏しい。またビタミン D の摂取・吸収・活性化・消費等の体内動態の研究についても未だ十分とはいえない。演者はビタミン D 不足に関する疫学調査の自験例を示すと共に、ビタミン D パラドックス、充足度マーカーの限界などに触れ、医学・公衆衛生分野より見たビタミン D の課題について述べる。

Vitamin D plays a pivotal role in the prevention of a variety of diseases such as severe infectious diseases, autoimmune diseases, depression, and infertility, which link directly to our quality of life. Considering the ageing of our society, countermeasures against vitamin D insufficiency will become increasingly important to improve health status of elderly population. Nevertheless, there is a global phenomenon called ‘vitamin D deficiency pandemic’ – a universal prevalence of vitamin D deficiency. To tackle this problem, multidisciplinary approach involving food science and epidemiology seems essential.

Although molecular mechanisms of vitamin D and its receptor have been made a substantial progress, there is scant research on the measurement of vitamin D sufficiency levels in our body. In addition, in vivo kinetics of vitamin D such as intake, absorption, activation, and consumption are not fully elucidated. In this session, the presenter will talk about the result of our epidemiological study on vitamin D deficiency. The presenter will also discuss vitamin D paradox and limitation of current biomarkers to showcase challenges in vitamin D research from the viewpoint of medical science and public health.

Vitamin D, Public Health, Biomarker

講演番号：3S13B6a-07
講演日時、会場：3 月 26 日 11:30～ B6 会場

食と栄養がもつ治療上乗せ効果の可能性ー新たな異分野融合治療戦略の開拓

Potential of Food and Nutrition to Additonal Effects to Therapy

○反町 典子（東大医科研）
○Noriko Toyama-Sorimachi (The Univ. of Tokyo)

線維症は恒常性を逸脱して組織にコラーゲンが沈着し、不可逆的に臓器機能の喪失をもたらす重篤な疾患である。様々な臓器で線維化は起こりうるが、中でも肺線維症は呼吸機能を喪失することにより死に至る深刻な疾患で、根治療法がないなかで感染症や環境因子によって患者数が増加している、アンメットニーズが高い疾患である。

アミノ酸トランスポーターSLC15A3 は免疫細胞のエンドリソソームに高発現し、免疫細胞の炎症応答を媒介する。私たちは SLC15A3 欠損マウスで進行した肺線維症が改善することを見いだし、そのメカニズムの解析を通じて、食や栄養を操作することで肺マクロファージの機能が変容し、肺線維症モデル疾患の改善がもたらされることを見いだした。この知見は、不可逆的なプロセスである線維症に対して、食や栄養を通じて既存薬に対する上乗せ効果を引き出すという新しい治療戦略に資する可能性が高い。

本講演では、食と栄養が免疫細胞に与える大きなインパクトとそれによる病態への影響を紹介し、疾患治療において食と栄養によって薬効に上乗せ効果をもたらすという、新しい異分野融合治療戦略について議論したい。

Fibrosis causes collagen deposition without homeostatic control, leading to irreversible loss of organ function. Pulmonary fibrosis is a serious disease that causes death due to loss of respiratory function, and is a disease of high unmet need, with the number of patients increasing because of infectious diseases and environmental factors in the absence of curative treatment.

Amino acid transporters expressed on endolysosomes of immune cells play an important role in inflammatory responses. We have reported that endolysosome-resident amino acid transporters in immune cells are involved in the pathogenetic regulation of various inflammatory diseases. We recently found that one of these transporters plays an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, and through mechanistic analysis we revealed that diet and nutrition have a significant impact on the function of pulmonary macrophages, resulting in improvement of the pulmonary fibrosis model disease.

In this presentation, I would like to introduce the significant impact of diet and nutrition on immune cell functions and their pathological effects, and also discuss a new interdisciplinary therapeutic strategy to bring about an additional effect of diet and nutrition on drug efficacy in the treatment of diseases.

inflammation, pulmonary fibrosis, food intake

講演番号：3S14A2p-01
講演日時、会場：3 月 26 日 13:50～ A2 会場

日本の食品機能学における研究成果を振り返り、未来を見つめる
Looking back at achievements in Japanese Functional Food　Science & looking to the future

○村上 明 (兵庫県大環境人間)
○Akira Murakami (Univ. of Hyogo)

我が国における食品機能性研究が文部省（当時）科学研究費の特定研究という形で本格的に始動してから約 40 年が経つ。この間、化学的アプローチの導入（大東肇ら：京都大学など；大澤俊彦ら：名古屋大学など、他)、機能性成分の代謝吸収機構の解明（寺尾純二ら：徳島大学など、他)、DNA マイクロアレイなどを駆使した網羅的解析（阿部啓子ら：東京大学など、他)、ファイトケミカル受容体の発見（立花宏文ら：九州大学、他）など、基礎研究における特筆すべき成果が挙げられてきた。しかしながら、薬剤と比較すると、作用機構に関する本質的な知見が慢性的に不足しているのが現状とも言えよう。たとえば、ポリフェノールの抗肥満作用は広く知られているが、現存の知見としては、リパーゼの活性化やそれに伴うβ酸化の亢進など下流のものが多く、機能性を発現するための「引き金」についての知見は欠落している。一方、応用面では、特定保健用食品や機能性表示食品制度に代表される、エビデンスに基づいた健康機能食品の上市が指摘できる。しかし、これらの健康食品が購買者においてどの程度まで機能性を発現しているのか、本当に国民の健康に資しているのかという問題について筆者が知る限り本格的な検証例はない。上記した閉塞状況を打破するには、斬新な発想を持つ若手研究者の存在が不可欠である。本シンポジウムでは、各若手演者が提示する仮説や研究結果に対し、率直に意見交換することで、10 年後以降の食品機能学についての未来像が共有できる機会としたい。

It has been approximately 40 years since Food Functionality Research actively began in Japan. During this period, many notable studies have been conducted, and the evidence-based health functional foods, as exemplified by the establishment of the Food for Specified Health Uses and Foods with Function Claims systems, have been launched. However, there are many unknowns as to whether these new foods exhibit functionality for consumers. Furthermore, there is a chronic lack of critical knowledge regarding the mechanism of action. To overcome this situation, the presence of young researchers with innovative ideas that are not bound by preconceived notions is essential. At this symposium, we hope to provide an opportunity for researchers to frankly exchange opinions on the hypotheses presented by each of the young speakers, and to share the future vision of Food Functionality Research 10 years from now.

Functional Food, Food Functionality Research, Overview

講演番号：3S14A2p-02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:05～ A2 会場

授乳期のフラボノイド摂取が乳児の生体機能に与える影響

Effects of Maternal Flavonoid Intake on the Biofunctions of Neonates

○石坂 朱里[1]、藤原 なお[1]、向井 理恵[2]、西川 美宇[3]、生城 真一[3]、村上 明[1] ([1]兵庫県大・環境人間、[2]徳島大・生物資源、[3]富山県大・工)
○Akari Ishisaka[1], Nao Fujiwara[1], Rie Mukai[2], Miyu Nishikawa[3], Shinichi Ikushiro[3], Akira Murakami[1] ([1]Univ. of Hyogo, [2]Tokushima Univ., [3]Toyama Pref. Univ.)

ヒトをはじめとした哺乳類は、生後しばらくの間、主に母乳を摂取して成長する。母乳は、栄養素のみならず、様々な生体防御因子を含んでおり、乳児の健全な発育に重要な役割を担う。一方、代表的なフラボノイドであるケルセチン（QUE）は、その一部が主に小腸で吸収され、小腸や肝臓で代謝を受けることが知られている。さらに、先行研究では、QUE がヒト母乳中に存在することも明らかとされた。しかしながら、その代謝物プロファイルや、乳児生体内への QUE 移行については不明であった。そこで我々は、QUE を摂取した母マウスの乳汁、母仔マウスの血液、尿および諸臓器中の QUE と代謝物を解析した。その結果、母マウス血漿に比べて乳汁中では、生理活性の強い QUE アグリコンの割合が高く、それが仔の生体内に移行することも初めて明らかにした（1)。本講演では、母親のフラボノイド摂取が乳児の生体機能に与える影響について議論したい。

1. Fujiwara N, Mukai R, Nishikawa M, Ikushiro S, Murakami A, Ishisaka A. *Biosci Biotechnol Biochem,* 87, 442-447 (2023)

Mammals, including humans, primarily depend on breastfeeding for growth during the early postnatal period. Breast milk contains nutrients and various biological factors that are crucial to neonatal health. Most of the ingested quercetin (QUE) is partially absorbed in the small intestine and metabolized in both the small intestine and liver. Previous studies have revealed the presence of QUE in human breast milk. However, QUE metabolic profiles in breast milk and its transfer to the neonate are unknown. We determined QUE and its metabolites in the breast milk of maternal mice and in the blood, urine, and organs of maternal and neonatal mice (1). A markedly high concentration of QUE aglycone was detected in breast milk as compared to plasma. The transfer of QUE from mother-to-neonate was demonstrated for the first time. In this presentation, we discuss the impact of maternal flavonoid intake on neonatal physiological functions.

1. Fujiwara N, Mukai R, Nishikawa M, Ikushiro S, Murakami A, Ishisaka A. *Biosci Biotechnol Biochem,* 87, 442-447 (2023)

flavonoid, breast milk, neonate

講演番号：3S14A2p-03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:35～ A2 会場

食品機能実行因子としての miRNA

microRNA as a Food Function mediator

○熊添 基文、立花 宏文（九大院農院 生機科）
○Motofumi Kumazoe, Hirofumi Tachibana (The Univ. of Kyushu)

食品因子の機能性成分には各食品因子に対応するレセプターを起点とした食品因子感知機構が存在する。我々はその感知機構において non coding RNA の一種である micro RNA（miRNA）が重要なメディエーターとなることを見出している。緑茶カテキンの一種であるエピガロカテキンガレート（EGCG）はメラノーマ細胞においてそのレセプターである 67 kDa laminin receptor（67LR）依存的に多くの細胞内 miRNA 発現量を調節することを見出している。EGCG はメラノーマ細胞に対して 67LR 依存的に let-7b を誘導するとともに、let-7b 依存的にその標的分子である High Mobility Group AT-hook 2（HMGA2）を低下させることを確認している。また、67LR ノックアウトマウスを用いた実験からも、EGCG は 67LR 依存的に血中 miRNA の発現調節を行うことを明らかにした。カカオポリフェノールの一種であるプロシアニジン C1 の経口摂取はマウスの認知機能を向上させるとともにある種の血中 miRNA を増加させるが、この miRNA に対する特異的阻害剤の投与によりプロシアニジン C1 の認知機能向上作用は観察されなくなった。また大豆イソフラボンの代謝産物であるエクオールは肝星細胞における miR-12135 の発現を誘導することで、線維化時に誘導される Integrin Subunit Alpha 11（ITGA11）の発現を低下させ、肝臓の線維化を抑制することを見出した。

さまざまな食品の摂取介入試験において採血された血液中の miRNA の解析から、変動する miRNA は摂取する食品毎に特徴的であり、ある種の食品摂取により発現が抑制される miRNA が認知機能低下に関与していることを見出している。以上のことから、食品の生体調節作用を考える場合、miRNA は重要な機能性実行因子として働いていると考えられる。

Epigallocatechin gallate (EGCG), a green tea catechin, regulates the expression of multiple micro RNA (miRNAs) via its sensing receptor, 67 kDa laminin receptor (67LR). Furthermore, oral administration of procyanidin C1, a cocoa polyphenol, improves cognitive function in mice and increases certain blood miRNAs. When a specific miRNA inhibitor is administered, the enhancement effects of procyanidin C1 are neutralized. We also demonstrated that Equol, a metabolite of soy isoflavones, induces the expression of miR-12135 in liver stellate cells, thereby inhibiting liver fibrosis by suppressing its target, Integrin Subunit Alpha 11 (ITGA11).

In summary, miRNAs play crucial roles as functional effectors in the biological regulation by food factors.

food factor, micro RNA, sensing receptor

講演番号：3S14A2p-04
講演日時、会場：3 月 26 日 15:05～ A2 会場

食用植物のナノ粒子の機能性評価

Fuction of nanoparticles derived from edible plants

○山崎 正夫[1]、山崎 有美[2]、大島 達也[3] ([1]宮崎大学農学部、[2]宮崎大学地域資源創成学部、[3]宮崎大学工学部)
○MASAO YAMASAKI[1], YUMI YAMASAKI[2], Tatsuya Oshima[3] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Miyazaki, [2]Fac. of Reg Innov.,Univ. of Miyazaki, [3]Fac. of Eng.,Univ. of Miyazaki)

ヒトにおいて、エクソソームを含む細胞由来のナノ粒子が細胞間情報伝達を担う因子として注目を集めている。細胞からのこのようなナノ粒子の産生は、生物界に広く共通する現象であることが明らかとなりつつあり、植物や微生物の細胞でも確認されている。したがって、我々は食品としてこれらのナノ粒子を日々摂取している可能性が高い。我々の研究グループでは、食品中にナノ粒子の存在を確認し、それらが機能性因子としての役割を持つ可能性を評価してきた。そこで、本シンポジウムでは、野菜や果実からのナノ粒子の単離と機能性評価実績を紹介したい。野菜や果実の搾汁液を調製した後、エクソソーム精製の常法である超遠心法を用いることで、ほぼすべてのサンプルからナノ粒子を調製することができた。特に、タマネギとアブラナ科野菜について評価した結果においては、ナノ粒子内にフラボノイドやイソチオシアネートなどのいわゆる機能性物質が含まれるだけでなく、粒径の違いにより RNA を豊富に含むナノ粒子が存在していた。また、マクロファージや腸管上皮細胞においては TLR-4, TLR-5 のリガンドによる炎症応答誘発作用がこれらのナノ粒子で抑制された。一方、無刺激下では炎症性サイトカインの産生を促進するケースも確認できた。さらに、ナノ粒子を蛍光ラベルしてマクロファージの培養系における挙動を評価したところ、エンドサイトーシスによる取り込みも確認された。今後、ナノ粒子の持つ食品機能学的意味をさらに検証していきたいと考えている。

Nanoparticles secreted from human cells including exosomes, have attracted attention as factors responsible for intercellular signaling. It is becoming clear that the production of such nanoparticles from cells is a widely common phenomenon in the biological world and has also been observed in plant and microbial cells. Therefore, it is likely that we ingest these nanoparticles as food. Our research group has identified the presence of nanoparticles in foods and evaluated their role as functional factors. In this symposium, I would like to introduce the way of isolation of nanoparticles from vegetables and fruits and the results of functional evaluation. After preparing juice of vegetables and fruits, we obtained nanoparticles from almost all samples by using the ultracentrifugation. Nanoparticles from onion and cruciferous vegetables contained phytochemicals such as flavonoids and RNA. In addition, these nanoparticles suppressed the inflammatory response stimulated by TLR-4 and TLR-5 ligands in macrophages and intestinal epithelial cells. On the other hand, we also observed the promotive effect on inflammatory response of nanoparticles under steady state conditions. Furthermore, macrophage could uptake the fluorescently labeled nanoparticles by endocytosis was also confirmed. In the future, we intend to examine the food functional significance of the nanoparticles.

nanoparticle, inflammation, plants

講演番号：3S14A2p-05
講演日時、会場：3 月 26 日 15:35～ A2 会場

質量分析イメージング法による生体分子の可視化－基礎研究から商品開発まで－

Mass spectrometry imaging in food science. From basic research to product development.

○財満 信宏 [1,2] ([1] 近大農、[2] アグリ技研)
○Nobuhiro ZAIMA[1,2] ([1]Kindai Univ, [2]ATIRI)

我々の生命活動を支える多種多様な生体分子は、我々の体に均一に存在するわけではなく、必要とされる場所に適切に存在し（もしくは分配され）、その場に必要な化学反応に関与することで組織ごとに異なる代謝などを成立させている。生体分子の存在場所を理解することは、生命現象の成り立ちを紐解くための知見となりうることに加え、代謝異常を伴う疾患の感知や疾患発症機構の解明などにもつながりうる。これまでに我々は、生体分子の位置情報を得るための手段の一つとして、質量分析イメージング法を用いた解析を行ってきた。質量分析イメージング法は、組織切片中の化合物の存在場所を可視化することを可能にするもので、イオン化する化合物であればどのようなものであっても「理論上」は可視化が可能となる。実際には、検出感度や分解能の限界によって生体に存在する化合物全ての可視化が達成されているわけではないが、従来のイメージング手法では可視化することができなかった機能性食品成分や代謝物などの可視化が可能となったことで様々な発見がもたらされている。本講演では、農作物中で観察された代謝物の不思議な分布のほか、新たなモデル動物の作出・機能性成分の作用機序の解明につながった例、商品開発に利用されている例などを紹介させていただきたい。

Biomolecules in our body exist in the specific tissues where they play roles in maintaining our bioactivities. Understanding the physical place of each biomolecules can provide important clues to reveal mechanisms underlying our biological activities and/or onset of diseases with metabolic abnormality. We use mass spectrometry imaging (MSI) as one of methods to analyze positional information of biomolecules in our body. MSI makes it possible to visualize distribution of biomolecules in section. MSI can visualize distribution of all kinds of ionized compounds in theory. In actuality, there is a limitation of detectable compounds owing to the detection sensitivity and/or spatial resolution, however, MSI has provided us several new findings in the fields of agricultural science by visualizing functional food factors which were impossible to be visualized by conventional imaging technologies. Here, I would like to introduce our research related to mysterious distribution of metabolites in agricultural food crops, establishment of new disease model animal, and development of food production.

Mass spectrometry imaging, Functional food factors, Vascular diseases

講演番号：3S14A2p-06
講演日時、会場：3 月 26 日 16:05～ A2 会場

食品機能研究の今後の展望

Future outlook for food function research

○立花 宏文 (九大院農)
○Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

食品の機能性研究は生命科学の進歩とともに発展してきた。本シンポジウムの最後として、今後の食品機能研究で解決すべき課題と期待されることについて下記の事例を紹介したい。

・難吸収性食品因子の機能性発現経路の解明
　　腸―末梢臓器連関
・食品因子の機能的相互作用の解明
　　食品因子による緑茶カテキンの機能性増強作用
・生命科学の進歩とともに明らかになる新たな機能性
　　Circular RNA と食品機能
・分析・解析技術の進歩とともに明らかになる新たな機能性
　　次世代シーケンサーによる修飾 miRNA の発現調節作用
・食品機能研究の成果が生命科学の進歩に貢献
　　EGCG センシング研究に基づいた新たな抗がん剤開発

Food functionality research has developed along with advances in life science. As a final part of this symposium, I would like to introduce the following examples of issues that need to be resolved and expectations for future food function research.

・Elucidation of the functional expression pathway of poorly absorbed food factors: Intestine-peripheral organ interaction
・Elucidation of functional interactions of food factors: Functional enhancement of green tea catechins by food factors
・New functionality revealed with progress in life science: Circular RNA and food functions
・New functionality revealed with advances in analysis and analysis technology: Regulation of expression of modified miRNA using next-generation sequencer
・Results from food function research contribute to progress in life sciences: Development of new anticancer drugs based on EGCG sensing research

food function, miRNA, Intestine-peripheral organ interaction

講演番号：3S15A3p-01
講演日時、会場：3 月 26 日 13:50～ A3 会場

はじめに：プロジェクトの概要について
Introduction: Project Overview

○石井 正治（東大院農）
○Masaharu Ishii (The Univ. of Tokyo)

本シンポジウムでは、GI 基金により今年度から運営されている私たちのプロジェクト（CO_2 固定微生物利活用プラットフォームの構築）の概要を紹介する。プロジェクトでは【CO_2 固定微生物の探索及び有用情報整備】【バーチャル CO_2 固定微生物のゲノム情報収集】【CO_2 固定微生物の機能情報のデータベース化と検索ツールの開発】そして【CO_2 固定微生物利活用プラットフォーム構築】を研究開発内容とすることにより、有用微生物の開発を加速する微生物等の改変プラットフォーム技術の高度化を図ることを期している。

本プロジェクトは、製品評価技術基盤機構、京都大学、茨城大学、東京大学、海洋研究開発機構、遺伝学研究所、DBCLS、bitBiome 株式会社に属するメンバーから形成され、微生物の単離、微生物の代謝生理、微生物の遺伝学、さらには情報科学に卓越した技量を有する面々の集まりとなっている。

本シンポジウムでは、全ての内容を紹介することはできないが、概要をお伝えすることで、今後の技術開発等の一助としていただければ幸いである。

In this symposium, we will present an overview of our project (Construction of a CO_2-fixing Microorganisms Utilization Platform), which has been funded by the GI Foundation since this fiscal year. In this project, we will “search for CO_2-fixing microorganisms and develop useful information”, “collect genome information on virtual CO_2-fixing microorganisms”, “create a database of functional information on CO_2-fixing microorganisms” and “develop a search tool”, and eventually construct a CO_2-fixing microorganism utilization platform. This project aims to advance the technology of microbial modification platforms to accelerate the development of useful microorganisms.

This project consists of members from National Institute of Technology and Evaluation, Kyoto University, Ibaraki University, The University of Tokyo, JAMSTEC, National Institute of Genetics, DBCLS, and bitBiome, Inc., all of whom have outstanding skills in microbial isolation, microbial metabolism and physiology, microbial genetics, and information science.

Although it is not possible to introduce all of the contents of this project, we hope that this symposium will be of some help in your future technological development.

carbon dioxide utilizing bacteria

講演番号：3S15A3p-02
講演日時、会場：3 月 26 日 13:55～ A3 会場

水素酸化細菌の生態と分離について

Ecology and isolation of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria

○西原 宏史（茨城大農）
○Hirofumi NISHIHARA (Ibaraki Univ.)

水素酸化細菌（好気性水素酸化細菌）は水素を好気的に酸化してエネルギーを獲得し、CO_2 固定を行って増殖することができる化学合成独立栄養細菌である。最適条件下で 60～70 分程度で細胞分裂するなど、優れた CO_2 固定能を有するものも知られることから、排出される CO_2 ガスを再び炭素資源へと変換するカーボンリサイクルへの利用も期待されている。近年では欧米のベンチャー企業を中心に、水素酸化細菌による蛋白質生産等、産業利用に向けた動きも目にする。水素酸化細菌の分離を試みる場合、水素が比較的豊富に存在しそうな環境に考えを巡らせるかも知れないが、そのような条件に限らずに分離株は得られている。水素をエネルギー源として利用する微生物は太古の地球より存在していたとされており（嫌気的な水素利用）、現代においても嫌気・好気環境を含めて水素を利用するポテンシャルのある微生物は広く分布しているのかも知れない。地球表面の好気的な場所でも、ミクロな視点では嫌気的に水素が発生しているような環境もあると言われており、また、大気中に存在する微量の水素をエネルギー源として酸化利用できる高親和性ヒドロゲナーゼをもつ微生物も存在する。これらのことも関係すると思われる。なお、紹介内容の一部は養殖業成長産業化技術開発事業（水産庁）「水素細菌を活用した養殖飼料開発」、グリーンイノベーション基金事業（NEDO）／バイオものづくり技術による CO_2 を直接原料としたカーボンリサイクルの推進「CO_2 固定微生物利活用プラットフォームの構築」の一環として実施されたものである。

Aerobic hydrogen-oxidizing bacteria can grow autotrophically by using hydrogen and CO_2 as sole energy and carbon source, respectively. Some strains are known as fast-growing autotrophs with doubling time of 60-70 min. Therefore, such aerobic hydrogenotrophs are highly expected to be utilized for carbon recycle. Isolation of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria has been reported from various environments including places where hydrogen is not likely present much amount. Microbial utilization of hydrogen is speculated to be occurred in ancient time on earth. Potential hydrogen-utilizers as energy source may be widely distributed in both aerobic and anaerobic environment at the present day. Aerobic hydrogen-oxidizing bacteria which can use trace amount of atmospheric hydrogen by high-affinity hydrogenase are also known. These may be related to the fact that aerobic hydrogenotrophs can be isolated from various environments.

hydrogen-oxidizing bacteria, isolation, ecology

講演番号：3S15A3p-03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:20～ A3 会場

微生物による CO2 固定システムの多様性
Diversity of microbial CO2 fixation systems

○布浦 拓郎 (海洋研究開発機構)
○Takuro NUNOURA (JAMSTEC)

独立栄養(微)生物の CO_2 固定システムとして、これまでに 7 種の経路が知られている。そして、これらの経路のいくつかには、亜型の存在も知られる。例えば Wood-Ljungdahl 経路（還元的 acetyl-CoA 経路）にはメタン菌型とバクテリア型の 2 種の経路が存在し、還元的 TCA 回路には、鍵反応である ATP 依存のクエン酸開裂を担う ATP citrate lyase の代替機構（citryl-CoA synthetase と citryl-CoA lyase からなる 2 反応システム）が知られる。更に、近年、我々や Berg のグループは、還元的 TCA 回路の新たな亜型として、ATP 非依存の citrate synthase の逆反応を含む還元的な TCA 回路が機能することを発見し、更に Berg らはこの仕組みの機能には高濃度 CO_2 が必須であることを示した。また、我々は水素酸化型メタン菌において、ピルビン酸（あるいはホスホエノルピルビン酸）からオキソグルタル酸に至る不完全な還元的 TCA 回路が CO_2 固定に機能していることを証明した（この仕組みは 1978 年に存在が示唆されていたが、十分なデータが得られていなかった)。この他、近年、複数の(超)好熱従属栄養生物において高濃度 CO_2 下において、還元的 TCA 回路と共通する仕組みで CO_2 固定を行っていることも明らかになりつつある。本発表では、これら CO_2 固定経路に関する最新の知見を紹介する。

To date, a total of seven inorganic carbon fixation pathways have been discovered, and subtypes have been also found in some of them. For example, archaeal and bacterial types are described in Wood-Ljungdahl pathway (also called reductive acetyl-CoA pathway). In a typical reductive TCA cycle (rTCA cycle), ATP citrate lyase is responsible for a key reaction of ATP-dependent citrate cleavage while an alternative two step reaction of citryl-CoA synthetase and citryl-CoA lyase has also been described. We and Berg *et al.* discovered a novel reductive operation of the TCA cycle with a reverse reaction of ATP independent citrate synthase. Moreover, Berg *et al.* found that high atmospheric CO_2 is necessary to the reductive operation of the TCA cycle. We also revealed the operation of incomplete reductive TCA cycle (pyruvate or phosphoenol pyruvate to oxoglutarate) for inorganic carbon fixation in a hydrogenotrophic methanogen while the system was proposed in 1970s. Moreover, inorganic carbon fixation with enzymes that shared with the rTCA cycle have recently been identified in heterotrophic (hyper)thermophiles. Here, I will introduce the recent updates about the inorganic carbon fixation in both autotrophic and heterotrophic organisms.

CO_2fixation, metabolome, central carbon metabolism

講演番号：3S15A3p-04
講演日時、会場：3 月 26 日 14:50～ A3 会場

微生物ビッグデータ・AI 技術を統合した酵素探索技術

Enzyme Discovery Technology Integrating Microbial Big Data and AI Technologies

○細川 正人 (bitBiome(株))
○Masahito Hosokawa (bitBiome, Inc.)

地球上の多様な環境微生物は、CO_2 等の未利用資源から有用物質を生産するバイオものづくりに活用可能な、未知の微生物や酵素を豊富に有している。従来の培養を介した有用微生物の獲得に加え、ショットガンメタゲノムシーケンス法により未培養環境微生物のゲノムや遺伝子のデータが飛躍的に蓄積されてきたことから、デジタル配列データを起点とした酵素探索・開発が盛んとなっている。

我々は、独自の微生物シングルセルゲノム解析プラットフォーム bit-MAP®より、環境試料から多様な未培養微生物ゲノムの効率的な回収を実現し、これまでに 12 億遺伝子以上から成る微生物遺伝子データベースを構築してきた。一方で、このようにして得られた微生物ゲノム・遺伝子データベースを用いた目的酵素の探索において、数千、数万とある候補遺伝子のすべてを実験的に性能検証することは困難である。そこで、*in silico* で目的酵素を絞り込むための手法 bit-QED (bitBiome Quality Enzyme Discovery) を開発した。これは標準的なバイオインフォマティクス配列解析と、独自に開発した酵素活性部位周辺の 3 次元構造予測に基づく表面特徴量解析を組み合わせた手法である。これにより、目的基質との反応性の予測結果に基づき、例えば 10～100 遺伝子程度の実験的検証が可能な程度まで目的酵素を絞り込むことができる。本講演では、上記技術を含む酵素探索を中心に、バイオものづくりにおける未培養微生物ゲノム・遺伝子データの活用について紹介する。

The diversity of environmental microbiotas presents a largely untapped reservoir for the discovery of novel enzymes. We have realized efficient recovery of diverse uncultured microbial genomes from environmental samples by using our pioneering microbial single-cell genome analysis platform, bit-MAP®, and have constructed a microbial gene database consisting of over 1.2 billion genes. To fully utilize the potential of the large microbial database, we developed an in-silico enzyme screening method, bit-QED, that helps us find enzymes of interest quickly and efficiently. bit-QED combines standard bioinformatic sequence analyses with a proprietary 3D structure modelling method of enzyme active sites. When combined with computational chemical approach such as molecular dynamics simulations, our approach efficiently identifies enzymes that react with a target substrate.

Enzyme, Genome, Microbe

講演番号：3S15A3p-05
講演日時、会場：3 月 26 日 15:15～ A3 会場

MAG(metagenome assembled genome)解析について
MAG(metagenome assembled genome) analysis

○森 宙史（遺伝研・情報系）
○Hiroshi Mori (Dept. Inform., National Institute of Genetics)

バイオインフォマティクス技術の発展により、メタゲノムシーケンシングの結果から個々の微生物の系統のゲノム配列を再構築する MAG(metagenome assembled genome)解析が盛んに行われるようになっている。培養可能の有無に関わらず微生物のドラフトゲノム配列を得ることが可能な MAG 解析は強力な解析手法であり、NEDO GI 基金事業においても多様な CO2 固定微生物のゲノム情報を様々な環境サンプルから得る目的で MAG 解析を行っている。本発表では、演者らが構築した MAG 解析パイプラインおよび CO2 固定経路の所持の有無を推定する解析ツールについて、実際にメタゲノム配列解析への適用例も含め紹介する。

MAG (metagenome assembled genome) analysis, which reconstructs the genome sequence of individual microbial taxa from metagenomic sequencing results, has become popular. MAG analysis is a powerful method to obtain draft genome sequences of microbes regardless of whether they are culturable or not. Our NEDO GI project also uses MAG analysis to obtain genome information of various CO2-fixing microbes from environmental samples. In this presentation, I will introduce our MAG analysis pipeline and analytical tools for inferring the presence or absence of the CO2 fixation pathways.

Metagenome, MAG, Bioinformatics

講演番号：3S15A3p-06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:40～ A3 会場

CO_2 固定微生物に関する情報の集約について

Integration of information on CO_2-fixing microorganisms

○市川 夏子（NITE-NBRC）
○Natsuko Ichikawa (NITE-NBRC)

微生物の持つ特性は非常に多様であり、我々が培養して保存できている微生物はそのごく一部にすぎないと言われている。NITE では産業に有用な微生物を保存・提供することで、また NITE をはじめとして国内の企業・公設試・大学が保有する微生物の情報を集約した横断的データベースである「生物資源データプラットフォーム（DBRP）」を提供することで、バイオものづくりに貢献している。

本プロジェクトでは「CO_2 固定微生物」に特化したプラットフォームを構築して CO_2 削減に配慮しながらバイオものづくりを志向するユーザーに活用していただくことを目指している。プラットフォームには、本プロジェクトで分離する新規の CO_2 固定微生物の情報を登録する予定であり、参画者との連携により培地情報、パスウェイ情報、ゲノム情報、遺伝子産物の三次元構造予測情報を整備する予定である。また、既知の CO_2 固定微生物についても文献等から情報を網羅的に収集する。これらの情報を比較することで新規の CO_2 固定微生物が有する特徴が明確になると考えている。本講演では、プラットフォームの構想と構築スケジュールについて紹介する。また、既知の CO_2 固定微生物の文献調査によって明らかになってきた実態についても紹介する。

It is said that microorganisms have extremely diverse characteristics and that the microorganisms we are able to cultivate are only a small fraction of them. NITE contributes to biomanufacturing by preserving and providing useful microorganisms for industry, and by providing the "Data and Biological Resource Data Platform," an integrated database of microorganisms. This Green Innovation project aims to build a platform specialized for "CO_2-fixing microorganisms" for users who are interested in biomanufacturing. We are planning to register novel CO_2-fixing microorganisms to the platform, and will include information on culture media, pathways, genomes and 3D structural prediction of gene product in collaboration with other databases. We also plan to comprehensively collect information on known CO_2-fixing microorganisms from references and other sources. Comparing this information will clarify the characteristics of new CO_2-fixing microorganisms. In this presentation, we will introduce the concept of the platform and the schedule for its development. Information on known CO_2-fixing microorganisms will also be outlined.

CO_2-fixing microorganisms, database

講演番号：3S15A3p-07
講演日時、会場：3 月 26 日 16:05～ A3 会場

最後に：CO_2 固定微生物利活用プラットフォームを介したバイオものづくり支援の取組

Lastly: Effort to Support Biomanufacturing through the CO_2-fixing Microorganism Utilization Platform

○加藤 愼一郎 (独立行政法人製品評価技術基盤機構)
○Shinichiro KATO (National Institute of Technology and Evaluation)

我々が構築を目指す「CO_2 固定微生物利活用プラットフォーム」は、プロジェクトが終了する 2030 年以降、一般公開し、CO_2 からのバイオものづくりへの貢献を果たすことを目標としている。

一方、他の GI 基金事業採択機関等から、本プロジェクトで得られる CO_2 固定微生物や関連情報を早期から利活用し、バイオものづくりに生かしたいとの要望を受けた。そこで、本プロジェクトで得られる成果物をタイムリーに利用してもらうための新たな協調領域「GI フォーラム」を立ち上げることとした。GI フォーラムは CO_2 からのバイオものづくりを志す国内の産業界やアカデミア等により構成される登録制の協調・協奏型コミュニティで、本プロジェクトと GI フォーラム参加機関の連携を通じた我が国の CO_2 からのバイオものづくりの活性化を目的とする。GI フォーラムでは、参加機関に対して本プロジェクトで得られた収集菌株や関連情報等への早期からのアクセスを可能とする。その見返りとして、参加機関にはそれらの成果物を利用して得られたデータ等の提供、プラットフォームのユーザーテストへの協力を通じて、プラットフォームの拡充・利便性向上への支援をお願いする。CO_2 固定微生物やその情報の取扱いに関する勉強会等も実施する予定である。GI フォーラムの趣旨に賛同し、参加に興味がある機関があれば遠慮なく連絡いただきたい。

The CO_2-fixing Microorganisms Utilization Platform will be open to the public after the project is completed in 2030 for the purpose of the contribution to biomanufacturing from CO_2 in Japan.

On the other hand, we have received requests from other participants of GI Fund project for early access to CO_2-fixing microorganisms and related information obtained through the project to utilize for biomanufacturing. We, therefore, decided to establish a new cooperative framework, "GI Forum". The purpose of the GI Forum is to promote biomanufacturing from CO_2 in Japan. In this Forum, participating institutions are provided with early access opportunity to the strains collected through the Project and related information. In return, we ask them to support the improvement of the platform by providing data obtained through the use of these strains and information and by cooperating in user testing of the platform. We also plan to hold seminars relating to the handling of CO_2-fixing microorganisms and their information. If you agree with the concept of the GI Forum and are interested in participating, please do not hesitate to contact us.

CO_2-fixing microorganism, biomanufacturing

講演番号：3S16A4p-01
講演日時、会場：3 月 26 日 13:53～ A4 会場

Arrest of blood intake and subsequent amino acid dynamics in *Aedes aegypti*

○Chisako Sakuma[1], Yusuke Kato[1,2], Hirotaka Kanuka[3,4], Fumiaki Obata[1,2] ([1]RIKEN BDR, [2]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [3]Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., [4]Ctr. Med. Entomol., Jikei Univ. Sch. Med.)

Developing approaches to control the spread of mosquito-borne diseases such as malaria and dengue fever requires an understanding of the mechanisms governing blood feeding and egg laying. Mosquitoes appear to regulate these by sensing different components of the host's blood at different time courses after the onset of feeding. At the end of the feeding phase, mosquitoes appear to cease feeding by sensing a 16-amino acid peptide called fibrinopeptide (FPA), which increases as blood coagulation proceeds in the mosquito midgut. We observed that serum extracted from animal blood functions to inhibit ATP feeding, a phagostimulant in *Aedes aegypti*. Fractionation and MS analysis of serum components identified FPA as the inhibitory factor. Furthermore, administration of batroxobin, a snake thrombin-like venom that specifically cleaves FPA from fibrinogen, to mouse blood inhibited feeding by mosquitoes. Mosquitoes may employ FPA, released as a byproduct of blood clotting, to quantify the amount of blood ingested and the duration of blood-feeding.

After feeding on blood, it is widely known that mosquitoes utilize blood-derived amino acids for energy production and egg yolk protein synthesis. However, not many studies have investigated in detail the dynamics of how the concentrations of the 20 amino acids change in the mosquito body, how they are metabolized and excreted. Therefore, LC-MS/MS was used to analyze the concentration of each amino acid in the mosquito's whole body and excreta at different time points after feeding. We found that the timing of maximum and minimum concentrations in the body differed for each amino acid. Furthermore, some amino acids were found to be excreted in higher amounts in the excreta. Here, we would like to present the details of amino acid dynamics and discuss the possible role of each amino acid in blood metabolism.

Mosquito, blood feeding, blood metabolism

講演番号：3S16A4p-02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:17～ A4 会場

The role of conditional trade-offs in lifespan determination in Drosophila melanogaster

○Piper Matthew, Mirth Christen (Monash University)

One of the cornerstones of evolutionary life history theory is that reproduction and lifespan are locked into an obligate trade-off as they compete for limiting resources. Our research has sought to dissect this axiom by exploring the role of specific dietary nutrients in mediating this trade-off. Our findings reveal an important paradigm shift: the trade-off between reproduction and lifespan is not inevitable but is conditional, depending on the identity of the limiting nutrient in the diet. These results not only provide novel insights into the complex interplay between diet, reproduction, and longevity but also contribute to our understanding of the mechanisms and the evolutionary context driving lifespan variation.

Drosophila melanogaster, lifespan, nutrient

講演番号：3S16A4p-03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:41～ A4 会場

Gut and pancreatic hormones released after a meal regulate glucose metabolism via the vagal afferents - brain axis.
○Yusaku Iwasaki (Kyoto Pref. Univ.)

Meal intake stimulates the secretion of various gastrointestinal and pancreatic hormones, indicating that post-meal information from food is converted into these postprandial hormones to regulate homeostasis. Postprandial insulin, released by the pancreas, and the glucagon-like peptide-1 (GLP-1), secreted from the intestine, play crucial roles in restoring elevated blood glucose levels to their basal state. It is generally understood that intestinal GLP-1 stimulates pancreatic beta cell to promote glucose-induced insulin secretion, and the insulin influences metabolic organs such as the skeletal muscles and adipose tissues to promote glucose uptake. As a result, GLP-1 and insulin cooperatively regulate glucose homeostasis as hormones.

Vagal afferent nerves are one of visceral sensory nerves that rapidly covey peripheral information to the brain. Our previous studies have demonstrated that GLP-1 and insulin individually or collaboratively activate the common subclass of vagal afferent neurons in ex vivo experiments (Y. Iwasaki, *Neuropeptide* 2017). However, the specific physiological functions induced by this collaborative action of insulin and GLP-1 on vagal afferents remain unclear.

We recently identify rare sugar D-allulose (Allu) as a non-calorie GLP-1 secretagogue (Y. Iwasaki, *Nat. Commun*. 2018). Endogenous GLP-1 release by oral gavage of Allu dramatically ameliorated hyperglycemia without changing plasma insulin levels in type-2 diabetic mice with hyperinsulinemia. This result suggests that intestinal GLP-1 enhances insulin sensitivity or ameliorates insulin resistance in type-2 diabetes. However, Allu-induced GLP-1 release did not alter blood glucose in health mice and type-1 diabetic mice with hypoinsulinemia. The improvement in hyperglycemia by Allu requires activation of vagal afferent nerves mediated by GLP-1 and insulin. In this talk, I will present our recent research aimed at understanding how endogenous GLP-1 and insulin regulate glucose metabolism via vagal afferents neural pathway.

GLP-1, insulin, vagal afferent nerves

講演番号：3S16A4p-04
講演日時、会場：3 月 26 日 15:05～ A4 会場

フタホシコオロギにおける成育環境に適応した摂食行動の調節機構
Regulatory mechanism of feeding behavior adapted to growth environment in crickets

○清家 瞳、永田 晋治（東大院新領域）
○Hitomi Seike, Shinji Nagata (The Univ. of Tokyo)

昆虫は地球上で最も繁栄した生き物であり、様々な環境に適応するために多種多様な形態や行動を獲得した。例えば、明暗周期や日長条件、外気温に応じて休眠する種がいる。また、幼虫期に経験した個体群密度によって摂食行動や攻撃性行動、運動活性を変化させることで環境に順応する種もいる。このように昆虫各種に備わっている環境に応答する行動を規定するのは、主にペプチドホルモンであると考えられている。そこで我々は、様々な行動制御のうち、摂食行動に着目して、ペプチドホルモンがどのようなネットワークを構築し行動を規定しているかを明らかにすることを目的として研究してきた。特に、我々の研究材料であるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* は、雑食性昆虫であり、セルフセレクションと呼ばれる「体内の栄養状態を認識し、足りない栄養素を補うような栄養分選好性行動」が見られる。そのため、コオロギを用いることで、食べる・食べないという行動以外に、雑食性として特徴的な肉食性と植食性の選好性行動の制御についても解析が期待できる。本シンポジウムでは、フタホシコオロギにおいて、摂食行動がどのようなメカニズムで制御されているかについて、特にホルモンをはじめとする内分泌制御について最新の知見も含めて紹介する。

Insects alter behaviors in response to their habitats and environments. For example, light/dark cycles, day length, and temperatures influence the possibilities of diapause. Also, even short-term experiences of environmental and population stress influence various biological activities including feeding, aggressive behaviors, and locomotor activities. We, therefore, aim to understand the underlying mechanisms of feeding behaviors predominantly established by peptide hormones. In order to elucidate the network of peptide hormones that regulate these behaviors, we conduct the usage of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*, an omnivorous orthopteran species. The omnivorous characteristics of cricket support understanding “self-selection,” which is an innate feeding behavior to compensate for required nutrients. Namely, we can address the motivative behavior “to eat or not to eat” and what to eat using the crickets. In this symposium, we present the endocrine control in self-selective feeding including our latest findings in crickets.

cricket, feeding behavior, peptide hormones

講演番号：3S16A4p-05
講演日時、会場：3 月 26 日 15:29～ A4 会場

Neural vitamin B1 sensing regulates food intake and preference
○Ken-ichiro NAKAJIMA[1,2,3] ([1]Nagoya Univ., [2]NIPS, [3]JST-PRESTO)

Omnivorous animals including human often need to choose what they eat among various foods. Gustatory and visceral inputs, both of which form food preference, play an important role in evaluating food value during this selection behavior. Although food preference is known to change depending on physical and psychological factors, it remains unknown why originally unattractive food sometimes become preferable. Hereafter, I call this phenomenon food revaluation (FR).

Vitamin B1 is one of essential micronutrients for energy production in all the animals on the earth. Despite its importance, it is largely unknown how the brain sense vitamin B1 or its deficiency.

To address these issues, we investigate the details of a gut-brain axis for vitamin B1 sensing in mice. We found that dynamic activity changes in specific neural populations during recovery from vitamin B1 deficiency. With these changes in neural activities, we succeeded in construction of a novel FR model with originally aversive diets.

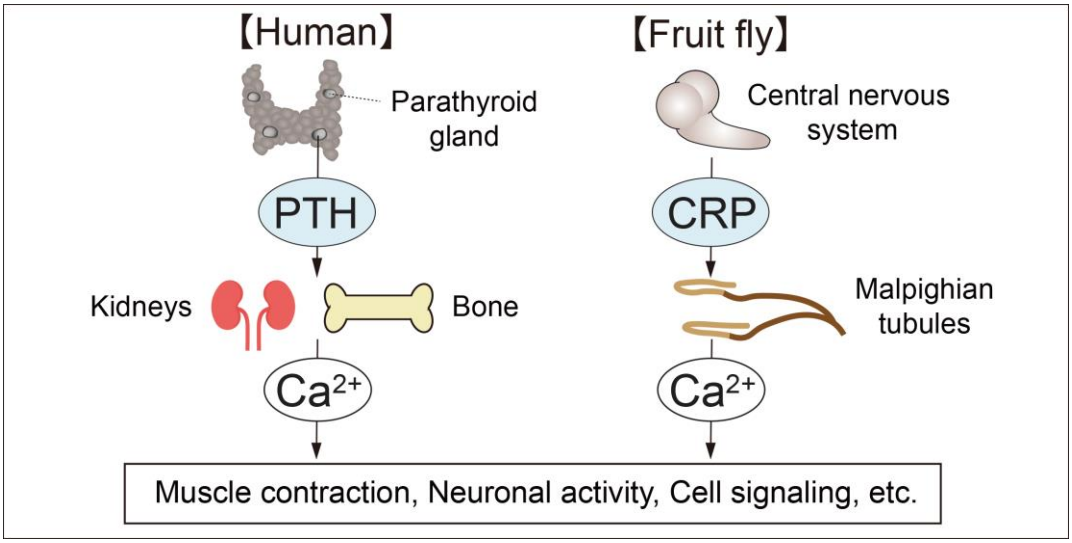
In this symposium, I am going to explain the recent progress in the identification of neural mechanism of FR.

Taste, Preference, Micronutrient

講演番号：3S16A4p-06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:53～ A4 会場

Unraveling the neuroendocrine mechanisms of calcium homeostasis in “bone-less” insects
○Naoki Okamoto[1], Yosuke Mizuno[2], Ryusuke Niwa[1] ([1]TARA, Univ. of Tsukuba, [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Univ. of Tsukuba)

Calcium ion (Ca^{2+}) is an essential mineral that supports various physiological activities. In vertebrates, Ca^{2+} homeostasis is primarily regulated by multiple hormones, including parathyroid hormone (PTH), depending on the vast Ca^{2+} reservoir in the bone. However, in invertebrates that lack *PTH* orthologs and bones, the endocrine mechanisms regulating Ca^{2+} homeostasis remain largely unknown. Here, we uncovered a potent peptide hormone, tentatively designated Ca^{2+}-regulatory peptide (CRP), responsible for regulating hemolymph Ca^{2+} levels in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Knockdown of *CRP* significantly decreases the hemolymph Ca^{2+} levels, resulting in a phenotype similar to animals reared on a Ca^{2+}-free diet. We further found that CRP secreted from three pairs of neurosecretory cells acts on a specialized Ca^{2+} storage compartment in the Malpighian tubules, elevating hemolymph Ca^{2+} levels. Our findings demonstrate that a neuropeptide CRP functions like a vertebrate PTH to regulate hemolymph Ca^{2+} levels in *Drosophila*, proposing a novel endocrine mechanism for governing Ca^{2+} homeostasis in insects.



Calcium, Hormone, Insect

講演番号：3S17B6p-01
講演日時、会場：3 月 26 日 13:53～ B6 会場

分裂酵母に学ぶ経時寿命の制御機構

Analysis of regulatory mechanisms of lifespan using fission yeast

○饗場 浩文（名大院創薬）
○Hirofumi Aiba (Nagoya University)

細胞レベルで寿命を理解することは、ヒトをはじめとした高等動物の寿命を理解するための基本となる。我々は、分裂酵母をモデルに経時寿命（細胞が増殖を止めた後の生存期間）がどのように決まるのかに関して研究を進めている。その際、（１）高発現することにより経時寿命を延ばす遺伝子（長生き遺伝子）と、（２）経時寿命が延びる変異株（長生き変異株）の探索と解析に焦点を当て解析を行ってきた。本発表では主に、長生き遺伝子として同定した Ecl (Extender of Chronological Lifespan) 遺伝子群について紹介する。

分裂酵母の Ecl 遺伝子群は *ecl1*$^+$, *ecl2*$^+$, *ecl3*$^+$の３つのパラログからなり、経時寿命の維持に重複して機能する。また、それぞれは異なる環境ストレス（*ecl1*$^+$は硫黄やアミノ酸の欠乏、*ecl2*$^+$は熱ストレス）に応答して発現することが示された。今回、これまで環境ストレスが未知であった *ecl3*$^+$遺伝子が、リン酸の欠乏に応答して発現し、性分化や細胞周期の制御に働くことが明らかになったので紹介する。さらに、*ecl1*$^+$, *ecl2*$^+$, *ecl3*$^+$の役割分担（3 つ重複して存在することの意義）についても、検討を加えたので紹介したい。

参考文献:Ohtsuka, H. *et al.*, Molecular Microbiology (2023) 120, 645–657. DOI: 10.1111/mmi.15134

Understanding of lifespan at the cellular level is fundamental to understanding the lifespan of humans and other higher animals. Using fission yeast as a model, we are studying how the lifespan of cell is determined. We have focused on (1) genes whose overexpression extend lifespan (long-lived genes) and (2) mutant strains that have an extended lifespan (long-lived mutants). In this symposium, we will introduce the Ecl family genes identified as the long-lived genes.

The Ecl family genes in fission yeast consists of three paralogs, *ecl1*$^+$, *ecl2*$^+$, and *ecl3*$^+$, that overlap in maintaining chronological lifespan. Each was predicted to be expressed in response to different environmental stresses. In this study, we present that the *ecl3*$^+$ gene, whose environmental stresses were previously unknown, is expressed in response to phosphate limitation and functions in the regulation of sexual differentiation and cell cycle. In addition, the roles of *ecl1*$^+$, *ecl2*$^+$, and *ecl3*$^+$ genes (the significance of having three similar genes) are also discussed.

chronological lifespan, fission yeast, Ecl family genes

講演番号：3S17B6p-02
講演日時、会場：3 月 26 日 14:17～ B6 会場

分裂酵母の一生を見る
Looking into the life of fission yeast

○中岡 秀憲（京大院生命）
○Hidenori NAKAOKA (Kyoto Univ.)

複製老化は細胞生物学において確立した概念であるが、対称分裂を行う微生物においても適用できるかどうかは議論の余地がある。我々は分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）の長期ライブイメージングを行うためのマイクロデバイスを開発し、典型的な培養条件において old-pole 系譜が数十世代以上の期間にわたって分裂率を保ったまま成長し続けることを見出した。従って、少なくとも old-pole 系譜では複製老化が生じる可能性は低いと考えている。

しかし、この観察系でも細胞死が観察され、それはランダムイベントであることが分かった。また、死亡率は培地や温度といった環境に固有のものであり、その環境での成長率と相関していた。これらの観察結果から、細胞成長と関連する何らかのランダムイベントが複製老化を介さずとも細胞死を誘導できることが示唆される。これは生命システムの安定性が完全ではないことの一つの表れであろう。細胞の確率的な死の過程で生じる様々な生理状態の変化を調べ、その上流にある細胞死誘導のトリガーとなる分子イベントの実体に迫ることを目指している。

Replicative aging is a firmly established idea in cell biology. However, it is still controversial whether symmetrically dividing microbes undergo replicative senescence or not. We developed a microfluidic device for a symmetrically dividing fission yeast species (*Schizosaccharomyces pombe*), and demonstrated that old-pole lineages kept dividing at a constant rate for tens of generations in standard culture conditions. Therefore it is unlikely that the old-pole lineages undergo replicative aging, although we cannot exclude the possibility that other types of lineages do.

It is noteworthy, however, that fission yeast cells in the favorable culture conditions did stochastically undergo cell deaths. The death rate was dependent on culture conditions such as media and temperature, and correlated with growth rates. These observations imply that some random events can trigger an exit from the steady growth states, which might give us a clue to understand a fundamental limitation in the stability of a biological system even without aging. We are currently further investigating changes in the physiological states in the dying cells to gain insights into the death-triggering events at molecular levels.

Replicative aging, fission yeast, microfluidics

講演番号：3S17B6p-03
講演日時、会場：3 月 26 日 14:41～ B6 会場

清酒酵母の液胞酸性化から見る高発酵性とストレス耐性

Relationship between vacuolar acidification, high alcohol fermentation and stress tolerance in sake yeast

○中瀬 舞、浅井 拓也、明石 貴裕（白鶴酒造株式会社）
○Mai NAKASE, Takuya ASAI, Takahiro AKASHI (Hakutsuru Sake Brewing Co.,Ltd.)

清酒醪は、発酵初期には高糖・低 pH・低温・低窒素源ストレス環境、発酵後期には高アルコールストレス環境となる。清酒酵母はこのようにドラスティックに変化する環境ストレスに晒されながらアルコール発酵を行っている。また、清酒醪環境における酵母の対数増殖は初期のうちに完了しており、その後の定常期の細胞の生理状態が発酵力に大きく関わることがわかってきた。このようなことから、清酒酵母が醪環境中で健全に発酵するためには、高いアルコール発酵性とストレス適応能力、そして定常期細胞の寿命（≒経時寿命）が関連すると考えられる。清酒酵母はアルコール発酵を行う際に細胞内 ATP を多く生産するが、過剰な ATP は解糖系を負に制御することが知られている。そこで我々は、ATP の消費を促す目的で液胞膜 V-ATPase をターゲットとして高発酵性株の育種を試みた。液胞膜 V-ATPase の活性阻害剤である Bafilomycin A1(Baf)に耐性を示す株は、液胞の酸性化・細胞内 ATP 量の減少・糖取り込み活性の向上・エタノール生産性の向上が観察された。さらに、醪末期の生菌率も顕著に高いことが明らかとなった。本発表では、これまでに明らかとなった Baf 耐性株の特徴から、高発酵性と清酒醪ストレスへの適応能力、そして酵母の寿命延伸との関連性について考察したい。

Sake yeast is exposed to high sugar concentration, low pH, low temperature, low nitrogen source and high alcohol stress in sake mash. It has been found that the logarithmic growth phase of yeast in the sake mash is completed in the early stage, and that the physiological state of the cells in the stationary phase after that has a large influence on the fermentability. From these facts, it is thought that in order for sake yeast to ferment healthily in sake mash, high alcohol fermentability, stress adaptation ability, and stationary phase cell lifespan (≒ chronological lifespan) are related. We found that strains resistant to Bafilomycin A1 (Baf), an inhibitor of the activity of the vacuolar membrane V-ATPase, showed vacuolar acidification, reduced ATP content, increased sugar uptake activity and increased ethanol productivity. Furthermore, it was revealed that the viable rate of yeast at the final stage of fermentation was significantly high. This presentation will discuss the relationship between the high fermentability of sake yeast, their ability to adapt to sake mash stress and the extension of yeast lifespan.

Sake, *S. cerevisiae*, V-ATPase

講演番号：3S17B6p-04
講演日時、会場：3 月 26 日 15:05～ B6 会場

ビール酵母の細胞死と寿命

Cell death and lifespan of the bottom-fermenting yeast

○善本 裕之（キリン HD 飲料未来研）
○Hiroyuki Yoshimoto (Institute for Future Beverages, Kirin Holdings Co., Ltd.)

ビール酵母は麦汁から栄養を摂取し、アルコールと香味成分を造り出す。麦芽使用比率が低い、或いは不使用となる発泡酒や新ジャンルでは、不足する糖は液糖で補われるものの、糖以外の栄養源が欠乏している場合がある。健全な発酵を行うためには、麦汁に含まれる糖と糖以外の栄養源の栄養源バランスが重要であり、バランスが崩れると発酵遅延や好ましくない香味の発生に繋がってしまう。これまでに、糖単独の培地でビール酵母を発酵させると、酵母が死滅すること(糖誘導細胞死= Sugar-Induced Cell Death)を明らかにしてきた。また、糖以外の栄養源を一定にして、糖濃度を 2%から 0.5%へ減少させると、酵母の寿命が 30%長くなることが報告されている(Lin ら, Nature 418, 344-348 (2002))。一方、ビール製造時は、発酵が終了した酵母を次発酵で使用する、所謂、酵母連用が行われる。酵母連用に伴う遺伝子コピー数の変化を DNA マイクロアレイ解析で調査したところ、酵母連用に伴い一部の染色体で遺伝子のコピー数が変化した。健全な発酵を行うためには、糖と糖類以外の栄養源バランス(細胞死や寿命)や遺伝子コピー数変化を考慮した制御が重要となる。

The bottom-fermenting yeast takes nutrients from the wort to produce alcohol and flavor compounds. In low-malt beer or no-malt new genre, the lack of sugar is compensated for with liquid sugar, but other sources of nutrients may be lacking. For good fermentation, the balance of nutrient sources between sugar and non-sugar sources in the wort is important, and an imbalance can lead to delayed fermentation and undesirable flavors. We have previously shown that fermentation of the bottom-fermenting yeast in a sugar-only medium results in the death of the yeast (Sugar-Induced Cell Death). It has also been reported that the Lifespan of yeast is extended by 30% when the sugar concentration is reduced from 2% to 0.5% with a constant nutrient source other than sugar (Lin et al., Nature 418, 344-348 (2002)). On the other hand, in beer production, yeast that has finished fermentation is used in the next fermentation (Repitching). DNA microarray analysis revealed that the copy number of genes in some chromosomes changed with the Repitching of yeast. For good fermentation,, it is important to control the balance of sugar and non-sugar nutrient sources (Cell death and Lifespan) and gene copy number changes.

bottom-fermenting yeast, Sugar-Induced Cell Death, lifespan

講演番号：3S17B6p-05
講演日時、会場：3 月 26 日 15:29～ B6 会場

酵母から哺乳類まで寿命を延ばす細菌
A bacterial strain that extends lifespan from yeasts to mammals

○伊藤 孝、吉田 稔 (理研 CSRS・ケミカルゲノミクス)
○Takashi Ito, Minoru Yoshida (Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS)

老化研究分野において、実験室内のモデル生物の寿命を延ばす手段はいくつか報告されているが、実社会における有効性はまだ示されていない。抗老化を目的とした介入は、医療行為としての対象とならないこと、またヒトの寿命が長いなどの点で、病気と比べて橋渡し研究を行う上で大きな制約がある。環境要因による長寿との相関を示す因子は複数明らかにされているが、生活環境に共存する他の生物種が長寿に及ぼす影響は、ヒトや実験室内モデル生物においてはまだ明らかにされていない。我々は、ヒトの生活環境に存在し、EU の安全適格性(QPS)を満たす属種の細菌株 P-1 が、出芽酵母、線虫、短寿命マウス、野生型マウス（雌雄）に共通して顕著に寿命を延ばすことを見出した。遺伝学的解析および生化学的解析から、長寿効果は真核生物に保存された mTORC1 経路の阻害が重要であることが、これらのモデル生物に共通して示唆された。モデル生物から社会実装への橋渡し研究として、ペット犬に P-1 を投与し、その結果を検証した。血液 RNA-Seq の結果は、マウスにおける結果と類似し、mTORC1 阻害による遺伝子発現変化のパターンが見られた。これらの結果から、酵母からマウスまで共通して寿命を延ばす介入が、実験室外の哺乳類でも類似した効果を示す可能性があるとともに、特定の細菌が真核生物の生存期間を制御する作用があることが示唆される。

In the field of aging research, several means of extending the lifespan of model organisms in the laboratory have been reported, but their effectiveness in the real world has yet to be demonstrated. We found that a bacterial strain, P-1 of bacterial species assumed as safe in EU, extended lifespan in budding yeast, nematodes, short-lived mice, and wild-type mice (male and female) in common. Genetic and biochemical analyses suggested that the longevity effect was due to inhibition of the mTORC1 pathway, conserved in eukaryotes, in common with these model organisms. As a translational study from lab organisms to species living in the real world, P-1 was administered to pet dogs to validate the results. Blood RNA-Seq results were similar to those in mice, showing a pattern of gene expression changes due to mTORC1 inhibition. These results suggest that interventions that extend lifespan, common from yeast to mice, may have similar effects in mammals outside the laboratory, and that certain bacteria act to regulate eukaryotic lifespan.

lifespan, aging, bacteria

講演番号：3S17B6p-06
講演日時、会場：3 月 26 日 15:53～ B6 会場

出芽酵母と線虫の寿命を延長するメチオニン代謝物

Methionine Metabolites Extend Lifespan in Budding Yeast and *C. elegans*

○水沼 正樹（広島大院統合生命）
○Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

老化・寿命制御機構の解明は、老化に伴うがんや代謝疾患、神経変性疾患など加齢性疾患の発症メカニズムの解明のみならず、それら疾患の予防・遅延を介した健康寿命の延伸に貢献することが期待される。近年、アミノ酸の一種であるメチオニン(Met)の制限はモデル生物の寿命を延長することに加え、加齢に伴う各種疾患を予防する有効な介入方法として有望視されている。

我々は、出芽酵母を用いた解析から、メチル基供与体・*S*-アデノシルメチオニン(SAM)合成の促進は寿命を延長することを発見した。具体的には、SAM は Met と ATP から生合成されるため、SAM 高生産による Met と ATP の消費がそれぞれ Met 制限の誘導と AMP 依存性キナーゼ(エネルギーセンサー・長寿遺伝子)を活性化する 2 つの作用により、寿命が延長するメカニズムである。驚いたことに、SAM のメチル化反応の競合阻害物質である *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)を酵母や線虫に作用させると寿命が延長した。これは、SAH が SAM 合成を促進することによる Met 制限と AMPK の活性化を誘導するというものである。本シンポジウムでは、酵母を用いた寿命研究は基礎的な老化・寿命制御の理解のみならず、発酵産業などの分野にも応用展開できる可能性についても触れたい。

The elucidation of aging and lifespan regulation mechanisms is expected to contribute not only to the elucidation of the onset mechanisms of age-related diseases such as cancer, metabolic diseases, and neurodegenerative diseases, but also to the extension of healthy lifespan through the prevention and delay of such diseases. Recently, methionine (Met) restriction has shown considerable potential as an effective intervention method to prevent various age-related diseases, in addition to extending the lifespan of model organisms. We found that stimulation of methyl group donor *S*-adenosylmethionine (SAM) synthesis extends lifespan in budding yeast. Specifically, since SAM is biosynthesized from Met and ATP, the consumption of Met and ATP by high SAM production induces Met limitation and activates AMP-dependent kinases (energy sensors and longevity genes), respectively, which are two mechanisms that extend lifespan. Surprisingly, *S*-adenosylhomocysteine (SAH), a competitive inhibitor of SAM methylation reactions, extended lifespan in yeast and nematodes. This is because SAH induces Met restriction and AMPK activation by stimulating SAM synthesis. In this symposium, I would like to discuss not only the basic understanding of lifespan research using yeast, but also the possibility of developing applications in the fermentation industry and other fields.

yeast, Methionine, *S*-adenosylhomocysteine

講演番号：4S18A1a-01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A1 会場

ケミカルバイオロジー的アプローチによるレジリエンスの理解
Understanding resilience from a chemical biology approach

○長田 裕之 [1,2] ([1] 理研環境資源セ、[2] 静岡県大薬)
○HIROYUKI OSADA[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]U. Shizuoka)

生物におけるレジリエンスを回復力あるいは適応能力と捉えると、個体レベルの研究が主流であり、細胞レベルでの研究は限定的である。本講演では、ケミカルバイオロジー的手法により動物および植物のレジリエンスに関して行った我々の研究を報告する。
１．Cupin スーパーファミリーに属する pirin タンパク質は、微生物から動植物に至るまで広く存在するが、その機能は生物種毎に多岐に亘っており未知の部分が多い。我々は、化合物アレイを用いて pirin に結合する小分子化合物の探索を行い、それで見出された TPhA を用いて pirin が悪性黒色腫細胞に於いて浸潤・転移に関わっていることを明らかにした。
２．植物は乾燥や塩分などのストレスに対して、アブシジン酸（ABA）を過剰に生産してリジリエンスを発揮する。シロイヌナズナでは、10 種類以上の ABA 受容体が知られているが、個々の受容体がどのような生物現象（気孔閉鎖、根の伸展など）に関わっているのかは不明な点が多い。そこで、我々は ABA 受容体 9 種類を調製し、化合物アレイを用いて、それぞれの受容体タンパク質に対する小分子リガンドのスクリーニングを行った。ヒット化合物（3’-butyl-ABA など）を用いて、ABA 受容体サブタイプに対する選択性、乾燥耐性に必須な遺伝子応答を解析した。

When considering resilience in living organisms, research at the cellular level is limited. However, I would like to talk the molecular mechanisms of resilience from chemical biology approach.
1. The pirin protein, which belongs to the Cupin superfamily, exists widely from microorganisms to animals and plants. We used a chemical array and found a small molecule, TPhA, as a pirin ligand. Using the TPhA, we revealed that pirin is involved in the invasion and metastasis of malignant melanoma cells.
2. Plants exhibit resilience in response to stresses such as drought and salinity by overproducing abscisic acid (ABA). More than 10 types of ABA receptors are known in *Arabidopsis*, but it is still unclear which receptor is involved in which biological function (stomata closure, root elongation). Then, we prepared nine types of ABA receptors and used the chemical array to screen small molecule ligands for each receptor. Using the hit compounds, we analyzed the ligand selectivity for ABA receptor subtypes and gene expression essential for resilience.

chemical array, pirin, abscisic acid

講演番号：4S18A1a-02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:55～ A1 会場

フェアリー化合物とレジリエンス

Fairy chemicals snd resilience

○河岸 洋和 (静大農)
○Hirokazu Kawagishi (Shizuoka Univ.)

芝が輪状に周囲より色濃く繁茂あるいは枯死し、後にキノコが発生する現象はフェアリーリング（fairy rings）と呼ばれ、西洋の伝説では妖精（fairy）が輪を作りその中で踊ると伝えられている。しかし、その妖精の正体（芝を繁茂させる原因）は謎のままであった。我々は、フェアリーリングを引き起こすコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から 2-アザヒポキサンチン（AHX）とイミダゾール-4-カルボキサミド（ICA）を発見した。AHX は植物中で代謝され 2-アザ-8-オキソヒポキサンチン（AOH）に変換された。その後、これらの 3 つの化合物（フェアリー化合物，fairy chemicals と命名，FCs と略称）はあらゆる植物中に内生し、新しいプリン代謝経路を介して生合成されることが証明された。FCs は植物に対して様々な生物的・非生物的ストレスに対するレジリエンスを強め、結果的に植物の成長を制御する [1,2]。本シンポジウムでは、その例を紹介する。

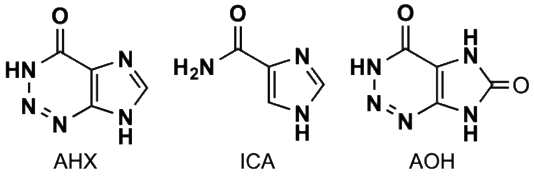


図1 フェアリー化合物の化学構造

The rings, ribbons or arcs of stimulated plant growth and/or of the fruiting bodies of the larger fungi which often occur in floors of woodlands, agricultural or amenity grassland in most parts of the world are commonly called “fairy rings”. 2-Azahypoxanthine (AHX) and imidazole-4-carboxamide (ICA) were isolated from a fairy-ring-forming fungus *Lepista sordida*. AHX was converted into a metabolite, 2-aza-8-oxo-hypoxanthine (AOH) in plants. These three compounds, named as fairy chemicals (FCs), endogenously exist in plants and are biosynthesized via a new purine metabolic pathway. FCs enhance resilience to a variety of biotic and abiotic stresses on plants, regulating the growth of plants.[1,2] Some examples will be presented in this symposium.

1) Kawagishi, H., Fairy chemicals – a candidate for a new family of plant hormones and possibility of practical use in agriculture –, Biosci. Biotechnol. Biochem., 82(5), 752–758 (2018)
2) Kawagishi, H., Are fairy chemicals a new family of plant hormones?, Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95(1), 29-38 (2019).

Fairy chemicals, resilience, stress

講演番号：4S18A1a-03
講演日時、会場：3 月 27 日 10:20～ A1 会場

昆虫の化学調節とレジリエンス
Chemical regulation of insects and resilience

○松田 一彦（近大院農）
○Kazuhiko Matsuda (Kindai University)

生物は環境変化にしなやかに対応し、種を維持している。このしなやかさ（レジリエンス）には、環境変化を感知する装置から個体レベルでの形質発現に至る巧妙な仕組みが関与している。講演者は殺虫剤抵抗性の研究を通じて、昆虫のレジリエンスの例を観察した。

合成殺虫剤ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対して選択的に作用し、殺虫効果を発揮する。この標的 nAChR は 5 つのサブユニットが中央のカチオンチャネルを取り囲むように集合してつくられる。例えばショウジョウバエでは α サブユニットとして 7 つの、non-α サブユニットとして 3 つのサブユニットが細胞・発達段階に応じて組み合わさり、神経伝達を調節している。ネオニコチノイドのアゴニスト・アンタゴニスト作用も多様な nAChR に応じて変化することから、その解析は想像以上に難しい。講演者はショウジョウバエを例に、通常は当該遺伝子の破壊・発現抑制が抵抗性につながるという常識に反して、過敏になる現象を観察し、多変量解析を駆使してその分子機構を解明した。本講演では、その詳細について紹介する。

Organisms respond to environmental changes to keep species。Such flexibility, which sophisticated mechanisms underlie is referred to as resilience. The author observed an example of resilience through the study of insecticide mode of actions.

Synthetic insecticides neonicotinoids act selectively on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). The nAChRs are formed by assembly of five subunits around the central cation channels. For example, in *Drosophila melanogaster*, seven α subunits and three non-α subunits combine together in response to neurons and developmental stages and regulate nerve transmission. Neonicotinoids act differentially on diverse nAChRs, hence it is rather difficult to study the mechanism of their actions. The author clarified that knockout/knockdown of a nAChR gene results in hyper-neonicotinoid sensitive, although such gene manipulation will lead resistance. The author will present the result in detail.

Chemical regulation, Insects, resilience

講演番号：4S18A1a-04
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A1 会場

ホタテガイの麻痺性貝毒代謝機構とフグのサキシトキシン、テトロドトキシン結合蛋白質
Metabolism of paralytic shellfish toxins in scallops, and Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein

○山下 まり[1]、沼野 聡[1]、長岡 佑真[1]、工藤 雄大[2,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]([1]東北大院農、[2]東北大学際研)
○Mari Yotsu-Yamashita[1], Satoshi Numano[1], Yuuma Nagaoka[1], Yuta Kudo[2,1], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]Tohoku Univ. FRIS)

ホタテガイなど二枚貝は、有毒渦鞭毛藻が生産するサキシトキシン(STX, **1,** Figure 1)やその類縁体(麻痺性貝毒(PST))を蓄積するが、有毒渦鞭毛藻の海水中細胞数が低くなるにつれて、次第にホタテガイの PST 濃度も低く元に戻る。また、ホタテガイの中腸腺には渦鞭毛藻にはほとんど検出されない M1(**2**) (Figure 2)など STX の 11 位にヒドロキシ基をもつ類縁体群(M トキシン)が検出される。M は代謝を意味する。講演者らは最近、新規の M トキシンとして、STX と骨格構造が異なる M5-HA (**3**) と H6-HA (**4**)を単離、構造決定した[1)]。ホタテガイが PST を蓄積したあと、低毒に戻るまでの PST の組成変化や M トキシン群への変換は、レジリエンス機構と考えられる。一方、講演者らはかつてヒガンフグ(*Takifugu pardalis*)の血漿中に STX、テトロドトキシン(TTX, **5**)結合蛋白質(PSTBP)が存在することや、その性状を報告した[2)]。その後、PSTBP 類似蛋白質は、南方に生息する *Arothron* 属のフグやオキナワフグ(*Chelonodon patoca*)にも存在し、PSTBP は有毒フグに共通する TTX, STX 耐性と蓄積に関与する蛋白質と考えられた[3)]。各 TTX 類縁体の PSTBP との結合性についても紹介する。

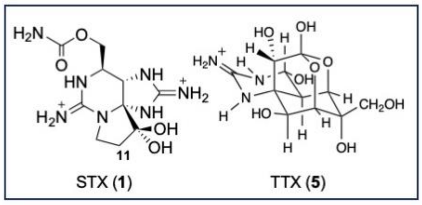


Figure 1 The structures of STX (**1**) and TTX (**5**)

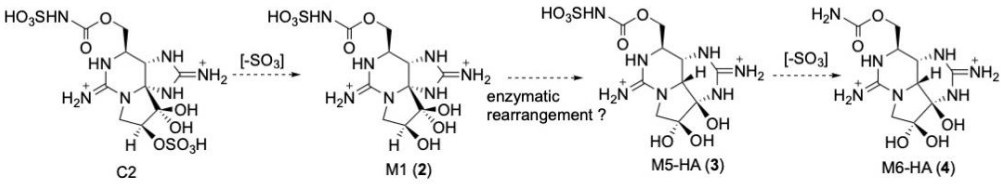


Figure 2 Proposed metabolic pathway from C2 to M1 (**2**), M5-HA (**3**) and H6-HA (**4**) in scallops.

The scallops accumulate paralytic shellfish toxins (PST) produced by some species of dinoflagellates. A group of PST which has a hydroxy group at C11 of saxitoxin (STX, **1**), called as M-toxins, is detected in bivalves, while it is mostly undetectable in dinoflagellates. We recently isolated and determined the structures of novel M-toxins, H5-HA (**3**) and H6-HA (**4**), from the scallops[1)]. Recovery of PST level after accumulation, and metabolism of PST to M-toxins can be thought as resilience in scallops. Additional finding about pufferfish STX and tetrodotoxin (TTX, **5**) binding protein (PSTBP) will be also presented[2,3)].

[References] 1) Numano, S., Yotsu-Yamashita, M. *et al., Chemosphere*, **2021**, *278*, 130224. 2) Yotsu-Yamashita, M. *et al., Eur. J. Biochem.*, **2001**, *268*, 5937–5946. 3) Yotsu-Yamashita, M. *et al., Mar. Drugs,* **2018**, *16*, 224. *沼野聡　現 水産研究・教育機構 水産技術研究所

scallop, saxitoxin, tetrodotoxin

講演番号：4S18A1a-05
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A1 会場

植物寄生線虫のレジリエンス
Resilience of plant parasitic nematodes

○伊藤 晋作（東京農大バイオ）
○Shinsaku Ito (Tokyo Univ. of Agr.)

植物寄生線虫は世界中で農業被害を引き起こす害虫にあげられている。特にシストセンチュウは通常土壌中でシストと呼ばれる殻の中で休眠しているが、環境変化や農薬などに強く、10 年以上生存可能であることから大きな被害を与えている。一方、植物への寄生が自身の生存に必須であるため、宿主を特異的に認識するために植物分泌物を孵化物質や誘引物質として認識することで、環境変化に柔軟に対応している。

シストセンチュウによる孵化物質、誘引物質の受容、認識機構はよくわかっていないが、我々の研究グループではモデル線虫である *Caenorhabditis elegans* の化学感覚関連遺伝子のホモログがその候補として機能すると考えている。これまでにダイズシストセンチュウを用いて宿主根への移動時に変動する遺伝子を探索したところ、複数の化学感覚関連遺伝子のホモログを見出した。RNAi によるグアニル酸シクラーゼ遺伝子の機能抑制は宿主根への移動が特異的に抑制されたことから、宿主認識に重要な遺伝子であると予想された。グアニル酸シクラーゼ遺伝子の他の植物寄生線虫への機能の詳細な解析結果に加えてその他の関連遺伝子の機能についても紹介する。

Plant parasitic nematodes cause devastating damage to crop yield in the world. Especially, the control of cyst nematodes is difficult because the dormant cyst nematodes in the soil are resistant to environmental changes and pesticides. On the other hand, the cyst nematodes respond flexibly to environmental changes by recognizing host-derived chemicals as hatching stimulants and attractants, since parasitism of host plants is essential to survive.

Although the mechanisms of how the cyst nematodes receive attractants are unknown, our group believes that cyst nematode homologs of chemosensory-related genes in the model nematode *Caenorhabditis elegans* may function as candidates for the recognition of attractants. We have explored genes that showed altered expression levels during migration to the host roots using soybean cyst nematode and found several chemosensory-related gene homologs. RNAi analysis revealed that one of the genes, the guanylate cyclase gene, regulated host recognition.

Cyst nematode, Attraction, Host recognition

講演番号：4S18A1a-06
講演日時、会場：3 月 27 日 11:35～ A1 会場

植物ホルモンとレジリエンス

Plant hormones and resilience

○浅見 忠男（東大院農）
○Tadao Asami (The Univ of Tokyo)

農業生産性の向上に役立つ資材として、植物ホルモン機能を応用した変異体や農薬が利用されている。たとえば緑の革命で用いられたジベレリンやストリゴラクトン関連変異体やオーキシン活性をもつ除草剤２，４−D等を上げることができる。また天然化合物の発見を契機としてその構造修飾により安定性や活性を高めた農薬も数多く知られている。今回、生体内植物ホルモンシグナルを変化させることで植物のストレス耐性を高める天然化合物とその応用方法について、我々の試みを３つ紹介する。一つ目は植物への病害抵抗性誘導効果をもつ新しい天然化合物群として発見したアシルスペルミジン類について、２つ目はカロテノイドから派生した新規植物ホルモン活性候補であるザキシノンとその誘導体について、最後は歴史のある化合物である植物ホルモンジベレリン機能の新しい利用方法についてである。

Plant hormone mutants and plant hormone regulators are used as agricultural materials that help improve productivity. Examples include the gibberellin-strigolactone mutant used in the Green Revolution and the herbicide 2,4-D, which has auxin activity. There are also a number of pesticides that have been discovered from natural compounds and then structurally modified to enhance their stability and activity. In this report, we introduce three of our attempts to develop natural compounds that enhance stress tolerance in plants by altering phytohormone signals in vivo and their application methods. The first is acylspermidines, a new group of natural compounds discovered to induce disease resistance in plants, the second is zaxinone, a new candidate for phytohormone activity derived from carotenoids, and its derivatives, and the last is a new way to utilize the plant hormone gibberellin function, which is a long-established compound. The last is about a new way to utilize the plant hormone gibberellin function, a compound with a long history.

plant hormone, stress resistance, increase in crop production

講演番号：4S19A2a-01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:35～ A2 会場

藻類の代謝工学による光合成バイオ生産への挑戦

Challenge to photosynthetic bioproduction through metabolic engineering of algae

○蓮沼 誠久 [1,2] ([1] 神戸大先端バイオ、[2] 神戸大科技イノベ)
○Tomohisa Hasunuma[1,2] ([1]EGBRC, Kobe Univ., [2]Kobe Univ.)

演者らはこれまで、光をエネルギー源とし、CO_2 を有用な有機物に高効率変換する藻株の開発に取組んできた。例えば、コハク酸や D-乳酸、*p*-クマル酸等のプラスチックモノマーを生産するラン藻や、フコキサンチンを高生産するハプト藻、オイルを高蓄積する緑藻等はその一部であるが、代謝工学的手法や進化工学的手法によりその物質生産能力を向上させてきた。新規藻株開発のキーテクノロジーとしてはメタボローム解析を有効に活用してきた。特に、*in vivo* 同位体標識法を導入した動的メタボロミクス技術を開発することで、生合成経路の解明、代謝ボトルネックの同定を可能にし、改変すべき酵素反応の特定に成功してきた。その代謝改変戦略を明確にし、物質生産能力を向上させてきた。本講演では、それらの実例に加え、社会実装に向けた大量培養技術の構築に向けた挑戦についても紹介したい。バイオものづくりにおける株育種では、合成生物学的アプローチを効率化する研究プラットフォーム「バイオファウンドリ」の開発が潮流となっており、バイオファウンドリへの藻類の適用についても議論できればと思う。

We have been working to develop algal strains that use light as an energy source and convert CO_2 into useful organic matter with high efficiency. For example, cyanobacteria, which produce plastic monomers such as succinate, D-lactate, and *p*-coumarate, and green algae, which accumulate high amounts of oil, are some examples of metabolic engineering. Its material production capacity has been improved through metabolic engineering and evolutionary engineering. Metabolomics has been effectively utilized as a key technology for the development of new algae strains. In particular, by developing dynamic metabolomics technology that incorporates *in vivo* isotope labeling, we have been able to elucidate biosynthetic pathways, identify metabolic bottlenecks, and successfully identify enzymatic reactions that should be modified. We have clarified the metabolic modification strategy and improved the substance production capacity. In this lecture, in addition to these examples, I would like to introduce the challenges of building mass culture technology for social implementation.

Metabolic engineering, Microalgae, Cyanobacteria

講演番号：4S19A2a-02
講演日時、会場：3 月 27 日 10:10～ A2 会場

太陽光と CO2 を直接原料とする藻類を活用したバイオものづくり

Bioproduction based on microalgae with direct use of sunlight and CO2

○笠原 堅（ちとせ研究所)
○Ken Kasahara (Chitose laboratory corp.)

昨年秋米国バイデン大統領が署名した大統領令に付随して 、バイオものづくりが今後10年以内に世界生産の1/3を置き換え、金額換算で約30兆ドル（4000兆円）に達するという分析結果が公表されました。我々は、電力では合成が困難な「有機物」を世界生産を置き換えるレベルで一次生産できるのは、太陽光とCO_2を直接の原料とする光合成で有機物を生み出す藻類のみと考えています。
藻類を活用した光合成基点の産業バイオ化を推進する当社のプロジェクトMATSURIには、すでに70機関を超えるパートナーが参画し、その活動の一環として応募した経産省/NEDOのグリーンイノベーション基金事業プロジェクト「光合成によるCO_2直接利用を基盤とした日本発グローバル産業構築」は、555億円規模で採択されました。
当日は、藻類由来の光合成産物から派生して生み出されうる製品化合物群とそこに対する産業界の期待を紹介します。また、目的とする製品化合物群の生成ルートについて、藻類以外のバイオ/非バイオのものづくり技術と比較した藻類の強みや課題を示し、千年先まで続くお祭りへの期待感の高まりを皆さんと共有できればと思います。

President Biden signed an Executive Order to launch a National Biotechnology and Biomanufacturing Initiative in September 2022. Followed by this order, the industry analysis suggested that bioengineering could account for more than a third of global output of manufacturing industries within 10 years, with the estimated value of USD 30 trillion. Complex organic matter can only be produced via photosynthesis performed by microalgae using solar energy and CO_2 as the direct source. CHITOSE believes that only microalgae production can replace and meet the global demands. Over 70 partners have joined CHITOSE-led MATSURI project (MicroAlgae Towards SUstainable and Resilient Industry) to develop and promote the photosynthesis based bio-industry. CHITOSE obtained funding from the Japanese Government (NEDO) for the Green Innovation Fund of 55.5 billion JPY, to accelerate the progress of the MATSURI project. The presentation will introduce potential products developed from microalgae, and what the industry and MATSURI partners expect from them. Furthermore, the presentation will address the comparison between bio-production (other than microalgae) and non bio-production methods between microalgae production methods.

micro algae, bioproduction, bioeconomy

講演番号：4S19A2a-03
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A2 会場

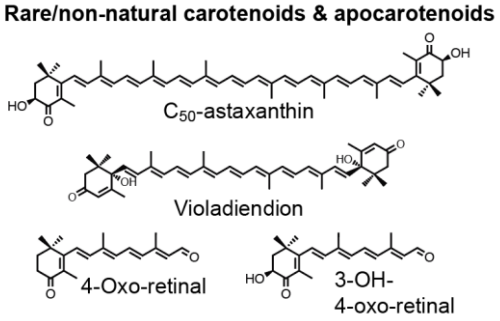
希少/非天然カロテノイド・アポカロテノイドの生合成工学

Production of rare or non-natural carotenoids and apocarotenoids by pathway engineering

○古林 真衣子（産総研・生物プロセス）
○Maiko Furubayashi (AIST BPRI)

カロテノイドは自然界に数百種以上存在する天然色素の一群で、細菌・菌類・藻類や植物によって生合成される。また、アポカロテノイドと呼ばれるカロテノイドの酸化開裂産物の一群には、植物の成長を制御する植物ホルモンのほか、香り分子やシグナル因子が知られており、バイオスティミュラントや香料、香辛料といった幅広い応用が期待されている。

現在広く研究・利用されているカロテノイドやその関連化合物は、自然界に広く存在する、比較的少数の種類の分子に占められている。自然界には 800 種類以上ものカロテノイドが存在するが、その入手困難さから、希少なカロテノイド分子の特性や機能は解明されないものも多く残っている。もし多様な構造を持つカロテノイドを実験室内で自在に、そして選択的に作り出すことができれば、より機能性の高いカロテノイドを見つけ出すことができるかもしれない。本講演では、進化分子工学やタンパク質工学を用いて、希少・新規なカロテノイド・アポカロテノイドの生合成経路を構築した試みについて紹介したい。



Carotenoids are a group of natural pigments found in nature, biosynthesized by bacteria, fungi, algae, and plants. Among them, a group of oxidative cleavage products of carotenoids known as apocarotenoids includes plant hormones that control plant growth, as well as fragrance molecules and signaling factors. These compounds have wide-ranging applications such as biostimulants, fragrances, and spices. Currently, the widely researched and utilized carotenoids and related compounds are a relatively small number of molecules that are abundant in nature. Although there are over 800 types of carotenoids in nature, many of their characteristics and functions remain unexplored due to the difficulty in obtaining them. If we could freely and selectively synthesize carotenoids with diverse structures in the laboratory, we might discover carotenoids with enhanced functionality. In this talk, I would like to introduce our attempts to construct biosynthetic pathways for rare and novel carotenoids and apocarotenoids using directed evolution, pathway engineering and protein engineering.

carotenoid, apocarotenoid, pathway engineering

講演番号：4S19A2a-04
講演日時、会場：3 月 27 日 11:20～ A2 会場

Bio ものづくり革命を志向した「よろづセンサ」計画
1000 SENSORS as a Bio-DBTL accelerator?

○梅野 太輔（早大院工）
○Daisuke UMENO (Waseda Univ.)

合成生物工学の一つの究極のゴールのひとつに，さまざまな有価物質への生合成経路の超高速な開通と効率化がある．ロボティクスの導入やオミクスの高度化，次世代シーケンシング，DNA 合成の超並列化，各種 AI 開発など，生物ものづくりによる DBTL（Design, Build, Test, Learn）サイクルは，「Test」の部分以外は，堅調に堅牢化・高速化・大規模化を達成しつつある．本講演では，DBTL における唯一各論的で Big players をも逡巡させているボトルネック；「Test」の克服にむけた我々の試みをご紹介したい．生物工学においては，既知・未知問わず無数かつ不可避な相互作用（Entanglement）よって，ナレッジベースの合理設計には限界がある．高品質かつ多数の教師データを機械学習に供することによって，バイオ DBTL の最後の壁，Test を打破することが可能であると期待される．

One of the ultimate goals of synthetic biotechnology is the ultra-fast and efficient establishment of biosynthetic pathways to various valuable substances at will. The DBTL (Design, Build, Test, Learn) cycle in biomanufacturing is steadily becoming more robust, faster, and larger, except for the "Test" part, through the introduction of robotics, advancement of omics, next-generation sequencing, massively parallel DNA synthesis and various AI developments. In this talk, we would like to introduce our attempt to overcome the bottleneck of "Test", which is the only domain with an individualistic nature and hence no unified solution has been presented. In the cell, there emerge the myriad of known and unknown cross-talks of the system components, and this limits the knowledge based-rational design of the efficient biocatalytic systems. With rapid development of biosensors for each and all individual projects on demand, it is expected that synthetic biologists concur the Test part, the final bottleneck of the bio-DBTL cycles.

Synthetic Biology, Biosensor, Directed evolution

講演番号：4S20A3a-01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A3 会場

真菌への寄生を確立する青枯病菌の化学コミュニケーション
Chemical communication of *Ralstonia* for endoparasitism into fungi

○甲斐 建次（阪公大院農）
○Kenji Kai (Osaka Metrop. Univ.)

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、ナス科を中心とした 350 種以上の植物に感染し、青枯病を引き起こすグラム陰性細菌である。本細菌の植物病原菌としての特性は多くの部分が解明され、私はそのメカニズム解明にクオラムセンシング（QS）を中心として取り組んできた。2016 年に、糸状菌との相互作用研究の過程で、青枯病菌が真菌に厚膜胞子を誘導し、その器官を通じて糸状菌に寄生する現象が発見された。大学教員になった頃から、細菌－糸状菌間の相互作用研究も細々と進めてきた。運命を感じて、この現象解明を精力的に進めている。気が付けば、強い競合相手がゴロゴロいる状況になってしまって、いくつかの点で海外勢に先を越されている。講演では、なんとかプライオリティーを維持している内容を中心に紹介する。

青枯病菌が糸状菌に内部寄生するには、厚膜胞子の誘導が必須となる。有名な Keller らによってその原因遺伝子が特定され、青枯病菌が作るリポペプチドが鍵分子であることが報告された。実は私も、その遺伝子には注目していたので、その論文を見たときは衝撃であった。私は天然物化学者なので化学では負けられないと、実験スピードをトップギアに入れてその分子の解明を何とか世界初で達成した。Ralstonin と名付けたその分子は、低濃度から *Fusarium oxysporum* などにおいて厚膜胞子を誘導した。さらに、誘導された胞子内に青枯病菌が寄生されるのが観察された。青枯病菌も他の細菌と同様、菌密度依存の遺伝子発現機構である QS 持っている。この QS 機構が、糸状菌内への寄生に必須であることを見出した。異種微生物間での相互作用に、QS が関与することが知られているケースは少なく、糸状菌内への寄生では初めての例である。青枯病菌の *F. oxysporum* へのアクセスから、その厚膜胞子誘導、胞子内への寄生までのメカニズムが少しずつ分かり始めた。講演を通して、青枯病菌にとっての真菌寄生の重要性を議論したい。

Ralstonia solanacearum is a Gram-negative bacterium that infects and causes bacterial wilt disease on more than 350 plant species. Many parts of the characteristics of this bacterium as a plant pathogen have been elucidated. We have been working to elucidate its mechanisms, mainly through quorum sensing (QS). In 2016, in the course of interaction studies with fungi, Keller's group discovered that *R. solanacearum* induces chlamydospores in the fungi. The bacterium parasitizes the fungi through the induced chlamydospores. We have found that the QS system of *R. solanacearum* is important in this parasitic process, which will be the focus of this talk.

quorum sensing, chemical communication, *Ralstonia solanacearum*

講演番号：4S20A3a-02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:55～ A3 会場

細菌が放出する細胞外膜小胞が生産誘導する天然物に関する研究
Studies on Silent Natural Products Induced by Bacterial Membrane Vesicles

○吉村 彩（北大院薬）
○Aya Yoshimura (Hokkaido Univ.)

最近の飛躍的なゲノムシーケンス技術の発展により細菌は我々が予想していた以上の天然物生合成遺伝子を保持していることが示された。しかし 80%以上の生合成遺伝子は通常の研究室培養条件では発現せず、休眠遺伝子と呼ばれる。これまで抗生物質や異種細菌を細菌培養液に添加することでいくつかの休眠遺伝子が活性化されている。それらの報告は細菌を本来の生育環境に模した条件で培養することで休眠遺伝子を活性化できることを示唆している。

近年、細菌が分泌する細胞外膜小胞（MVs）が海水から検出され、環境中で細菌は MVs に曝されていることが報告された。MVs はタンパク質・DNA 断片や小分子化合物を内包する小胞で、細菌間コミュニケーション媒体として機能する。我々は MVs を外部刺激として細菌培養液に添加することで細菌の本来の生育環境を模倣すれば未開拓の天然物を取得できると期待した。実際、本研究は *Burkholderia multivorans* の MVs が広範な細菌種に対して多様な物理化学的性質を有する代謝物を生産誘導させることを明らかにした。さらに MVs が *Xenorhabdus innexi* に対して天然物を生産誘導させるメカニズムを解析した結果、MVs は *X. innexi* のクオラムセンシング抑制を介して複数の天然物を生産誘導することを示した。一方、MVs により生産誘導された天然物を内包する *X. innexi* の MVs は *B. multivorans* に対して静菌作用を示した。以上から *B. multivorans* と *X. innexi* は MVs と天然物を介して競争的に相互作用することが示唆された。

Bacteria biosynthesize natural products with diverse chemical structures for flexible fitness to their original habitats. However, more than 80% of natural products have not been produced under normal laboratory conditions. Some previous reports have suggested that mimicking bacterial original habitats can activate silent metabolite production. Since bacterial membrane vesicles (MVs) work as signaling mediators in bacterial cell-to-cell communication, we envisioned that MVs activate the production of untapped natural products by imitating external stimuli in the bacterial original habitats. In this study, we employed *Burkholderia multivorans* MVs, which induced silent metabolites in a wide range of bacteria. A mechanistic analysis of MV-induced metabolite production in *Xenorhabdus innexi* suggested the interspecies communication between *B. multivorans* and *X. innexi* through MV exchange.

Silent biosynthetic gene clusters, Membrane vesicles, Bacterial communication

講演番号：4S20A3a-03
講演日時、会場：3 月 27 日 10:20～ A3 会場

酵母のグルコース飢餓時の排他的な生存戦略

Exclusive survival strategy of yeast during glucose starvation

○小田 有沙[1]、田村 美樹[1]、金子 邦彦[2]、太田 邦史[1]、畠山 哲央[3]([1]東大院総合文化、[2]コペンハーゲン大学 ニールスボーア研究所、[3]東京工業大学地球生命研究所)
○Arisa H. Oda[1], Miki Tamura[1], Kunihiko Kaneko[2], Kunihiro Ohta[1], Tetsuhiro S. Hatakeyama[3]
([1]The Univ. of Tokyo, [2]Niels Bohr Inst., [3]Tokyo Inst. of Tech.)

微生物はその生育環境に応じて、他の微生物と共生したり、あるいは競合的なコミュニケーションを行う。競合的なコミュニケーションにおいて、増殖を害するような物質を分泌をすることは、自身やその系譜のフィットネスに影響を及ぼしかねない。
私たちは、分裂酵母や出芽酵母が、グルコース枯渇時に複数の物質を分泌し、同種を含む周囲の微生物の増殖を抑制する現象を見出した。さらに、この飢餓時の酵母の培養上清の成分を質量分析し、酵母が分泌する増殖阻害物質を少なくとも二つ同定した。
自らの増殖をも抑制する物質の分泌は、生存には一見不利に見える。だが、実際には飢餓環境へ適応し、増殖阻害物質を分泌した酵母は、自身の分泌した増殖阻害物質へも適応しており、高濃度の増殖阻害物質であっても耐性も示した。このような増殖阻害物質の分泌と適応を組み合わせた競合的なコミュニケーション現象を「Latecomer killing (新参者殺し)」と名づけた。この現象を紐解くと、単なる栄養源枯渇への適応だけでなく、自らの分泌した毒のストレスへの適応も加わった複層的なストレス応答の様子が伺えた。

Chemical signaling networks for intercellular communication in microorganisms are important in microbial ecology. Although beneficial communications within the same species were well known, competitive communication within clonal cells is rare because it generally decreases fitness. Here, we show that the yeast releases some toxins to kill even clonal cells and cause a delay in the early growth phase during glucose depletion. However, cells growing in starvation conditions adapted to these toxins simultaneously, enabling them to persist in growth despite the presence of these harmful substances. We identified two key toxic substances from the conditioned media.
Such a toxin-adaptation system is beneficial for self-purification of the cellular lineage in lacking sufficient nutrients. We named this phenomenon “the latecomer killing”.

yeast, starvation, adaptation

講演番号：4S20A3a-04
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A3 会場

光を使うのか？防ぐのか？微生物型ロドプシンと細胞内色素の関係

Use light? Preventing the effects of light? Microbial rhodopsin and intracellular pigments

○吉澤 晋[1,2] ([1]東大大海研、[2]東大院新領域)
○Susumu Yoshizawa[1,2] ([1]AORI, UTokyo, [2]Grad. Sch. Front. Sci., UTokyo)

地球上の生命は太陽から降り注ぐ光エネルギーを使うことで、生命活動を行なっている。常識的には太陽光を化学エネルギーに変換可能な機構は『光合成』である。しかしながら、微生物型ロドプシンもまた光を生物が利用可能なエネルギーに変換する光受容体である。微生物型ロドプシンは発色団としてβカロテン誘導体であるレチナールを持つ 7 回膜貫通型の光受容体の総称であり、レチナールが光を受け取ることで起こる構造変化を起点として、その機能が発現する。我々の目の網膜にもロドプシンは存在するが、こちらのロドプシンは動物型ロドプシンと呼ばれ、微生物型ロドプシンと同じ 7 回膜貫通型の光受容体ではあるが、進化的には微生物型ロドプシンとは全く別物と考えられている。ロドプシンが光を受容するにはレチナールとの結合が必須であることから、ほとんどのロドプシン保有バクテリアではゲノム上にカロテノイド生合成遺伝子およびβカロテンからレチナールを合成する遺伝子が保存されている。これまでバクテリアが生産するカロテノイドや Aryl polyene などの細胞内色素は、抗酸化物質としてその役割が調べられてきた。しかしながら、多様な分類群から微生物型ロドプシンが見つかったことで、カロテノイドなどの色素は抗酸化物質としての利用だけでなく、ロドプシンを介した光エネルギー受容にも関与することが示され、細胞内色素の複雑な役割が徐々に分かってきた。本発表では、バクテリアが作る多様な細胞内色素がどのようにロドプシンと関わるのかを、最新の知見を交えて議論する。

Microbial rhodopsins are seven-transmembrane photoreceptor proteins with retinal, a ß-carotene derivative, as a chromophore, and their function is triggered by the structural change induced by the reception of light by retinal. Since the binding of retinal is essential for rhodopsin to accept light, almost all rhodopsin-possessing bacteria have conserved carotenoid biosynthesis genes and genes that synthesize retinal from ß-carotene in their genomes. Intracellular pigments such as carotenoids and aryl polyenes produced by bacteria have been investigated for their role as antioxidants. However, the discovery of microbial rhodopsins from diverse taxa has demonstrated not only the antioxidant properties of carotenoid pigments but also their involvement in rhodopsin-mediated phototrophy, gradually revealing the complex roles of intracellular pigments.

Rhodopsin, Carotenoid, Photoheterotroph

講演番号：4S20A3a-05
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A3 会場

病害抑止的な土壌微生物叢をつくり出す魔法の薬の開発に向けて

Toward the development of a magical remedy that can create disease-suppressive microbiota in soil

○清水 将文[1]、西岡 友樹[2] ([1]岐阜大応生、[2]産総研)
○Masafumi Shimizu[1], Tomoki Nishioka[2] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

土壌伝染性の病原菌を原因とする病害（以下，土壌病害）は，農作物に甚大な被害をもたらしている。農作物の生産現場では，土壌燻蒸消毒が一般的な土壌病害対策となっているが，用いられる化学燻蒸剤は毒性が強く環境への影響も大きいことから，これに代わる土壌病害防除法の開発が世界的に急がれている。医学分野では，腸内細菌叢の構成異常が様々な疾病の発生や増悪と密接に関連することが明らかになりつつあるが，同様に，土壌病害の発生には土壌微生物叢の状態が大きく影響することが古くから知られていた。そのため，土壌微生物叢を改善し，土壌病害を防除する方法が長年模索されている。我われは，中国発祥の伝統農法であるネギ類の混植・輪作でフザリウム萎凋病が抑制される現象に着目し，その仕組みについて研究を進めてきた。そして最近，ネギ類特有のジペプチドが，土壌中に存在する特定の拮抗細菌群を増殖させ，フザリウム萎凋病を抑制する作用をもつことを発見した。本講演では，その研究について紹介したい。

Soil-borne diseases caused by soil-borne plant pathogens cause enormous yield and economic losses worldwide. To reduce the damage caused by soil-borne diseases, farmers often use harmful chemical fumigants to eradicate pathogens in the soil. With the recent strong movement to reduce the use of agrochemicals, the development of safer and more sustainable measures to control soil-borne diseases is now an urgent global challenge. Recent research highlights the importance of soil microbiota imbalance as a key factor in the prevalence of soil-borne diseases. Therefore, the development of a method to transform a disease-conducive soil microbiota into a disease-suppressive one is considered an ideal strategy for the sustainable control of soil-borne diseases. We investigated the mechanisms underlying the suppressive effect against Fusarium wilt of various crop plants conferred by crop rotation/intercropping with *Allium* plants such as Welsh onion and onion - traditional cropping practices oriented in China. We found that the accumulation of antagonistic bacteria in *Allium*-cultivated soils is the main factor responsible for the suppression of Fusarium wilt. In addition, we discovered that a dipeptide produced by *Allium* plants can stimulate the accumulation of indigenous antagonistic bacteria and thereby suppress Fusarium wilt. This presentation will give an overview of our research.

Soil microbiota, Disease suppressive soil, Dipeptide

講演番号：4S20A3a-06
講演日時、会場：3 月 27 日 11:35～ A3 会場

分裂酵母のロバストな増殖を支える共生物質の探索と機能解析

Exploration of symbiotics supporting the robust growth of fission yeast

○西村 慎一（広島大院・統合生命）
○Shinichi Nishimura (Hiroshima Univ.)

20 世紀初頭のペニシリンの発見をきっかけに、微生物から抗生物質探索が盛んにおこなわれ、多くの抗生物質が発見されてきた。一方で、梅澤濱夫博士は 1962 年の著書でこのように書いている：「この研究は、微生物の生産する有機化合物の宝庫の中で、細胞機能を阻止する以外の物質を探す方向にも発展するのは当然である」。実際、近年には、異種微生物間あるいは同種微生物の異細胞間で代謝物（共生物質）をやり取りすることでロバストな増殖を可能にしている事例の報告が増えてきた。微生物間の代謝物を介したコミュニケーションの解明は生態系の理解や病原性微生物の感染戦略の理解につながり、学問的にも実学的にも重要な課題と考えられる。

我々は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて微生物のロバストな増殖を支える共生物質の探索を行っている。単細胞真核生物である *S. pombe* は 2002 年にゲノムが解読され、2006 年に全 ORF がクローン化され、2010 年には遺伝子破壊株コレクションが作製されるなど、網羅的解析のリソースが整備された、細胞生物学における重要なモデル生物である。一方で本生物は細胞外の窒素源の有効利用のために Nitrogen Signaling Factor と呼ばれるユニークなフェロモン様分子を分泌・感知することが報告され（Sun *et al.*, 2016）、細胞間コミュニケーションの全貌を理解するための貴重なモデル生物になると期待される。我々は非必須遺伝子破壊株コレクション（3420 株）を用いた組織的解析により、80 余りの変異株が合成培地において単独では増殖できないこと、そのうち 37 株は野生株との共存により増殖が回復することを見出した。本発表では分裂酵母が細胞間で共有する共生物質について、最新の成果を紹介し、分裂酵母のロバストな増殖を支える機構について議論したい。

Recently, there have been an increasing number of reports in which robust growth is supported by exchanging/sharing metabolites (symbiotics) among cells of different/same species of microbes. We are investigating symbiotics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe.* We have examined comprehensive growth test using a collection of nonessential gene deletion strains to identify more than 80 mutant strains that were unable to grow alone on synthetic media. Notably, 37 of them recovered their growth by coexisting with wild-type strains. Here, we would like to introduce the latest results on the symbiotics secreted and shared among cells, and discuss the mechanisms that support robust growth of fission yeast.

fission yeast, communication, symbiotics

講演番号：4S21A4a-01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A4 会場

コレステロール代謝改善ペプチド研究の新展開
New Insights of Cholesterol Metabolism-Improving Peptide Research

○長岡 利 (岐阜大・応用生物)
○Satoshi Nagaoka (Gifu Univ.)

[1] コレステロール（CHOL）代謝改善ペプチド（ラクトスタチン：IIAEK）の受容体の発見

我々は牛乳 β-ラクトグロブリンより CHOL 代謝改善ペプチド、ラクトスタチンを発見した。ラット腸粘膜及び Caco-2 細胞の脂質ラフト画分に対する IIXEK(IIAEK を蛍光物質導入により可視化する新規分子プローブ)を用いた光親和性標識実験などにより、IIAEK と相互作用する受容体として腸アルカリ性ホスファターゼ（IAP）を特定した(2)。IAP 欠損マウスでは IIAEK の CHOL 低下作用は消失した。よって、IIAEK は IAP を受容体とし、CHOL 代謝改善作用を発揮する新規情報伝達系を発見した。

[2] CHOL 代謝改善・抗肥満ジペプチド（FP：Phe-Pro）の発見

牛心臓加水分解物より CHOL 代謝改善作用と抗肥満作用の両方を発揮するジペプチド FP を発見した。FP の作用はペプチド輸送担体 1（PepT1）欠損マウスでは消失した。LC/MS で定量した血中濃度の FP は、ヒト肝臓細胞において CHOL 代謝を改善した。FP は PPAR alpha のリガンドとして機能することを明らかにした。

[3] CHOL 代謝改善・抗肥満・抗脂肪肝トリペプチド（RPR：Arg-Pro-Arg）の発見

サケ由来プロタミンから新規CHOL代謝改善・抗肥満トリペプチドRPRを発見した。ヒト肝臓細胞による非アルコール性脂肪肝モデルにおいて、RPRはPepT1を介してトリグリセリド蓄積を改善した。

[1] IIAEK：IIAEK (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys, lactostatin) is a novel cholesterol-lowering pentapeptide derived from bovine milk β-lactoglobulin. We used photoaffinity labeling and nano LC-MS/MS analyses using IIXEK to identify the target protein, intestinal alkaline phosphatase (IAP) interacted with IIAEK. We discovered that IIAEK specifically interacted with IAP to improve cholesterol metabolism with a specific activation of IAP and downregulation of ABCA1. The cholesterol-lowering action by IIAEK was disappeared in *Akp3*KO mice.

[2] FP：We discovered a novel cholesterol-lowering dipeptide FP (phenylalanine-proline) from 400 dipeptides. The cholesterol-lowering action induced by FP was disappeared in *PepT1*KO mice. We found that the cholesterol-lowering action of FP is mediated by PepT1. The physiological blood concentration of FP as a PPAR alpha ligand can ameliorate cholesterol metabolism in HepG2 cells.

[3] RPR：We discovered a novel anti-obesity and hypocholesterolemic peptide (Arg-Pro-Arg : RPR) derived from protamine in mice. The anti-obesity effects of protamine are linked to the upregulation of adipocyte PPARγ1 and hepatic PPARα and the downregulation of hepatic SCD1 via SREBP1 and adipocyte FAS. RPR ameliorates oleic acid-induced lipogenesis via the PepT1 pathway in HepG2 cells.

IIAEK, FP, RPR

講演番号：4S21A4a-02
講演日時、会場：3 月 27 日 09:55～ A4 会場

大豆機能性成分：β-コングリシニンおよびそのペプチドの生理効果

Physiological Effects of Soy Functional Components: β-Conglycinin and its Peptides

○中森 俊宏（不二製油グループ本社）
○Toshihiro Nakamori (FUJI OIL HOLDINGS INC.)

大豆由来の β コングリシニン(βコン)が中性脂肪低減に関与することがヒト臨床試験の結果明らかとなった。その作用本体は、β コンの消化分解により発生する β コングリシニン由来ペプチドであると考えられている。実際、大豆タンパク質を微生物由来の酵素で人工消化して調整した大豆ペプチドを用い、肝臓培養細胞 HepG2 を指標に関与成分の単離同定を試みた。その結果、脂肪酸合成抑制作用を有する SY(Ser-Tyr), VK(Val-Lys)及び KA(Lys-Ala)を見出した。これらの血中脂肪酸濃度低減に関わるペプチドは β コンの一次配列に多く見られたことから、β コンの中性脂肪低減効果は、一つではなく複数の機能性ペプチドが関与していることが示唆された。一方、SY に関しては、脂質代謝以外の生理効果も報告されている。高血圧低下作用ならびに短期記憶力改善効果に関しては、機能性表示食品の関与成分の一つとして報告されている。SY は多様な生体調整機能を有する魅力的な機能性ペプチドではあるが、大豆タンパク質を原料に単離・精製するのは収率が低く経済的でない。最近、アミノ酸リガーゼを利用するジペプチド製造方法が報告されており、セリンおよびチロシンから SY を高効率で製造する方法が検討されている。近い将来、食品タンパク質由来の機能性ペプチドが、ビタミンのような多様な生体調整機構を有する成分として実用化されることを期待したい。

It has been revealed through clinical trials that β-conglycinin (β-con) is involved in reducing neutral fats. The main agent of this action is believed to be its peptides by its breakdown with digestive enzyme. In fact, we attempted to isolate and identify from soy peptides, which were prepared by enzymatic soy protein hydrolysis with microbial-derived enzymes, using HepG2 liver culture cells. As a result, we found SY(Ser-Tyr), VK(Val-Lys), and KA(Lys-Ala). These peptides involved in reducing free fatty acid were often found in the primary sequence of β-con, suggesting that the functional component involves not just one, but mutual interaction. On the other hand, physiological effects other than lipid metabolism have also been reported for SY. It has been reported as one of the components involved in Foods with functional claims on lowering high blood pressure and improving short-term memory. While SY is an attractive peptide with various physiological adjustment functions, it is not economical to isolate and purify it from soy material due to low yield. Recently, a method for producing peptides using amino acid ligase has been reported, and a method for efficiently producing SY from Serine and Tyrosine is also being considered. In future, we hope that di-peptides derived food origin will be turned into practical use as functional components with various physiological adjustment mechanisms, like “Vitamins”

Soy peptides, β-Conglycinin, Ser-Tyr

講演番号：4S21A4a-03
講演日時、会場：3 月 27 日 10:20～ A4 会場

GLP-1 産生消化管内分泌細胞が認識するペプチド構造

Peptide structures sensed by GLP-1-producing enteroendocrine cells

○比良 徹（北大院農）
○Tohru HIRA (Hokkaido Univ.)

消化管ホルモンの 1 種である Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、血糖依存的インスリン分泌促進作用、食欲抑制作用など多様な生理作用を有し、GLP-1 受容体アゴニストは糖尿病、肥満症の治療薬に用いられる。GLP-1 の分泌はグルコース、脂肪酸、ペプチド、アミノ酸により促進される。我々はジペプチドライブラリーを用い、複数のジペプチドが強力に GLP-1 分泌を促進することを見出した。これらに一貫した共通性は見られなかったことから、GLP-1 産生細胞は多様なペプチド構造を異なるメカニズムにより認識することが考えられる。その中で最も活性の高かった Trp-Tyr (WY)については、逆配列（YW）や構成アミノ酸（Trp と Tyr）では作用が無いことから、WY という配列が認識されていることが示された。また、WY に Phe (F)を付加したトリペプチド（FWY、WYF）は WY よりも高い活性を示した。WY の認識に関わる分子として、芳香族アミノ酸や塩基性ペプチド、γグルタミルペプチドの受容体として知られるカルシウム感知受容体（CaSR）の関与が示唆された。また、WY の配列を含む他のペプチドを用いた構造活性相関に関する知見についても紹介したい。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), one of gastrointestinal hormones, has diverse physiological effects such as glucose-dependent insulin secretion and appetite suppression. GLP-1 receptor agonists are used in the treatment of diabetes and obesity. The secretion of GLP-1 is stimulated by glucose, fatty acids, peptides, and amino acids. By using a dipeptide library, we discovered that various dipeptides strongly promote GLP-1 secretion. As there was no consistent commonality among them, it is suggested that GLP-1-producing cells recognize diverse peptide structures through different mechanisms.

Trp-Tyr (WY) potently stimulated GLP-1 secretion but the reverse sequence (YW) or constituent amino acids (Trp and Tyr) did not, suggesting that WY is specifically recognized as “peptide”. Moreover, tripeptides with the addition of Phe (F) to WY (FWY, WYF) exhibited higher activity than WY alone. The involvement of the calcium-sensing receptor (CaSR), known as a receptor for aromatic amino acids, basic peptides, and γ-glutamyl peptides, was suggested as a molecule recognizing WY. Insights into structure-activity relationships using other peptides containing the WY sequence will be presented.

GLP-1, peptide

講演番号：4S21A4a-04
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A4 会場

コラーゲンペプチド Pro-Hyp は特定の幹細胞マーカー発現線維芽細胞の増殖に影響する

Collagen peptide Pro-Hyp affects proliferation of fibroblasts with specific stem cell markers

○淺井 智子[1]、織田 あやね[2]、佐藤 健司[2] ([1]奈女大生、[2]京大院農)
○Tomoko ASAI[1], Ayane ODA[2], Kenji SATO[2] ([1]Nara Women’s Univ., [2]Kyoto Univ.)

二重盲検プラセボ対照試験において、コラーゲン加水分解物摂取は皮膚や関節の状態の改善、褥瘡の治癒を促進することが報告されている。我々は、コラーゲン加水分解物摂取によりヒト血漿中のコラーゲンペプチド（Pro-Hyp など）が増加することを明らかにしてきた。Pro-Hyp は、コラーゲン繊維に接着した線維芽細胞の増殖を促進させ、創傷治癒を促進すると考えられている。一方、正常組織における線維芽細胞の過剰な増殖は報告されていない。これらの事実から、Pro-Hyp に対する応答性が異なる線維芽細胞が存在すると仮説を立て、創傷治癒過程で増加し治癒の終息と共に減少すると報告がある間葉系幹細胞マーカーp75NTR 陽性細胞に焦点を当て Pro-Hyp の影響を検討した。マウス皮膚培養により遊走した細胞を観察した結果、培養初期の遊走線維芽細胞は p75NTR 陽性細胞であり培養日数を経るにつれ減少すること、また Pro-Hyp 添加により p75NTR 陽性が増殖することが明らかとなった。これらの結果は、コラーゲン加水分解物摂取後に血中に増加する Pro-Hyp は、間葉系幹細胞から分化直後の線維芽細胞を特異的に増殖させることで創傷治癒を促進させると考えられる。現在他の幹細胞マーカーについても検討を進めており、これらの結果も含めて紹介する。

Double-blind and placebo-controlled trials have demonstrated that the supplementation of collagen hydrolysates improves skin and joint conditions and enhances healing of bed sores. We have demonstrated that the ingestion of collagen hydrolysate increases food-derived collagen di- and tri- peptides such as Pro-Hyp in human blood plasma. Pro-Hyp enhances the proliferation of fibroblasts attached to collagen fibrils. However, excess proliferation of fibroblasts in normal tissue by supplementation of collagen hydrolysates have not been reported. These facts suggested the presence of Pro-Hyp-responding and non-responding fibroblasts in the body. We focused on the mesenchymal stem cell marker p75NTR-posive cells, which have been reported to appear in wound healing sites and disappear after the healing. We found that p75NTR-positive cells were present in the fibroblasts migrated from mouse skin and the fibroblasts lost p75NTR after prolonged cultivation. Addition of Pro-Hyp triggered proliferation of p75NTR-positive fibroblasts on collagen fibrils but not p75NTR-negative ones. These results indicate that Pro-Hyp promotes wound healing by specifically proliferating p75NTR-positive cells in the wound site. Effects of Pro-Hyp on cells with other stem cell markers are currently being investigated, which will be also introduced.

Pro-Hyp, collagen peptide, stem cell marker

講演番号：4S21A4a-05
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A4 会場

コラーゲンペプチドの脳神経調節作用

Neuromodulatory effect of collagen-derived peptides

○水重 貴文（宇大農）
○Takafumi Mizushige (Utsunomiya Univ.)

精神疾患であるうつや認知症の患者数は世界中で増加傾向にあり深刻な健康問題になっている。我々は，うつや認知症を予防する食品由来ペプチドの探索を行ってきた。コラーゲンは動物体内に最も豊富に存在するタンパク質である。コラーゲンは難消化物であるが，これを分解する酵素が生姜根茎に存在する。生姜酵素でコラーゲンを分解すると，X-Hyp-Gly や Gly-Pro-Y（X と Y は任意のアミノ酸）といったトリペプチドが生成する。一方，生姜酵素で分解したコラーゲン分解物（GDCH）に熱処理を施すと，cyclo-X-Hyp や cyclo-Gly-Pro といった環状ペプチドが生成する。GDCH や熱処理 GDCH を経口投与し，門脈血，循環血，脳脊髄液，脳組織内に存在するペプチドを調べたところ，直鎖状および環状のペプチドが体内循環し，最終的に脳内にまで移行することが示唆された。次に，マウス行動試験を用いて，GDCH がうつ様行動を低減させることと，熱処理 GDCH が認知機能を向上させることを見出した。また，経口投与後に体内循環するコラーゲン由来ペプチドの中から活性成分探索を行い，複数の活性ペプチドを見出した。さらに，意欲や認知機能の制御に密接に関与する海馬に注目し，神経前駆細胞の増殖，神経栄養因子や神経成長因子の遺伝子発現，モノアミンなどを解析し，メカニズムの一端を明らかにしてきた。最近，MR スペクトロスコピーを用いて，脳内代謝産物の in vivo 測定を進めている。本発表では，コラーゲン由来の低分子ペプチドのうつ様行動や認知機能に対する作用とそのメカニズムについて，最近の研究成果を紹介する。

Mental disorders such as depression and dementia are a severe health problem worldwide. We found that ginger degraded collagen hydrolysate (GDCH) exhibited oral active antidepressant-like activity. In addition, heated GDCH exhibited oral active cognitive function improving effect. GDCH generated cyclo-X-Hyp and cyclo-Gly-Pro after heat treatment. It was suggested that several collagen-derived linear and cyclic peptides penetrated into the brain. These peptides also exhibited antidepressant-like activity and/or cognitive function improving effect. We examined proliferation of neural progenitor cells, gene expression of neurotrophic and nerve growth factors, monoamine amount in the hippocampus. Recently, we performed in vivo measurement for metabolites in the brain using magnetic resonance (MR) spectroscopy. In this presentation, I introduce recent research about antidepressant and cognitive function improving effects after oral administration of collagen hydrolysate and peptides and their mechanism.

peptide, depression, cognition

講演番号：4S21A4a-06
講演日時、会場：3 月 27 日 11:35～ A4 会場

脳神経細胞でのペプチド作用
Function of peptides in brain nerve cells

○松井 利郎（九大院農）
○Toshiro Matsui (Kyushu University)

ペプチドによる直接的な脳機能改善を期待するには、ペプチドが血液脳関門（Blood-Brain Barrier：BBB）を透過、蓄積することを実証する必要がある。雄性 ICR マウスを用いた左心室からの脳灌流試験によって、我々は Gly-Pro および Tyr-Pro が BBB 障壁を透過し、脳実質に移行することを明らかにしてきた [1)]。灌流後には BBB 透過ジペプチド Tyr-Pro が海馬、線条体や小脳周辺に分布・蓄積していることを、フィチン酸をマトリックス補助剤とする MALDI-MS イメージング法 [2)]によって可視化し、証明している。また、その摂取（200 mg/kg/day, 2 wk）は Aß$_{25\text{-}35}$ 誘発による急性 AD 型認知症マウスでの短期および長期記憶不全の進行を有意に抑制した [3)]。最近では、ICR マウスに単回経口投与した Tyr-Pro（10 mg/kg）が投与 15 分後には脳実質に到達することを APDS アミン誘導体化 LC-qTOF/MS 法によって実証し、食品として摂取したペプチドが循環血に吸収され、さらに脳まで速やかに到達することを初めて報告している（450 ng/blood, 11 ng/brain）[4)]。

また、Aß$_{25\text{-}35}$-AD 型認知症マウス脳でのアセチルコリン系の活性化について、レチノイン酸により分化誘導したマウス脳神経細胞 NE-4C 細胞を用いてその機構解明を図ったところ、Tyr-Pro は脳に発現しているアディポネクチン受容体に作用し、下流側のシグナル系を活性化していることを明らかにしている。本講演では、その詳細についてこれまでに得られている知見を紹介し、ペプチドによる脳機能改善作用の可能性について言及したい。

Refs) 1) Tanaka, *et al*., *Sci. Rep.,* **9**, 5769 (2019) , 2) Nguyen *et al*., *J. Mass Spectr*., **51**, 748–756 (2016),
3) Tanaka, *et al*., *npj Sci. Food*, **4**, 7–10 (2020), 4) Cheng, *et al*., *Sci. Rep.,* **13**, 16908 (2023)

There have been few evidential *in vivo* studies that peptides can cross the blood-brain barrier (BBB) in their intact forms. In an ICR mouse perfusion experiment, we found that Gly-Pro and Tyr-Pro can cross the BBB parenchyma, following the accumulation in the parenchyma of the mouse brain, such as hippocampus and cerebral cortex. We also demonstrated that orally administered Tyr-Pro (10 mg/kg) to ICR mouse was detected in the brain in its intact form (450 ng/blood, 11 ng/brain). In mouse NE-4C nervous cells differentiated by retinoic acid, we found that Tyr-Pro induced the activation of acetylcholine nervous system by the stimulation of adiponectin receptor.

Peptide, brain nerve cell, Alzheimer's disease

講演番号：4S22B6a-01
講演日時、会場：3 月 27 日 09:35～ B6 会場

C. elegans の寿命を指標とした機能性食品の探索：健康寿命への展望

Exploring functional foods useful for healthy life span using *C. elegans* in vivo model

○安田 佳代（東海大健）
○Kayo Yasuda (Tokai Univ.)

線虫の一種である *C. elegans* は老化の研究において大きく貢献した実験動物である。老化を分子遺伝学的に研究するための実験動物の条件は、多細胞生物であること、遺伝学が確立されていること、実験しやすい寿命を持つことなどが挙げられる。長寿命変異株が *C. elegans* で発見されて以来、寿命に関わるシグナル経路も解明され、ほ乳類との共通経路もあることから、*C. elegans* の老化研究はヒトを含めた他の動物にも適応できることが示されている。我々は酸化ストレスが関わる老化のメカニズムを研究する中で、抗酸化物質の探索や、食品や漢方などの抗老化作用などを調べており、*C. elegans* の寿命を指標とした機能性食品の探索の有用性を報告する。

人が健康に過ごすためには平均寿命より健康寿命が重要であると言われている。人生 100 年時代と言われているが、120 年まで長生きすることより、健康で生き生きとした活動的な高齢期の生活を送ることが求められているからである。この健康長寿、すなわち健康で活動的な長寿をサポートするような栄養素の探索を行うために、寿命と活動量を考慮した探索法を紹介し、今後の展望を考察したい。

A species of nematode "*C. elegans*" is a laboratory animal that has made significant contributions to the study of aging. Requirements for laboratory animals to study aging include being multicellular organisms, having established genetics, and having an appropriate lifespan. Since the discovery of long-lived mutant strains in *C. elegans*, signaling pathways involved in lifespan have been elucidated, and some pathways are common to mammals, indicating that aging studies in *C. elegans* can be adapted to other animals including humans. In our research on the mechanism of aging associating with oxidative stress, we are studying antioxidants and investigating the anti-aging effects of foods and herbal medicines. I will discuss on the usefulness of *C. elegans* as an indicator of screening for functional foods.

It is said that healthy life expectancy is more important than average life expectancy for QOL. In order to search for nutrients that support healthy and energetic longevity, I would like to introduce an investigation method based on life span and activity level of *C. elegans*, and discuss future prospects.

C. elegans, Anti-aging, Exploring functional foods

講演番号：4S22B6a-02
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B6 会場

乳酸菌・食品成分の機能性を線虫モデルで探る

Expedition to functional food factors and lactic acid bacteria with *Caenorhabditis elegans*

○小村 智美（兵庫県立大）
○Tomomi Komura (The Univ. of Hyogo)

食細胞に関する免疫学説でノーベル賞を受賞したメチニコフは、ヨーグルトに含まれる乳酸菌が長寿を導くという「不老長寿説」を提唱した。しかしながら、その実験的な証拠は長年なかった。その理由は、哺乳類を用いた寿命研究は数年かかり、時間的にも経費の上でも制約が厳しいためである。そこで当研究室は *Caenorhabditis elegans*（線虫）に着目した。線虫は、自然界では土壌中の腐敗菌などを食べる細菌食性動物で、実験室では非病原性大腸菌を餌として容易に飼育できるため分子生物学領域で重宝されてきた。1999 年に、ヒトの病原菌を線虫に与えると短期間で死滅することが報告され、その後は線虫をモデルとする感染研究も盛んに行われたが、乳酸菌を始めとする有用な微生物が線虫にどのような影響を与えるかほとんど調べられていなかった。当研究室は、Ikeda らが発見した乳酸菌摂取による線虫の寿命延長研究（Appl. Environ. Microbiol., 73:6404-9, 2007）を引き継ぎ、その抗老化作用の解明に取り組んできた。最近では、乳酸菌が神経機能の老化を軽減することを見出し、加齢性の神経変性疾患「アルツハイマー病」を模したモデル線虫を用いて有効な乳酸菌の探索を進めている。さらに宿主の老化や加齢性疾患と関係する終末糖化産物（AGE; advanced glycation end products）やヒトにも保存されている遺伝子などに着目した解析を進めることで、線虫の世界だけでなく哺乳類やヒトへの応用の可能性を秘めた研究へと発展できるよう貢献していきたいと考えている。そこで今回は、抗老化や加齢性疾患に対する乳酸菌や食品成分の有効性について、線虫モデルを用いた研究結果を紹介する。

Dr. Metchnikoff, awarded the Nobel Prize for his immunological theory of phagocytosis, proposed the theory of “The Prolongation of Life,” in which the longevity of people is attributed to lactic acid bacteria in yogurt; however, but no experimental evidence supported this theory. These studies using mammals take several years and are strictly limited by animal ethics. Therefore, we focused on the nematode, *C. elegans*. as host model. Our studies have been focused on elucidating the longevity and anti-aging effects of lactic acid bacteria in nematodes. Recently, we explored the effect of lactic acid bacteria in the *C. elegans* Alzheimer's disease model. In this talk, we introduce the efficacy of lactic acid bacteria and food components for anti-aging and age-related disease prevention using the *C. elegans* model.

C. elegans, lactic acid bacteria, anti-aging

講演番号：4S22B6a-03
講演日時、会場：3 月 27 日 10:25～ B6 会場

線虫モデルにおけるメイラード反応生成香気の抗老化作用およびその分子機構解明
The anti-aging effect of odorants generated by the Maillard reaction using a *C. elegans* model and elucidation of its molecular mechanism
○横山 壱成（日大生物資源）
○Issei YOKOYAMA (Nihon Univ.)

香りは我々の生活に身近に存在し、嗅覚を刺激することで生理的な作用をもたらすことが知られている。食品のメイラード反応では、多種多様なの香気成分が生成され、これらは嗜好性の向上に大きな役割を果たしている。一方、メイラード反応生成香気の吸入は、様々な生理作用を誘導することも明らかにされている。このような香気は、食事の場面において日常的に吸入することが多く、老化などの長期的な視点での生体への影響が予想される。しかし、香りの老化に対する評価において、マウスなどのモデルで検討する際、コストおよび実験者の負担増加そして動物福祉の問題が生じる。

そこで演者は、老化のモデル生物かつ高い嗅覚機能を有する線虫 *C. elegans* を用い、メイラード反応生成香気の抗老化作用およびその分子機構の解明に取り組んでいる。これまでに、野生型の線虫がメイラード反応生成香気に対して誘引行動を示すことを見出した。また、この行動は嗅覚シグナルの伝達不全である変異体（*odr-3*）ではみられないことから、嗅覚系を介して誘引行動が起こることが考えられた。さらに、線虫に継続的な香気曝露を行ったところ、加齢に伴って低下する運動性が維持され、寿命が延長されることを明らかにした。本講演では、他のモデル生物との比較などを交えながら、線虫モデルにおけるメイラード反応生成香気の抗老化作用について、演者らの研究成果を紹介する。

Odorants generated by the Maillard reaction contribute to the improvement of the palatability of foods and induce physiological effects through inhalation. Since the odorants of the Maillard reaction is naturally inhaled from processed foods, it may also affect aging process. However, there are several issues, including animal welfare in rodent models for aging research. *C. elegans* is a leading model organism for aging research and has a highly developed olfactory system for chemicals. We found that the Maillard reaction odorants induced attraction behavior in the wild-type (N2) *C. elegans*, but not anosmia mutant (*odr-3*). Moreover, the increases in locomotor activity and lifespan in wild-type *C. elegans* were observed by repeated odor exposure. These results indicate that the anti-aging effect was induced through olfactory system in *C. elegans*. In this lecture, I would like to present the anti-aging effect of the odorants generated by the Maillard reaction in *C. elegans* model.

Odor, Maillard reaction, *C. elegans*

講演番号：4S22B6a-04
講演日時、会場：3 月 27 日 10:50～ B6 会場

線虫を用いたビタミン生理学ー未知なる分子機構の解明ー

Vitamin physiology using *C. elegans*: Investigation of the unknown molecular mechanisms

○美藤 友博（鳥大農）
○Tomohiro BITO (Tottori Univ.)

ビタミン B_{12}（B_{12}）は水溶性の B 群ビタミンの一つであり，食事摂取基準では 13 種のビタミンの中で推奨量が最も少ない．生体内において，B_{12} の上方配位子に 5’-デオキシアデノシル基が配位したアデノシルコバラミンとメチル基が配位したメチルコバラミンが補酵素型 B_{12} として機能し，奇数鎖脂肪酸や分岐鎖アミノ酸の異化代謝ならびにメチオニン代謝に関与している．食事からの B_{12} の摂取・吸収には胃の機能が重要であるため、胃の機能が低下しやすい高齢者は B_{12} 欠乏症発症のハイリスク群であることが知られている。B_{12} 欠乏症では巨赤芽球貧血や神経障害の発症のみならず，認知機能の低下，成長遅延，不妊症などの発症も報告される．更なる健康寿命の延伸が叫ばれる昨今，未だ明らかにされていない B_{12} の生理機能の解析や B_{12} 欠乏症の発症機構の解明が求められている．

体長 1 mm 程度にも関わらず筋肉，神経系，消化管など動物としての基本体制を有する線虫 *Caenorhabditis elegans* は，ヒトのモデル生物として高次な生命現象の解明に利用されている．これまでに，線虫が哺乳動物と同様に正常な生育に B_{12} を要求することを明らかにすると共に，食餌性 B_{12} 欠乏線虫を調製し，B_{12} 欠乏症の詳細な発症機構を詳細に検討してきた．本シンポジウムでは，線虫モデルだからこそ得られた新たな結果をご紹介する予定である。

Vitamin B_{12} (B_{12}) is a water-soluble member of the B-group vitamins. B_{12} functions a crucial role in the metabolism of odd-chain fatty acids and branched-chain amino acids and methionine metabolism. Given the pivotal role of the stomach in B_{12} absorption from the diet, the elderly, who often experience reduced gastric function, are recognized as a high-risk group for developing B_{12} deficiency. B_{12} deficiency not only causes megaloblastic anemia and neurological disorders but also contributes to cognitive decline, delayed growth, and infertility. *Caenorhabditis elegans* is employed as a model organism to unravel higher-level biological phenomena in humans. Previous research has demonstrated the necessity of B_{12} for normal growth in nematodes, like mammals. Furthermore, the creation of B_{12}-deficient nematodes through dietary manipulation has facilitated a detailed investigation into the onset mechanisms of B_{12} deficiency. This symposium aims to present novel findings obtained specifically through the nematode model, shedding light on previously undisclosed aspects of B_{12}-related phenomena.

Vitamin B_{12}, Cobalamin, Metabolic disorder

講演番号：4S22B6a-05
講演日時、会場：3 月 27 日 11:15～ B6 会場

遺伝子組換え線虫を用いた食品中の機能性分子探索に向けて

Construction of a transgenic nematode for searching functional molecules in foods

○河野 強（鳥取大院持続性）
○Tsuyoshi Kawano (Tottori Univ.)

【背景】優れたモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* は種々の基礎研究に用いられ、多くの重要な知見をもたらした。これまで発表者は、*C. elegans* を用いて生育/寿命制御に関する研究を展開してきた。その過程で、腸で産生されるインスリン様分子が生育状況に応じて分泌方向（基底膜側/頂端側）を可逆的に変動するとの知見を得た[1)]。これを受けて発表者は、膜輸送に関わる RAB ファミリータンパク着目して、さらなる研究展開を図った。

【結果と考察】*C. elegans* の幼虫生育阻害を指標として *rab* 遺伝子に対する RNAi スクリーニングを行ったところ、複数の *rab* 遺伝子の幼虫生育への関与が示唆された。このうち、ヒトではワールブルグ・ミクロ症候群に関与する *rab-18* に着目し同遺伝子の機能解析を進めた。*C. elegans* RAB-18 はコレステロール輸送体の膜輸送（頂端側）を制御しており、コレステロール吸収を介して生育を制御すると結論付けた。また、コレステロール輸送体をヒトのものと入れ換えた *C. elegans* は、コレステロール輸送能を示し、かつ、阻害剤エゼチミブに感作した。この「輸送体入れ換え *C. elegans*」はコレステロール吸収阻害剤の評価に有効である、と考えられる。本件は特許出願済みである。

【Background】The nematode *Caenorhabditis elegans* is an excellent model organism for diverse foundational investigations, yielding numerous profound insights. In the course of our exploration into the molecular mechanisms governing development and longevity using *C. elegans,* we found a reversible alteration in the secretion polarity of an intestinal insulin-like peptide in response to growth status.[1)] Consequently, we focused on RAB family proteins, involved in membrane trafficking, to advance our research further.

【Results and Discussion】Our RNAi screen for *C. elegans rab* genes relevant to larval development revealed the significance of several genes. Among them, we focused on *rab-18* gene, which exhibits relevance to the human disease, Warburg Micro Syndrome. *C. elegans* RAB-18 orchestrates membrane trafficking for an intestinal cholesterol transporter, thereby signifying its role in modulating larval development through the regulation of cholesterol absorption. The human cholesterol transporter NPC1L1, expressed in *C. elegans* intestine, showed not only its transport activity but also its sensitivity to the inhibitor ezetimibe, suggesting that this transgenic nematode is useful for screening for novel inhibitors for cholesterol absorption, as well as evaluating the efficacy of functional foods (patent pending).

1) Matsunaga Y et al. Nat Commun 2016, DOI: 10.1038/ncomms10573.

transgenic nematode, cholesterol transporter, bioassay

分野融合連携（他学会連携）シンポジウム

3月25日（月）13:50〜16:20

2AJ 【分野融合連携シンポジウム】韓国KMBとの合同企画　Microbiology and Biotechnology Researches in Japan and Korea
Transdisciplinary Joint Symposium between JSBBA and KMB on Microbiology and Biotechnology Researches in Japan and Korea

3月25日（月） 13:50〜16:20
共　催：The Korean Society for Microbiology and Biotechnology
世話人：大西 康夫（東大院農），濱野 吉十（福井県大生物資源），Yong-Cheol Park（Kookmin Univ.）
座　長：櫻谷 英治（徳島大生物資源），新谷 政己（静岡大工）

13:50 **Opening Remarks by an Organizer**
……Yasuo Ohnishi（Dept. Biotech., Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo）

13:53 **Opening Remarks by the President of KMB**
……Jong-Won Oh（Dept. Biotech., Div. Life Sci., Yonsei Univ.）

13:56 2AJ-01 **The past, present, and future of KMB, the Korean Society for Microbiology and Biotechnology**
……○Kyoung Heon Kim（Dept. Biotech., Grad. Sch., Korea Univ.）

14:16 2AJ-02 **Cytosolic protein delivery with microbial polycationic isopeptides**
……○Yoshimitsu Hamano（Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.）

14:46 2AJ-03 **Yeast metabolic engineering for mass production of food ingredients, biofuel and biochemicals**
……○Yong-Cheol Park（Dept. Bio. Ferment. Conv. Technol., Kookmin Univ.）

15:16 2AJ-04 **Towards engineering bacterial membrane vesicles**
……○Masanori Toyofuku（Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba）

15:46 2AJ-05 **Polyhydroxyalkanoates（PHAs）production from various carbon sources: Improvement of microbial strains and processes for enhancing PHA production**
……○Jeong-Jun Yoon（Green & Sustainable Mater. R&D Depart., KITECH）

16:16 **Closing Remarks by the President of JSBBA**
……Makoto Nishiyama（AgTech, Grad. Sch. Agric. Life Sci., UTokyo）

3月26日（火）9:30〜12:00

3AJ 【分野融合連携シンポジウム】日本蛋白質科学会/AMED-BINDSとの合同企画　先端技術支援で加速するタンパク質科学研究
Transdisciplinary Joint Symposium with PSSJ and AMED-BINDS：Protein science research accelerated by advanced technology support

3月26日（火） 9:30〜12:00
共　催：日本蛋白質科学会，AMED-BINDS
世話人：伏信 進矢（東大院農），吉田 彩子（東大院農）
座　長：伏信 進矢（東大院農），吉田 彩子（東大院農）

9:30 はじめに（BINDS PSより）……井上 豪（阪大院薬）

9:40 3AJ-01 生命科学・創薬を支えるクライオ電子顕微鏡構造解析の高速化……○難波 啓一（阪大院生命機能）

10:10 3AJ-02 Cryo-EM構造で明らかになった活性制御タンパク質によるCoA転移酵素の調節機構
……○吉田 彩子[1,2]，宮田 知子[3]，難波 啓一[3]，西山 真[1,2]
（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構，[3]阪大院・生命機能）

10:35 3AJ-03 ゲノム機能制御装置としてのクロマチン構造とダイナミクス……○胡桃坂 仁志（東大定量研）

11:05 3AJ-04 X線自由電子レーザーによる時分割実験の現状と展望……○南後 恵理子（東北大多元研）

11:35 3AJ-05 水素細菌由来複合体タンパク質のクライオ電子顕微鏡解析……廖 増威，○伏信 進矢（東大院農）

講演番号：2AJ-01
講演日時、会場：3 月 25 日 13:56～ A1 会場

The past, present, and future of KMB, the Korean Society for Microbiology and Biotechnology

○Kim Kyoung Heon (Dept. Biotech., Grad. Sch., Korea Univ.)

KMB, the Korean Microbiology and Biotechnology Society, was established as the Korean Society for Applied Microbiology in Republic of Korea in 1973. For this establishment, more 12 founding members of KMB got together in Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea in 1970. The founding members agreed on the primary purpose of establishing KMB to lead the development of the microbial industry of Korea and to provide a scientific forum to exchange technical information between experts in the microbiological field of Korea. In 2001, due to the advancement of biotechnology field and for the more aggressive and extensive vision of KMB, KMB decided to change its original name, Korean Society for Applied Microbiology to its present name, Korean Microbiology and Biotechnology Society. KMB not only holds the annual meeting in June and the Winter symposium in January every year but also publishes the Journal of Microbiology and Biotechnology indexed in SCIE and its Korean sister journal, Microbiology and Biotechnology Letters. Since the establishment of KMB in 1973, it has passed 50 years, and KMB celebrated its 50 years of excellence in microbiology and biotechnology with ~8,000 members and ~90 institute members in Korea. KMB further seek its development and expansion on a global scale. KMB started exchanging organizing committee with the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology (USA) in 2015, and it continued until now. Lastly, I am here to seek any collaboration and exchange program with JSBBA for mutual interests in science and technology for a brighter future.

Korean Society for Microbiology and Biotechnology, Microbiology, Biotechnology

講演番号：2AJ-02
講演日時、会場：3 月 25 日 14:16～ A1 会場

Cytosolic protein delivery with microbial polycationic isopeptides

○Yoshimitsu Hamano (Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Practical intracellular delivery of biological macromolecules would dramatically transform therapeutic approaches and foster experimental breakthroughs. Cell-penetrating peptides (CPPs) are among the most promising strategies, and CPP-driven technology currently revolves around natural and synthetic peptides. Here, we report the cell-penetrating activities of two bacterial polycationic isopeptides, ε-poly-L-α-lysine (ε-PαL) and ε-oligo-L-β-lysine (ε-OβL), which can circumvent the canonical CPP drawbacks of poor proteolytic resistance, cytotoxicity, and endosomal trapping. To allow the polycationic decoration of various biological substances (cargoes) with these isopeptides, we synthesized clickable ε-PαL and ε-OβL derivatives carrying a C-terminal azide group by microbial and enzymatic approaches, respectively. Their conjugates with fluorescein were quickly internalized into living mammalian cells by energy-independent direct penetration and energy-dependent endocytosis/macropinocytosis. We further revealed that ε-OβL, a substructure of antibiotic streptothricins, functions as a CPP to deliver the antibiotic core structure into cells. Our protocol with clickable ε-PαL and ε-OβL also facilitated cytosolic delivery. Notably, a Cre recombinase conjugate with ε-PαL entered cells and mediated its Cre/loxP recombination, and a full-length immunoglobulin-G antibody delivered by ε-PαL escaped from endosomes. Due to their cell-penetrating activities, we tentatively designated ε-PαL and ε-OβL polycationic isopeptides entering cells (PIECEs). These intriguing new tools should expand the applicability of CPP-driven technology.

peptide, cell-penetrating peptide, click chemistry

講演番号：2AJ-03
講演日時、会場：3 月 25 日 14:46～ A1 会場

Yeast metabolic engineering for mass production of food ingredients, biofuel and biochemicals

○Park Yong-Cheol (Dept. Bio. Ferment. Conv. Technol. Kookmin Univ.)

For sustainable development of biological processes, various microbial host strains have gained attention from academia and industry. Among them, yeast is a unicellular eukaryotic microbe used traditionally in brewery and bakery industries. Also, it has been genetically engineered to increase robustness for mass production of proteins and biochemicals of interest. In this presentation, two representative yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* are introduced as host strains with big potential for future bioprocesses. To develop a commercially available bioprocess, meanwhile, engineering of genetic and microbial systems should be complementary to bioprocess engineering by feed-forward and feed-back cycles. Microbial Factory Technology armed with genetic, evolutionary and metabolic engineering, -omic technology and fermentation optimization is a promising technology able to meet the system and process complementation, and applicable for rapid development of biochemical production process. In this study, the yeast systems were engineered by genetic and metabolic engineering for mass production of food ingredients, biofuels and biochemicals. The engineered yeasts could produce the target chemicals at high titers, conversion yields and production rates, which were able to be obtained by fermentation optimization.

Yeast, metabolic engineering, mass production

講演番号：2AJ-04
講演日時、会場：3 月 25 日 15:16～ A1 会場

Towards engineering bacterial membrane vesicles

○Masanori Toyofuku (Univ. of Tsukuba)

Most bacteria release membrane vesicles (MVs) ranging in diameter from approximately 40 to 400 nm. It is now evident that MVs play crucial roles not only in inter-bacterial interactions but also in bacterial-host interactions. There is a growing interest in MVs due to their potential use as a platform for vaccine development and drug delivery systems.

MVs are essential for transporting various biomolecules, including the dispersion of highly hydrophobic substances. Our research has uncovered hydrophobic signaling molecules used in bacterial communication are delivered by MVs, leading to the concept of binary signaling. Additionally, a distinctive feature of MVs is their ability to transport substances while maintaining their concentration. We have coined the term “quantal secretion” to describe this secretion system, which is distinct from canonical secretion systems in bacteria.

Understanding the fundamental processes of how and when MVs are formed is essential not only for understanding their functionality but also for utilizing MVs in applications. Membrane blebbing is a route for MV formation, and we have also revealed that MVs can be formed through cell death, which processes are called explosive cell lysis in Gram-negative bacteria and bubbling cell death in Gram-positive bacteria. While membrane blebbing is a stochastic process and challenging to regulate, the induction of MV formation mechanisms associated with cell death is mainly linked to bacteriophages, revealing regulatory mechanisms that can be exploited. Consequently, this allows us to induce MV formation.

In this talk, I will present MV formation mechanisms, functions, and potential applications based on our recent results.

Bacteria, Membrane vesicle, Phage

講演番号：2AJ-05
講演日時、会場：3 月 25 日 15:46～ A1 会場

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from various carbon sources: Improvement of microbial strains and processes for enhancing PHA production
○Yoon Jeong-Jun (Green & Sustainable Mater. R&D Depart. KITECH)

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a biopolymer synthesized by microorganisms, offering a potential substitute for petroleum-based plastics due to its similar physical properties and 100% biodegradability in natural environment. Among them, mcl-PHA is composed of relatively long carbon chains (C6~C18) and exhibits excellent flexibility, however, due to technical limitations and the cost of raw materials, PHA is challenging to completely replace petroleum-based plastics. In this study, a comparative analysis was conducted of ten different *Pseudomonas* species to investigate the potential for mcl-PHA production using biomass-derived carbon sources. As the results, it revealed that when acetate was used as the carbon source, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas citronellolis* exhibited the highest bacterial growth. In addition, it revealed that unlike other *Pseudomonas* species, *P. aeruginosa* primarily contained 3-hydroxydecanoate as the major monomer in mcl-PHA, and it was observed that *Pseudomonas chlororaphis* and *P. citronellolis* included 3-hydroxyvalerate. Then *P. chloroaphis* was genetically modified to enhance PHA production from acetate, it overexpressed the acetyl-CoA acetyltransferase (atoAD) gene. The engineered *P. chloroaphis* showed a significant 6.6-fold increase to 0.5 g/L of PHA compared to wild-type. These results demonstrate that overexpression of genes involved in the acetate metabolic pathway influences PHA production, suggesting their potential use in further strain improvement studies for enhanced PHA production. This work was supported by the R&D Program for Forest Science Technology (grant number: 2023473E10-2325-EE02) of Korea Forest Service (KFS).

Biodegradable bioplastic, Biopolymer, Polyhydroxyalkanoate (PHA)

講演番号：3AJ-01
講演日時、会場：3 月 26 日 09:40～ A1 会場

生命科学・創薬を支えるクライオ電子顕微鏡構造解析の高速化

Acceleration of cryoEM structural analysis for life science and drug discovery

○難波 啓一 (阪大院生命機能)
○Keiichi Namba (Osaka Univ.)

生体高分子の立体構造は生命科学のみならず医学・創薬に必須な基盤情報である。複雑な生体機能メカニズムを解明するには生体高分子の立体構造とその動態や分子間相互作用を様々な状態で可視化することが必須で、可視化すべき立体構造の数は数億にも上る。クライオ電子顕微鏡法は最近の技術進歩により構造生物学の基盤技術である X 線結晶解析法や NMR を補足する役割を超え、高分解能構造解析法として極めて強力なツールとなった。安定性と制御性の高い電子光学系、冷陰極電界放出型電子銃、エネルギーフィルター、高速・高感度の CMOS 型直接電子検出カメラ等を装備したクライオ電子顕微鏡や高速コンピューターと画像解析ソフトなどハード・ソフトの開発により、わずか数μg の水溶液試料から立体構造を 2 日程度で決定することが可能になった。分子モデル構築に必要な原子レベル分解能の構造解析に要する数千枚の電子顕微鏡像の撮影に以前は数日を要したが、最近の技術進歩により数時間、場合によっては 1 時間以内に完了するまで高速化した。クライオ電子顕微鏡による生体高分子の立体構造解析法の最近の進歩と生命科学や創薬科学への今後の貢献について展望を述べる。

The 3D structure of biological macromolecules is fundamental information not only for life science but also for medicine and drug discovery. To elucidate complex biological functional mechanisms, it is essential to visualize the 3D structures of biological macromolecules, their dynamics and intermolecular interactions in various states, and the number of structures to be visualized is several hundred million. Recent technological advances have made cryoEM an extremely powerful tool for high-resolution structural analysis, beyond its role as a complement to X-ray crystallography and NMR. The development of hardware and software, including electron cryomicroscopes equipped with highly stable and controllable electron optics, cold cathode field emission guns, energy filters, and CMOS-type direct electron detection cameras with high frame rates and high sensitivity, as well as high-speed computers and image analysis software, has made it possible to determine a 3D structure from a solution sample of only a few mg in about two days. Collection of several thousand EM images required for near-atomic resolution structural analysis necessary for model building used to take several days, but recent technological advances have sped up the process to completion within a few hours or even less than an hour in some cases. Recent advances in cryoEM methods and their future contributions to life science and drug discovery will be discussed.

cryoEM, structural life science, biological macromolecule

講演番号：3AJ-02
講演日時、会場：3 月 26 日 10:10～ A1 会場

Cryo-EM 構造で明らかになった活性制御タンパク質による CoA 転移酵素の調節機構

Regulatory mechanism of CoA transferase by the interaction with a regulatory protein revealed by Cryo-EM structural analysis

○吉田 彩子[1,2]、宮田 知子[3]、難波 啓一[3]、西山 真[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]阪大院・生命機能）
○Ayako Yoshida[1,2], Tomoko Miyata[3], Keiichi Namba[3], Makoto Nishiyama[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. of Front. Biosci., Osaka University)

CoA transferase（CoAT）はアシル CoA と短鎖脂肪酸の変換に関わり、多くの生物種に広く分布している。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の CoAT はアセチル CoA から様々な短鎖脂肪酸への CoA 転移に関わる。我々はこれまでに CoAT が酵素活性を持たないアラニン脱水素酵素ホモログタンパク質（ADLP）と相互作用し、ADLP と NAD^+の共存下で CoAT 活性が阻害されることを見出している。ADLP は NADH も結合するものの CoAT 活性には影響を与えないことから、ADLP が細胞内の NAD^+/NADH 比を感知して CoAT 活性を調節する制御タンパク質として機能することが分かっている。しかしながら ADLP と NAD^+による CoAT 活性調節機構の構造基盤は明らかにできていなかった。本発表では AMED-BINDS の支援でクライオ電子顕微鏡法により決定した CoAT·ADLP 複合体の構造を報告する。NAD^+の存在下、非存在下における CoAT·ADLP 複合体構造の比較から、NAD^+の結合により ADLP と CoAT の結合が安定化されることが明らかとなり、ADLP と結合することで CoAT の活性中心付近の可動性が制限され活性が阻害されることが示唆された。

CoA transferase (CoAT) is the enzyme involved in the conversion between acyl-CoA and short-chain fatty acids and is widely distributed among various organisms. An extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, has one gene encoding CoAT, which catalyzes CoA transfer from acetyl-CoA to various short-chain fatty acids. Previously, we found that CoAT interacts with a catalytically inactive alanine dehydrogenase-like protein (ADLP). Interestingly, CoAT activity is inhibited in the presence of ADLP and NAD^+. ADLP also binds NADH; however, NADH does not affect the CoAT activity even in the presence of ADLP. This suggests that ADLP serves as a regulatory protein to control the CoAT activity in response to the NAD^+/NADH ratio in cells. However, the structural basis of this regulatory system of CoAT has not yet been clarified. In this presentation, we will introduce the Cryo-EM structure of the CoAT·ADLP complex determined with the support of AMED-BINDS. Comparison of the structures of the CoAT·ADLP complex in the presence and absence of NAD^+ revealed that the binding of NAD^+ to ADLP stabilizes the CoAT·ADLP complex. This suggests that the less flexibility of a region covering the active site of CoAT in the complex with ADLP · NAD^+ is a possible cause of the decrease in the CoAT activity.

CoA transferase, Cryo-EM, regulatory protein

講演番号：3AJ-03
講演日時、会場：3 月 26 日 10:35～ A1 会場

ゲノム機能制御装置としてのクロマチン構造とダイナミクス

Chromatin structure as a device for genome function

○胡桃坂 仁志（東大定量研）
○Hitoshi Kurumizaka (The Univ. of Tokyo)

真核生物では、ゲノムはクロマチン構造を形成して細胞核に収納されている。クロマチンの基盤構造はヌクレオソームで、4 種類のヒストン H2A、H2B、H3、H4 からなるヒストン 8 量体におよそ 150 塩基対の DNA が結合した構造体である。ヌクレオソームは、DNA 結合タンパク質群の DNA 結合に対して阻害的である。そのため、転写、複製、修復、組換えなどのゲノム DNA の機能発現の際には、DNA 結合タンパク質はヌクレオソーム構造の障壁を乗り越える必要がある。しかし、真核生物がゲノム機能発現の際に、どのようにヌクレオソームの阻害効果を乗り越えているのかに関しては、いまだ不明瞭である。我々はこの長い間の疑問に対して、生化学的およびクライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的アプローチによる解析方法を確立してきた。今回、我々の最新の研究結果を紹介し、ゲノム DNA が機能する際のヌクレオソームの構造変動の役割について議論したい。

In eukaryotes, chromatin plays a crucial role in accommodating the genome within the nucleus. The fundamental unit of chromatin is the nucleosome, where approximately 150 base pairs of DNA are wrapped around the surface of a histone octamer. The histone octamer is composed of two copies each of the histones H2A, H2B, H3, and H4. The nucleosome structure limits the accessibility of DNA-binding proteins to the DNA. Nonetheless, these proteins must overcome the nucleosome barrier to function in genome regulation, a process that remains poorly understood. To address this long-standing question, we have established methods for nucleosome reconstitution and structural analysis. We have documented the biochemical characteristics and structural versatility of nucleosomes using cryo-electron microscopy. In this meeting, I will present our current progress and discuss the mechanisms by which the nucleosome acts as a regulatory element for gene regulation within chromatin.

Chromatin, Structural biology, Epigenetics

講演番号：3AJ-04
講演日時、会場：3 月 26 日 11:05～ A1 会場

X 線自由電子レーザーによる時分割実験の現状と展望

Current status and prospects of time-resolved experiments using X-ray free electron lasers

○南後 恵理子（東北大多元研）
○Eriko Nango (Tohoku Univ.)

我々は、X 線自由電子レーザー（XFEL）を用いたタンパク質構造解析手法の一つであるシリアルフェムト秒結晶構造解析の技術開発に取り組んでいる。XFEL とポンププローブ法を組み合わせることにより、光励起性タンパク質が光により変化する様子を原子レベルで“動画”のように捉える時分割実験技術は既に確立され、多くのユーザー実験で利用されている。この手法はその時間分解能から、これまで原子分解能で追うことのできなかった化学反応などの早い反応の追跡に適している。また、上記の方法を更に応用し、最近では光非励起性タンパク質の動画解析も可能になってきている。その方法の一つとして、基質やリガンドのような低分子と微結晶を迅速にマイクロ流路内で混合する二液混合法があげられ、実際に酵素反応の過程を捉えることにも成功している。これらの時分割実験技術は、従来は得ることができなかったタンパク質の反応や構造変化を原子レベルで解明することにより、生命科学研究の深化に深く貢献すると期待される。本発表では、我々が取り組んできた時分割実験の技術開発とそれを用いた実際の解析例について紹介する。

We have been developing a technique for serial femtosecond crystallography (SFX), a protein structure determination method using X-ray free electron lasers (XFELs). Time-resolved experimental techniques for capturing light-induced changes in photosensitive proteins have been established and used in many user experiments by combining SFX and pump-probe methods. This technique is suitable for tracking fast reactions, such as chemical reactions that could not be followed at the atomic level because of the high temporal resolution. In addition, time-resolved experiments using a reaction trigger other than light have also been developed. Mix-and-inject SFX allows a rapid mixing with microcrystals and substrates in a microfluidic channel to capture processes of enzymatic reactions. These time-resolved experimental techniques can contribute to life science research by elucidating reactions and structural changes of proteins at atomic resolution. In this presentation, I will introduce our developments and successful results from time-resolved experiments using XFELs.

X-ray free electron lasers, Protein dynamics, X-ray crystallography

講演番号：3AJ-05
講演日時、会場：3 月 26 日 11:35～ A1 会場

水素細菌由来複合体タンパク質のクライオ電子顕微鏡解析
Cryo-EM analysis of complex proteins from hydrogen-oxidizing bacteria

廖 増威、○伏信 進矢（東大院農）
Zengwei Liao, ○Shinya Fushinobu (The Univ. of Tokyo)

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 と *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 はいずれも好熱性の化学独立栄養性水素細菌であり、水素酸化を利用してエネルギー生産を行い、二酸化炭素固定により有機物を合成する。我々は水素細菌のシャペロニン GroELS と Rubisco-activase 複合体のクライオ電子顕微鏡解析を行った。大腸菌の GroELS では $GroEL_{14}$ の二重リングの片方に $GroES_7$ リングが結合した弾丸型複合体が優性種であることが知られているのに対し、TH-1 株の GroELS は大部分が２つの GroES リングが結合したフットボール型複合体であった。TK-6 株の GroELS は、AMP-PNP 存在下で測定を行ったところ、弾丸型、半フットボール型に加えて、これまでシャペロニンで観測されていなかった非対称フットボール型複合体が存在していた。非対称フットボール型複合体では片方の $GroES_7$ リングが $GroEL_{14}$ 二重リングよりやや離れており、GroEL のアピカルドメインが上に開くことによりシャペロニン内のチャンバーが広がっていた。この状態は $GroES_7$ リングが会合/解離する途中の段階を示していると考えられる。本講演では TH-1 株の Rubisco と、AAA+ ATPase(CbbQ)とアクセサリータンパク質(CbbO)からなる再活性化因子(CbbQO)との複合体のクライオ電顕構造についても紹介する。

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 and *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 are both thermophilic chemoautotrophic hydrogen-oxidizing bacteria. We performed cryo-EM analysis of chaperonin GroELS and the Rubisco-activase complex from these bacteria. While the dominant species of *Escherichia coli* GroELS is a bullet complex consisting of one $GroES_7$ ring bound to a $GroEL_{14}$ double ring, TH-1 GroELS was mostly present as a football complex consisting of two $GroES_7$ rings bound to both sides of $GroES_{14}$. TK-6 GroELS in the presence of AMP-PNP was present as the bullet, a half-football, and an asymmetric football complex, which had not previously been observed in chaperonins. In the asymmetric football complex, one of the $GroES_7$ rings was slightly elevated from the $GroEL_{14}$ double ring, and the apical domain of GroEL was elevated, enlarging the chaperonin chamber. This state may correspond to an intermediate stage of the process of $GroES_7$ ring association/dissociation. We will also present cryo-EM analysis of the complex structures of Rubisco from TH-1 strain and its activase CbbQO, which consists of AAA+ ATPase (CbbQ) and an accessory protein (CbbO).

cryogenic electron microscopy, hydrogen-oxidizing bacteria, chaperonin

ランチョンセミナー プログラム

ランチョンセミナーでは，幅広い“農芸化学分野”に関わる企業関係の皆様から新製品や新技術等の情報を発信していただき，産学官連携の推進に努めております．

ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムのチケットは，当日の朝に東京農業大学1号館1階出入口ロビー「ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムチケット配布デスク」にて配布します．配布時間は，3月25日，26日とも8:15～10:15です．

チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットをお受け取り下さい．

チケット配布は，定員に達した時点で終了します．

チケットは，開始時間を過ぎると無効になります．その後はチケットをお持ちでない方と同等の扱いとなりますのでご注意ください．チケットをお持ちでない方は，ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．

3月25日（月）12:35～13:25

LS2-1　株式会社 J-オイルミルズ　　B1会場

座長：仲川 清隆（東北大学大学院農学研究科　教授）

油脂酸化メカニズム研究の進展　～東北大学「J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座」の取り組みから～

1. 油脂の酸化評価の新技術開発

青木 亮輔（(株)J-オイルミルズ研究開発センター　兼　東北大学大学院農学研究科）

2. オリーブオイルの風味発現メカニズム解明

加藤 俊治（東北大学大学院農学研究科　Jオイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座准教授，食品機能分析学准教授（兼務））

LS2-2　味の素株式会社　　B5会場

アミノ酸を活用した乳牛・肉牛由来の温室効果ガス削減の取組み

神原 真生（味の素株式会社）

LS2-3　Noster 株式会社　　C1会場

座長：小川 順（京都大学大学院農学研究科）

多様性とのびやかなつながり　－腸内細菌が紡ぐ健康―

1. 腸脳相関：運動意欲における腸内細菌の役割

Christoph A. Thaiss（University of Pennsylvania）

2. 腸内細菌脂質代謝物と代謝性肝疾患

細岡 哲也（静岡県立大学薬食生命科学総合学府）

LS2-4　株式会社カネカ　　C5会場

座長：岡田 憲典（東京大学アグロバイオテクノロジー研究センター）

植物のゲノム編集における「デリバリー技術」研究開発の新展開

1. DNAを使わずに植物をゲノム編集するiPB法の開発

今井 亮三（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 エグゼクティブリサーチャー，国立大学法人筑波大学 生命環境系 教授）

2. カネカのアグリビジネス展望：iPB法をはじめとした独自技術の応用展開

島谷 善平（株式会社カネカ　R&B本部　新規事業開発部）

LS2-5　キリンホールディングス株式会社（100 周年記念特別ランチョンセミナー）　D1 会場

キリングループの多様な事業を支える研究開発と人材

津田 秀樹（キリンホールディングス　R&D 本部　研究開発推進部）

LS2-6　株式会社島津製作所　D5 会場

司会：渡邉 淳（株式会社島津製作所）

1. MALDI-MS プロテオタイピングによる微生物の分析

寺本 華奈江（株式会社島津製作所）

2. 腸内環境を模した共培養を実現する腸内細菌共培養デバイスのご紹介

橋本 豊之（株式会社島津製作所）

LS2-7　株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ　E1 会場

On-chip Droplet Selector を活用した目的微生物の大規模スクリーニング

矢部 修平（理化学研究所バイオリソース研究センター　植物 - 微生物共生研究開発チーム）

3 月 26 日（火）12:35 ～ 13:25

LS3-1　キッコーマン株式会社　C5 会場

座長：佐藤 隆一郎（東京大学大学院農学生命科学研究科　特任教授）

食塩としょうゆのおいしい話

1. 食塩と健康：疫学研究からのアプローチ

津金 昌一郎（国際医療福祉大学大学院　教授）

2. しょうゆでおいしく適塩

中島 文子（キッコーマン株式会社　研究開発本部）

LS3-2　ベックマン・コールター株式会社　D1 会場

菌株構築・培養検討の微量化，自動化で微生物によるモノづくり研究開発を加速させませんか？

藤村 興輝（ベックマン・コールター株式会社 ライフサイエンス マーケティング本部　本部長）

LS3-3　Twist Bioscience　D5 会場

#WeMakeDNA - 人工遺伝子を用いた金属 - タンパク質複合体研究へのアプローチ

1. 大腸菌組換え金属タンパク質の研究と人工合成遺伝子の活用

藤城 貴史（埼玉大学大学院理工学研究科 生命科学部門分子生物学領域）

2. Writing the Future：あなたの最高の研究アイデアを実現する Twist 人工遺伝子ツール

金城 一貴（Twist Bioscience）

LS3-4　SCIEX　E1 会場

生体分子の定性解析をより深く．質量分析の新技術：電子励起解離

建田 潮（株式会社エービー・サイエックス　テクニカルマーケティング）

油脂酸化メカニズム研究の進展

～東北大学「J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座」の取り組みから～

2019年4月に、東北大学農学研究科に設置された「J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座」（東北大学仲川清隆教授(兼任)）は、脂質酸化メカニズムの研究を行ってきました。脂質酸化は、劣化という側面だけでなく、食品の風味発現やおいしさに影響を与えるのに重要な役割を示しています。このメカニズムを解明し、劣化を抑え、風味発現をコントロールする技術開発の基盤研究に取り組んでいます。設立後５年たち研究も順調に推移してきたことから、24年4月より、さらに３年間延長し研究を推進することにいたしました。本セミナーでは、この５年間の成果を報告させていただきます。

日時：2024年3月25日12:35～13:25
会場：B1；　　プログラム番号　LS2-1

座長：仲川清隆（東北大学大学院農学研究科　教授）

１．油脂の酸化評価の新技術開発

青木亮輔　((株)J-オイルミルズ研究開発センター　兼　東北大学大学院農学研究科）

食用油脂を廃棄する際の劣化指標として「酸価」が使われています。酸価は油脂中のトリグリセリドから加水分解された遊離脂肪酸量を測定するとされ、日本および海外でも公定法として広く使われている指標です。そのような中で、我々は無加水条件下でも熱によって生じるカルボン酸を初めて特定し、これが遊離脂肪酸とともに酸価に大きく寄与していることを初めて明らかにしました。この知見から油脂の使用を延長するためには、加水分解を抑えることに加えて、熱による酸化の抑制が有効であることを証明でき、油脂の新たな管理方法が提案可能となったと言えます。

２．オリーブオイルの風味発現メカニズム解明

加藤俊治（東北大学大学院農学研究科　Jオイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座　准教授、食品機能分析学　准教授（兼務））

オリーブオイルはその独特の香りと高い酸化安定性から古くから親しまれていますが、意外なことにその香りの生成メカニズムの一部は未だ謎に包まれていました。本共同研究講座では、独自の分析技術を用いた5年にわたる取り組みの中で、様々な植物油脂から種々の香り成分がどのように生成されるかを詳細に解明してきました。そして極最近オリーブオイルの香りの生成メカニズムとして、新たな経路を明らかにしつつあります。本セミナーでは我々の5年間の取り組みとともに、新たに明らかとなったオリーブオイルの香りの生成メカニズムについて紹介します。

共同研究講座HP：https://www.agri.tohoku.ac.jp/jomil/index.html

ランチョンセミナー：LS2-2　開催日時：3 月 25 日（月）　12:35-13:25　会場：B5

アミノ酸を活用した乳牛・肉牛由来の温室効果ガス削減の取組み

味の素(株)　バイオ・ファイン研究所　神原真生

アミノ酸はタンパク質の構成要素であるが、体内で十分量を生成することができない必須アミノ酸と生成できる非必須アミノ酸がある。必須アミノ酸を適切な時期に適切な量を給与することは、家畜の生産性の向上および飼料のコストダウンを通じて農家の収益性に直結する。そのため、リジンやメチオニンなどの飼料用アミノ酸が、家畜生産において一般的に使用されている。

ウシは４つの胃を持っており、ヒトやブタのような単胃動物における胃に相当するのは第四胃である。特徴的なのは第一胃(ルーメン)で、ここには微生物(ルーメン細菌)が棲息しており、その代謝物や菌体自身がウシの栄養素として利用される。ルーメン細菌は宿主であるウシの栄養摂取を助ける一方で、飼料に添加した必須アミノ酸を分解し、アミノ酸として吸収部位まで届けることを困難にしてしまう。そのため牛用アミノ酸製剤においてはアミノ酸をルーメン細菌による分解から保護し、かつ吸収部位でリリースさせるルーメン保護技術が必要になる。味の素(株)は、水溶性が高いために長年の課題であったリジンのルーメン保護技術を確立し、2011 年より商品化している(AjiPro®-L[1]，図 1)。牛の泌乳期間や分娩前後の飼料に AjiPro®-L を添加することにより、乳量が増加し、代謝病が減少することが報告されている[2,3]。

必須アミノ酸は一種類でも必要量に対して充足していなければ、そのアミノ酸の充足度がタンパク質生産の制限となる(桶の理論)。他の余剰アミノ酸はタンパク質合成には使用されず、代謝されて尿素などの形で尿へ排泄される。排泄物に含まれるアミノ酸由来の窒素は土壌・水質・大気汚染の原因となるばかりか、牛由来の温室効果ガスの一つである一酸化二窒素(N_2O)の発生源にもなることから近年注目されている。桶の理論に基づきアミノ酸のバランスを整えた飼料(アミノ酸バランス飼料:AAB 飼料，図 2)は、過剰な窒素の供給を減らし、温室効果ガスを低減することも可能となる。我々は乳牛への AAB 飼料の給与により、生産性を棄損することなく窒素排泄を低減できることを実証した[4]。また肉牛においても同様のコンセプトが有効であることを確認した[5]。これらの手法は、温室効果ガス削減量をクレジット化できる J-クレジットの方法論として登録されている[6]。現在、このようなカーボンクレジット制度も活用しながら、農家、乳業メーカーなどのステークホルダーと連携して、業界全体で温室効果ガスを削減する取り組みを推進している。

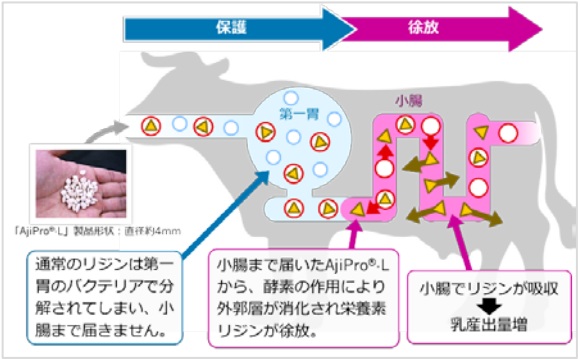


図 1　AjiPro®-L のルーメン保護技術

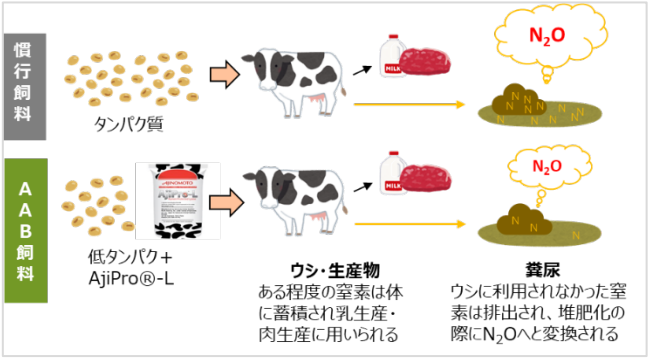


図 2　アミノ酸バランス飼料(AAB 飼料)

[1] 味の素ヘルシーサプライ株式会社ウェブサイト「AjiPro®-L 乳牛用リジン製剤」(https://www.ahs.ajinomoto.com/products/feed/ajipro-L.html)
[2] Nocek *et al.* (2010) JDS vol. 93, E-Suppl. 1: 235-236
[3] Guadagnin *et al.* (2023). J. Dairy Science, DOI: 10.3168/jds.2022-22390
[4] Higuchi *et al.* (2016). *The 17th AAAP Animal Science Congress* (Abstracts #310)
[5] Kamiya *et al.* (2021). *Animal Science Journal*, DOI: 10.1111/asj.13562
[6] J-クレジット方法論 AG-001「牛・豚・ブロイラーへのアミノ酸バランス改善飼料の給餌」

プログラム番号 LS2-3

NOSTER

日本農芸化学会2024年度大会
Noster株式会社ランチョンセミナー

多様性と のびやかなつながり

腸内細菌が紡ぐ健康

日時

2024年 3月25日(月) 12時35分~13時25分まで

会場

C1

座長・総論

小川 順 教授
[京都大学大学院 農学研究科]

演題

1. 腸脳相関：運動意欲における腸内細菌の役割
演者／Dr. Christoph A. Thaiss [University of Pennsylvania]

2. 腸内細菌脂質代謝物と代謝性肝疾患
演者／細岡 哲也 准教授 [静岡県立大学薬食生命科学総合学府]

腸脳相関という言葉がテレビから聞こえてくるようになったように、腸と他臓器との関連性が様々に見だされ、認知されてきています。このような腸を中心とする臓器間ののびやかなつながりが、我々の健康、生命の営みを支えています。つながりは、多岐にわたるが故に、変化に対する恒常性を提供できる可能性があります。

そして、この頼もしい複雑性をもたらしているのが、腸内細菌やその代謝物の多様性と言えます。次々と現れる変化に対応できる役者たちが、満を持して待機しているからです。

そのからくりが、さまざまな生命現象において、少しずつ理解されつつあります。見いだされてきたつながりは、多様な腸内細菌叢の変化と、それに伴う代謝物の消長に導かれ、その姿は、まるで万華鏡のごときイベントとして提示されます。

本セミナーでは、「腸内細菌叢ー代謝物ー恒常性」という多様性がもたらすのびやかなつながりをあぶりだした最新の研究を、運動や代謝改善といった表現形を例にご紹介いただき、皆さんとともに腸内細菌が紡ぐ健康に思いをはせたいと考えています。

日本農芸化学会 2024 年度大会
株式会社カネカ
ランチョンセミナー（プログラム No. LS2-4）

植物のゲノム編集における「デリバリー技術」研究開発の新展開

座長：岡田 憲典 先生（東京大学アグロバイオテクノロジー研究センター）
日時：3 月 25 日　**会場**：C5

近年、世界規模での急激な気候変動による農作物の収量減少、可耕面積の減少、そして人口増加に伴い、食糧需給の逼迫が懸念されている。特に日本は食糧の海外依存率が高く、食糧危機への対策は今後より一層重要になる。その有力な解決策として期待されるのが、ゲノム編集をはじめとしたバイオ技術により植物育種のプロセスを加速・効率化することである。

1) DNA を使わずに植物をゲノム編集する iPB 法の開発

今井 亮三
農研機構 生物機能利用研究部門 エグゼクティブリサーチャー
筑波大学 生命環境系 教授

作物でゲノム編集を行う場合、通常培養を介した形質転換が必要である。しかし多くの作物の商業品種においては、脱分化と再分化を経る培養法による形質転換は困難であり、ゲノム編集技術の作物育種への展開を阻害する要因となっている。そこで我々は in planta Particle Bombardment（iPB）法という培養を使わずに植物体を直接ゲノム編集する技術を開発した。iPB 法では、CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質を直接導入することにより、DNA を使わずにゲノム編集を行うことができる。本講演では iPB 法の技術の紹介とその作物育種への利用例を紹介する。

2) カネカのアグリビジネス展望：iPB 法をはじめとした独自技術の応用展開

島谷 善平
株式会社カネカ　R&B 本部　新規事業開発部

カネカは、世界の食糧需給に貢献するソリューションの提供を目指して、植物バイオの研究開発と事業化を進めている。2021 年には，日本たばこ産業株式会社（JT）から同分野の事業を承継しており、両社の人材・技術・設備を統合して、アグリバイオリサーチセンター（静岡県磐田市）を発足させた。カネカの基幹技術は、核酸やタンパク質を植物細胞へ送り込む「デリバリー技術」であり、遺伝子組換えにも、ゲノム編集にも必須である。この発表では、カネカが NARO と共同で開発した iPB 法に加え、JT 開発のアグロバクテリウム法をご説明するとともに、デリバリー技術のライセンス、共同研究開発、研究開発受託などの植物バイオ事業をご紹介したい。

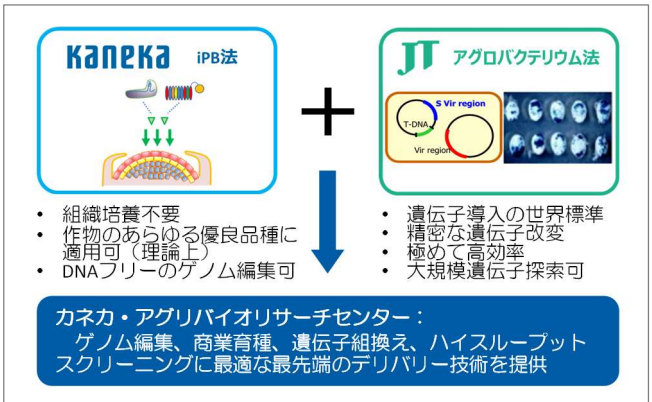


図　カネカと JT の植物バイオ事業の統合

キリングループの多様な事業を支える研究開発と人財

キリンホールディングス株式会社　R&D 本部　研究開発推進部長　津田秀樹

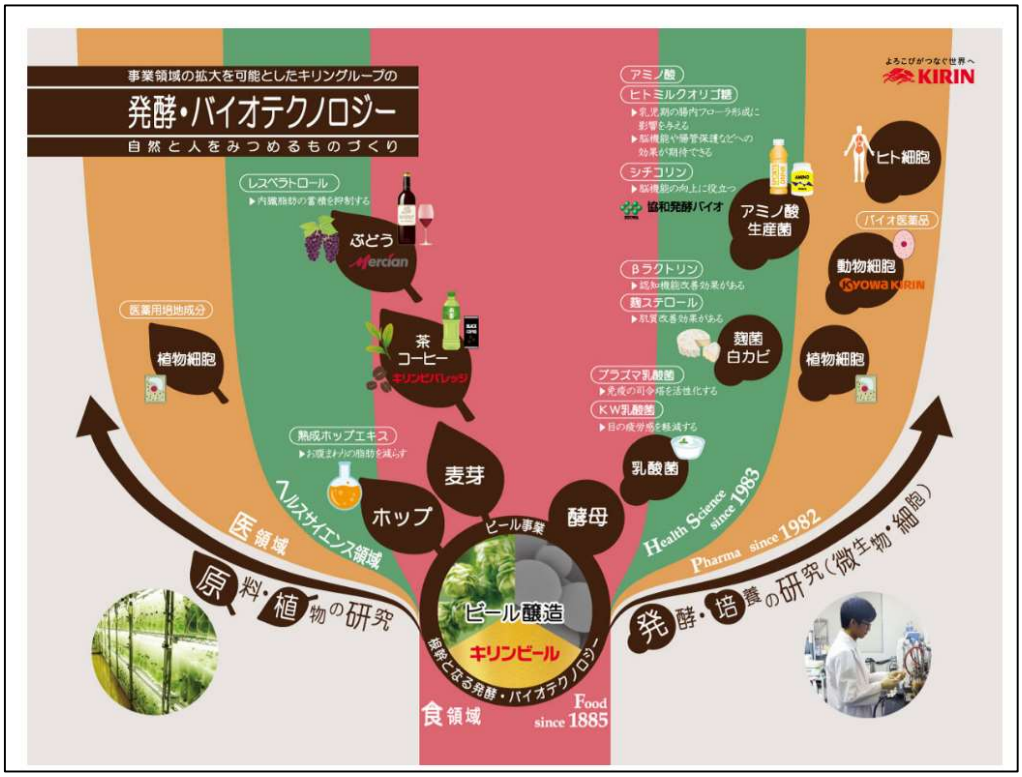
日時：3 月 25 日 12:35 - 13:25、会場：D1、プログラム番号：LS2-5

＜講演要旨＞

キリングループは、未来を見据え「食から医にわたる領域で価値を創造し、世界の CSV 先進企業となる」というビジョンを掲げています。CSV（Creating Shared Value）を日本語にすると「共通価値の創造」、社会的ニーズや社会問題の解決に取り組むことで社会的価値と経済的価値を創出し、成長の推進力にしていくことを指します。

キリングループの研究開発部門は、グループ各社が事業を通じてこの社会的ニーズや社会問題の解決に取り組むためにサイエンスとテクノロジーの力で貢献しています。酒類・清涼飲料から健康機能性食品、医薬品まで事業領域は幅広く、それぞれ基礎研究・応用研究さらには事業に直結する商品やサービスの開発を行うため、研究者・技術者の専門性やバックグラウンドもさまざまです。しかし、研究者・技術者たちは多様な技術や知見を取り込みながら、事業を支える新たな成果を生み出してきました。一人ひとりが持つ能力を最大限に引き出し、切磋琢磨ができる環境、その先に新たな価値創造の実現があると考えています。

本講演では、キリングループの研究開発を紹介しながら、CSV 経営の実現に向けて高い研究力・研究マネジメント力を有しながら幅広く人財が活躍している様子をお伝えします。



SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会ランチョンセミナー

日時 2024年3月25日(月) 12:35-13:25

会場 D5　プログラム番号 LS2-6

演題 1 MALDI-MSプロテオタイピングによる微生物の分析

演者 寺本 華奈江 (株式会社島津製作所)

MALDI-MSによる微生物分析は、臨床微生物検査分野を中心に普及が始まり、今では食品分野の微生物分析にも利用が広まっている。島津製作所では、MALDI-MSによる微生物の試料調製法や、データ処理法に関する研究開発を進めている。微生物をMALDI-MSで測定するとリボソームタンパク質を主としたピーク群が観測されると考えられている。しかし、MALDIマススペクトルのパターンは、培養条件や試料調製法により変わることも経験的に知られている。
本セミナーでは、培養条件や試料調製法、現在の課題や今後の展望など、MALDI-MSによる微生物分析について概説する。

演題 2 腸内環境を模した共培養を実現する腸内細菌共培養デバイスのご紹介

演者 橋本 豊之 (株式会社島津製作所)

腸内細菌が様々な疾患、健康状態と関係があることがわかってきており、腸内細菌を制御することで健康状態を制御できるのではないかと考えられている。島津製作所では、腸内細菌研究、機能性食品素材開発をターゲットとした研究開発ツールである「腸内細菌共培養デバイス」のテスト販売を開始した。このデバイスは腸管上皮細胞を境にApical側を嫌気環境に、Basal側を好気環境に置くことで、生きた腸内細菌と生きた腸管上皮細胞を同一環境で培養(共培養)することを実現したデバイスである。腸内細菌と腸管上皮細胞の相互作用、腸内細菌が産生した物質の細胞透過を調べることができ、腸内細菌の新規機能開発、機能性食品素材の評価に使用できると考えている。本セミナーでは、腸内細菌共培養デバイスの概要、実験例について紹介する。

司会 渡邉 淳 (株式会社島津製作所)

お問合せ
(株)島津製作所 分析計測事業部 営業統括部 産学官・プロジェクト推進室　連携推進グループ
〒101-8448 東京都千代田区神田錦町1−3　TEL：03-3219-5869

Sponsored by
オンチップ・バイオテクノロジーズ

ランチョンセミナー

2024.3.25 (月) 12:35 ~ 13:25

会場 E1

プログラム番号: LS2 - 7

演者

矢部 修平

理化学研究所　バイオリソース研究センター
植物−微生物共生研究開発チーム（PI ： 市橋　泰範）

演題

On-chip Droplet Selectorを活用した目的微生物の大規模スクリーニング

地球上にはおよそ1兆種の微生物が存在しますが、未だ人類はその99%以上を培養することができておりません。On-chip Droplet Generatorは環境サンプルに生息する微生物を1～複数細胞ごとに1つの微小な液滴（Water in Oil型）に封入し、それを100万以上のオーダーで生成することができます。またOn-chip Droplet Selectorは、個々の液滴の蛍光、前方散乱光（FSC）及び側方散乱光（SSC）情報を取得し、標的とする液滴を1つずつ分離してマイクロプレートなどに自動分注できるシステムです。これら2つの装置と次世代シーケンサーによる種同定を組み合わせることで、環境中の微生物において非常に稀な機能であっても従来技術の1,000倍以上の高効率で選抜・同定することが可能になると考えました（特願2022-074332）。そこで当研究室では、本アイデアの有効性を確認するため、青枯病菌（*Ralstonia solanacearum*）の拮抗微生物を環境サンプルから大規模なスクリーニングに着手しました。本実験系では、GFP標識した*R. solanacearum*と環境微生物を微小液滴内で培養し、拮抗作用によりGFP蛍光が消失した液滴をOn-chip Droplet Selectorを用いて大規模にスクリーニングする系です。この系を用いて土壌から生成した約200万個の微小液滴から拮抗微生物候補株1,216株をハイスループットに獲得することに成功しました。現在、他のスクリーニング系についても研究開発を進めており、本セミナーではこれらの取り組みについてもご紹介します。

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

〒184-0012
東京都小金井市中町2丁目16-17

info@on-chip.co.jp
042-385-0461
https://on-chip.co.jp/

LS3-1　日本農芸化学会2024年度大会
キッコーマン株式会社　ランチョンセミナー

3月26日（火）12:35-13:25
東京農業大学　世田谷キャンパス　C５会場

食塩としょうゆのおいしい話

座長　東京大学大学院農学生命科学研究科　佐藤 隆一郎　特任教授

「食塩と健康：疫学研究からのアプローチ」

国際医療福祉大学大学院　津金 昌一郎　教授

食塩と健康との関係が示された歴史的な端緒は、調味料としての塩が存在しないアマゾン先住民族ヤノマミ族の調査で、尿中ナトリウム排泄量が極めて少なく（カリウムが100倍）、血圧平均値が約100/60で、しかも加齢に伴って上昇しないことが明らかになった疫学研究であろう。

その後、集団レベルでの食塩摂取量・尿中排泄量と健康指標（高血圧、脳卒中、胃がんなどの発生率）を比較するエコロジカル研究（地域相関研究）、個人レベルの食塩の摂取量を把握し健康指標との関連を検証するコホート研究、そして、食塩摂取（減塩）をランダムに割り付けて健康指標との関連を検証する介入研究などが世界中で実施された。

その結果、食塩の高摂取は、高血圧を介して脳卒中・虚血性心疾患などの循環器疾患のリスクを高めることや高塩分食品の摂取が胃がんのリスクを高めることなどが明らかになった。世界の早期死亡の約4%が食塩の過剰によるとの推計もあり、減塩は国際的な健康課題である。

日本人の食塩摂取源は多岐にわたり、調味料由来が最も多いが、加工食品や味付け済食品など自己裁量ではコントロールするのが難しい食品からの寄与も大きい。今後は、食環境整備などによる食文化を尊重した減塩の社会実装が求められる。一方で、日本食は食塩摂取量が多くなるのが弱点とされるが、世界屈指の長寿であるという事実もある。減塩だけに偏重するのではなくトータルで真に健康的で美味しく、かつ、持続可能な食について考える必要もある。

「しょうゆでおいしく適塩」

キッコーマン（株）研究開発本部　中島 文子

しょうゆには、食塩の代替として用いることで、ナトリウム摂取量を減らす節塩効果があります。本セミナーでは料理や加工食品におけるしょうゆを用いた節塩の例をご紹介いたします。私たちはしょうゆ以外にも多様な食ニーズに対応できる商品やレシピをご提供し、お客様の「おいしく適塩」の実現をサポートして参ります。



kikkoman
おいしい記憶をつくりたい。

キッコーマンの適塩に関する情報はこちらから
https://www.kikkoman.co.jp/kikkoman/ajiwairichgenen/
https://www.nature.com/articles/d42473-023-00278-3

（記事広告）

Bioproduction Workflow Solution

BECKMAN COULTER
Life Sciences

菌株構築・培養検討の微量化、自動化で微生物によるモノづくり研究開発を加速させませんか？



ベックマン・コールター ライフサイエンスはバイオプロダクション研究･開発ワークフローをより効率よく実施し、いち早く製品を市場に届けるためのソリューションを提供しています。
本セミナーでは遺伝子合成からスクリーニング、生産株の最適化、プロセス開発まで、様々なステップに適用できる弊社の最新のソリューションを一挙にご紹介いたします。

日　時
2024年 3月 26日 [火] 12:35 ～ 13:25

プログラム番号 **LS3-2**　　会　場 D1

演　者 藤村 興輝　ベックマン・コールター株式会社
ライフサイエンス マーケティング本部 本部長

ベックマン・コールター ライフサイエンスのバイオプロダクションソリューション



セミナー内で紹介する主な製品・ソリューション

① 微生物の流加培養 + オンラインモニタリングをマイクロウェルプレートで

BioLector XTマイクロバイオリアクターは、最大48の微生物を同時に培養、モニタリングでき、さらに流加培養やpH制御などの複雑なプロセス制御が可能、菌株スクリーニング、初期プロセス開発を加速させます。

② 遺伝子合成をより速く、より低コストに、ハイスループットに

アコースティック分注テクノロジーを用いたEcho 525による nLレベルの非接触超微量分注で、これまでの遺伝子合成反応を大幅に微量化、高速化することが可能です。細胞構築のDesign – Build – Test - Learnのプロセスを加速させ、パワフルなプラットフォームを構築します。

③ 核酸精製から細胞株スクリーニングアッセイまで、ワークフローを自動化
Biomek i-Series自動分注ワークステーション

Biomek i-Seriesは柔軟性の高いシステムで、バイオプロダクション研究の様々なワークフローを自動化し、ハイスループット化することが可能です。

ベックマン･コールター株式会社

本　　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730　☎ 03-6745-4704
e-mail bckk_ls_web@beckman.com　URL https://www.beckman.jp

Beckman CoulterおよびBeckman Coulterロゴは、Beckman Coulter, Inc.の登録商標です。

MAPSS-LS-202312-38



日本農芸化学会2024年度大会
ランチョンセミナー（プログラム No. LS3-3）

講演番号 LS3-3 | 3月26日 (火) 午後 12:35 - 13:25

#WeMakeDNA - 人工遺伝子を用いた金属-タンパク質複合体研究へのアプローチ

[共催企業]Twist Bioscience

招待講演

大腸菌組換え金属タンパク質の研究と人工合成遺伝子の活用

埼玉大学大学院理工学研究科 生命科学部門分子生物学領域
藤城 貴史 准教授

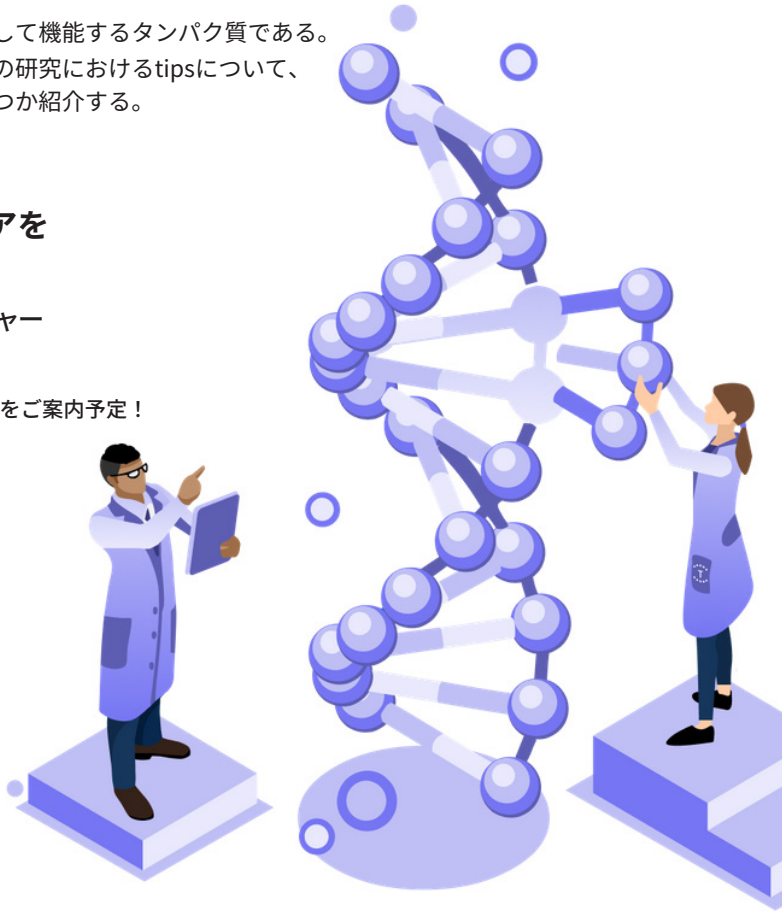
金属タンパク質は、遷移金属イオンや遷移金属を含む補因子を利用して機能するタンパク質である。
本講演では、人工遺伝子を利用した組換え金属タンパク質生産やその研究におけるtipsについて、
一般的な注意事項や発表者のこれまでの実体験などを踏まえ、いくつか紹介する。

企業講演

Writing the Future: あなたの最高の研究アイデアを実現するTwist人工遺伝子ツール

Twist Bioscience シニアビジネスデベロップメントマネージャー
金城 一貴

当日ランチョンセミナーご参加者様限定でご利用いただけるキャンペーンをご案内予定！



セミナー参加登録で当たる！

以下リンクよりセミナー参加登録をしていただくと、
抽選で以下のスペシャルプレゼントが当たります。

- **最大1.8kb！Twist Gene Fragments 1本無料チケット (3名様)**
- **Twist オリジナル ぬいぐるみ (5名様)**

さらに、ご参加登録いただいた皆様には、後日、本講演映像を
ご覧いただけるウェブリンクをお送りいたします。
当日のご参加が難しい場合にも、ぜひご登録ください。

セミナー参加登録は QRコードから

ランチョンセミナーお弁当の確約は、当日学会にて配布される整理券をお受け取りください。

【お問い合わせ先】

Twist Bioscience
E-mail: jsalescustomer@twistbioscience.com
Phone: 045-345-5840

© 2024 All Rights Reserved Twist Bioscience Inc.



日本農芸化学大会 2024 年度大会
ランチョンセミナー

生体分子の定性解析をより深く。
質量分析の新技術：電子励起解離

日時　2024 年 3 月 26 日（火）
12：35 ～ 13：25

会場　E1

プログラム番号　LS3-4

演者　株式会社エービー・サイエックス　テクニカルマーケティング　建田 潮

生体分子の構造を知ることは、農芸化学の様々な分野において、これまで見えなかったものを見えるようにするという観点で非常に重要な役割を果たします。質量分析の技術はこれまでも生体分子の定性解析によく使用されてきました。本ランチョンセミナーでは、内因性低分子化合物（メタボローム）、脂質、糖鎖から糖ペプチド、タンパク質まで、電子励起解離で得られる情報によって可能となった、化合物の構造解析についてわかりやすく解説いたします。

SCIEX
The Power of Precision

株式会社エービー・サイエックス
www.sciex.jp　Email : jp_sales@sciex.com

本社：〒140-0001 東京都品川区北品川 4-7-35　御殿山トラストタワー 21F
TEL：0120（318）551　FAX：0120（318）040
大阪：〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎 3-19-3　ピアスタワー 3F

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to www.sciex.com/diagnostics. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures. Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries (see www.sciex.com/trademarks). © 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.　MKT07-1271-A

JABEE ランチョンシンポジウム

「活躍する技術士～JABEE の先を見据えて～」

初期専門能力開発（IPD, Initial Professional Development）システムは、若手技術者が安全で安心な社会の構築に貢献し、社会的・経済的役割を果すための資質・能力を習得する活動とされ、その仕組みづくりが日本技術士会を中心として進んでいます。民間企業でも、自社の能力開発の仕組みとして、若手技術者の成長スピードを上げること、国際的に通用する資質を有する技術者を育成することを目的として、導入する動きが始まりました。

このような「若手技術者」に向けた取り組みを紹介し、JABEE 認定プログラム修了者を含めた若手技術者が技術士資格を目指すきっかけになるようなシンポジウムを開催します。

主　　催：日本農芸化学会 JABEE 対応委員会
日　　時：2024 年 3 月 26 日（火）12:30～13:30
場　　所：東京農業大学世田谷キャンパス　B1 会場（1 号館 2 階 231）
世話人・座長：東田 英毅（JABEE 対応委員会、日本技術士会生物工学部会、株式会社ちとせ研究所）

プログラム：

12:30～12:35　開会の挨拶
　　喜田 聡（日本農芸化学会理事、東京大学大学院農学生命科学研究科）

　　はじめに：JABEE と技術士の深いつながり
　　東田 英毅（JABEE 対応委員会、日本技術士会生物工学部会、株式会社ちとせ研究所）

12:35～13:00　3LS01-01：IPD への取り組み
　　中川 裕康（日本技術士会）

13:00～13:25　3LS01-02：技術士資格でデザインする自分らしい職業
　　本田 大士（技術士事務所本田バイオ技術研究所）

13:25～13:30　閉会の挨拶
　　東田 英毅（JABEE 対応委員会、日本技術士会生物工学部会、株式会社ちとせ研究所）

講演番号：3LS01-01
講演日時、会場：3 月 26 日 12:35～ B1 会場

IPD への取り組み
Approach to IPD

○中川 裕康（日本技術士会）
○Hiroyasu Nakagawa (Institution of Professional Engineers, Japan)

１． 技術士と日本技術士会

技術士制度は「戦後日本の復興」を目指しアメリカのコンサルティングエンジニア制度を参考に、1957 年に創設された。技術士は、先進的な活動から身近な生活に関わっている。

日本技術士会は 1951 年に発足し、現在会員数は 16 千人 19 部会で構成されており、技術士さらには技術者の社会的地位の向上と広く社会への貢献を目的として技術士の CPD（Continuing professional Development:継続研鑽）に関する各種事業や、IPD（Initial Professional Development : 初期専門能力開発）に取り組んでいる。

２． IPD と CPD

我国は資源の乏しい中戦後「技術立国」として成長を遂げ世界の発展に貢献してきたが、近年その状況が危ぶまれる事態となっており,若手技術者の育成が急務となっている。日本技術士会も積極的にこの検討に取り組み、モデルとなるプロトタイプの構築や自律的に修習が行える仕組みづくりの検討を進めている。

１． Professional Engineers and Institution of Professional Engineers, Japan（IPEJ）

The Professional Engineer System was established in 1957 with reference to the Consulting Engineer System in the U.S., aiming at the "reconstruction of postwar Japan. Professional engineers are involved in a wide range of fields, from advanced activities to everyday life.

IPEJ was founded in 1957, and currently has 16,000 members and 19 subcommittees. The Society is involved in various projects related to CPD and IPD for the purpose of improving the social status of professional engineers and contributing to society at large.

２．IPD and CPD

In spite of the scarcity of resources, Japan has grown as a "technology-driven country" since the end of World War II and has contributed to the development of the world. However, in recent years, this situation has come under threat so the training of young engineers has become an urgent task.

IPEJ is also actively involved in this study, and is now considering the construction of a prototype that will serve as a model and the creation of a system that will allow for autonomous training.

Professional Engineers, CPD, IPD

講演番号：3LS01-02
講演日時、会場：3 月 26 日 13:00～ B1 会場

技術士資格でデザインする自分らしい職業

Design your own unique profession with a professional engineer's license.

○本田 大士（本田バイオ技研）
○Hiroshi Honda (Honda Biotech Lab.)

厚労省モデル就業規則は副業・兼業を容認する方向へ舵を切り、ジョブ型雇用の推進やコロナ禍で急進した情報通信技術は技術者の働き方を大きく変えていく。今私達は、どのような職業で、どのようにサイエンスに関わるべきだろう。技術士資格は個人とサイエンスとの反応を助ける触媒のようなものだ。専門家同士の密な交流が加速し、サイエンスジョブを生み出すきっかけが得られる。職業をジョブの集合（ポートフォリオ）と捉えることで、職業のデザインを助けてくれる。離職時にサイエンスとの繋がりを保つための保険としても機能するかもしれない。私自身は技術士資格を取得して、企業研究者の傍ら、独立系研究者、事業者、大学教員、リサーチ・アドミニストレーターなどの複数の肩書を持つポートフォリオ科学者になった。他社に相談できる仲間が沢山増えた。経営者の知り合いが増えた。複数の大学で教鞭をとれた。多くの講演の機会を頂いた。研究所の所長になれた。多くの研究機関と連携できた。収入も増えたが、何より楽しみが増えた。皆さんも技術士になって〝自分らしい職業のデザイン〟を始めてみませんか？

The MHLW Model Employment Regulations are steering toward allowing side and concurrent jobs, and ICT accelerated by Corona-virus disaster and the promotion of job-based employment will drastically change the engineer’s work. What kind of profession and how should we be involved in science now? The professional engineer certification is like a catalyst that helps the reaction between the individual and science. It will accelerate close interactions among professionals and provide an opportunity to create science jobs. It helps us design your profession by viewing the profession as a set of jobs (portfolio). It may also serve as insurance against leaving the profession. After obtaining my professional engineering license, I became a portfolio scientist with multiple titles, including independent researcher, business owner, and university faculty member, in addition to being a research scientist in a company. I have many more collaborators in other companies. I was able to teach at several universities. I became the director of my research institute. My income has increased, but most of all, I have more fun. Why don't you become a professional engineer and start "designing your own profession"?

professional engineer, science careers, design your own profession!

【特別企画】

教育講演

Educational Lecture

農芸化学研究領域のレジェンドの先生方に、各研究分野の基礎的内容から最近の成果、また、若手へのメッセージも含めて、農芸化学研究の入門編としてご講演頂きます。シニアの先生方にとっては専門外の研究を基礎から理解する貴重な機会にもなります。
（早朝からの講演ですので、先着順で朝食を提供致します。数に限りがありますので、配布終了の場合にはご容赦下さい。）
くわしくはホームページ(https://www.jsbba.or.jp/2024/anniversary/educ-lect.html)をご参照ください。

日　時：3 月 25 日(月)～3 月 27 日（水）いずれも時間は 8：30～9：20
場　所：東京農業大学世田谷キャンパス内 B1 会場、C1 会場
参 加 費: 大会参加費と同じ

プログラム：
3 月 25 日（月）8:30～9:20
B1 会場
8:30　2E-01　研究者のキャリアデザイン、どう描くべき？
－自身の食品科学研究から振り返る－
上原万里子（東京農大応生）
C1 会場
8:30　2E-02　常識を鵜呑みにしない大切さ
大利徹（北大院工）

3 月 26 日（火）8:30～9:20
B1 会場
8:30　3E-01　植物色素の化学研究 これまでとこれから
吉田久美（愛工大工、名古屋大）
C1 会場
8:30　3E-02　cAMP と CoQ10 に惹かれて
川向誠（島根大生資）

3 月 27 日（水）8:30～9:20
B1 会場
8:30　4E-01　別府輝彦先生の至言と微生物ケミカルバイオロジー
吉田稔（理研、東大）
C1 会場
8:30　4E-02　細菌も会話し群れている
野村暢彦（筑波大）

講演番号：2E-01
講演日時、会場：3 月 25 日 08:30～ B1 会場

研究者のキャリアデザイン、どう描くべき？－自身の食品科学研究から振り返る－
How should researchers design their careers? ~Looking back on my own food science research~

○上原 万里子（東京農大応生）
○Mariko UEHARA (Tokyo Univ. of Agric.)

研究者のタマゴだった頃の最初の研究テーマは、「鉄欠乏状態が生体機能に及ぼす影響」であった。鉄が欠乏すれば貧血になるのは当たり前だが、当時は微量元素の鉄の不足でビタミンや 3 大栄養素の代謝を変動させるといった知見は広く知られてはいなかった。当時、鉄欠乏状態で起こる定説を覆す実験を行い論文化も出来たが、それでも少数派だったと思う。それが留学中にとった行動で変化したことがある(詳細は講演で)。研究者のキャリアデザインの中で留学することは重要であり、その後の研究者人生に大きく影響する。自身の転機にもなった。私はヘルシンキ大学の「phytoestrogen の父」と呼ばれた Adlercreutz 教授に師事し、主な研究対象も「phytoestrogen」に移った。元々ミネラルの研究をしていたので、帰国後は phytoestrogen の骨粗鬆症予防効果をテーマとした。食品の機能性が注目され始めた時期でもあり、慢性炎症を基盤とするロコモやメタボの phytochemical による予防までテーマを広げ、ミネラルの研究も取り混ぜながら現在に至る。年々大学の管理運営の業務が増え、研究とのバランス問題に直面しているが、一人で頑張らず周囲の支援を求めて来た。今年度から JST 創発的研究支援事業のアドバイザーを拝命していることもあり、若手研究者の皆様の支援に尽力する為、自身の研究史を振り返り、研究者のキャリアデザインのポイントについて、改めて考えてみたい。

Studying abroad is an important part of researcher's career design, and it has a great impact on their subsequent life as researchers. That was a turning point for me as well. I studied under Prof. Adlercreutz, known as the “father of phytoestrogens” at University of Helsinki, and my main research focus also shifted to “phytoestrogens”. Since I was originally involved in mineral research, I focused on preventive effects of phytoestrogens in osteoporosis. When I returned to Japan, the functionality of food was beginning to attract attention, so I expanded my focus to preventive effects of phytochemicals in locomotive and metabolic syndromes, which are based on chronic inflammation, and continued to include research into minerals. As year by year, the administrative duties of own university increased, and I faced the problem of balancing it with own research, but I sought support from researchers around me. Since I have been appointed as a JST's FOREST adviser for young researches from this year, I would like to look back on my own research history and reconsider the key points of how researchers should design their careers.

career design, phytochemicals, iron-deficiency

講演番号：2E-02
講演日時、会場：3 月 25 日 08:30～ C1 会場

常識を鵜呑みにしない大切さ

Importance to doubt common sense.

○大利 徹（北大院工）
○Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

筆者は、微生物を題材に、その時代に利用可能となった技術を取り入れ、①ゲノムデータベースの精査による新規一次代謝経路の発見と生化学実験による詳細な解析、②特異な構造を持つ二次代謝産物の生合成に関与する新規酵素の解析を 40 年近く行ってきた。それらの多くは難しい科学ではなく、身近な何故？という現象にこだわり、地道に解析を行ってきたものがほとんどである。①では、メナキノン新規生合成経路やペプチドグリカンに D-グルタミン酸（Glu）を導入する新規機構を明らかにした。②では、ペプチド系天然物に構造多様性をもたらす生合成酵素や多価不飽和脂肪酸（PUFA）生合成酵素の解析を行い新たな知見を得た。本講演では、これらの解析に至った経緯や得られた成果について紹介したい [1)]。

1)Dairi, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **87**, 797-808 (2023).

For the past forty years, I have been studying biosynthetic enzymes for natural products produced by microorganisms, which include (i) identification of new primary metabolic pathways and enzymes for menaquinone and peptidoglycan biosynthesis, and (ii) discovery of unique biosynthetic enzymes for secondary metabolite, especially for peptide natural products and poly unsaturated fatty acids (PUFA)[1)]. Triggers of these studies were based on simple questions and phenomenon. I will talk about the details of these studies including their backgrounds.

1)Dairi, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **87**, 797-808 (2023).

microorganisms, natural product, biosynthetic enzyme

講演番号：3E-01
講演日時、会場：3 月 26 日 08:30～ B1 会場

植物色素の化学研究　これまでとこれから
Chemical studies of plant pigments: from the past 100 years to future

○吉田 久美[1,2] ([1]愛工大工、[2]名古屋大)
○Kumi Yoshida[1,2] ([1]Aichi Insti of Tech., [2]Nagoya Univ.)

初期の有機化学の歴史は、色素化学の歴史といっても過言ではない。視覚に訴える「色」という現象について、「その色を手に入れたい、仕組みを知りたい」と考えることは当然であろう。中でも植物色素が果たした役割は大きい。アリザリン、インディゴ、シコニンなど、いずれも 19 世紀から 20 世紀にかけて構造研究や合成研究が盛んに行われた。天然物化学研究の領域においても植物色素は、初期には化学研究、現在では分子生物学研究、機能性研究へと展がっている。その中で、フラボノイド系色素であるアントシアニンは、花や、野菜や果実・種子、葉や茎、根の色素として高等植物に広く分布する。アントシアニンは、多彩な発色という特徴で他の植物色素と一線を画す。自然界に存在するアントシアニンの発色団は、主に 6 種類しかなく、しかも B 環上の置換様式のわずかな違いに過ぎない。それにもかかわらず橙色から赤、紫、青色に至るまでの、吸収極大波長にして 500 nm から 700 nm までの光を吸収する。色変化の理由として 20 世紀初頭に、アントシアニンが溶液の pH によって色が変化することから pH 説が提唱されたが、これに対して日本の研究者が金属錯体説で反論した。現在ではいずれの説も正しいことが実証されている。また、19 世紀末に出された最初のアントシアニンの研究報告は、アジサイの色素に関するものであったが、この発色の仕組みは、最近になってようやく明らかにされた。赤アズキの種皮色素も長くアントシアニンと誤認されていたが、別の色素が本年になり明らかになった。本講演では、我々のグループが行ってきたアントシアニン研究を中心に、過去 100 年から現在までの植物色素の化学、そして今後の課題を紹介する。

Anthocyanins, flavonoid pigments, are widely distributed in higher plants as pigments of flowers, vegetables, fruits, seeds, leaves, stems, and roots. Anthocyanins are distinguished from other plant pigments by their versatile coloration. There are only six major naturally occurring anthocyanin chromophores with small differences. Nevertheless, they exhibit from orange to red, violet, and blue. In the early 20th century, the pH theory was proposed for the color change, since anthocyanins change color depending on the pH of the solution. However, Japanese researchers proposed the metal complex theory against this. After 80 years both theories have been proven to be correct. The first report on flower coloration by anthocyanin was　on hydrangea pigments, but the mechanism of this coloration was clarified 21st century. clarified. The seed coat pigment of red azuki has been misidentified as an anthocyanin, but a different pigment was revealed in 2019. In this talk, I will introduce the chemistry of plant pigments from the past century to the present. In addition, I will talk on the future challenges.

anthocyanin, blue flower coloration, plant pigent

講演番号：3E-02
講演日時、会場：3 月 26 日 08:30～ C1 会場

cAMP と CoQ10 に惹かれて

Fascinated by cAMP and CoQ10

○川向 誠（島根大生資）
○MAKOTO KAWAMUKAI (Life & Env. Sci., Shimane Univ.)

私は京都大学の農芸化学科に 1977 年に入学し、農芸化学会には学部 4 年生の時以来 43 年間会員として、留学時期を除いて欠かさず出席してまいりましたので、最も愛着のある学会が農芸化学会です。英文誌に 40 編の論文を掲載し、シンポジウムを 12 回企画し、中四国支部長も経験させていただきました。昨年度功績賞をいただくことができたことは光栄でした。農芸化学という言葉が大学の組織で使われなくなっている現状は寂しいことですが、実学と基礎科学の間で生物学と化学の融合領域を標榜する重要な学問分野です。博士号を取得した頃は、大腸菌の cAMP と細胞分裂の制御の研究を進め *fic* 遺伝子の発見につながりました。1989 年に米国の CSHL 研究所に留学して以降は分裂酵母を中心に研究を展開し、cAMP に関する興味を継続して持ち続け、分裂酵母の有性生殖の制御メカニズムをテーマとして継続して研究を進めました。同時に、産業上有用な物質として CoQ10 という化合物に着目して CoQ10 の生合成と生産を含め、実学と基礎科学を両睨みにしながら研究活動を進めてきました。島根大学で 38 年間勤務し、本年度で定年退職するところで、かならずしも恵まれている環境ではない地方大学でどのような視点で研究を進めてきたかをお話しすることができれば幸いです。

I enrolled in the Department of Agricultural Chemistry at Kyoto University in 1977, and have been a member of JSBBA for 43 years since my fourth year as an undergraduate, attended all annual meetings except when I was studying abroad. I published 40 papers in the English journal, organized 12 symposiums, and served as the Chugoku-Shikoku branch chief for JSBBA. It was an honor to receive the Award for Senior Scientists last year. Although it is pity that the term "Agricultural Chemistry" is not so much used in universities, I can confidently say that it is an important academic field between practical science and basic science. When I received my Ph.D., I focused on cAMP and the regulation of cell division in *Escherichia coli*, leading to the identification of the *fic* gene. Since I studied abroad at CSHL in US in 1989, I have focused on fission yeast. My interest in cAMP continues in fission yeast, and I have been conducting research on the control mechanism of sexual differentiation. At the same time, I have been interested in CoQ10 as an industrially useful substance and utilized biotechnology. I have been conducting research activities with both practical science and basic science in mind. Based on my 38 years of working at Shimane University in the last year of my official professor position, I would be happy if I could talk about how I have pursued my research at a local university, which is not always in a favorable environment.

cAMP, CoQ10, Fission yeast

講演番号：4E-01
講演日時、会場：3 月 27 日 08:30～ B1 会場

別府輝彦先生の至言と微生物ケミカルバイオロジー

Prof. Teruhiko Beppu's words of wisdom and microbial chemical biology

○吉田 稔[1,2] ([1]理研、[2]東大)
○Minoru Yoshida[1,2] ([1]RIKEN, [2]The Univ. of Tokyo)

応用微生物学の新時代を切り開き、わが国のバイオテクノロジーをリードされた別府輝彦先生（東京大学名誉教授・文化勲章受章者）が昨年 11 月に 89 歳で他界された。先生は微生物学の多くの分野で当時としては前例のない画期的な概念を打ち出すとともに、現代の微生物学の方向性を予見していた。その過程では、具体的な研究のアドバイスだけでなく、分かりやすく力強い言葉の力によって後進の指導を行った。抗生物質をはじめとする微生物二次代謝産物の研究分野もそのひとつであり、新規物質発見が下火になっていた時代に、画期的な作用機序研究を推進することによって再び微生物代謝産物の価値を高めたと言える。そしてその門下生らによってわが国独特のケミカルバイオロジーが確立されたと言っても過言ではない。本講演では、微生物ケミカルバイオロジーの誕生と発展を例に取り、別府先生の先見性、卓越性についてお伝えしたい。

The late Dr. Teruhiko Beppu (Professor Emeritus of the University of Tokyo and recipient of the Order of Culture), who pioneered a new era of applied microbiology and led biotechnology in Japan, passed away last November at the age of 89. Dr. Beppu was a pioneer in many areas of microbiology, launching groundbreaking concepts that were unprecedented at the time and foreseeing the direction of modern microbiology. In this process, he provided not only concrete research advice, but also guidance to younger researchers through the power of his clear and powerful words. One such example is the field of research on secondary metabolites of microorganisms, such as antibiotics. At a time when the discovery of new substances was declining, his promotion of groundbreaking research on mechanisms of action has once again raised the value of microbial metabolites. It is no exaggeration to say that the chemical biology unique to Japan was established by a number of his students. In this lecture, I would like to talk about the birth and development of microbial chemical biology as an example of Dr. Beppu's foresight and excellence.

Applied microbiology, Chemical biology, Mode of action

講演番号：4E-02
講演日時、会場：3 月 27 日 08:30～ C1 会場

細菌も会話し群れている

Bacteria also gather and converse with each other.

○野村 暢彦 (筑波大学)
○Nobuhiko Nomura (Univ. of Tsukuba)

微生物の中でも細菌は、植物に次ぐバイオマスをしめている。そして、細菌は食・環境・健康に深く関わっている。細菌はほとんどバイオフィルムを形成し集団で会話しながら暮らしている。その会話も、集団用の Quorum-sensing と、メンブレンベシクル(MV)を介した離れた細胞また細胞特異的な機構を有していることが明らかになってきた(1)。我々が想像するより、細菌は高度かつ広範囲でコミュニケーションしていることが明らかになってきている(2)。また、集団であるバイオフィルムにおいては、不均一な遺伝子発現また自然突然変異の誘発など、同調していない均一でない現象が注目されている(3,4)。これら最新の知見を含めながら、細菌についての知についてレビューしたい。

1) Toyofuku M., Nomura N., Eberl, L. (2019) **Nature Reviews Microbiology** 17.
2) Prasad M., *et al.* (2023) **Science** 381.
https://www.youtube.com/watch?v=UwPVeiMYi-M
3) Obana N., *et al.* (2017) **Infection and Immunity** 85.
4) Obana N., *et al.* (2020) **NPJ Biofilms and Microbiomes** 6.

Among microorganisms, bacteria have the second largest biomass after plants. Bacteria are deeply involved in food, the environment, and health. Bacteria form almost all biofilms, conversing with each other. It has become clear that they have quorum-sensing and membrane vesicle (MV)-mediated cell-cell and cell-specific mechanisms (1). It is becoming clear that bacteria communicate more sophisticatedly and extensively than we might imagine (2). In addition, the heterogeneity of gene expression and spontaneous mutagenesis in biofilms, which are populations of bacteria, are attracting attention as out-of-sync phenomena (3,4). I would like to review what we know about bacteria, including the latest findings.

Bacteria, Biofilm, Cell-cell communication, Quorum-sensing, Membrane vesicle

【特別企画シンポジウム】

これまでの農芸化学研究の 100 年を振り返って

Looking back on the research of agricultural chemistry 100 years

日本農芸化学会創立 100 周年を記念して、農芸化学のレジェンドである先生方に農芸化学研究の各分野の研究進展をご講演頂きます。「農芸化学」研究の歴史を短時間で振り返る貴重な機会となります。

くわしくはホームページ(https://www.jsbba.or.jp/2024/anniversary/past100years.html)をご参照ください。

日　時 ： 3 月 24 日（日）14：15～17：05
場　所 ： 東京農業大学世田谷キャンパス百周年記念講堂
　　東京都世田谷区桜丘 1-1-1 TEL: 03-5477-2207
参 加 費： 大会参加費と同じ

プログラム：

14:15　1SA-01　生物活性物質探究の 100 年：歴史と展望 -農芸化学は宝の山だ
　　北原 武（東京大学名誉教授）
　　須貝 威（慶應義塾大学薬学部教授）

14:48　1SA-02　日本の農芸化学における抗生物質研究からケミカルバイオロジーへの展開
　　長田裕之（静岡県立大学薬学部 特任教授
　　兼 理化学研究所環境資源科学研究センター ユニットリーダー）

15:21　1SA-03　農芸化学における醸造微生物、特に麹菌を含む糸状菌の研究の 100 年を振）り返る
　　五味勝也（東北大学大学院農学研究科発酵微生物学寄附講座 教授

15:54　1SA-04　栄養・食品科学研究領域のこれまでの歩み
　　佐藤隆一郎（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻
　　社会連携講座「栄養・生命科学」特任教授）

16:27　1SA-05　健康維持のための機能性食品の開発研究
　　山本万里（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門
　　エグゼクティブリサーチャー）

講演番号：1SA-01
講演日時、会場：3 月 24 日 14:15～ 100 周年記念講堂

生物活性物質探究の 100 年：歴史と展望 -農芸化学は宝の山だ-

The Centennial for Pursuit of Bioactive Substances: History and Prospect

○北原 武（東京大学）
○Takeshi Kitahara (The Univ. of Tokyo)

顕著な生物活性を有する天然有機化合物の単離・構造決定・合成・機能解析等に関連した研究成果および実用化は、多分野を包含し基礎から応用まで広汎に探求する農芸化学の歴史における「世界に冠たる業績」の一つである。

その端緒は、鈴木梅太郎による米糠中の抗脚気成分、オリザニン（ビタミン B_1）研究（1910 年発表）であり、その後鈴木学派により、ビタミン A や B_6 の発見等、ビタミン研究における世界的な業績が次々と報告されて発展した。この源流は、やがてピレスロイド、ロテノン等の天然殺虫剤研究や植物ホルモン、ジベレリン研究等に受け継がれて奔流となり、農学系生命科学・有機化学の中核として大きく展開されて来たのである。

本分野の歴史を概説し、現時点における将来への展望についても述べたい。

Studies on remarkably bioactive natural products, namely, isolation, structure determination, synthesis, functional analysis *etc.*, have been extensively carried out in our agro-chemical society over the years. As a result, we are proud worldwide that not only fundamental research-output but also a lot of practical applications have been realized in this field.

In 1910, Umetaro Suzuki discovered an anti-beriberi component, Orizanin (Vitamin B_1) from rice blan and the important research area of vitamin sciences developed worldwide. Since then, studies on natural insecticides, such as pyrethroids, rotenoids *etc.*, a plant hormone, gibberelins and so on have been developed intensively.

Overview of history and future prospect in this field will be discussed.

Centennial for pursuit, Bioactive substances, History and prospect

講演番号：1SA-02
講演日時、会場：3 月 24 日 14:48～ 100 周年記念講堂

日本の農芸化学における抗生物質研究からケミカルバイオロジーへの展開

Chemical biology originated from antibiotic research in agricultural chemistry, Japan

○長田 裕之 [1,2] ([1] 理研 環境環境資源セ、[2] 静岡県大薬)
○Hiroyuki Osada[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]U. Shizuoka)

農芸化学における微生物代謝産物の研究は、日本農芸化学会誌創刊号（1924 年 10 月）に、藪田貞次郎によるコウジ酸の研究が掲載されて以来、現在に至るまで綿々と続いている。第二次世界大戦中に設立された碧素委員会に、東大農学部の教授らが参加し、我が国独自のペニシリン開発に携わった。戦後、世界中の製薬企業が抗生物質探索を行ったが、米原弘らのブラストサイジン S、鈴木三郎らのポリオキシンの開発は、医薬ではなく農業用抗生物質という点で本学会ひいては我が国の特徴が出ている成果である。抗生物質の黄金期が過ぎた後も、微生物代謝産物のスクリーニングにより、三共（現・第一三共）が高脂血症治療薬プラバスタチン、藤沢薬品（現・アステラス製薬）が免疫抑制剤タクロリムスの開発に成功した。また、微生物から、糖タンパク質合成阻害剤ツニカマイシン、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン、チロシンキナーゼ阻害剤アーブスタチン、イソロイシン tRNA 合成阻害剤リベロマイシンなど、有用な酵素阻害剤も多数見出されており、これらの研究は、化学を起点として生命現象の解明に至るケミカルバイオロジー研究に繋がっている。本講演では、本学会員が関わった研究を中心に、抗生物質の研究からケミカルバイオロジー研究への展開について概説する。

Research by T. Yabuta on kojic acid was published in the first issue of the Journal of the Japanese Society of Agricultural Chemistry (1924). The research on microbial metabolites in the field of agricultural chemistry has continued steadily until now. After the Second World War, pharmaceutical companies around the world searched for new antibiotics. In Japan, the development of blasticidin S by H. Yonehara et al. and polyoxin by S. Suzuki et al. are achievements that the Society is proud of in terms of agricultural antibiotics rather than medicines. Even after the golden age of antibiotic research, Sankyo (currently Daiichi Sankyo) developed the hyperlipidemia drug, pravastatin, and Fujisawa Pharmaceutical (currently Astellas Pharma) developed the immunosuppressant, tacrolimus, through the screening of microbial metabolites. In addition, many useful enzyme inhibitors (tunicamycin, trichostatin, erbstatin, reveromycin, etc.) have been discovered from microorganisms, and these studies have led to chemical biology research that elucidates biological phenomena from the view of chemistry. I will mainly outline the development of antibiotic research to chemical biology research in which the Society members have been involved in.

microbial chemistry, antibiotics, chemical biology

講演番号：1SA-03
講演日時、会場：3 月 24 日 15:21～ 100 周年記念講堂

農芸化学における醸造微生物、特に麹菌を含む糸状菌の研究の 100 年を振り返る

Looking back on 100 years of research on brewing-related microorganisms, especially filamentous fungi including *Aspergillus oryzae*, in agricultural chemistry

○五味 勝也（東北大院農）
○KATSUYA GOMI (Tohoku Univ.)

今回の日本農芸化学会創立 100 周年にあたって微生物関連研究の 100 年間を振り返るとの講演依頼を受けましたが、微生物に関しては膨大な研究成果が輩出されていますので、それらをすべてカバーすることは到底不可能なことはご理解いただけると思います。したがって、本講演ではわが国の微生物学の端緒を開き、現在のバイオテクノロジーの源流となったと言ってもよいであろう、醸造関連微生物ー特に麹菌をはじめとする糸状菌の研究を振り返ることで今回の責任を果たしたいと思います。しかし、糸状菌の研究に絞ったとしても数多の研究がなされてきていますので、ここでは以下の 3 つのトピックについて、遺伝子組換え技術の誕生前（伝統的バイオテクノロジー時代）から誕生後（モダンバイオテクノロジー時代）にわたる研究の進展を紹介できればと思います。

（1）コウジカビにおける多糖類分解酵素の生産とその誘導機構
（2）コウジカビの細胞壁構造とそれに関わる酵素遺伝子の機能
（3）コウジカビなどの糸状菌の有機酸発酵と有機酸排出機構

On the occasion of the 100th anniversary of the founding of the Japanese Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, I was asked to give a lecture looking back on 100 years of microbial-related research. However, as you all understand, since a huge amount of research results have been produced regarding microorganisms, it would be impossible to cover them all. Therefore, in my lecture, I would like to fulfill my responsibility by looking back at the research on brewing-related microorganisms, especially filamentous fungi such as *Aspergillus oryzae*, which opened the beginnings of microbiology in Japan and became the origin of current biotechnology. Even if focusing on filamentous fungi, a large number of studies have also been conducted, so here I will introduce the research on the following three topics, ranging from before the birth of gene recombination technology (traditional biotechnology era) to after the birth (modern biotechnology era).

(1) Production of polysaccharide-degrading enzymes in *Aspergillus* and their induction mechanism.
(2) *Aspergillus* cell wall structure and the functions of their biosynthesis enzyme genes.
(3) Organic acid fermentation and organic acid excretion mechanism of filamentous fungi.

Aspergillus, polysaccharide-degrading enzymes, cell wall

講演番号：1SA-04
講演日時、会場：3 月 24 日 15:54～ 100 周年記念講堂

栄養・食品科学研究領域のこれまでの歩み
History of the Nutrition and Food Science Research Area

○佐藤 隆一郎（東大院農）
○Ryuichiro Sato (The Univ. of Tokyo)

日本の栄養・食品科学研究は 1900 年代初頭、鈴木梅太郎博士によるビタミン B1 の発見、池田菊苗博士の旨味成分グルタミン酸ナトリウムの発見により、世界を大きくリードしていた。そののち、産官学組織に所属する日本農芸化学会会員により、栄養・食品科学領域は学会の主要な領域として発展を遂げた。100 年間の歴史の中で特筆すべきことは、食品の三次機能が提唱されたことと言える。文部省（現:文部科学省）の特定研究「食品機能の系統的解析と展開」が実施され(1984～86 年)、食品には生体調節機能があり、機能性食品という概念、名称が提示された。その後特定保健用食品制度が開始され、多くの社会実装がなされ、それに続いて機能性表示食品制度が始まり、今日に至っている。このような流れに伴い、研究領域全般に生体内での生理現象を分子・遺伝子レベルで解析し、健康維持に結びつく栄養・食品機能を追跡する研究が主流となるという、学術領域の劇的なパラダイムシフトが起こった。

In the early 1900s, with the discovery of vitamin B_1 by Dr. Umetaro Suzuki and the discovery of monosodium glutamate, an umami ingredient, by Dr. Kikunae Ikeda, Japan greatly led the world in nutritional and food science research. Since then, the field of nutrition and food science has developed as one of the main fields of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry through the efforts of members from industry, government, and academia. What is noteworthy in the 100-year history of this field is that the tertiary function of food was proposed. Along with this trend, researches that analyze *in vivo* physiological phenomena at the molecular and genetic level and trace nutritional and food functions linked to health maintenance have become mainstream, leading to a dramatic paradigm shift in this academic field.

Nutritional science, Food science, Functional food

講演番号：1SA-05
講演日時、会場：3 月 24 日 16:27～ 100 周年記念講堂

健康維持のための機能性食品の開発研究

Research and development of functional foods for health maintenance

○山本 万里（農研機構食品研）
○Mari Maeda-Yamamoto (Inst. of Food Res., NARO)

日本は世界に先駆けて機能性食品の研究、開発を行ってきた。高齢化社会を迎えるに当たり、糖尿病、心臓疾患、高血圧、高脂血症、高コレステロール血症、骨粗鬆症、がん、アレルギー、感染症などの生活習慣病を毎日摂取する食品により予防したいという考えから、1984 年から文部省の特定研究「食品機能の系統的解析と展開」が開始された。それから、食品中機能性成分の探索・同定、安全性の確認、作用メカニズムの解明、臨床試験による作用の検証が行われてきた。それらの成果を活用して、様々な機能性食品が開発されたが、保健機能食品制度（特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品）の施行により、表示される生体調節作用は多様化した。機能性食品・機能性食品素材の開発には農芸化学分野の研究成果が多く利用されており、農芸化学技術賞を受賞した研究にも多くの関連研究が含まれている。そのような研究も含め製品化に結びつく機能性成分（食物繊維、ポリフェノール、アミノ酸。リグナン、ラクトフェリン、クマリン、チオ糖類、イソα酸、抗酸化物質等）や機能性成分を活用した機能性食品の開発研究を紹介する。

Japan has led the world in research and development of functional foods. In 1984, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) launched the "Systematic Analysis and Development of Food Functions," a specific research project to prevent lifestyle-related diseases such as diabetes, heart disease, hypertension, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, osteoporosis, cancer, allergies, and infectious diseases through daily food intake. Since this project, functional ingredients in foods have been explored and identified, their safety confirmed, mechanisms of action clarified, and their effects verified through clinical trials. Various functional foods have been developed based on the results of these studies, and with the enforcement of the Foods with Health Claims System (Foods for Specified Health Uses, Foods with Nutrient Function Claims, and Foods with Functional Claims), the labeled physiological function effects have become more diverse. A lot of research results in the field of agricultural chemistry have been used in the development of functional foods and functional food materials, and many related studies have been included in the research that received the JSBBA Award for Achievement in Technological Research. Research on the development of functional foods that has been conducted to date, including such research, will be presented.

functional food, foods with health claims system, functional ingredients

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製(コピー)及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2024 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会 2024 年 度 大 会 講 演 要 旨 集 (オンライン)
Program & Proceedings (online) of the Annual Meeting 2024 Tokyo of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2024 年 3 月 5 日公開　Published online 5 March 2024　ISSN 2186-7976

発行者　公益社団法人日本農芸化学会　JSBBA　https://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　DYNACOM　https://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　KOMIYAMA PRINTING　https://www.kopas.co.jp/