

公益社団法人日本農芸化学会 助成金受領者報告書 (2021)



—— 公益社団法人日本農芸化学会 ——

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

公益社団法人 日本農芸化学会

助成金受領者報告書

目 次

1. 助成金交付実績一覧	1
2. 第15回農芸化学研究企画賞報告書	5
3. 第16回農芸化学研究企画賞報告書	13
4. 第1回中小企業産学・産官連携研究助成報告書.....	27
5. 第46回研究奨励金報告書	53
6. 第47回研究奨励金報告書	65
7. 第71回国際会議出席費補助金報告書	77
8. 第72回国際会議出席費補助金報告書	87
9. 第73回国際会議出席費補助金報告書	93
10. 第74回国際会議出席費補助金報告書	97
11. 2018年度農芸化学女性研究者賞報告書	101
12. 2018年度農芸化学若手女性研究者賞報告書	109
13. 2019年度農芸化学女性研究者賞報告書	115
14. 2019年度農芸化学若手女性研究者賞報告書	121

1. 助成金交付実績一覧

農芸化学研究企画賞，中小企業産学・産官連携研究助成の交付実績

年 度	農芸化学研究企画賞		中小企業産学・産官連携研究助成		計
平成15 年	2 件	400 万円			400 万円
16 年	3 件	600 万円			600 万円
17 年	4 件	800 万円			800 万円
18 年	3 件	600 万円			600 万円
19 年	2 件	400 万円			400 万円
20 年	3 件	600 万円			600 万円
21 年	3 件	600 万円			600 万円
22 年	3 件	600 万円			600 万円
23 年	3 件	600 万円			600 万円
24 年	3 件	600 万円			600 万円
25 年	3 件	600 万円			600 万円
26 年	2 件	400 万円			400 万円
27 年	3 件	600 万円			600 万円
28 年	3 件	600 万円			600 万円
29 年	2 件	400 万円			400 万円
30 年	3 件	600 万円	7 件	700 万円	1300 万円
令和元年	2 件	400 万円	7 件	700 万円	1100 万円
2 年	3 件	600 万円	7 件	690 万円	1290 万円

研究奨励金，国際会議出席費補助金の交付実績

年 度	研究奨励金		国際会議出席費補助金		計
昭和48 年	4 件	180 万円	6 件	120 万円	300 万円
49 年	8 件	400 万円	9 件	270 万円	670 万円
50 年	11 件	550 万円	9 件	270 万円	820 万円
51 年	10 件	500 万円	10 件	300 万円	800 万円
52 年	10 件	500 万円	10 件	300 万円	800 万円
53 年	10 件	500 万円	11 件	300 万円	800 万円
54 年	10 件	500 万円	10 件	300 万円	800 万円
55 年	10 件	500 万円	10 件	300 万円	800 万円
56 年	10 件	448 万円	10 件	270 万円	718 万円
57 年	10 件	450 万円	10 件	270 万円	720 万円
58 年	10 件	450 万円	10 件	270 万円	720 万円
59 年	10 件	500 万円	10 件	300 万円	800 万円
60 年	15 件	750 万円	14 件	389.4 万円	1,139.4 万円
61 年	17 件	845 万円	16 件	450 万円	1,295 万円
62 年	17 件	850 万円	16 件	450 万円	1,300 万円
63 年	17 件	846.4 万円	16 件	450 万円	1,296.4 万円
平成元年	18 件	894.7 万円	15 件	449.7 万円	1,344.4 万円

年 度	研究奨励金		国際会議出席費補助金		計
2年	20 件	1,000 万円	18 件	521 万円	1,521 万円
3年	22 件	1,099 万円	18 件	532.6 万円	1,631.6 万円
4年	22 件	1,098 万円	18 件	532 万円	1,630 万円
5年	18 件	900 万円	12 件	315 万円	1,215 万円
6年	10 件	500 万円	10 件	200 万円	700 万円
7年	9件	449.8 万円	12 件	180 万円	629.8 万円
8年	5件	250 万円	6件	89.7 万円	339.7 万円
9年	5件	250 万円	6件	90 万円	340 万円
10 年	5件	250 万円	4件	57 万円	307 万円
11 年	5件	250 万円	8件	120 万円	370 万円
12 年	5件	250 万円	6件	90 万円	340 万円
13 年	5件	250 万円	6件	90 万円	340 万円
14 年	5件	250 万円	6件	89 万円	339 万円
15 年	5件	250 万円	5件	75 万円	325 万円
16 年	5件	249 万円	6件	90 万円	339 万円
17 年	5件	250 万円	5件	75 万円	325 万円
18 年	5件	250 万円	6件	85 万円	335 万円
19 年	5件	250 万円	6件	90 万円	340 万円
20 年	5件	250 万円	6件	90 万円	340 万円
21 年	5件	250 万円	6件	90 万円	340 万円
22 年	5件	250 万円	4件	60 万円	310 万円
23 年	5件	250 万円	4件	55 万円	305 万円
24 年	5件	250 万円	4件	60 万円	310 万円
25 年	5件	250 万円	3件	55 万円	305 万円
26 年	5件	250 万円	5件	90 万円	340 万円
27 年	5件	250 万円	10 件	160 万円	410 万円
28 年	5件	250 万円	5件	100 万円	350 万円
29 年	5件	250 万円	4件	60 万円	310 万円
30 年	5件	250 万円	6件	104 万円	354 万円
令和元年	5件	250 万円	3件	60 万円	310 万円
2年	5件	219.7 万円	1件	2,220 円	2,199,220 円

農芸化学女性研究者賞，農芸化学若手女性研究者賞助成金の交付実績

年 度	農芸化学女性研究者賞		農芸化学若手女性研究者賞		計
2018年	3件	300 万円	3件	150 万円	450 万円
2019年	3件	300 万円	3件	150 万円	450 万円
2020年	3件	300 万円	3件	150 万円	450 万円

2. 第15回農芸化学研究企画賞報告書

第15回農芸化学研究企画賞報告書

重点研究領域：先導的生物活性物質研究と新技術開発

受賞テーマ：筋分化を誘導する乳酸菌オリゴDNAの生体内作用の実証

信州大学農学部
高谷智英

研究の背景

人体最大の組織である骨格筋の萎縮は、加齢性筋量減少症（サルコペニア）や老年性虚弱（フレイル）の主徴であり、運動器症候群（ロコモティブシンドローム）の原因疾患の一つである。また、心不全や慢性腎疾患の患者が合併する筋萎縮は、生命予後の危険因子でもある。特に、がん患者の約80%が合併するがん悪液質（カヘキシー）では、顕著な筋力・筋量の消耗が進行し、がん死因の約20%を占める。さらに近年、肥満患者における筋萎縮（サルコペニア肥満）と代謝異常の関係が注目されるなど、加齢のみならず、様々な疾患と筋萎縮の連関が明らかになりつつある。したがって、超高齢社会において、日常生活動作（ADL: activities of daily living）や生活の質（QOL: quality of life）を維持し、健康寿命を延伸するには、筋萎縮の予防・治療法の確立が不可欠である。

筋萎縮は、筋線維の数やサイズの減少、タンパク質分解系の調節不全、サテライト細胞（骨格筋幹細胞）の機能障害などからなる複合的な病態である。筋再生の過程において、筋線維上のサテライト細胞は筋芽細胞へと活性化する。筋芽細胞は筋細胞へと分化した後、互いに融合して多核の筋管を形成し、筋線維を再生する。このように、筋組織の恒常性維持において筋芽細胞は中心的な役割を担っている。しかし、筋芽細胞の分化能は加齢や疾患によって減弱することが報告されており、これが筋萎縮の遠因の一つと考えられている。

オリゴ核酸は化学合成や修飾が容易な安定分子であり、医薬品としての応用も進んでいる。相補的な配列に結合して遺伝子発現を調節するアンチセンス核酸や、標的分子に特異的に結合して機能を阻害するアプタマーがよく知られる。一方、腸内細菌などのゲノムに由来する核酸は、病原

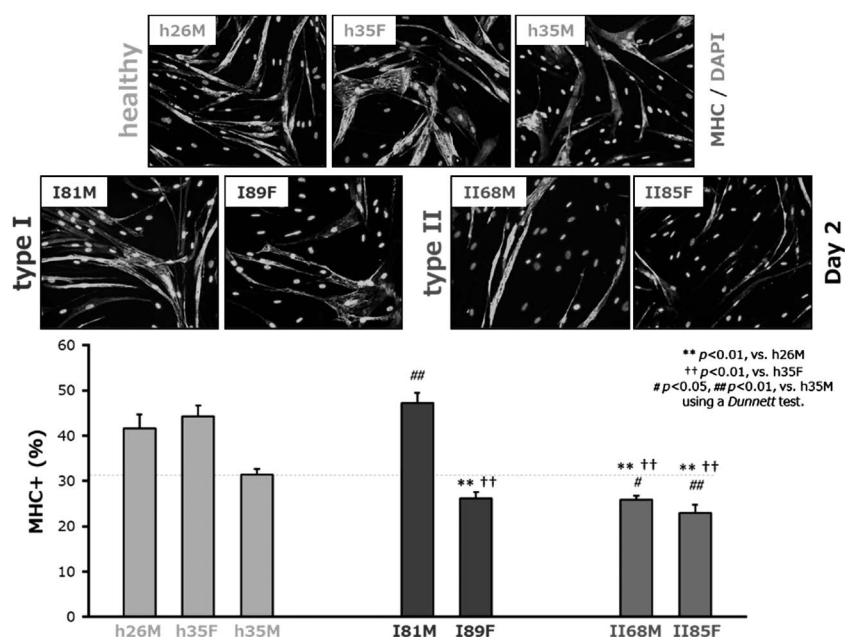


図1. 糖尿病患者筋芽細胞の分化能。

健常者（healty: h26M, h35F, h35M）、I型糖尿病患者（type I: I81M, I89F）、およびII型糖尿病患者（type II: II68M, II85F）の筋芽細胞を分化誘導し、免疫染色によってMHC陽性細胞率を定量した。

体関連分子 (PAMPs: pathogen-associated molecular pattern) として Toll 様受容体 (TLR: Toll-like receptor) を介して自然免疫系を活性化する。これら生物由来のオリゴ DNA は免疫賦活剤として用いられるが、一部の免疫型オリゴ DNA は、骨系幹細胞の分化に影響するという興味深い先行研究がある。報告者は、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来する 18塩基のオリゴ DNA をスクリーニングした結果、筋芽細胞の分化を著明に促進する一連の新奇配列を見出し、「筋形成型オリゴ DNA」(myoDN: myogenetic oligodeoxynucleotide) と命名した。

研究の課題

myoDN は、筋芽細胞に直接作用する生物活性物質として、筋萎縮治療薬などへの応用が期待される。その基盤技術を確立するべく、本研究では、ヒト筋芽細胞を用いた病態筋萎縮モデルを確立し、myoDN の筋分化促進作用を検討した。また、安全性の確保に不可欠な myoDN の作用機序の理解を深めるべく、その分子メカニズムを詳細に解析した。

研究の結果

本研究では、myoDN の中でも最も筋分化促進活性の高い iSN04 (5'-AGA TTA GGG TGA GGG TGA-3') を用いた。

糖尿病患者筋芽細胞における myoDN の効果

健常者3名、I型糖尿病患者2名、およびII型糖尿病患者2名から採取された、計8名分の筋芽細胞 (Lonza) を用いた。コラーゲンコートした培養皿にこれらの筋芽細胞を播種し、分化培地で分化誘導した後、筋細胞の最終分化マーカーであるミオシン重鎖 (MHC) で免疫染色して筋分化を評価した。分化能に個人差はあるものの、I型糖尿病患者1名、II型糖尿病患者2名の筋芽細胞で有意な筋分化の減弱を認めた (図1)。このことから、糖尿病患者では筋芽細胞の分化能が低下する傾向にあることがわかった。

次に、糖尿病患者の筋芽細胞に 10-30 μM の iSN04 を投与し、MHC 陽性筋細胞への分化が改善するかを検証した。その結果、II型糖尿病患者1名を除き、全ての糖尿病患者筋芽細胞の筋分化率が iSN04 投与によって有意に改善された (図2)。これらの結果から、myoDN は、糖尿病患者で悪化する筋芽細胞の分化を促進し、サルコペニア肥満などの代謝疾患に関連する筋萎縮症の予防・治療に有用である可能性が示された。

がん悪液質モデルにおける myoDN の効果

先行研究において、前立腺がん細胞の培養上清 (CM: conditioned medium) でマウス筋芽細胞株 C2C12 を培養すると、MHC 陽性筋細胞への分化が悪化することが報告されており、がん細胞の分泌物による筋分化の阻害が、がん悪液質における筋量減少の原因の一つではないかと考えられ

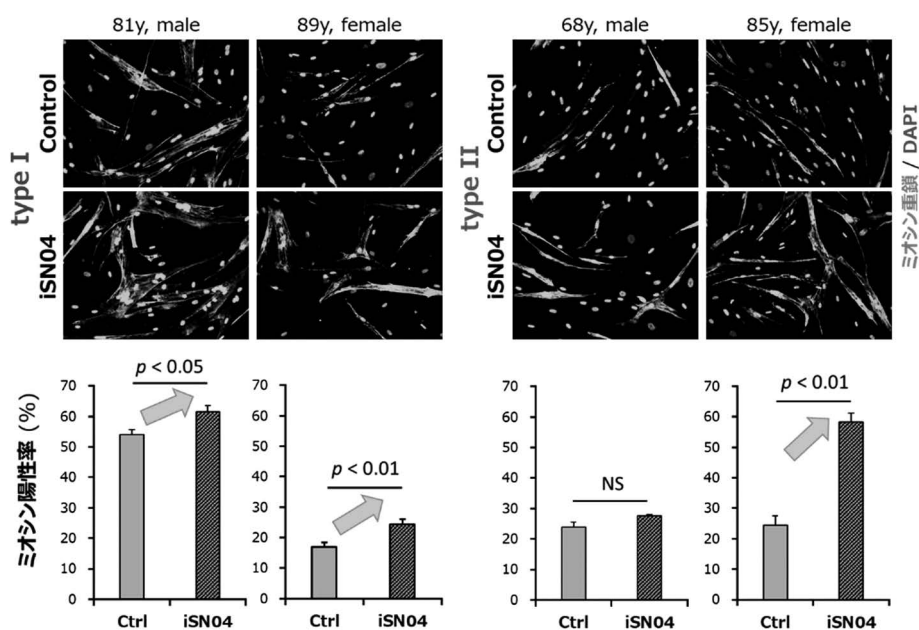


図2. iSN04 による糖尿病患者筋芽細胞の分化能の改善。

図1のI型糖尿病患者2名、およびII型糖尿病患者2名の筋芽細胞に、10-30 μM の iSN04 を投与して分化誘導し、免疫染色によって MHC 陽性細胞率を定量した。

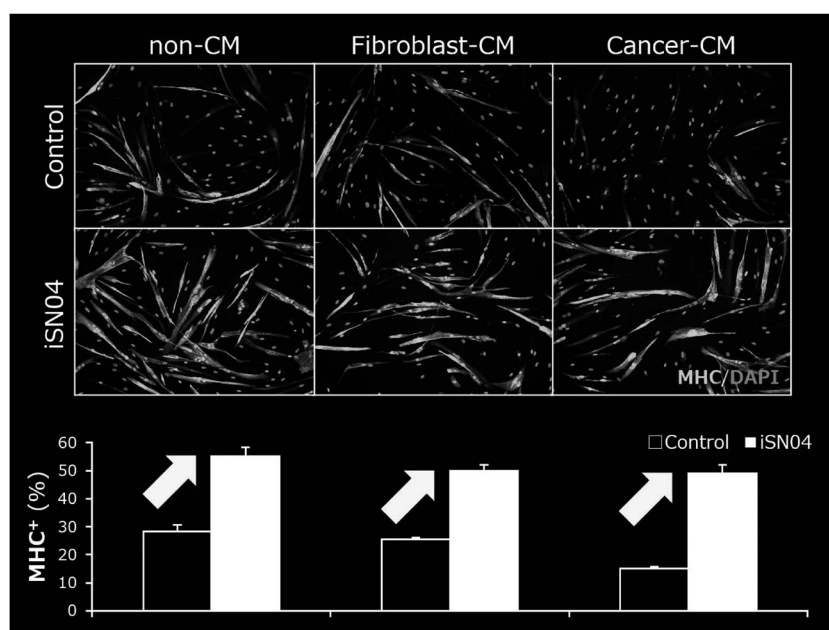


図3. がん悪液質モデルにおける筋芽細胞の分化能.

非CM (non-CM), 30%大腸線維芽細胞CM (Fibroblast-CM), 30%大腸がんCM (Cancer-CM) で培養した健常者筋芽細胞に, 30 μ M の iSN04 を投与して 48 時間分化誘導し, 免疫染色によって MHC 陽性細胞率を定量した.

ている (Marchildon *et al.*, *PLoS One*, 2015; 10: e0145583).

本研究では, 大腸がん細胞の CM, および正常大腸線維芽細胞の CM を用いて実験を行った. 線維芽細胞 CM は健常者筋芽細胞の分化に影響しなかったが, 大腸がん CM 群では有意に MHC 陽性細胞率が低下した. 30 μ M の iSN04 を投与して 48 時間分化誘導すると, いずれの群においても MHC 陽性率が著明に向上し, 大腸がん CM 群においても対照群と同程度まで筋分化率が改善された (図 3). 以上の結果から, myoDN は, 大腸がんの分泌物によって悪化する筋芽細胞の分化を回復し, がん悪液質に伴う筋量の減少を緩和することで, がんの生命予後の改善に有用である可能性が示された.

myoDN の作用機序の解明

iSN04 は, 立体構造依存的に筋分化促進活性を発揮すること, 培養液中に投与するだけで細胞内に取り込まれることなどから, 筋芽細胞内において標的となるタンパク質と結合し, その機能を阻害ないし変化させていると考えられた. そこで, iSN04 を固定した磁気ビーズで可溶性細胞溶解液を沈降し, SDS-PAGE および CBB 染色によって iSN04 結合タンパク質を分離した. 質量分析により, 77 kDa 付近に検出された iSN04 結合タンパク質がヌクレオリンであることを同定した.

ヌクレオリンは, 細胞膜, 細胞質, および細胞核で機能する多機能タンパク質だが, 筋芽細胞や筋分化における役割はわかっていない. 免疫染色の結果, ヌクレオリンは未

分化な筋芽細胞の核 (特に核小体) に局在しており, 筋分化に伴って徐々に細胞質へと拡散していくことがわかった.

がん細胞などの活発に増殖する細胞では, ヌクレオリンが細胞膜上に存在することが知られている. このことから, 抗腫瘍作用を示すヌクレオリンアプタマーとして, AS1411 というオリゴ DNA が開発されている. AS1411 を筋芽細胞に投与すると, iSN04 と同様に筋分化を促進したことから, iSN04 はヌクレオリンと物理的に結合することによってその機能を阻害していることが強く示唆された. 細胞核内のヌクレオリンは, RNA 結合タンパク質として標的 mRNA に結合してその翻訳を阻害することが報告されている. 報告者は現在, iSN04 が, ヌクレオリンの標的 mRNA の翻訳阻害を解除することで, 標的 mRNA がコードするタンパク質が増加するのではないかと考え, 実験を進めている. この仮説は RNA シーケンスによるシグナル伝達経路の解析でも裏付けされており, iSN04 の作用機序を理解する上で重要な知見がもたらされると期待している.

今後の実用化への展望

本研究の成果により, iSN04 をはじめとする myoDN が, 糖尿病などの代謝性疾患で見られる筋萎縮や, がん患者が合併するがん悪液質における筋量減少に対して, 筋分化促進効果を発揮することが示された. RNA シーケンスの解

析から、既知の免疫型オリゴ DNA と異なり、myoDN の作用は TLR を介さないことも明らかになった。myoDN は、免疫系に影響せずに筋分化を促進することで、疾患性あるいは加齢性の筋萎縮を改善する核酸医薬の創薬シーズとして期待される。

myoDN は gymnosin によってキャリアなしで細胞内に取り込まれるが、これは一本鎖オリゴ DNA に共通して見られる一般的な性質である。オリゴ DNA の短縮化には、取り込み効率の向上や、合成コストの削減などの利点がある。報告者は現在までに、iSN04 の配列・構造・活性相関の解析結果を踏まえて、18塩基の iSN04 と同等の活性を示す 12塩基の myoDN の開発に成功している。今後の実用化をにらみ、iSN04 をはじめとする一連の myoDN の配列とそれらの様々な生理活性については、4件の特許を出願中である（後掲）。

myoDN の臨床応用には、安全性の確保と、それを担保する作用機序の解明が不可欠である。本研究では、iSN04 の標的タンパク質としてヌクレオリンを同定し、その分子メカニズムの核心に迫りつつある。ヌクレオリンアプターとしては既に AS1411 が存在するが、26塩基の

AS1411 と比較し、iSN04 は 18塩基、短縮型 myoDN は最短 12塩基と、大きなアドバンテージがある。また、複数の細胞を用いた実験から、AS1411 の活性は iSN04 のおよそ 3分の 1 であることもわかってきた。

myoDN は、非免疫型微生物由来オリゴ DNA が、体性幹細胞である筋芽細胞の運命を制御するという世界初の例である。発生学的に、骨格筋は心筋や平滑筋と極めて近縁であり、また、同じく間葉系幹細胞を由来とする脂肪細胞や骨細胞とも関連がある。myoDN はこれらの細胞の分化プロセスにも作用することが推測され、さらなる展開が期待される。

出願特許

1. 高谷智英, 下里剛士, 梅澤公二. 筋分化促進剤, 筋分化促進方法, 筋分化促進オリゴ DNA, 増強剤及びオリゴ DNA. 特願 2018-568609.
2. 梅澤公二, 高谷智英. 筋分化促進剤および筋分化促進方法および筋分化促進オリゴ DNA. 特願 2019-142724.
3. 高谷智英. 心筋分化促進剤, 心筋分化促進方法. 特願 2018-142473, 特開 2020-019718.
4. 高谷智英, 三谷壘一. 脂肪分化抑制剤. 特願 2020-125833.

重点研究領域：グリーンバイオテクノロジー

受賞テーマ：セルロースナノファイバー生産のための温泉微生物生態系エンジニアリング

東京都立大学大学院理学研究科
春田 伸

研究の背景

細菌のつくるセルロースはバクテリアセルロースと称され、ナノ繊維構造を持ち、高い強度やその保湿性から、音響振動板や表示デバイスなどの工業材料から人工血管などの医療用材料として活用されている。近年では他樹脂との混合による新素材の開発にも期待が高まっている。バクテリアセルロース生産の研究は、食酢醸造にも使われる *Gluconacetobacter* などの酢酸菌を中心に進められてきた。

2003年に、高温温泉流水中に観察される微生物集塊のひとつである硫黄芝に菌体外多糖としてセルロースが含まれることが報告された。しかし、これまで 70℃ 以上でセルロースを合成する好熱菌は知られておらず、中温菌とは異なる生産性やセルロースの物性に期待される。硫黄芝は硫化水素泉に生育する微生物群集（バイオマット）のひとつで、中性から弱アルカリ性の硫化水素泉には、*Aquificae* 門の *Sulfurihydrogenibium* 属細菌（通称 Large Sausage-Shaped Bacteria）を主たる構成種とする硫黄芝が広く観察

される。本菌は独立栄養硫酸化細菌と考えられるが、培養困難で未だ分離培養されていない。

研究の課題

本研究では、温泉微生物群集による二酸化炭素からのセルロースナノファイバー合成法の開発を目指した。70～80℃の高温弱アルカリ硫化水素泉に観察される好熱性微生物群集が生産するセルロースの特性を解析するとともに、その生産機構を明らかにし、生産性を最大限に引き出す方策を提案することを目的とした。

研究の結果

1. 温泉微生物群集が生産するセルロース

長野県中房温泉では、年間を通して安定した泉質の温泉水が野外を流れ、40℃から 80℃の幅広い温度域に多彩な微生物群集が発達している。温泉水は、pH 8.5程度で、0.1～0.3 mM の硫化水素を含む。70～80℃の温泉流水中に

は、白色～淡黄色～灰色の微生物集塊が観察される。この微生物集塊を採取し、セルラーゼで処理したところ、集塊構造が崩れて細菌細胞が分散し、グルコースが遊離することを確認した。

微生物集塊をカルコフロールホワイトで染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。カルコフロールホワイトは、 β グルカン構造をもつセルロースの蛍光染色剤として広く使用される。図1に示すように細胞を包み込むように集塊全体に繊維状の構造体が観察された。また、希アルカリ法で微生物集塊から細菌細胞を除去し繊維質画分を抽出して電子顕微鏡で観察したところ（図2）、温泉微生物群集のセルロース繊維は、酢酸菌が生産するバクテリアセルロースと比較して、太く長いという特徴が見られた。

2. 温泉微生物群集のセルロース合成者

中房温泉から採取した微生物集塊からDNAを抽出して16S rRNA遺伝子を対象にしたアンプリコン解析を行った。*Aquificae*門の細菌が50-80%を占めており、なかでも*Sulfurihydrogenibium*属細菌が多く、*Hydrogenobacter*属細菌も検出された。これら硫黄／水素酸化細菌がこの微生物生態系の主要一次生産者と考えられる。これらのほかに、発酵細菌、硫酸還元菌、好気従属栄養細菌等が検出された。これら細菌は、種間で炭素源およびエネルギー源を授受して微生物群集を形成していると考えられた。

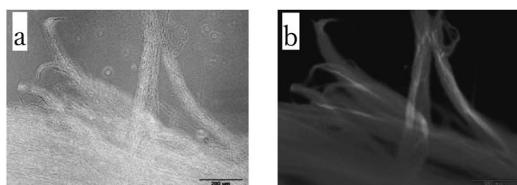


図1. 温泉微生物集塊のカルコフロールホワイト染色
a: 位相差観察像, b: aと同一視野の蛍光顕微鏡観察像。

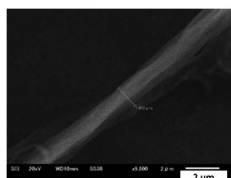


図2. セルロース繊維の電子顕微鏡像
微生物集塊から細胞を除去し、SEM観察。

次いで、メタゲノム情報を取得し、メタゲノムアッセンブリゲノム (MAG) を構築した。主要種である未培養*Sulfurihydrogenibium*属細菌のMAG (1,377,033 bp) を90%以上の完全性で得ることができ、一つの遺伝子領域に、セルロース合成関連遺伝子、*bcsA* 遺伝子、*bcsB* 遺伝子、*bcsZ* 遺伝子、*bcsC* 遺伝子を有することが分かった（図3）。

これら遺伝子は、セルロース合成能が知られている酢酸菌や大腸菌等の中温性プロテオバクテリアが有する遺伝子と相同性があり、セルロース合成機構には類似性があると考えられた。セルロースを分泌する外膜タンパク質BcsCの比較・機能解析から、セルロース繊維の特性（太さ、長さ、結晶性等）を決定する機構を明らかにできる可能性がある。

さらに、微生物集塊から全RNAを抽出しRNA-seq解析を行い、これら遺伝子が温泉環境中の微生物集塊で転写されていることを確認した。また、本菌以外のセルロース合成酵素遺伝子の転写物は検出されず、この未培養*Sulfurihydrogenibium*属細菌が主たるセルロース合成者と考えられた。

3. 温泉微生物群集のセルロース合成量を決定する因子

中房温泉郷において、温泉水の水深や流速の異なるさまざまな場所から微生物群集を採取し比較解析した結果、細菌組成とセルロース量の関連性が示唆された。酢酸菌などでは、培地の炭素・窒素比がセルロース合成量に影響する因子として知られている。温泉水に含まれる窒素化合物の量は非常に少なく、温泉微生物群集の窒素固定活性がセルロース合成量に関与していると予想した。ただし、70℃を超える高温での生物的窒素固定は知られていなかった。

中房温泉から採取した微生物集塊から窒素固定活性を測定したところ、水素や硫酸に依存する活性を検出することに成功した。次いで、窒素固定者の多様性を知るため、微生物群集からDNAを抽出し、窒素固定酵素（ニトロゲナーゼレダクターゼ）をコードする遺伝子*nifH*を対象にしたアンプリコン解析を行った。その結果、硫黄／水素酸化細菌、発酵細菌、硫酸還元細菌由来と考えられる*nifH*遺伝子が検出された。このうちアンプリコン解析で高頻度に検出された*Hydrogenobacter*属の新規好気性硫黄／水素酸化・独立栄養性窒素固定細菌の分離培養に成功した。本菌の生理性状解析の結果、窒素固定には、微好気条件が必要



図3. メタゲノムから検出したセルロース合成関連遺伝子群。

bcsA, UDP-グルコース β グルカングリコシルトランスフェラーゼ; *bcsB*, 活性調節タンパク質; *bcsC*, 外膜セルロース分泌孔; *bcsZ*, エンドグルカナーゼ。h, 推定ORF。

であることがわかった。

上述したように、微生物集塊の色と、細菌群集組成およびセルロース量に関連性が見られた。灰色がかった色の微生物集塊は、嫌気性細菌の割合が高く、セルロース量が多い傾向があった。温泉水の流速、水深の違いによる酸素や硫化水素供給量の違いが、微生物群集の酸化還元状態に影響し、群集の代謝生理特性を決定していると考えられた。

これらの知見をもとに、生産プロセスをモニターする物理化学的指標および微生物学的指標を設定して、実験室で微生物集塊の培養系を構築し、菌叢改変を試みるとともに、至適生産条件を探った。しかし、酸素供給量が多いと生産性が著しく低下し、少なすぎるとセルロース分解が進むなど、条件の最適化は困難であった。セルロース合成者である硫黄酸化細菌は微好気条件を好むことが示唆されているが、酸素供給が限定的になるとセルロース分解細菌および窒素固定細菌の活性を上昇させ、窒素源が豊富になり、その結果、セルロース生産量が抑制されたと予想される。さらにセルロース合成および窒素固定反応は、群集内の発酵細菌によって生産される水素による影響も受けられていると考えられた。温泉微生物群集のセルロース合成量は、セルロース合成細菌（硫黄酸化細菌）およびセルロース分解細菌（発酵細菌）の活性だけでなく、微生物群集全体のエネルギーおよび窒素固定と炭酸固定のバランスによる影響も大きいと考えられた。

今後の実用化への展望

温泉現地における大量生産に向けた培養実機の開発・製作には至っていないが、培養システムのプロトタイプの製作に着手しており、また温泉地に培養器を設置するための協議を開始している。

温泉微生物集塊からセルロース画分を抽出・精製する方法を確立し、シート状に加工することに成功している（図4）。現在、温泉微生物セルロースの製品化に向けて、加工製品の特性解析を進めている。

温泉地には、本研究で取り上げた化学独立栄養細菌群集以外にも光合成細菌、シアノバクテリアを含む微生物群集が観察される。これらは70℃以下の温度域にみられ、セル

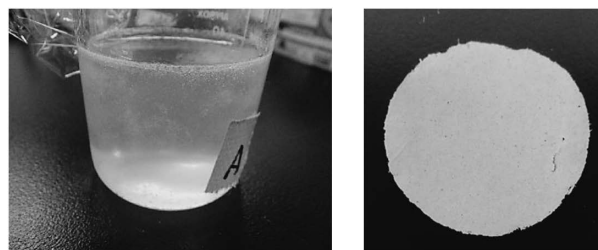


図4. 温泉微生物セルロース。

左：微生物集塊から精製したセルロース懸濁液，右：精製セルロースから熱プレスで加工・成形したシート。

ロース合成者 *Sulfurihydrogenibium* 属細菌も共存している。さらに、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus* にもセルロース合成能が知られている。微生物群集エンジニアリングにはまだ解決すべき課題も多いが、化学合成だけでなく光合成による一次生産も活用できるようになれば、さらなるセルロース生産性の増強が期待される。

誌上発表

- 1) Nishihara, A., V. Thiel, K. Matsuura, S. McGlynn, and S. Haruta. Phylogenetic diversity of nitrogenase reductase genes and possible nitrogen-fixing bacteria in thermophilic chemosynthetic microbial communities in Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.*, 33: 357-365 (2018).
- 2) Nishihara, A., K. Matsuura, M. Tank, S. McGlynn, V. Thiel, and S. Haruta. Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum *Aquificae* isolated under nitrogen-fixing conditions from Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.*, 33: 394-401 (2018).
- 3) Nishihara, A., S. Haruta, S. McGlynn, V. Thiel, and K. Matsuura. Nitrogen fixation in thermophilic chemosynthetic microbial communities depending on hydrogen, sulfate, and carbon dioxide. *Microbes Environ.*, 33: 10-18 (2018).

謝辞

本研究に際し、研究助成および助言をいただいた公益社団法人日本農芸化学会および関係の先生方に心より感謝申し上げます。研究に携わってくれた西原重理沙博士（現産業技術総合研究所）、Chen Yuxin氏、山口真由氏、また、試料の解析にご協力いただいた東京都立産業技術研究センターに感謝します。最後に、試料採取にご協力いただいた中房温泉の皆様に感謝申し上げます。

3. 第16回農芸化学研究企画賞報告書

第16回農芸化学研究企画賞報告書

重点研究領域：先導的生物活性物質研究と新技術開発

受賞テーマ：青枯病菌クオラムセンシング機構を標的にしたトマト萎凋病の予防・治療薬の開発

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
甲斐建次

1. 研究の背景

2016年、青枯病菌が土壌中の糸状菌の中に寄生しているという衝撃的な事実が、権威ある微生物生態学雑誌 ISME Journal 誌に報告された (Spraker *et al.*, 2016). 青枯病菌はよりストレスに強い糸状菌の中に隠れることで、悪環境にも耐えている可能性が示唆された。さらに, ralstonin と名付けられた環状ペプチドの生合成遺伝子 *rmy* クラスターを欠損させると、共生能が消失することが報告され、本物質がこのユニークな共生系の鍵因子であることが明らかになった。ドイツチームとのし烈な競争になったが、応募者は世界に先駆けて本物質の単離・構造決定に成功した (Kai *et al.*, *Organic Letters*, 2017). 現在も ralstonin 研究を展開しており、本分野で世界をリードしている。

一方、応募者は ralstonin 研究以前から、QS 機構の研究を展開しており、青枯病菌 QS 機構の細胞間コミュニケーションに関わる QS シグナル分子が methyl 3-hydroxymyristate (3-OH MAME) であることを同定している (Kai *et al.*, *ChemBioChem*, 2015). 3-OH MAME の合成酵素あるいは受容体遺伝子欠損株は、QS 機構が働かないため、植物に対する病原性が消失する。応募者はこれまでの研究で、青枯病菌 QS 機構を阻害する PQI 類の開発に成功して

いる。青枯病菌において、QS 機構は ralsotnin 類を含めた二次代謝産物の産生も制御している。したがって、応募者がこれまでに開発した QS 阻害剤は、青枯病菌の糸状菌内への感染を使った土壌潜伏機構にも有効ではないかという仮説を立てた (図1)。

植物細菌病は、世界の農業に甚大な損失を与えている。特に、青枯病菌は多種の食用植物に萎凋症状 (青枯病) を引き起こし、その経済的損失は1年あたり数千億円 (国内では数百億円) と極めて大きい。そのため、「国際的な食料需給の不安定性の増大」ばかりでなく、「日本国内の食料自給率の向上」を妨げる一因にもなっている。土壌消毒と抵抗性台木を用いた接木栽培が、青枯病防除に主に用いられてきた。しかし、それらの効果は安定的なものではなく、度々青枯病が蔓延してきた。ヒト、家畜および魚類の細菌病治療で用いられている抗生物質のような強い殺菌作用を持つ化合物は、耐性菌株の出現による効力の低下が大きな社会問題となっている。さらに、環境や安全・安心な食料生産に対する影響も懸念されており、殺菌剤を植物細菌病防除に用いることは今後ますます厳しくなる。さらに、青枯病菌の病原性機構が未解明であったため、適切な標的にフォーカスした防除技術の研究開発すらできていないのが実情であった。

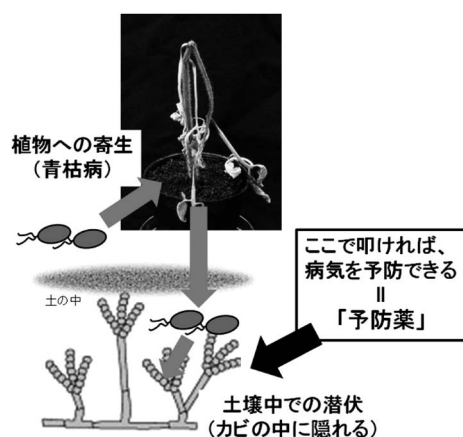


図1.

2. 研究の課題

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、世界規模で猛威を振るう植物病原細菌である。本病はナス科を中心に、200種以上の植物に急激な萎凋・枯死を引き起こす恐ろしいものである。しかし、有効な化学防除法は確立されていない難防除植物病害であるため、農作物が本病に罹った場合なす術がないのが実情である。さらに厄介なことに、一度、青枯病菌が発生した土壌中には、菌が長く生息し続けるため、再び青枯病菌が発生するリスクが伴う。この過程で、青枯病菌は糸状菌 (カビ) 内に潜伏している。青枯病菌が植物と糸状菌へ感染する過程はいずれも、菌密度依存の遺伝子発現機構であるクオラムセンシング (QS) によって

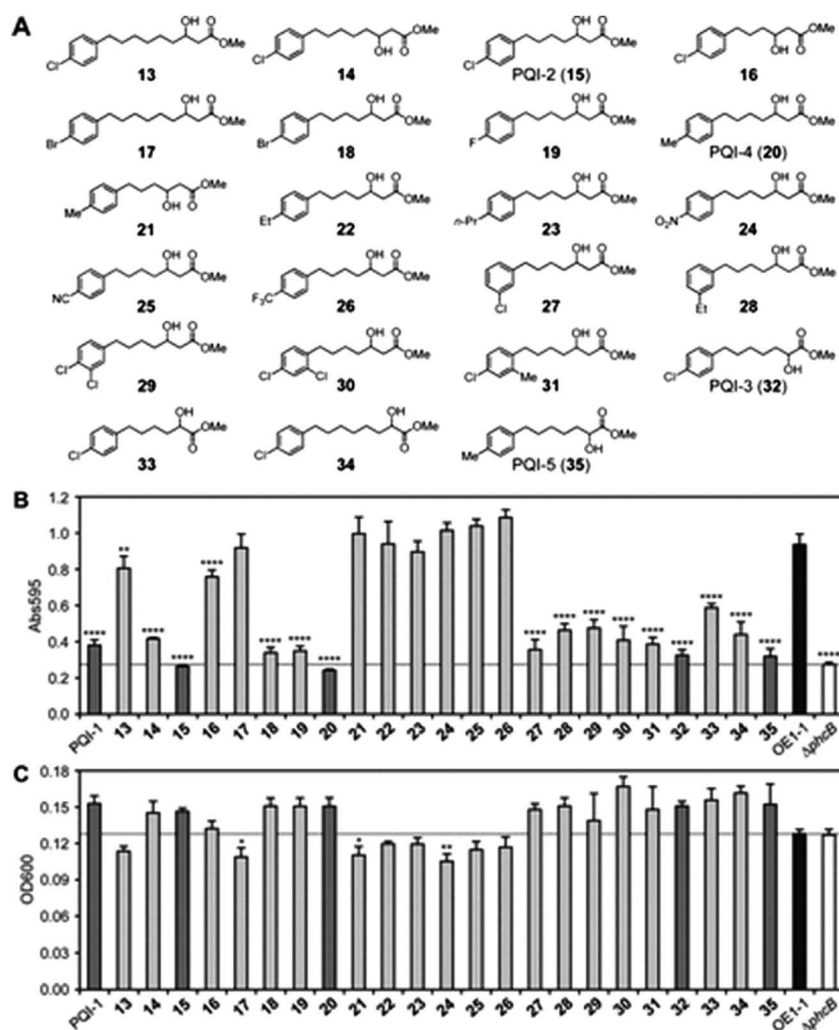


図2.

制御されていることを、応募者は見出した。本申請研究では、青枯病菌の土壌潜伏機構を阻害することで青枯病を「予防」し、かつ、植物への感染を阻害して「治療」する革新的な二機能性薬剤を開発し、農芸化学・植物保護分野に革新的な進歩をもたらすことを目指す。

3. 研究の結果

PQI類のデザイン・合成：3-OH MAME アナログ 10 種を用意し、それらの終濃度 $100 \mu\text{M}$ における QQ 活性をバイオフィーム形成阻害活性を指標に調べたところ、PQI-1 が中程度の活性を示した。続いて、PQI-1 の活性を向上させるために、PQI-1 アナログをデザイン・合成し、それらの終濃度 $10 \mu\text{M}$ におけるバイオフィーム形成阻害活性を評価した。その結果、4' 位 H 基を Cl 基または Me 基に置換することによって、活性は大きく向上した。さらに、ベンゼン環とメチルエステル構造を繋ぐリンカー部分の改変

を行ったところ、炭素数 7 のアルキル鎖が最適であった。また、OH 基の位置を 3 位から 2 位へ改変した結果、2 位に OH 基を有する化合物は優れた活性を示した。最終的に 23 種の PQI-1 アナログを合成し、それらの中から 4 種の強力な QQ 剤候補化合物 PQI-2-5 を見出した（右上図）。見出した PQI-2-5 の活性を精査するために、終濃度 0.01 – $100 \mu\text{M}$ においてバイオフィーム形成阻害アッセイを行った。その結果、PQI-2 と 4 は $10 \mu\text{M}$ で、PQI-3 と 5 は $1 \mu\text{M}$ でバイオフィーム形成を完全に抑制することが示された。

PQI-2-5 の QQ 活性評価：QQ 剤候補化合物 PQI-2-5 は QS に制御される他の主要病原因子の産生を阻害するかどうかを調べた。青枯病菌に各 PQI を終濃度 0.01 – $100 \mu\text{M}$ で処理し、ralfuranone 産生、ralfuranone 生合成遺伝子 *ralsA* 発現および EPS I 産生への影響をそれぞれ調べた。その結果、これらの病原因子の産生を PQI-2 と 4 は $100 \mu\text{M}$ で、PQI-3 と 5 は $10 \mu\text{M}$ で完全に抑制した。なお、

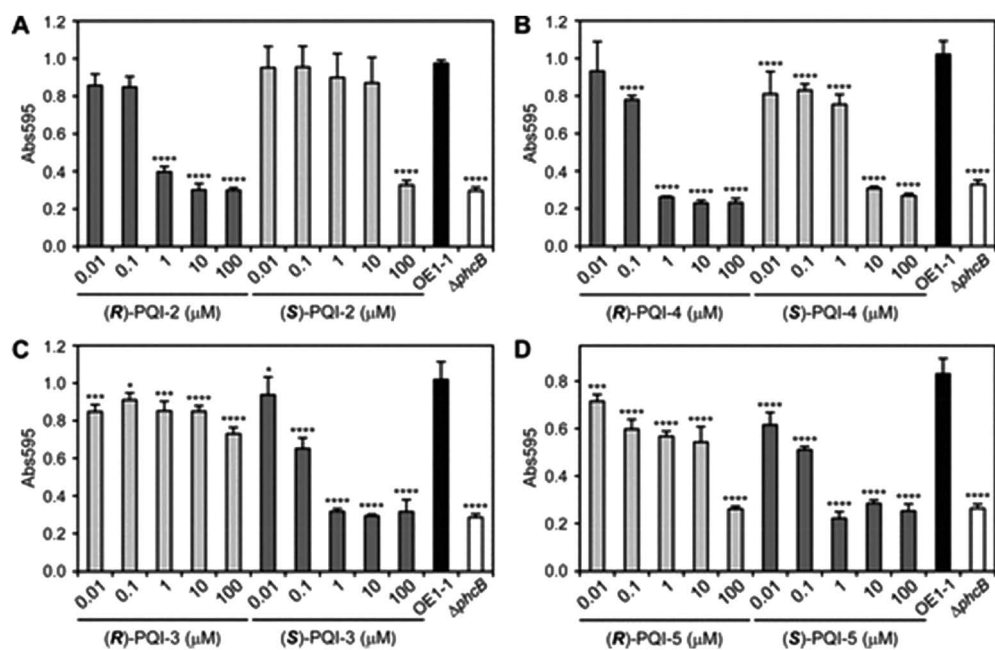


图 3.

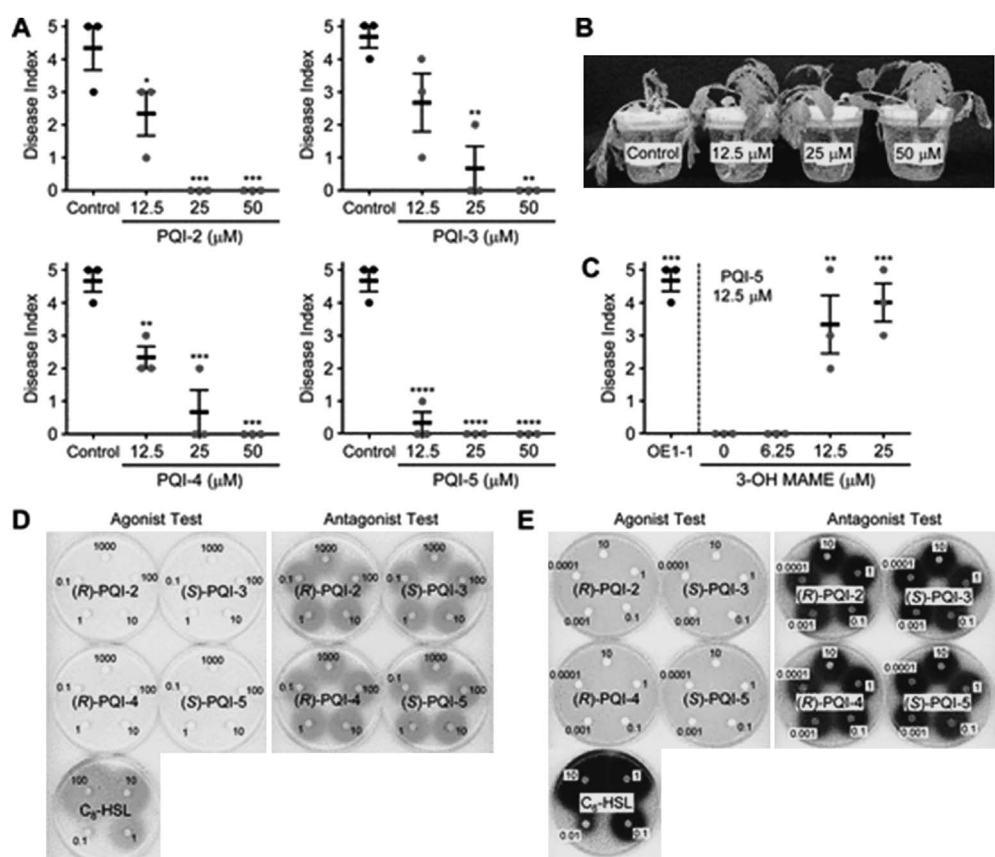


图 4.

いずれの化合物も菌の生育阻害活性を示さなかった。したがって、PQI-2-5はQQ剤であることが示された。

PQI-2-5の立体配置がQQ活性に与える影響について調べた。3-OH MAMEはQS誘導活性において高い立体特異性を示し、R体がS体よりも強くQSを誘導することを見出している。そこで、PQI類の光学分割を行い、バイオフィーム産生阻害アッセイを用いて得られた光学異性体のQQ活性を評価した。その結果、PQI-2と-4ではR体、PQI-3と-5ではS体にそれぞれ強い活性が認められた。現在、他の病原因子の産生に対する阻害活性を調べ、光学異性体の詳細なQQ活性を評価している。

続いて、PQI-2-5の作用様式を調べるために、バイオフィーム形成量を指標とするアッセイを用いて、3-OH MAMEとの競合試験を行った。PQI-2-5をそれぞれ1、10 μ Mで青枯病菌に処理し、3-OH MAMEを0.01-10 μ Mになるよう添加したところ、3-OH MAME濃度依存的にPQI-2-5によるバイオフィーム形成阻害は打ち消された。以上の結果より、PQI-2-5は3-OH MAMEの競合的アンタゴニストであることが強く示唆された。

PQI-2-5の青枯病発病抑制効果：PQI-2-5を処理することで青枯病の発病を抑制できるかどうかを検証した。発芽後3週のトマトに本菌を感染させた後、各PQIを含む水耕液で7日間培養した。無処理区のトマト植物体は接種後4日目で萎凋が始まり、7日目には完全に枯死した。一方、PQIを処理したトマト植物体ではPQIの濃度依存的に萎凋症状が緩和された。特に、*in vitro*で最も高いQQ活性

を示したPQI-5は、化合物処理期間を接種後7日間から3日間に短縮した場合でも、青枯病による萎凋発現を完全に阻害した。これらの結果は、PQI処理が青枯病の発病を抑制する有効な手法であることを示唆した。

4. 今後の実用化への展望

現在、細菌性植物病害に対する有効な化学防除法は開発されていない。本研究では、QQが青枯病菌の防除において有効な薬剤ターゲットの1つであることを示すことができた。我々が開発したPQI類、あるいは同様の活性を有する化合物が新しい農薬のリードとなることが期待される。

実用化に向けた課題としては大きく3点あると思われる。1つ目はより強いQS阻害効果を示す化合物の創出である。現時点のPQI類の活性は、学術研究レベルでは十分なものではあるが、実際にフィールドで使うことを想定すると物足りないことは否定できない。2つ目は、PQI類の植物内における動態の詳細な解析である。どの程度植物体で安定であるのか、植物に顕著な毒性を示す化合物に変換されないかといった具体的なデータを示していく必要がある。3つ目は、大学だけではどうにもならないことであるが、化合物の安全性試験である。もし、PQI類が本当に有望な化合物であるならば、農薬会社と協力して、様々な安全性試験を実施しなければ、畑に撒くことは不可能である。つまり今後は、よりフィールドでの実用性・安全性を検証していく必要がある。

重点研究領域：グリーンバイオテクノロジー

受賞テーマ：微生物の低栄養性に必須なアルデヒド脱水素酵素の工学的利用

静岡大学工学部
吉田信行

1. 研究の学術的背景—N9T-4株は炭素・窒素・硫黄源を大気中から取り入れる

地球規模で資源問題が注目されているなか、現大気中のCO₂を由来とする植物バイオマス資源の重要性が至る所で強調されている。現大気中のCO₂を固定して生産されるバイオマスであるから、「カーボンニュートラル」「再生可能」といった言葉で飾られることが多い。しかしながら、例えば注目されて久しいバイオエタノールの生産について、実質的に成功しているのはバイオマスの「原産国」のみである。特に、我が国におけるこれらのバイオマスの生産性は極めて低く、輸入コストを考えると国内でバイオエ

タノールを生産することは極めて困難である。したがって本申請者は、資源の乏しい我が国にとっての至上命題は「バイオマス資源の有効利用」ではなく、「利用可能なバイオマスの効率的生産」(農学分野)あるいは「CO₂を含めた非バイオマス炭素の直接的有効利用」(工学分野)にあると考えている。「直接的」とはバイオマスを介さず微生物によって直接有用物質へと変換する、という意味である。

本受賞者は、低炭素・低エネルギー型のバイオ燃料生産プロセスの開発を最終目的として、自然界から低栄養性細菌(オリゴトロフ)の単離を試みている。低栄養性細菌についての定義は曖昧であるが、我々は独立栄養条件(光、

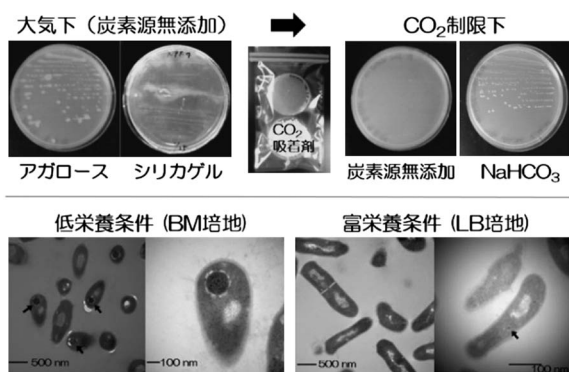


図1. 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株
下の写真中の矢印はオリゴボディーを示す。

金属、水素などをエネルギー源として含むような）ではなく、1 mg/L の炭素源を含む培地で生育する微生物と定義している。本受賞者のグループが自然界から見いだした *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源を全く含まない（添加しない）無機塩培地に良好に生育する超低栄養性細菌である。本菌は CO₂ を制限した環境にすると生育を示さないが、培地中に炭酸水素ナトリウムなどの CO₂ 源を加えておくと、そのような環境においても良好な生育を示す（図1, 上図）。従って、CO₂ を固定して生育する、いわゆる独立栄養的な生育を示すようであるが、本菌のゲノムには、既知の独立栄養性細菌（オートトロフ）の CO₂ 固定系において重要な役割を果たす鍵酵素をコードする遺伝子が確認できず、さらに、それぞれの酵素活性も検出できない。また、生物学的に最も特徴的な点は、CO₂ 固定に必須である光、金属などのエネルギー源の添加を全く必要としないという点である（*J. Bacteriol.*, 189: 6824-6831, 2007）。これまでに行ったプロテオーム解析、あるいはトランスクリプトーム解析により、メタノール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素が低栄養生育時に著しく発現することが判明している（*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75: 123-127, 2011）。これらは本研究課題で鍵となる酵素であるので、後に詳しく述べる。以上のような知見から、本菌における、アルデヒド代謝に関連した炭素節約型のユニークな低栄養代謝を提唱している（*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99: 5627-5637, 2015）。さらに、本菌は窒素源、硫黄源を取り除いた培地においても生育を示すことが分かっている。このうち窒素源については、高親和性アンモニアトランスポーターを利用することによって、大気中の微量アンモニアを取り込んでいることが明らかとなっている（*J. Biosci. Bioeng.*, 117: 28-32, 2014）。おそらくは硫黄源についても同様に、硫化カルボニル、二酸化硫黄などの大気中硫黄化合物を取り込んでいるものと予想している。すなわち本菌は、炭素・窒素・硫黄という生物にとつ

て必須な主要三元素を全て大気中から取り入れることができる、大気資化菌であると言える。

本菌の細胞内構造についても興味深い知見が得られている。電子顕微鏡観察の結果より、低栄養生育させた細胞内には比較的大きく、球形で明瞭な構造体（オリゴボディーと命名）が生成することが分かった（図1, 下図）。オリゴボディーは無機ポリリン酸が蓄積していることが判明し（*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101: 331-340, 2017）、低栄養生育との関連性を現在検討中である。無機ポリリン酸の顆粒を形成する微生物に関する報告はあるが、本菌のように細胞内に1つの顆粒を形成している例はまれである。また、N9T-4 株は低栄養条件で細胞内にトレハロースやグリコーゲンなどの糖質を蓄積することが分かっている（*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 610-613, 2016）。特にトレハロースについては、上記ポリリン酸合成系遺伝子を欠損させるとその含量が上昇し、0.54 g/g 乾燥菌体とかなりの量となる。これらの物質の蓄積も、本菌が低栄養条件で生育するための戦略であると考えている。

本研究企画では、このような非常にユニークな性質を有する N9T-4 株の低栄養生育に重要な役割を果たしている2つの酵素に着目し、それらの工学的利用を目指した基盤的研究を試みた。

2. 研究課題—N9T-4 株の低栄養関連酵素を使って、他の菌を低栄養化する

aldA および *mnoA* は N9T-4 株を低栄養培地（炭素源無添加の無機塩培地、BM 培地）で培養した際に、富栄養培地（LB 培地など）に比べ500倍程度発現が上昇する遺伝子で、それぞれ NAD 依存性アルデヒド脱水素酵素、*N,N*-ジメチル-4-ニトロソアニリン（NDMA）メタノール脱水素酵素をコードする。特に *aldA* は低栄養生育に必須な遺伝子であり、その欠損株は低栄養生育を示さないが、*aldA* を含むプラスミドを導入すると生育を回復する。そこで、*aldA* を他の有用 *Rhodococcus* 属細菌に導入し、低栄養性を付加することを試みる、というのが当初の研究課題であった。研究を進める過程で得た新しい知見を元に研究計画の変更を行ったが、それらについては以下適所に記述する。いずれにしても、将来的には低炭素・低エネルギー型バイオプロセスの開発を目指すものである。挑戦性の高い研究計画ではあるが、*aldA* を N9T-4 株内で高発現させると、低栄養生育がさらに増強されるという予備的な知見が、本研究企画を遂行するモチベーションとなった。

3. 研究の結果—N9T-4株の *aldA*, *mnoA* を導入することにより TAG 生産能が向上

①低栄養性遺伝子の再評価と *mnoA* の機能解析

上述の通り, *aldA*, *mnoA* は低栄養条件で高発現し, *aldA* 欠損株 ($\Delta aldA$ 株) は低栄養生育能を失う。しかしながら, $\Delta mnoA$ 株は親株と変わらない低栄養性を示すという結果が得られていたので, *mnoA* に関する検討は後回しにしていた。本研究においても企画の段階では *aldA* のみを対象としていたが, 今回, 保存されていた $\Delta mnoA$ 株の性質がおかしいことに気付き, 改めて欠損株の取得を試みた。その結果, $\Delta aldA$ 株ほどではないものの BM 培地上での生育が極端に悪くなり, LB 培地上での生育は親株と変わらなかった。つまり, $\Delta mnoA$ 株の低栄養生育能が低下するということが分かった (図2)。

これまでに *aldA* 遺伝子産物については詳細に検討し, NAD を補酵素とし, C1~C8 の直鎖状脂肪族アルデヒドに作用する脱水素酵素 (NAD-ALDH) であることが分かっている。この種の酵素が属するファミリーの中でホルムアルデヒドに作用する酵素は極めてまれであるが, それは基質濃度阻害によるものではないかと本受賞者は予想している。今回 *mnoA* も低栄養生育に重要であることが判明したので, *mnoA* 遺伝子産物の機能解析を試みることにした。*mnoA* は NDMA を人工電子受容体とするメタノール脱水素酵素 (NDMA-MDH) とアノテーションされており, グラム陽性菌のメチロトロフがメタノールを資化する際の初発酵素であることが予想されている。近年, NDMA-MDH の生体内での電子受容体がマイコファクトシン (MFC) という物質である可能性を示す報告があった。この MFC については, グラム陰性菌の PQQ に相当する役割が予想されており, PQQ に非常によく似た経路

で生合成されることが分かっている (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103: 2903-2912, 2019)。興味深いことに, N9T-4株ゲノムの *aldA*~*mnoA* 間に, MFC の生合成系の遺伝子が全て存在していることが分かった (図3) (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 84: 865-868, 2020)。本領域には本菌の低栄養性への関与が予想される他の遺伝子もいくつか存在しており, 低栄養性遺伝子クラスターとして, 現在様々な検討を進めている。

mnoA を大腸菌内で発現させ, 精製タンパク質として単離することができたが, 酵素活性を検出することができなかった。そこで, *Rhodococcus* 属用発現ベクターに *mnoA* をプロモーターごと導入し, N9T-4株内での発現を試みた。その結果, MnoA はメタノール脱水素酵素としてアノテーションされているにも関わらず, メタノールには作用せず, 試験したアルコール (C1~C4) の中ではエタノールに対してのみ活性を検出することができた。NDMA を電子受容体とする酵素活性の測定は非常に再現性に乏しく, 本当にエタノールのみを基質とするのかを確定するには至っていない。現在 NDMA-MDH の測定法を再検討中である。ただし, N9T-4株は C2~C4 のアルコールを炭素源とすることができ, $\Delta mnoA$ 株はそれらのアルコールを資化することができないので, NDMA-MDH は少なくともこれらのアルコールには作用すると予想している。

②他の *Rhodococcus* 属細菌の低栄養性について

今回の検討で, *aldA*, *mnoA* いずれも低栄養生育に重要であることが分かったので, この2つの遺伝子を用いて他の *Rhodococcus* 属細菌の低栄養化を試みることにした。まず, 低栄養化の対象を見つけるために, 研究室保存の *Rhodococcus* 属細菌の低栄養性を調べた (図4)。その結果, 多くの株が N9T-4株と同程度の低栄養生育を示したが, 低栄養性が弱い株が3株あり, *R. erythropolis* NBRC 15567株は BM 培地上で全く生育しなかった。これらの株へ N9T-4株の *aldA*, *mnoA* を導入したかったが, プラスミドによる形質転換そのものができなかった。

そこで, トリアシルグリセロール (TAG) を細胞内に顕著に蓄積することが知られており, バイオ燃料生産の有望株である *R. wratislaviensis* DSM 44193株に着目した。

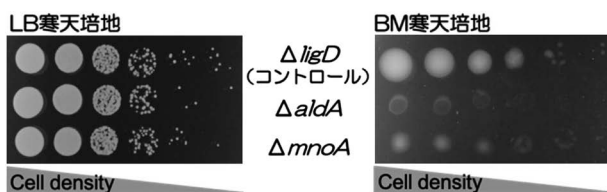


図2. $\Delta mnoA$ および $\Delta aldA$ の低栄養生育。

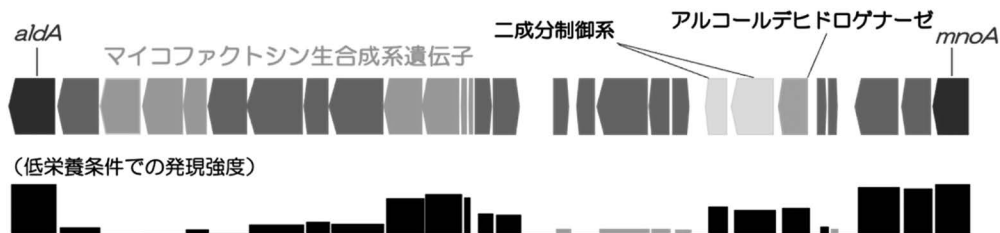


図3. N9T-4株ゲノムにおける *aldA*, *mnoA* 間の遺伝子構造。

R. erythropolis NCIMB 11215
R. rhodochrous ATCC 12674
R. erythropolis NBRC 15567
R. erythropolis NBRC 16296
R. rhodochrous ATCC 19140
R. erythropolis N9T-4 $\Delta ligD$
R. erythropolis IFM 155
R. rhodochrous ATCC 17041
R. rhodochrous ATCC 17895
R. rhodochrous ATCC 33258
R. wratislaviensis DSM 44193
R. erythropolis PR4
R. opacus NBRC 108011
R. ruber NBRC 15591
R. erythropolis DSM 743

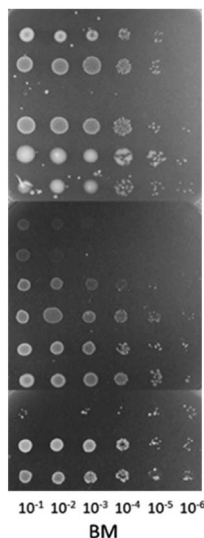


図4. 様々な *Rhodococcus* 属細菌の低栄養生育.

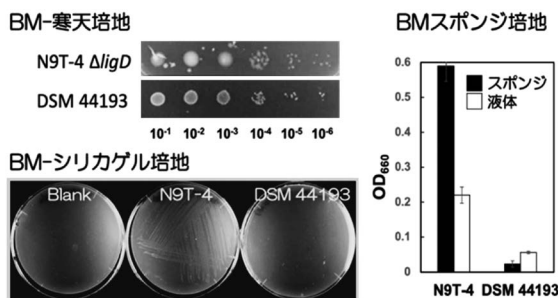


図5. DSM44193株は低栄養生育を示さない?.

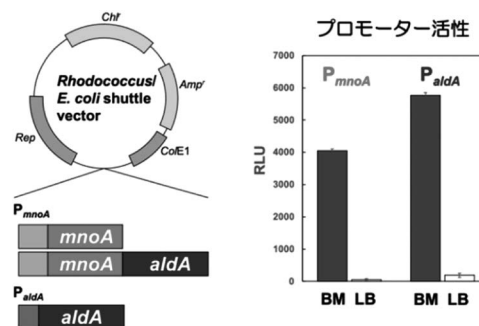


図6. 低栄養誘導型プロモーターを用いた遺伝子発現系の構築. プロモーター活性は、ルシフェラーゼ遺伝子を導入することにより測定した.

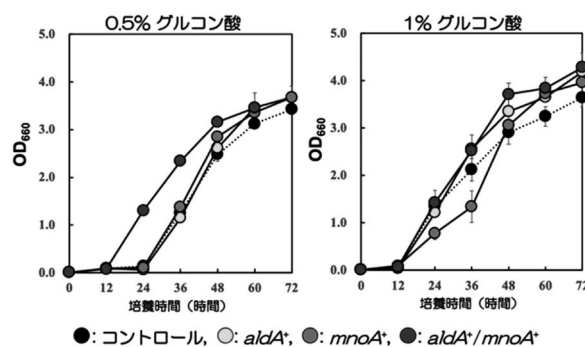


図7. DSM 44193形質転換体の低栄養生育.

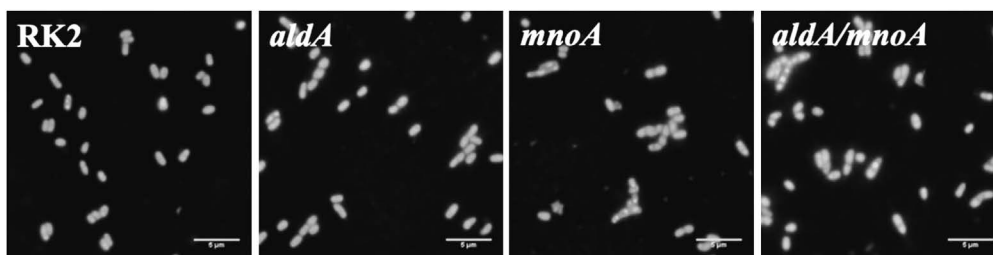


図8. DSM 44193形質転換体の蛍光顕微鏡観察.
各形質転換体を 0.5%グルコン酸を含む MSM培地で培養し、ナイルレッドで染色.

DSM 44193株はBM寒天培地上ではN9T-4株と同様の生育を示したが、支持体としてシリカゲルを用いた固体培地では生育しないことが明らかとなった (図5). また、スポンジを支持体として用いるとN9T-4株の液体培養の効率が向上することが分かっているが (Biosci. Biotechnol. Biochem., 82: 1652-1655, 2018), DSM 44193株はスポンジ液体培養でもほとんど生育を示さないことが判明した (図5).

③DSM 44193株のTAG生産における低栄養化

上記のように、DSM 44193株は低栄養性を本来示さな

いことが明らかになったので、N9T-4株由来の *aldA*, *mnoA* の発現を試みた. それぞれの遺伝子の発現にはそれぞれのプロモーターを用いた. これらのプロモーターをプラスミドに導入しても、やはりその活性はBM培地で著しく高く、LB培地ではほとんど活性を示さなかった (図6). 低栄養条件で発現可能なベクターが構築できたことになり、栄養条件でのスイッチのON/OFFが必要な際に利用できそうである. このシステムを用いて、DSM44193株内で *aldA*, *mnoA* を発現させ、まずそれら形質転換体の生育

表1. DSM 44193形質転換体の細胞内TAG含量.

培地中の濃度 (%)		TAG生産量							
C (GN)	N	RK2		<i>aldA</i> ⁺		<i>mnoA</i> ⁺		<i>aldA</i> ⁺ / <i>mnoA</i> ⁺	
		①	②	①	②	①	②	①	②
1.0	0.1	6.11	31.8	5.38	30.3	7.08	39.5	6.00	33.6
1.0	0.01	3.10	46.0	4.36	56.2	3.71	52.2	4.97	57.7
0.5	0.1	0.80	8.3	1.63	16.4	1.66	17.0	1.50	15.3
0.5	0.01	1.90	33.0	1.91	31.6	2.50	37.8	2.37	32.3

①: 培養液1LあたりのTAG生産量 (mg/L)

②: 乾燥菌体重量当たりのTAG生産量 (%)

を調べた。その結果、残念ながらN9T-4株のような低栄養性を付与することは出来なかった。

DSM 44193株にTAG生産には炭素源としてグルコン酸が用いられることが多い。そこで、BM培地にグルコン酸を添加し、その生育とTAG生産を検討した。その結果、図7に示したように、特に*aldA*, *mnoA* 両方を発現させた株で生育が促進されることが分かった。次に、形質転換体をナイルレッドで染色し、蛍光顕微鏡下でTAGの生産を観察したところ、図8のように形質転換体で蛍光のシグナルが強くなり、*aldA/mnoA* 発現株で最も強い蛍光シグナルが検出された。細胞内TAG含量の測定結果も概ね生育および蛍光顕微鏡観察の結果と同様で、*mnoA* の導入がTAG生産に強く反映されていることが分かった (表1)。

4. 今後の実用化への展望

本研究において、*aldA*, *mnoA* を導入することにより、DSM 44193株に低栄養生育能を付与することは出来なかったが、TAG生産性を20%ほど向上させることができた。これはTAG生産における低栄養化、低炭素化に成功したとも言える。さらに詳細な検討は必要であるが、生産量から判断すると、*mnoA* の発現がTAG生産の鍵となっ

ているようである。上述の通り、NDMA-MDHの生体内の電子受容体はMFCであることが予想されており、MFCの生合成系を強化することでさらなるTAG生産性の向上が望まれる。N9T-4株におけるMFCの生合成および生理学的役割についても現在検討中である。また、本研究成果をもとに、様々な有用物質生産系へ*aldA*, *mnoA* などの低栄養性遺伝子を導入することにより、生産プロセスの効率化、低炭素化が期待できる。

微生物生理学的には、なぜ*mnoA* と*aldA*, すなわちアルコールとアルデヒド脱水素酵素が低栄養生育に関与するのかという疑問がある。この点についても、今回の研究で新たに判明した興味深い知見がいくつかあるが、本報告書では公表を差し控えさせて頂きたい。

5. おわりに

以上のように、研究企画賞として頂いた助成金を元に研究を行い、*Rhodococcus* 属細菌の低栄養性に関する基礎、応用研究を今後展開していくために重要な成果を得ることができました。改めて、選考委員の先生方、助成頂いた企業の皆様に厚くお礼申し上げます。

重点研究領域：食領域における機能性食品素材等の新素材研究および新技術開発

受賞テーマ：環境調和型プロセスにより脱脂米糠から回収・精製された完全アレルギーフリータンパク質及び機能性リン化合物の機能性食品原材料としての用途開発・市場導入に関する研究

山形大学大学院農学研究科
渡辺昌規

研究の背景

米の精米時に副生される米糠は、全国で年間約80万t(平成27年度米生産量798万t(農林水産省「作物統計」)の10%)存在しているとされており、主成分として、タンパク質、糖質、脂質、リン等のミネラル塩の他、フィチン酸、

イノシトール等の機能性成分を含有していることが知られている。

特に米タンパク質は、セリアック病に代表される自己免疫疾患の起因物質である小麦等に含まれるグルテンの代替タンパク (グルテンフリー食品原材料: Hypo-allergenic

material) として、その利用用途の拡大が期待されており、その他にもサプリメント、食品添加物、化粧品素材として、年々、需要が高まっている。肥料・工業原料であるリンは、世界的な枯渇が危惧されており、食糧安全保障の観点からも、新たな自給方法が模索されている。なお、タンパク質及びリンの市場規模は、それぞれ、300億円（乳清、大豆タンパク質として）、200億円（財務省統計）と事業化対象として非常に魅力があり、本技術の確立により米副産物循環利用分野にイノベーションをもたらす可能性を秘めている。

しかしながら、搾油後の米糠である脱脂糠は、有用な上記成分を著量含有しているのにも関わらず、そのほとんどが収益率の低い家畜飼料、堆肥原料として用いられている現状にある。また、米糠に含有する米タンパク質には、上記以外に血糖降下作用を有するアルブミン、抗酸化作用を有するペプチドやアレルギー活性を示すタンパク質成分を含有しており、選択的な米由来タンパク質の回収・精製技術の確立が求められている。これらを背景に、我々は有価資源である機能性タンパク質・リン成分を同時に米糠から回収する技術（Fig. 1）を開発し、これまでに以下の成果を得ている。

成果1 未脱脂米糠（FFRB: full-fat rice bran）からリン成分を分離・回収後、アルカリ抽出を経て、等電点沈殿により得られた画分中のタンパク質含量を測定した結果、45-52 wt%を示し、リンの分離・回収を行っていない場合の31-36 wt%と比べ、タンパク質含量の向上が確認された。

成果2 成果1により回収されたリン画分をEDX解析による元素分析を行った結果、リン含量として15-16 wt%に達するとともに、カドミウムなどの重金属類は検

出されていない。これらの結果より、回収されたリン画分中のリン含量はリン鉱石（リン含量5-11 wt%）に相当し、安全性の高い、新たなリン鉱石代替物質として、今後の利活用の可能性が示された。

成果3 成果1より回収・精製されたタンパク質回収画分のSDS-PAGEによるタンパク質組成分析を行った結果、等電点沈殿（IP: isoelectric precipitation）/電解水（EW: electrolyzed water treatment）処理時のpH（pI）値を可変させることにより、回収タンパク質中のグルテリン前駆体及びグロブリン含有率を任意でコントロールすることが可能であり、タンパク質回収画分のタンパク質組成を任意で制御可能であることを示唆した。

成果4 米の14-16 kDaのアレルゲンに対するモノクローナル抗体（1次抗体：25B9マウス2）、2次抗体（POD-linked anti mouse IgG）を用いた、イノムブロット法によるアレルゲンタンパク質の解析の結果、コントロールである米アレルゲン、FFRBの双方において、PVDF膜上に、アレルゲンタンパク質の存在を示すバンドが検出されたが、脱脂米糠（DFRB: defatted rice bran）および、本プロセスよりpI値の異なる条件下で回収されたタンパク質画分（pI: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0）においては、アレルゲンタンパク質の存在を示すバンドは認められなかった。このことは、脱脂米糠は、米油生産時において、有機溶媒によるFFRBからの油脂抽出、加熱処理が工程に含まれており、これらの工程により、原料米糠中の米アレルゲンタンパク質は分解されたものと推察される。併せて、米以外の食物アレルゲン（卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類）についても同様にアレルゲンタンパク質の分析を行った結果、これらアレルゲンは検出されなかった。よって、本プロセスにより回収されたタンパク質画分は米アレルゲンタンパ

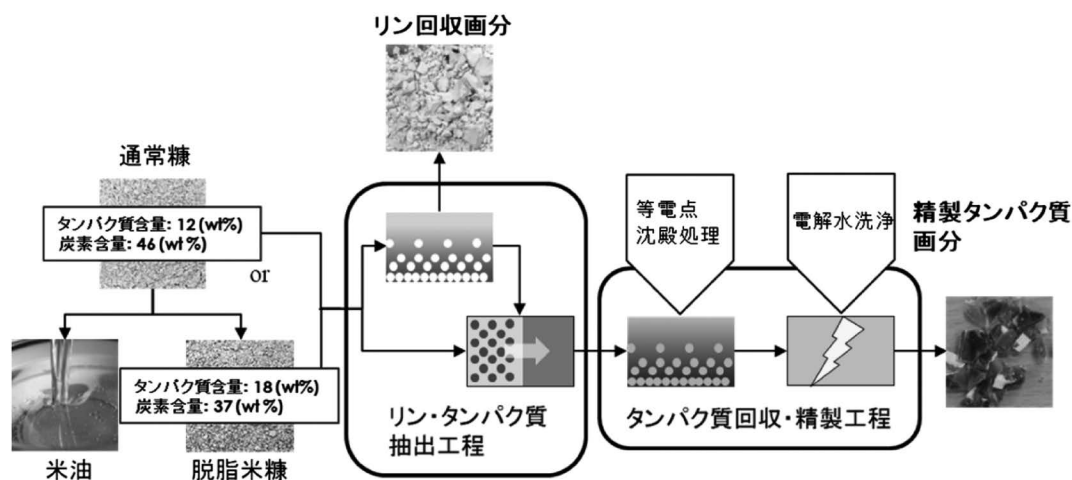


Fig. 1. タンパク質・リン連続回収プロセス（IP-EWT法）。

ク質を含有しない事、アレルゲンフリー（特定原材料として）であることから、安全なタンパク質供給源となりうる可能性が示唆された。

まだ解っていない事（解決すべき課題） 本技術の技術移転・事業化を検討するにあたり、DFRB からの IP-EWT 法による回収タンパク質の高純度・高収率化、機能性タンパク質の選択的回収・精製プロセスの構築が必要であるとともに、当該技術により回収・精製されたタンパク質のグルテンフリー食品原材料としての評価・解析を通じ、本技術により得られたタンパク質・リン成分の用途開発に不可欠な基礎情報（成分組成、諸特性、機能性等）のさらなる蓄積が必要である。

研究の課題

本研究では、次の3点の課題を設定した。

1. DFRB から 60% 以上のタンパク質含量を示すタンパク質画分を得ることが可能なタンパク質回収・精製プロセスの確立
2. 新技術（IP-EWT 法）による米糠由来タンパク質の選択的回収・精製と機能解析の実施
3. 技術移転、事業化を前提とした、本技術による脱脂米糠からの機能性タンパク質・リン生産コスト試算に基づくプロセスの再構築

本研究開発では、保有特許技術（特許第5819601号「米副産物のリン及びタンパク質の連続回収方法」）に等電点沈殿法・電解水処理を組み合わせることで、タンパク質回収・精製時の pH 値を一定保つことが可能となるため、タ

ンパク質の再可溶化による収率の低下を抑えるとともに、不純物である遊離糖や脂質成分、塩類の除去も併せて可能とする新技術を開発する。さらに、等電点沈殿法の特徴である固有の等電点を有するタンパク質への選択的な沈降性付与特性を利用した機能性タンパク質の選択的回収・精製について検討を行う。

研究の結果

従来の IP-EWT プロセスの再構築による、精製タンパク質回収画分のタンパク質含量、タンパク質回収率の向上について検討を行った結果、タンパク質抽出時の溶媒に占めるミネラル成分回収後の排水の割合を半減させることにより、精製タンパク質回収画分のタンパク質含量、タンパク質回収率、双方共に約10%向上させることが可能となった（Fig. 2）。回収タンパク質画分のタンパク質原料としての用途開発時に必要とされる吸油・水特性の結果を Fig. 3 に示す。タンパク質画分の吸油特性は、回収時の等電点の値に依存する傾向を示し、本傾向は、等電点の違いによる画分の疎水性基の露出による疎水性度の変化によるものと推察された。また、当該タンパク質は、既存の大豆タンパク質に相当する吸油・水特性を示した。タンパク質高次構造は、タンパク質を含む食品物性に大きな影響を与える。そこで、本プロセスにより得られたタンパク質画分の FT-IR デコンポリューション解析結果及び動的粘弾性解析結果をそれぞれ、Table 1, Fig. 4 に示す。FT-IR デコンポリューション解析結果、米タンパク質は、穀類（大豆、小麦）タンパク質と同様な2次構造由来のスペクトルパターンを示した。また、米タンパク質の2次構造（ β シート・

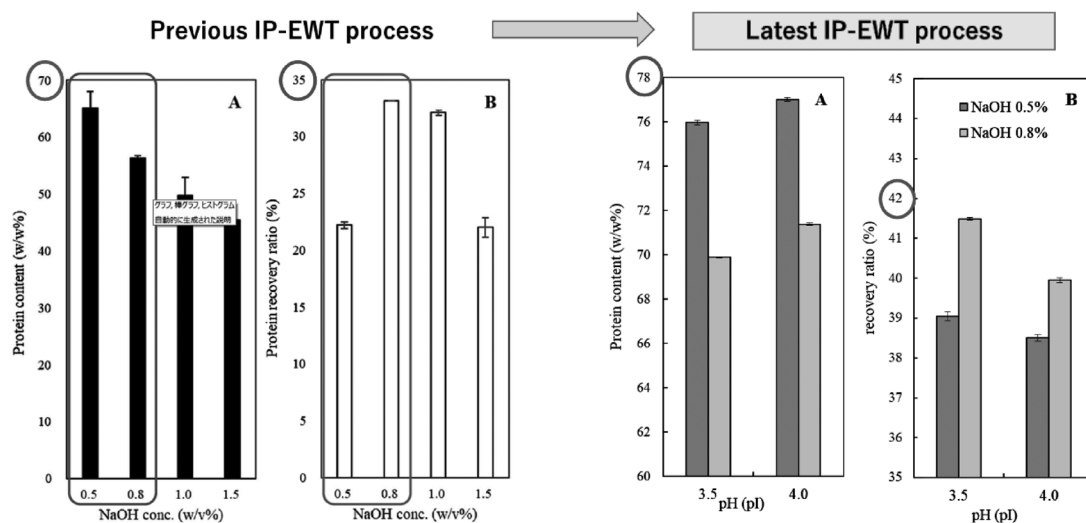


Fig. 2. Effect of NaOH concentration and iso-electric precipitation on rice protein extraction and recovery process for protein content and its recovery ratio of protein isolates from Heat stabilized defatted rice bran (HSDFRB).

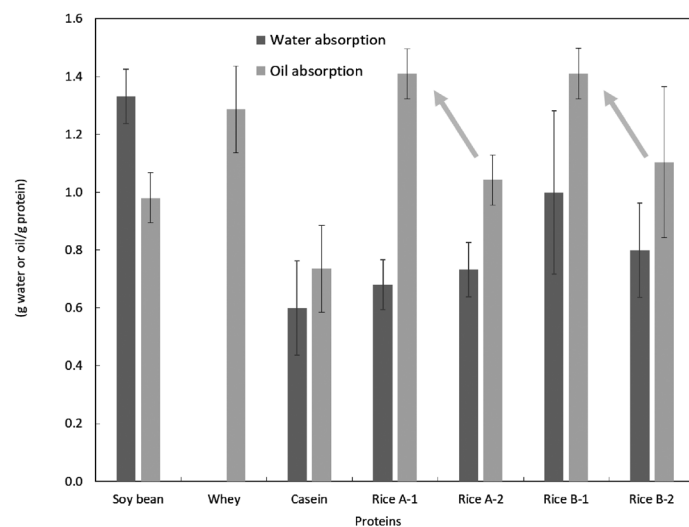


Fig. 3. Comparison of water and oil (soy bean) capacity of rice protein isolates and commercialized proteins.
Rice A-1: 0.5% NaOH, pH 3.5, Rice A-2: 0.5% NaOH, pH 4.0, Rice B-1: 0.8% NaOH, pH 3.5, Rice B-2: 0.8% NaOH, pH 4.0.

Table 1. Comparison of protein secondary structures determined by FT-IR spectroscopy-self-deconvolution.

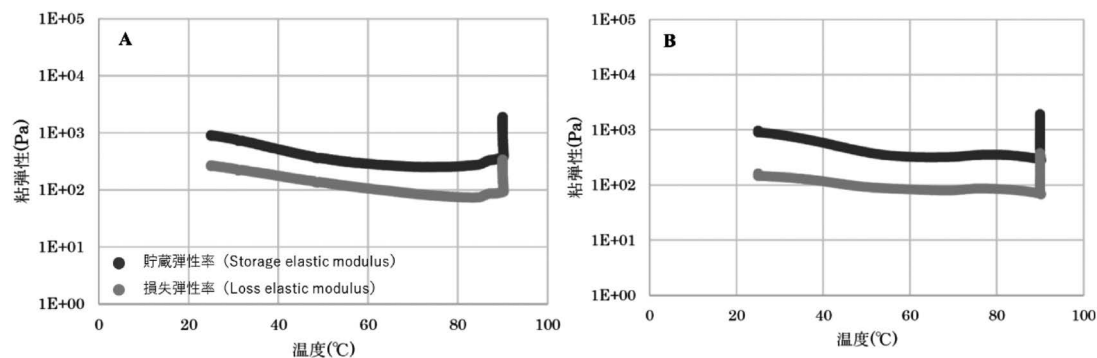
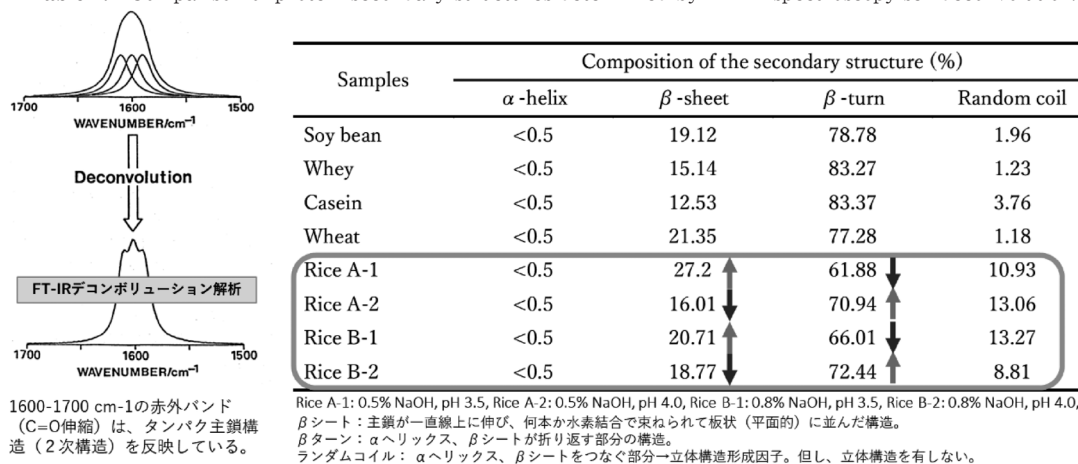


Fig. 4. Comparison of dynamic viscoelasticity of rice protein isolate (A) and soy bean protein (B).

ターン)は、等電点(回収・精製時)の影響を強く受けることが明らかとなった。動的粘弾性解析結果では、全ての温度条件下において、貯蔵弾性率が損失弾性率を上回り、ゲル状態を維持していることが認められた。また、粘弾性値より、米糠由来タンパク質画分は、大豆タンパク質に匹敵するゲル特性、弾性の双方を有していることが明らかとなった。

今後の実用化への展望

本研究により、米ぬか由来タンパク質の機能特性評価項目である、吸水・油特性、FT-IR デコンポリューション、DMA(動的粘弾性)解析の結果、米糠タンパク質は、大豆タンパク質と類似の食品機能特性を有していることが明らかとなった。さらに、タンパク質抽出・回収時の等電点の任意制御により、異なる食品機能特性を有するタンパク

質含有画分の取得が可能となり、アレルギーフリー・代替肉原料等の機能性食品原材料として、本タンパク質の適用領域拡大の可能性が示めされた。今後は、本基礎的知見を共同研究企業に提供し、アレルギーフリータンパク質含有栄養補助食品、代替肉製造開発に展開することを目指し、展示会への出品にも挑戦する予定である。

また、既設のプレパイロットプラントを用いた、IP-EWT法の電解水を用いた工程(脱塩処理、回収)の最適化により、従来のIP-EWT法よりも、回収タンパク質含量、タンパク質回収率をそれぞれ、10%以上改善することに成功し、70%を超えるタンパク質、フィチン含有画分の取得をそれぞれ可能にする本プロセスの変更内容の知財化(補正)、スケールアップへの対応等について、今後検討を進める予定である。

4. 第1回中小企業産学・産官連携 研究助成報告書

第1回中小企業産学・産官連携研究助成報告書

有用藻による商品化を目指したモノづくり

研究代表者 茨城大学，農学部，食生命科学科 朝山宗彦

中小企業研究責任者 バイオックス化学工業株式会社 佐々木大作

自然界から独自に単離した有用藻（緑藻パラクロレラ BX1.5 ならびに藍藻 ABRG5-3/SK1-2-1 株）の圧倒的な有用物質生産・特殊能力を活かし，屋外大規模培養による効率的生産条件や藻体回収技術の再検証や改善を行いながら，機能性食品（まるごとサプリメント，藻エキス入り発酵黒ニンニク）の試作品化ならびに化粧品・食品添加剤になりえる新奇酸性グルカン（多糖）やフィコシアニン（青色素タンパク質）の製造技術を開発することを目的とした．同時に有用成分や機能を分析し，モノづくりに向けた基盤情報とした．

1. 背景

微細藻類は，高い増殖力および光合成能を有することが知られている．加えて，安価な培地で培養することが可能で，場所や季節などにも制限されないことから“モノづくり（バイオリファインリー）”に適している．微細藻類の中でも特に緑藻（green algae）と藍藻（cyanobacteria）は，脂質や糖，タンパク質や色素などの有用物質を効率良く生産できることから，持続可能なバイオマスを提供する資源（resource）として，医薬・食品・燃料等の産業分野で注目されている．本研究で用いる緑藻 *Parachlorella* sp. BX1.5 ならびにシアノバクテリア 2種 *Pseudanabena* sp. ABRG5-3/*Limnothrix* sp. SK1-2-1 は，それぞれバイオックス社と茨城大学とが共同研究で単離・純化に成功した新奇天然藻であり，細胞内に有用な中性脂肪（TAG）あるいはアルカンや青色素タンパク質（フィコシアニン，PC），細胞外に多糖を生産することが明らかとなった有望株である（図1）．しかし，実用化のためには藻の大規模培養技術の確立，有用物質の効率的な誘導・蓄積培養条件の最適化，安価な抽出・加工技術の開発などが課題である．そこで微細藻類の培養と有用物質の特性・機能解析については，ここ 30 年間の豊富な知識と経験を有する茨城大学農学部の朝山教授に相談して本事業に応募し，採択（採択番号 SME-3）に至った．

本事業では，①緑藻 BX1.5 株の屋内外培養条件の検討，および細胞内 TAG や細胞外多糖（EPS）の特性・機能解析を行うことにより，それを製品開発の基盤とした．一方，

②糸状性シアノバクテリア ABRG5-3/SK1-2-1 株に関しては，これまでスピルリナ株のみで実用化されてきたフィコシアニン製造法に対し，本事業では培養細胞に水だけを添加することで容易に細胞破碎を促し，フィコシアニンを高効率で回収することができる「水添加抽出法」の開発にチャレンジし成功した．得られた ABRG5-3/SK1-2-1 株由来のフィコシアニンと市販されているスピルリナのそれとを，温度・pH・光などの環境条件下での安定性や抗酸化能の面から比較して特性を評価することにより，飲食品などモノづくりへの礎とすることを目的とした．

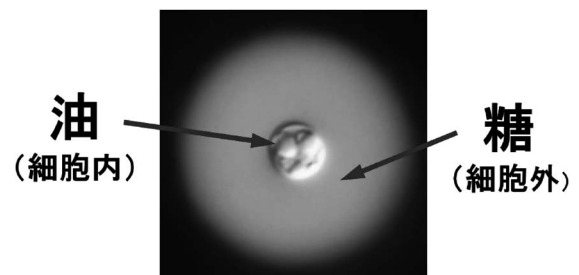


図1. 油と多糖を共生産する新種藻 BX1.5.

2. 研究成果

(2-1) 緑藻パラクロレラ BX1.5 の研究成果

本株を BG11-N/-P 培地で培養した場合，C16 飽和脂肪酸（C16:0，燃料向き）ならびに C18 不飽和脂肪酸（C18:2，C18:3，食用油向き）を主成分とする TAG が効率

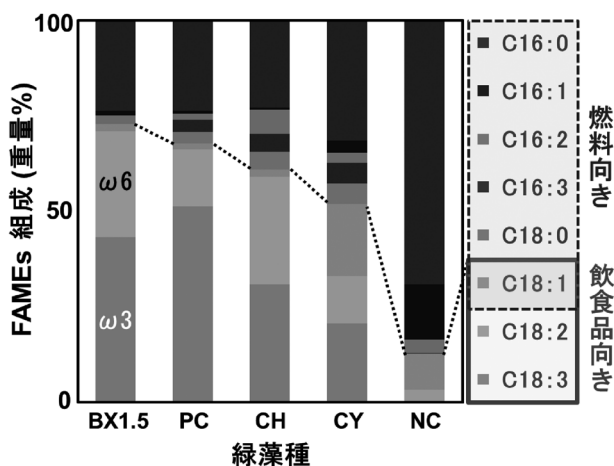


図2. 緑藻脂質の組成比較.

良く蓄積されていた。しかし、この培養条件ではバイオマスそのものが低減することから、2%炭酸ガス供給下BG11培地で培養することの方が、相対的にTAG生産に有効であることが明らかとなった。乾燥菌体重量あたりに占めるFAMES組成を緑藻 (BX1.5, パラクロレラ PC^[1], クロレラ CH^[1], クラミドモナス CY^[2], ナンノクロロプシス NC^[3]) 間で比較しても、BX1.5脂質は $\omega 3/\omega 6$ 油の含量が他種に比べ、豊富なことが示された (図2)。

BX1.5細胞を一定の環境ストレス条件下に晒したところ、酸またはアルカリ (pH 2, 11)、高温度 (50~70℃)、紫外線 (UV) 照射、乾燥 (熱、凍結乾燥) などに対して耐性を示した (図3, 挿入部分)。この耐性は、BG11-N/-P培地由来細胞間で一部異なるパターンを示したことから、培地pHに加え、細胞内の脂質やクロロフィルa蓄積量などの差も、ストレス耐性へ影響している可能性が示された^[12,17]。現在、この優れた耐性能を活かして10トン規模での屋外培養を行っており、良好な成績をあげている (図3)。

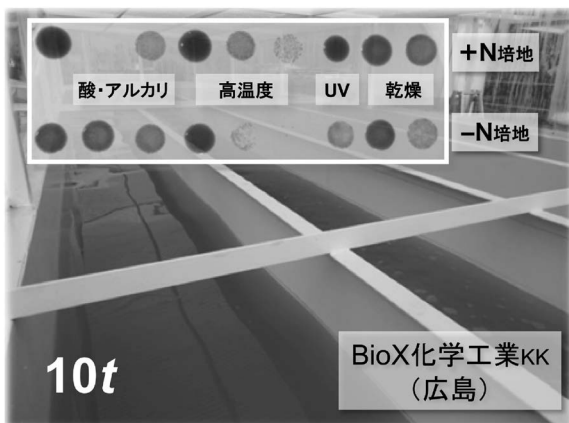


図3. 環境ストレス耐性と屋外培養.

次にBX1.5株を窒素欠乏BG11-N培地で培養し、生産させた細胞外多糖 (以下、BX1.5 EPS) をエタノール抽出により精製した。得られたEPSエキスを粉末をイオン交換水に溶かし、これをゲル濾過HPLCクロマトグラフィーに供した。その結果、BX1.5 EPSの絶対分子量の平均は、175 (~211) 万ダルトンであった。これは、天然多糖としては、シアノバクテリア *Aphanothese sacrum* (和名スイゼンジノリ) 由来の硫酸ムコ多糖 (サクラン: 200~1,600 万ダルトン^[3]) に次ぐ超高分子である。以上の分析結果を含め、BX1.5 EPSの成分分析値、絶対分子量、水溶液中で分散している状態での分子回転半径の測定値を【表1】および【表2】に示す。得られた多糖エキスのうち、約10%は蛋白質を含み、約74%が糖を含んでいた。多糖は、ラムノースを主成分とすることからラムナン (rhamnan) であり、さらにウロン酸の一種を含むことから酸性ラムナンであることが明らかとなった。また赤外分光分析 (FT-IR) により、IRスペクトルを取得したところ、BX1.5 EPSについて、硫酸基は検出されなかった。緑藻 *Monostroma nitidum* (和名ヒトエグサ) の多糖は、ラムナン硫酸 (分子量 8.7×10^5 ダルトン) と呼ばれるように、ラムノースを主成分 (全糖の約80%) とする側鎖に硫酸基を有する^[4-6]。このように微細藻類由来の酸性多糖の多くは多糖構造の側鎖に硫酸基を有するが、BX1.5 EPSの酸性 (ウロン酸) ラムナンは特徴的であった^[11,16]。

表1. BX1.5 EPS (エキス) の特性

全糖含量 (乾燥重量%)	蛋白質含量 (乾燥重量%)	絶対分子量 (Da)	分子回転 半径 (nm)
73.8	9.6	1.75×10^6	181.5

表2. BX1.5 EPS (エキス) の単糖組成

糖組成 (モル%)				
Rha	Gal	Glc	Xyl	GalA
49	16	13	13	9

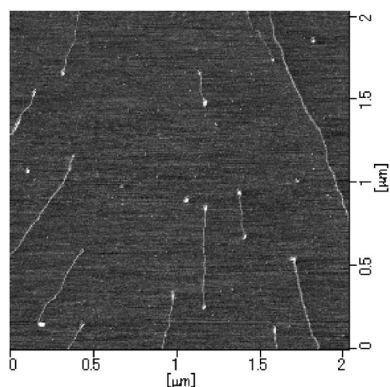


図4. BX1.5 EPSの原子間力顕微鏡像.

更に、BX1.5 EPS の分子構造を、原子間力顕微鏡 (AFM) で解析した。その結果、BX1.5 由来多糖は、凡そ直鎖構造を持つことが示された (図4)。AFM で測定した1分子の鎖長は平均0.5~1.2 μm と算出された。直鎖構造を有する多糖としては、非光合成微生物アルカリゲネス由来のカードラン (平均分子量 $>2.0 \times 10^5$ ダルトン) や紅藻由来の κ -カラギーナン (平均分子量 $1 \sim 2 \times 10^5$ ダルトン) が挙げられ、食品添加剤などに利用されてきた。これまで微細藻類由来の多糖は、分岐 ($\beta 1 \rightarrow 6$ 結合) 構造を有しているものが一般的であったが、今回、BX1.5 EPS のように概ね直鎖構造を持つものは初めてである。

図4 で用いた多糖及び他の多糖について、以下のとおり、水溶液 (水分散液) の粘度特性とゲル形成性を調べ、比較した。最終濃度が 0.1 (w/w) %, 0.2%, 0.5%, 1.0%, 又は 5% になるようにイオン交換水で希釈し、多糖濃度が異なる試料を調製した。各試料の 0.5 mL を用い、温度調節機能を有するコーンプレート型粘度測定器 (ブルックフィールド社; LV-DV2T, コーンプレート CPA-52Z) で、20℃における絶対粘度を測定した。また多糖の水溶液を 4℃で 24 時間冷蔵保存し、ゲル形成の有無を評価した。多糖としては、BX1.5 EPS (直鎖) の他、グアーガム (分岐)、ペクチン (分岐)、大豆多糖類 (多分岐)、アラビアガム (多分岐)、 κ -カラギーナン (直鎖)、カードラン (直鎖)^[7] を使用した。直鎖構造を有する多糖類は一般的に粘度が高い傾向にあるが、BX1.5 EPS (酸性ラムナン) は、今回調べた直鎖構造を有する多糖類の中では最も水溶液の粘度が低く、また 0.5~10% の水溶液においてゲルを形成しなかった。また、BX1.5 EPS は、高濃度 (5~10%) においてゲルを形成しないものの、粘稠性に優れたゾルを形成した (高粘度及び粘稠性により粘度の測定不可)。一方、多分岐構造を有する多糖類は粘度が低く、10% 水溶液でも 11.5 mPa·sec (アラビアガム) や 110 mPa·sec (大豆多糖類) に留まった。それ故、BX1.5 EPS は、水に溶け、低濃度で高い粘性を示し、かつゲルを形成しない (ゾル化する) 独特な性質を有する多糖類であることが明らかとなった。なお予備的実験として、BX1.5 EPS は、少なくとも 20% 程度までは水に溶解させることができることが示された。

BX1.5 EPS 水溶液の粘度の温度依存性を調べるため、図4 で用いた多糖を濃度 1% になるようにイオン交換水に懸濁後、70℃で 20 分加熱溶解した。得られた水溶液の 0.5 mL を用い、温度調整機能を有するコーンプレート型粘度測定器によって絶対粘度を測定した。粘度の測定は、10℃, 20℃, 及び 40℃で行った。比較のため、 ι -カラギーナン又は、 κ -カラギーナンを同じ手順で調製し、粘度測定を行った (対照区)。図5 に示すように、BX1.5 EPS (酸性

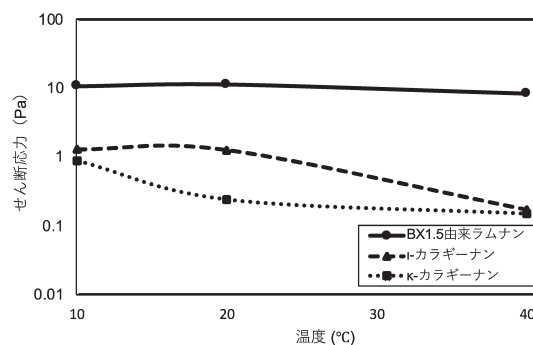


図5. BX1.5 EPS 水溶液の温度非依存性粘度。

ラムナン) 水溶液は、少なくとも 10℃ から 40℃ の温度帯で粘度がほとんど変化せず、広い温度範囲で安定した粘度をもたらすことが示された。このように、多糖 BX1.5 由来ラムナンの粘度が、一般的な温度帯 (特に 10℃~40℃) で変化しにくいことは、食品添加剤や化粧品添加剤としての優れた特性を示していた^[11,16]。

乳化油滴の分散安定化と流動性改善を目的に、BX1.5 EPS を配合した、乳化タイプのマヨネーズ様食品 [例えば、キャノーラ油分 40~50 (w/w) %, BX1.5 EPS 0.3% 配合など] を調製した。調製したマヨネーズ様食品を冷蔵庫で 12 日間保存し、6 日目と 12 日目にオイルオフ (油分離)、凝集の有無を目視で確認した。また、乳化油滴のメディアン粒径をレーザー回折式粒度分布計 (SALD-2200; 島津製作所) で測定し、20℃における粘度を音叉式粘度測定装置 (SV-10A; A&D 社) で測定した。オイルオフや沈殿が少ないほど安定性が高く、また凝集が認められないか又は少ないほど安定性が高いことを示す。粒度分布は 12 日間の保存期間中の変化が少ないほど安定性が優れることを示す。試験の結果、BX1.5 EPS を含むマヨネーズ様食品では、油分 40% 及び 50% の条件下で油の分離と油滴の凝集が認められなかった。油滴粒子のメディアン粒径の経時変化が少なく、経時的な粘度増加も少ないことから、BX1.5 EPS を添加したマヨネーズ様食品は安定性に優れていることが示された。一方、キサントランガム (*Xanthomonas campestris* 由来: グルコースを主成分とする分岐型多糖、分子量約 200 万ダルトン) を含むマヨネーズ様食品では、油分 40% 及び 50% の条件下で油滴粒子の凝集 (図6A)、油滴のメディアン粒径の粗大化、並びに粘度の大幅な経時的増加が認められた。本評価系で、キサントランガムは配合量 0.3% では十分な保存安定性をもたらさなかった。以上の結果から、BX1.5 EPS は、食品安定剤として使用されているキサントランガムに勝る乳化安定化機能を有することが示された。

マヨネーズをピザトースト等の製造のために調味料とし

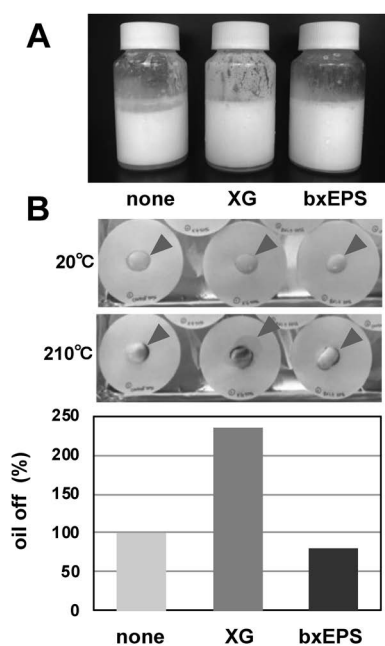


図6. BX1.5 EPS の乳化安定と焼成耐性効果.

て利用する場合、加熱した場合に油の分離が認められないこと、すなわち乳化状態が維持されることが望まれる。そこで、前述したマヨネーズ様食品を用いて、加熱焼成時の安定性（焼成耐性）について検討した。マヨネーズ様食品各1 mLを、No.1濾紙（ADVANTEC社）に垂らし、オープン（MRO-TS8; HITACHI）で210℃で3分間加熱した。加熱後、オープンから取り出した直後に濾紙上の油染みの外縁をマーキングし、デジタルマイクロSCOPE（VHX-200; キーエンス社）で画像を読み取って油染みの面積を計算した。試験は3回実施して面積の平均値を算出した。安定剤を含まない比較品の油染みの平均面積を100とし、それに対する、安定剤を含む試験品のそれぞれの油染みの平均面積の相対サイズ（オイルオフ面積）を算出し、各マヨネーズ様食品の焼成耐性を評価した。BX1.5 EPSを含むマヨネーズ様食品は、加熱により生じたオイルオフ（油分の染み出し）が少ないことから、加熱しても乳化状態を保持する機能が高いことが示された（図6B）。すなわち、BX1.5 EPSは油脂と馴染みやすく、熱処理にも安定であり、その点でも食品添加剤として好ましい特性を有している。

BG11液体培地を用いておよそ2日間、2%CO₂ガスを供給しながらBX1.5株を振とう培養した。得られた培養物の100 μLを、1.5 mL容マイクロチューブに採集し、これを高速遠心機にかけ、培養上清を捨てて菌体を回収した。得られた菌体塊に、0.5% (w/v) EPS水溶液を100 μL添加する（試験区）か、又は何も添加しない（菌体のみ：対照区）ことにより、試料を調製した。なお使用したEPS水溶液は、実施例1で回収した多糖BX1.5EPSに0.5% (w/v) 濃度と

なるように水を添加し、90℃で数分間加熱融解後、室温に戻したものである。

各試料を、熱乾燥（42℃で一晩）又は凍結乾燥（-80℃で凍結後、0.002 mBar設定条件下で真空乾燥を210秒）に供した。乾燥後の各試料に100 μLのBG11液体培地を添加し、その混合液のうち5 μLを採取してBG11寒天培地にスポットした。比較のため、凍結乾燥前のそれぞれの試料であって-80℃で凍結しておいた試料（凍結融解試料）に、100 μLのBG11液体培地を添加し、その混合液のうち5 μLを採取してBG11寒天培地にスポットした。また、上記と同様にして調製した菌体塊に、0.5%EPS水溶液（試験区）、又は滅菌水（対照区）を100 μL添加して混合し、試料毎に混合液全量を96穴プレートの1穴に移した。この試料に紫外線（UV光源から4 cmの距離で100 μmol photons m⁻² s⁻¹）を10分間照射後、5 μLを採取し、BG11寒天培地にスポットした。このようにして各試料をスポットしたBG11寒天培地を、白色蛍光灯（30 μmol photons m⁻² s⁻¹）下、30℃で5～10日間連続して培養した。この培養中、5日目、8日目、及び10日目の寒天培地を観察し撮影を行った。結果を図7に示す。

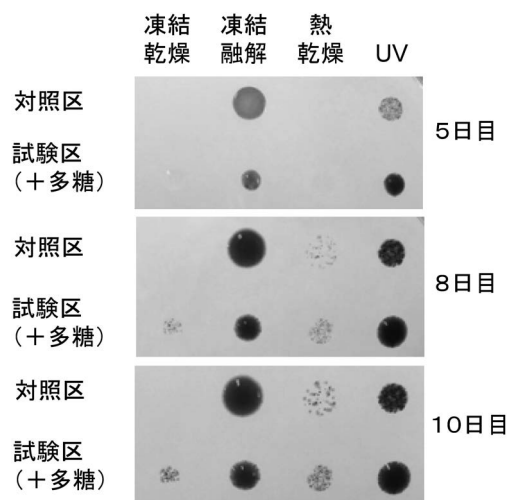


図7. BX1.5 EPS の環境ストレス耐性付与効果.

まずBX1.5株の生育は、凍結融解を経ても可能であることが明らかとなり、これは本株の長期保存が可能である特長を示している。また、多糖を添加した試料でも、凍結融解を経た再培養で生育が可能であることが明らかとなった。さらに、凍結（真空）乾燥、熱乾燥、又は紫外線（UV）処理のいずれのストレス下でも、多糖を添加した試験区の方が、無添加の対照区と比較して、より良好な生育を示した。この結果は、BX1.5EPSが、熱、減圧（真空）、乾燥、及び紫外線などの環境ストレスに対する抵抗性（環境スト

レス耐性)の増加を生存細胞にもたらすことを示す。このような環境ストレス耐性増強作用は、例えば、化粧品添加剤、培養系添加剤、又は医薬品添加剤としてのBX1.5EPSの有用性を示していた^[11,16]。

(2-2) 藍藻ABRG5-3/SK1-2-1の研究成果

糸状性藍藻(シアノバクテリア)、シュードアナベナABRG5-3株ならびにリムノスリックスSK1-2-1株をそれぞれ室内30℃、30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 白色蛍光灯照射下、5LのBG11液体培地で約1ヶ月培養した。培養後、それぞれの菌体を遠心により回収し、菌体塊体積1に対し16倍の脱イオン水を添加したのち、これらを暗黒下で3から12日間室温で静置し、溶菌とフィコシアニンの上澄液への滲み出しを促した。

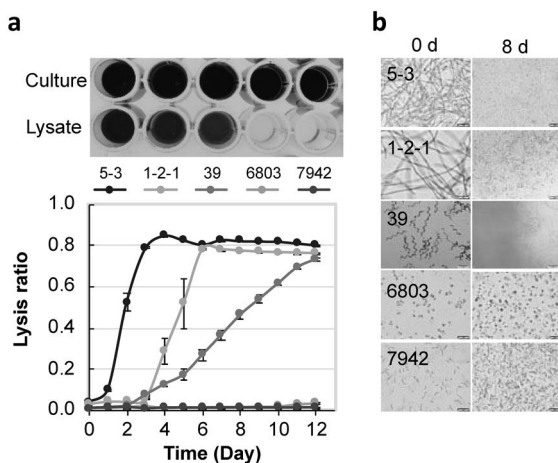


図8. 糸状性藍藻の水添加溶菌とフィコシアニン上澄液。

その結果、図8に示すように糸状性藍藻ABRG5-3, SK1-2-1, NIES-39(スピルリナ)株で溶菌液の上澄にフィコシアニンの滲み出しが確認された(図8a)。一方、球菌PCC6803株や桿菌PCC7942株では同条件下で溶菌は認められなかった(図8b)。これにより、水添加溶菌法が糸状性藍藻由来フィコシアニンの滲み出しに有効なことが明らかとなった。得られたフィコシアニン上澄液に活性炭を添加して、夾雑物を除去し、ONEステップによる精製を行なった。

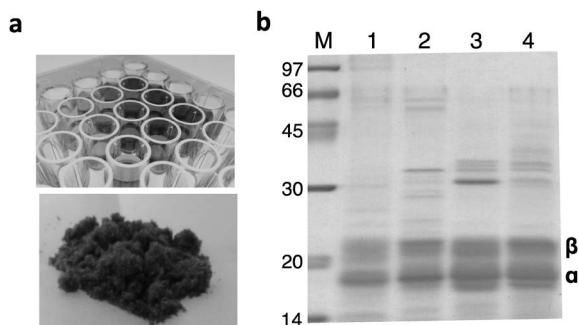


図9. 精製フィコシアニン。

その結果、図9a(上段、上澄液;下段、フィコシアニン粉末)と図9b(精製フィコシアニンのSDS-PAGE: M, 分子量マーカー; 1, ABRG5-3; 2, SK1-2-1; 3, NIES-39; 4, スピルリナ由来市販品)に示すように糸状性藍藻3株ABRG5-3, SK1-2-1, NIES-39(スピルリナ)由来フィコシアニン精製品は、スピルリナ市販品のそれと同程度かそれ以上の精製度であった。以上は、活性炭によるONEステップの精製が非常に有効であることを示唆していた^[15]。

得られた精製フィコシアニンを用いて、温度(55℃, 5時間)と強光(100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 白色光, 72時間)曝露条件下におけるpH(4, 5, 7)での安定性を調査した。その結果、熱安定性に関しては、ABRG5-3とSK1-2-1株由来のそれは、pH5(弱酸性)で約60%が5時間後も安定維持されており、これはスピルリナ由来のものと同程度であった(データ示さず)。また、強光曝露下ではスピルリナ由来のそれが72時間後には20%程度安定性が減少するも、ABRG5-3とSK1-2-1株由来のそれらは、ほぼ100%安定を維持していた(データ示さず)。さらにABTS法により精製フィコシアニンの抗酸化能を測定した。その結果、図10に示すように、ABRG5-3, SK1-2-1, NIES-39(スピルリナ)の精製品は、スピルリナ市販品とそれとほぼ同程度の抗酸化能を示した。以上の結果は、ABRG5-3/SK1-2-1由来フィコシアニンの安定性や抗酸化能が市販のスピルリナのそれと同等(あるいはそれ以上)であり、実用化の可能性が示唆された^[15]。

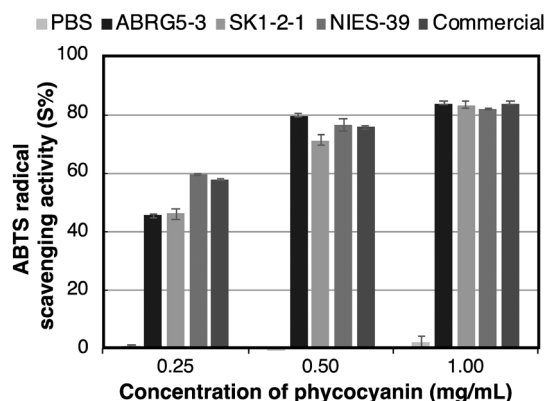


図10. 精製フィコシアニンの抗酸化能。

3. 今後の課題と展望

多糖に関しては、本事業で用いたパラクロレラBX1.5株の他にも、例えば南米パタゴニア地方の塩湖から単離されたパラクロレラ株が菌体外に生産する多糖が知られている^[8]。この分岐を含む多糖の成分は、ガラクトースを約70%、アラビノースを約23%含んでおり、BX1.5のそれとは全く異なり、マウス腫瘍形成の抑制効果を示すことが明

らかになっている^[9]。一方、シアノバクテリア（藍藻）の一種、スピリリナは従来、食用にされてきたが、菌体外多糖スピランは、BX1.5EPSと同様に、ラムノースを60%程度含む分岐型の酸性（ウロン酸：GalA&GlcA）ラムナンであり、腫瘍転移抑制作用が認められている^[10]。以上のように、微細藻類EPSの化粧品・医薬品への応用が期待される。現在、パラクロレラ BX1.5株の利用に関しては、熟成黒ニンニクや藻コンニャクの商品化に成功し、販売に至っている。今後は、BX1.5株を丸ごと利用した（例えば、サプリメント）製品開発に加え、本事業で使用したBX1.5 EPSを用いた化粧品（例えば、発毛、美白、抗炎症作用を有する等）・医薬品（抗ウイルス感染、抗ガン、培養促進効果を有する等）の開発が期待される（図11）。そのためには、菌体外多糖を更に効率よく生産・加工する技術やそれらEPSの機能を実証する必要があるが、化粧品成分の国際命名法（INCI名）^[14]として「BX1.5 エキス」が登録できたことは、今後の社会実装に弾みがつくものと期待される。一方、藍藻由来の青色色素タンパク質フィコシアニンに関しても、飲食品の添加・着色剤の他、医薬品などの素材としての可能性について研究開発中である。また今回は書面の関係上説明を割愛したが、他の有用藻も用いたバイオリファイナリーの基盤技術の開発も行なっており^[13,18-32]、企業と大学との共同研究が将来的にますます発展し、産業化につながるよう鋭意努力をしてゆきたい。

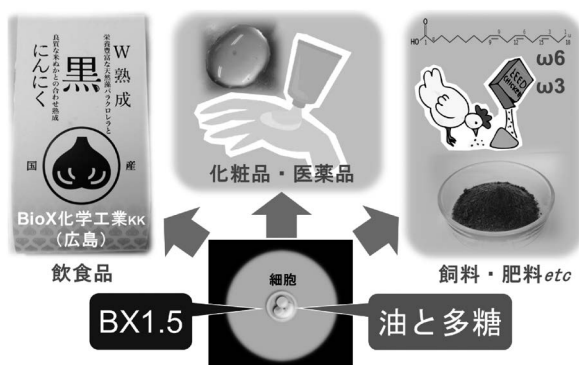


図11. BX1.5藻バイオリファイナリーの可能性。

4. 謝辞

本事業（採択番号SME-3）遂行に際し、多大なるご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に心より感謝し、ここ敬意を表します。また多糖の研究では、貴重なご助言をいただきました中村彰宏博士（茨城大学教授・不二製油未来創造研究所所長）に心よりお礼申し上げます。

5. 引用文献

- [1] 特開2019-17328（公開日2019.2.7）

- [2] 特願2019-009792（出願日2019.1.23）
 [3] 特許第406644（国際特許公開WO2008/062574）：「糖誘導体とその利用」
 [4] Whe-Jun *et al.* Carbohydrate Polymers (2008) 74巻, 834-839頁
 [5] Lee *et al.* Carbohydrate Polymers (2010) 81巻, 572-577頁
 [6] Supatra *et al.* International Journal of Biological Macromolecules (2011) 48巻, 311-318頁
 [7] 特許第4110255号：「カードランからなる液晶ゲル及びその製造方法」
 [8] 特開2014-25035：「新規多糖体」
 [9] Ishiguro *et al.* PLOS ONE (2017) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175064>
 [10] 特開平9-176022：「腫瘍転移抑制剤」

6. 本事業関連の実績

(6-1) 特許等

- [11] 「緑藻由来多糖及びその製造法」
 特許第6712709号（登録日2020.6.4）
 [12] 「緑藻を用いた有用脂質製造法」
 特許第6647593号（登録日2020.1.17）
 [13] 「混合液混合種培養によるバイオ燃料生産技術」
 特許第6603305号（登録日2019.10.18）
 [14] 「Parachlorella sp BX1.5 Extract」(INCI名)
 (国際命名の取得日2019.6.19)
 「パラクロレラ BX1.5 エキス」(化粧品の成分表示名)
 (日本化粧品連合会より取得日2020.7.21)

(6-2) 学術論文

*Corresponding author; Authors of this project.

- [15] Aoki J, Sasaki D, *Asayama M: Development of a method for phycocyanin recovery from filamentous cyanobacteria and evaluation of its stability and antioxidant capacity. *BMC Biotechnology*, 21:40 (2021) <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00692-9>
 [16] Sasaki M, Takagi A, Sasaki D, Nakamura A, *Asayama M: Characteristics and function of an extracellular polysaccharide from a green alga *Parachlorella*. *Carbohydrate Polymers*, 254 (2021) 117252 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117252>
 [17] Sasaki M, Takagi A, Ota S, Kawano S, Sasaki D, *Asayama M: Coproduction of lipids and extracellular polysaccharides from the novel green alga *Parachlorella* sp. BX1.5 depending on cultivation conditions. *Biotechnology Reports*, 25, BTRE e00392 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00392>

(6-3) 学会発表等 下線は、本事業の参画者

- [18] 高木明香莉, 福田寛史, 高橋正俊, 沼野節子, 朝山宗彦「ラン藻と水性根粒菌の共生生態と共培養による新しいモノづくり」第43回日本分子生物学会年会2020（12月2-4日, 発表3日）オンライン開催（神戸）ポスター発表3P-0431（プログラム集FJ0333）
 [19] 渡邊明花, 菅原卓也, 鎮西真理子, 兼崎 友, 中平洋一, 朝山宗彦「糸状性ラン藻 *Pseudanabaena* 株シグマ因子 SigB の特徴づけと発現解析」第43回日本分子生物学会年

- 会2020（12月2-4日，発表3日）オンライン開催（神戸）ポスター発表3P-0060（プログラム集FJ0315）
- [20] 石田怜也，高木明香莉，朝山宗彦「緑藻パラクロレラ屋内培養条件の検証」日本農芸化学会関東支部2020年度大会オンライン開催口頭発表2C-5（要旨集p35）
- [21] 佐々木大作，朝山宗彦，高木明香莉「藻によるモノづくり」第6回BRAVE 2020大会（10月17日）遠隔・対面式併用ピッチ会<https://brave.team/blog/2020/10/29/brave-2020/>
- [22] 朝山宗彦，高木明香莉，佐々木大作「藻産業の技術革新の基盤を作るバイオフィナリー」第7回アグリテックグランプリ 2020年度大会（9月26日）対面式ピッチ会，東京・汐留三井化学本社<https://techplanter.com/atg2020/>
- [23] 朝山宗彦「藻によるモノづくり～探索・遺伝子・物質生産～」日本農芸化学会2019年度大会（3月28日）九州大学シンポジウム口頭発表S0131（4SYa6-1）
*新型コロナウイルス対応により要旨登録発表
- [24] AOKI Jinichi, ASAYAMA Munehiko「A new manufacturing method for phycocyanin from novel filamentous cyanobacteria」第42回日本分子生物学会年会2019（12月3-6日，発表4日）パシフィコ横浜ポスター発表2P-0675（プログラム集p360）
- [25] 佐々木大作，佐々木智子，朝山宗彦「藻によるモノづくりで未来を創造する藻類カンパニー」第14回広島県信用金庫合同ビジネスフェア 2019（11月13日）広島グリーンアリーナ，スタートアップ・金の卵ゾーン（出展集p19）
- [26] 高木明香莉，佐々木大作，朝山宗彦「藻バイオフィナリー（藻によるモノづくり）」第3回茨城テックプランター2019（11月9日）常陽藝文センター（水戸市三の丸）ファイナルプランブリ出場・口頭発表（企業賞・協賛発酵バイオ賞受賞：チーム MoMo, <https://techplanter.com/>
- 2019/11/12/2019-11-9-ibaraki-grandprix/）
- [27] 高木明香莉，佐々木美月，朝山宗彦「有用油脂生産藻の特性分析と環境ストレス耐性評価」第71回日本生物工学会年会2019（9月16-18日，発表16日）岡山大学津島キャンパス口頭発表（トピック採択発表）1Bp-12（要旨集p105；トピック要旨集p38-39）
- [28] 佐々木大作，佐々木智子，朝山宗彦「藻によるモノづくりで未来を創造する藻類カンパニー」Class A主催コンベンション 2019（9月8日）パシフィコ横浜アネックスホール（出展ブース番号27，出展集p5）
- [29] 佐々木美月，高木明香莉，中村彰宏，佐々木大作，朝山宗彦「緑藻パラクロレラ新素材によるバイオリファインリーの新展開」日本農芸化学会関東支部2019年度大会（9月7日）筑波大学口頭発表0-7（要旨集p17）
- [30] 渡邊明花，菅原卓也，鎮西真理子，兼崎友，中平洋一，朝山宗彦「糸状性ラン藻*Pseudanabaena*株シグマ因子SigBの特徴と発現解析」日本農芸化学会関東支部2019年度大会（9月7日）筑波大学ポスター発表P22（要旨集p33）
- [31] 朝山宗彦「藻由来油脂と多糖の新素材（藻バイオリファインリーの可能性）」JST主催イノベーション Japan 2019～大学見本市～（8月29-30日）東京ビッグサイト・青海展示棟Bホール：ポスター展示ライフサイエンスL-10，ショートプレゼンテーション（口頭発表）0830-A-19
- [32] 朝山宗彦（招待講演）「油と糖の共生産藻などによる機能性バイオ」第7回機能性バイオミニシンポジウム～藻類バイオとOPERAの新たな展開に向けて～ JST_OPERA プロジェクト主催東京大学柏の葉キャンパス駅前サテライト（2019年7月4日）口頭発表（ポスター part 3）

UV-LED照射による醸造用ブドウ果皮のポリフェノール含量の増進

研究代表者 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 岡澤敦司
中小企業研究責任者 カタシモワインフード株式会社 高井利洋

1. 背景：企業からの説明

大阪河内のワイン醸造は100年の歴史をもつ。ブドウ栽培の歴史はさらに古く，柏原市では約300年前からブドウが栽培されていた記録が残っている。現在もごく限られた地域での栽培ながら，大阪府は全国9位のブドウ収穫量を誇る。赤ワインの製造において，特にブドウ果皮の色素であるアントシアニン含量がワインの品質を左右する。日本で醸造用のブドウを栽培する場合，例えば，メルローなど欧州の品種を育ててもアントシアニン含量が期待するほど上がらないことがあり，問題となっている。さらに，近年，猛暑やゲリラ豪雨などの天候不順によって，ブドウ果実の色付きが悪くなるなど，品質低下が問題となっている。そこで本研究では，大阪府立大学で発明された植物のポリフェノールの増産方法を用いて，ブドウ果皮のアントシア

ニンなどのポリフェノール含量を高めるための技術開発を行うこととした。

カタシモワインフード株式会社で栽培したワイン醸造用ブドウ品種に種々の条件で，大阪府立大学の岡澤らが作成したLED光源を用いて特定の波長のUVを照射し，大阪府立大学にて成分の変化を解析した。また，大阪府立環境農林水産総合研究所にて，UV照射と未照射のブドウを用いてワインの試験醸造を行った。

UV照射によっては，品質向上を期待できるほどのアントシアニンの増産は認められなかった。一方，ブドウの機能性成分として良く知られているレスベラトロールの著しい増量が認められた。また，試験醸造を行ったワインについてUV照射による香りや味の変化が認められた。直ちに，事業に応用するには至らないものの，大阪府立大学での研

究を継続することによって、ワインの高品質化につながる技術が確立される可能性が示された。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

〈研究に関する背景〉植物のUV応答に関し、分子遺伝学研究によって受容体蛋白質UVR8を起点とするシグナル伝達経路や、誘導される芳香族代謝物の生合成に関わる酵素遺伝子などが明らかにされている。しかし、そのUV応答の波長特性を調べた研究事例は限られており、植物のUV応答を食資源の高付加価値化に利用するための知見が不足していると考えた。そこで、研究代表者はUV-LEDを製造する日亜化学工業(株)と共同で、UV-LEDを用いて波長毎の代謝変動を解析した。その結果、UV-B域では280 nmにピークをもつLED光が顕著に芳香族化合物の代謝を誘導することを発見した¹⁾。そこで、大阪の重要な農作物の一つであるブドウに得られた知見が適用できるかどうかを検討することとした。

研究の詳細

①シロイヌナズナの280および310 nm UV-B応答のオミクス解析

280 nm UV-LEDに対する植物の特異的な応答を理解するために、280および310 nm UV-LEDをそれぞれ照射したシロイヌナズナについて、トランスクリプトミクスおよびメタボロミクスを実施した。その結果、遺伝子発現および代謝物量のいずれも280 nmの照射によってのみ顕著に変動し、特にTCA回路、ポリアミン、脂質、および、芳香族化合物の代謝が亢進した(論文投稿中)²⁾。

②ブドウの290 nmのUV-B応答のオミクス解析

カタシモワインフード株式会社に栽培したワイン醸造用ブドウに290 nmにピークをもつUV-LED光を照射し、トランスクリプトミクスおよびメタボロミクスを実施した。その結果、当初期待したアントシアニンに対する効果は認められなかったものの、機能性ポリフェノールとして知られるレスベラトロールについて顕著な増加を確認した。こ

の増量は、ブドウ品種を問わず検討した全ての品種で確認された(投稿準備中)。また、UV照射を行ったブドウを用いて大阪府立環境農林水産総合研究所にて試験醸造を行った。官能評価の結果、味と香りにわずかながらも変化が確認でき、UV-LEDをワインの品質向上に利用できる可能性が示された。

考察と展望

UV-LEDを用いた一連の実験によって、植物のUV応答には波長特性があり、食資源の高付加価値化にはその特性を理解することが必要であることが示された。UV応答がよく研究されているシロイヌナズナにおいてさえ、既知のシグナル伝達モデルでは、本研究で示された280と310 nmに対する応答の違いを説明できなかったことから、UV-LEDは植物のUV応答をさらに正確に理解するために用いることが可能ということが明らかになった。今後、シロイヌナズナおよびブドウをはじめとする実用植物についてUV応答を詳細に解析することによって、UV-LEDによる食資源の高付加価値化が可能と考えられる。

3. 謝辞

本研究を助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。また、UV-LEDをご提供いただいた日亜化学工業株式会社、並びに、ワインの試験醸造とブドウ栽培試験にご協力いただいた大阪府立環境農林水産総合研究所に感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

- 1) 岡澤敦司, 藤川康夫, 鶴本智大, 植物中のフェノール性化合物の増量方法, 特開2018-196802.
- 2) Tomohiro Tsurumoto, Yasuo Fujikawa, Daisaku Ohta, Atsushi Okazawa*, Transcriptome and metabolome analyses revealed that narrowband 280 and 310 nm UV-B induce distinctive responses in Arabidopsis, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.02.12.430709

血管機能改善作用を持つ桜島大根の新たな加工品創出に関する研究

研究代表者 鹿児島大学農学部 加治屋勝子
中小企業研究責任者 株式会社立石食品 山田優一郎

1. 背景

株式会社立石食品は、鹿児島にあるさつま揚げ専門店であり、保存料無添加、甘すぎず、塩味控えめなさつま揚げを製造しています（詳細についてはホームページをご参照ください）。これまで、各店舗限定商品や季節限定商品などの販売を手掛け、購買客が飽きない店作りを工夫してきました。本事業では、単なる新商品開発に留まらず、経営理念にも掲げている「社会への貢献」「伝統ある郷土の食文化の創造」に対応するため、鹿児島大学で得られた桜島大根の血管機能向上に関する研究成果を活用し、予防医学的な観点から科学的根拠のある新商品の開発に挑戦したいと考えました。開発するのは、桜島大根を活用した「さつま揚げ」です。

研究成果の活用については「言うは易く行ふは難し」であり、商品開発に伴う活性の喪失、現実的な配合量、コスト面などクリアしなければならない課題が存在します。これらを大学との連携研究によって解決していきたいと考えました。

本事業で開発した商品は、地域の特産物である桜島大根を活用した新たな加工品であり、その大きさ・重さが障壁となる流通や、青果ならではの短い消費期限などのデメリットの克服にも繋がる新しい取り組みです。実際に600セットが瞬く間に完売し好評を得たのは、単なる物珍しさだけではなく、桜島大根が基礎研究から臨床試験まで行われた注目に値する素材であり、健康に関心を持たれている消費者が多いことを意味していると感じています。本事業を契機として引き続き、健康素材による新商品開発・販売に取り組むと考えています。

2. 研究成果

健康な血管は、ゴムホースのように伸び縮みして心臓から送り出された血液を全身に送っている。この血管は、内膜、中膜、外膜の3層構造になっており、血液が通る内側から順に、内皮細胞、平滑筋細胞、コラーゲン繊維層で構成されている。この構造のおかげで、血管が強くしなやかに伸び縮みすることができ、血液を送るサポートができる。しかし、ストレスや加齢に伴って血管は硬くなり、血液が

流れにくくなることで動脈硬化、高血圧などを招き、狭心症や心筋梗塞、脳梗塞といった命にかかわる病気を引き起こしてしまう。最新の令和元年人口動態統計によると日本人の死亡率は循環器疾患が約25.4%に及んでおり、また世界のリスクファクター別死亡数（Number of deaths by risk factor, World, 2017）の第1位は「高血圧」が飛び抜けており、健康寿命の延伸には血管の健康が求められていることがわかる。我々は、循環器疾患を「如何に予防するか」が国民衛生上の緊急課題であると考え、血管内皮細胞から放出されている一酸化窒素（NO）に着目して血管機能の改善研究に取り組んでいる。NOは、血管の伸び縮みを調節する司令塔のような役割や白血球等が血管に付着して血栓になるのを防ぐ役割を持ち、血管に直接働きかけている重要な物質である。このNO産生量がストレスや加齢に伴って減少することから「NO産生量を維持する（活発にさせる）食べ物」を探索することにした。しかしながら、極めて低濃度で短寿命のNOの測定法は、吸光光度法、蛍光法、化学発光法、電極法、電子スピン共鳴法など、いずれも限られた一定時間のNO産生量を間接的に測定する方法しかなかった。このままでは血管内皮機能を正確にリアルタイムに測定することができないと考え、NO産生経路の解明が可能な新しい装置の開発に着手した。この新装置開発には浜松ホトニクス株式会社中央研究所の全面的な協力を受け、血管の収縮・弛緩を調節している血管内皮機能を正確にリアルタイムに測定する評価系を世界で初めて構築し、特許を出願した。本装置を用いて血管内皮機能をターゲットに約300種類の農産物をスクリーニングしたところ、桜島大根によるNO産生改善作用を発見し、同時に機能性成分であるトリゴネリンを同定した。更に、このトリゴネリンがCa²⁺チャネルに作用してNO合成酵素を活性化し、結果的にNO産生量の増加に寄与しているという詳細な作用メカニズムまで明らかにした。これらの研究実績を活かして、本事業による連携研究をすすめた。

考察と展望

桜島大根入りさつま揚げの創作は、商品開発室での試作、素材のアレンジ（生、冷凍、漬物を使用）、配合割合及び

組み合わせの検討、実店舗での試作を経て、贈答用の他、店舗での直接（揚げ立て）販売も行われた。桜島大根の早朝納品の際に予想もしないハプニングもあったが（詳細は「加治屋勝子のつれづれブログ～鹿児島編～」をご参照ください。 https://katsukokajiya2.blogspot.com/2021/02/blog-post_26.html）、本プロジェクトが多くの方々に桜島大根の特徴を知って頂く貴重な機会であったと考える。今後も、研究成果の活用を積極的に実施していきたい。

3. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝いたします。今回の研究成果の活用は、この事業があったからこそ創出され、日の目を見ることができました。そして、消費者の皆さんが血管の健康を考えるキッカケを提供できたこと、研究成果を論文で終わらせることなく世の中に還元できたことを一研究者として嬉しく思います。

4. 成果報告および参考文献

下線は研究代表者、*は研究責任者を示す

- 1) Rei Kuroda, Kimiko Kazumura, Miki Ushikata, Yuji Minami, Katsuko Kajiya*: Elucidating the improvement in vascular endothelial function from Sakurajima Daikon and its mechanism of action: a comparative study with Raphanus sativus Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66, 8714-8721, 2018.
- 2) Compounds in 'monster' radish could help tame cardiovascular disease ACS News Service Weekly PressPac: August 08, 2018. 掲載誌の表紙に採用され、アメリカ化学会より画期的研究トピックスとしてプレスリリースされた。
- 3) Maho Sasaki, Yuri Nonoshita, Takashi Kajiya, Nobuhiko Atsuchi, Megumi Kido, Djong-Chi Chu, Lekh Raj Juneja, Yuji Minami, Katsuko Kajiya*: Characteristic analysis of trigonelline contained in Raphanus sativus cv. Sakurajima daikon and results from the first trial examining its vasodilator properties in Humans Nutrients, 12, 1872-1883, 2020. 特集号 Phytochemicals and Human Health, Dietary (Poly)Phenols and Health に掲載された。
- 4) 特開2018-201448（公開日：2018年12月27日）。発明者：加治屋勝子*，数村公子：血管内皮細胞の一酸化窒素産生を亢進する物質のスクリーニング法。

北海道産大麦若葉の機能性表示食品への展開

研究代表者 北海道大学大学院農学研究院 加藤英介
中小企業研究責任者 日生バイオ株式会社 佐藤浩志

1. 背景：企業からの説明

2014年に一部のアメリカ産大麦若葉において、日本国内では認められていない殺菌方法を行っていたとの情報が入り、お客様から安心・安全な国産の大麦若葉の需要が急速に高まった。これまでの国産大麦若葉の一大産地は九州であったが、2016年に初めて北海道産大麦若葉の栽培を本格的に開始し、原料供給が行えるまでに至った。

北海道産大麦若葉の機能性を探索し、様々な機能性を見出すことに成功した[1-3]。その一つとして抗肥満効果を報告しているが[4]、その作用機序や有効成分は不明であった。機能性表示食品の取得には、機能性を担保する成分を定量し、その含量を証明する必要がある。そこで、北海道産大麦若葉の抗肥満効果の作用機序の解明とその有効成分の同定が必要であることから、研究実施可能な加藤先生に相談し、本事業に応募することとした。

作用機序として、腓リパーゼ阻害活性によるものであることを解明し、その有効成分の一つがFructose-bisphosphate aldolaseであることの同定に成功し、特許出願に至っ

た[5]。機能性表示食品の取得に向けた課題として残るはヒト試験のみとなり、機能性表示食品の取得可能な青汁製品の企画を進めることで、販売促進に繋がることを期待している。

2. 研究成果

研究に関する背景

肥満は、様々な国で該当者数が年々増加している健康問題である。医薬品も開発されているが、代謝障害など体への悪影響が明確でない程度の肥満者や、肥満の予防を目的とする場合は、医薬品よりも機能性食品が有力な選択肢となる。肥満対策に用いられる食品の機能のうち、最も広く用いられているのは腓リパーゼ阻害活性である。腓リパーゼの阻害は、脂質の消化を抑制することで腸管からの脂質吸収を抑制し、結果的に過剰な摂取を原因とする肥満を予防することができる。

研究代表者のグループでは、様々な食品、薬用植物の腓リパーゼ阻害活性を評価し、その活性成分を探索、同定し

ている [6]。北海道産大麦若葉について腓りパーゼ阻害活性を評価したところ、阻害活性を示すことが分かったため、共同研究として企画し、腓りパーゼ阻害による脂質吸収抑制効果が北海道産大麦若葉の抗肥満作用に関係しているか、および含有されている腓りパーゼ阻害成分がなんであるか明らかとすることにした。

研究の詳細

大麦若葉エキス末の腓りパーゼ阻害と脂質吸収抑制効果の検証

北海道産の大麦若葉エキス末の腓りパーゼ阻害活性を *in vitro* で測定したところ、最大阻害率は 60% 程であった

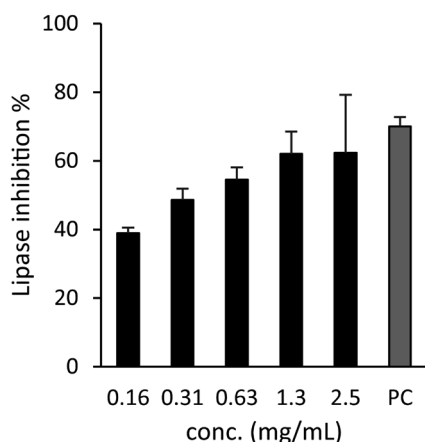


図1. 大麦若葉エキス末の腓りパーゼ阻害活性。

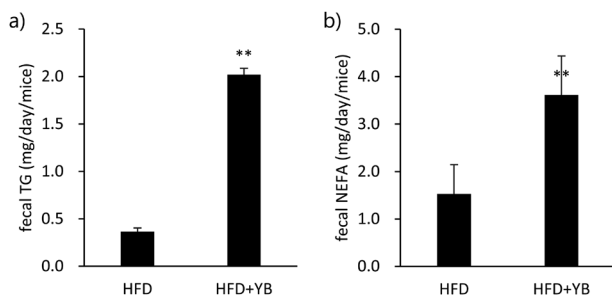


図2. C57BL/6 マウスへの高脂肪食 (HFD) または大麦若葉エキス末添加高脂肪食 (HFD+YB) 給餌後の糞中トリグリセリド量 (a) と遊離脂肪酸量解析結果 (b)。

が、濃度を薄くした際の阻害率の減少が緩やかで、低濃度でも一定の阻害を示した (図1)。この結果から大麦若葉の抗肥満作用には、腓りパーゼ阻害活性が関与していることが推定された。

次に *in vivo* で大麦若葉エキス末の腓りパーゼ阻害活性による脂質吸収抑制効果を確認するため、高脂肪食もしくは大麦若葉エキス末添加高脂肪食をマウスに給餌し、糞中脂質量の変化を解析した。その結果、大麦若葉エキス末の添加により糞中トリグリセリド量と遊離脂肪酸量の増加がみられた (図2)。したがって、腓りパーゼの阻害による脂質吸収の抑制が、大麦若葉エキス末の抗肥満作用であると示唆された。

大麦若葉エキス末中の腓りパーゼ阻害成分の探索

大麦若葉エキス末中の腓りパーゼ阻害成分候補としては、ポリフェノール及びタンパク質が想定された。当初はポリフェノールを想定していたが、溶媒分配や各種カラムクロマトグラフィーの結果から否定されたため、標的をタンパク質に切り替えて探索を行った。塩析やイオン交換カラムを用いて分離していった結果、SDS-PAGE 分析により約 34 kDa の位置に単一のバンドが観察され、かつ腓りパーゼ阻害活性を示す画分を精製することに成功した (図3)。

大麦若葉エキス末中の腓りパーゼ阻害タンパク質の解析
精製した画分中の 34 kDa のバンドについて nanoLC-MS/

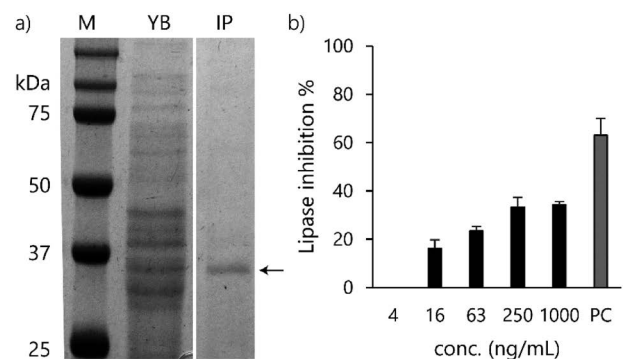


図3. 単離した画分の SDS-PAGE 分析結果 (a) と腓りパーゼ阻害活性 (b)。
M: マーカー, YB: 大麦若葉エキス末, IP: 精製した画分。

Fructose-bisphosphate aldolase (*Hordeum vulgare*, Uniprot A0A287NGA7)

```

1      MQK
4      TIASPGRGIL AMDESNATCG KRLASIGLEN TEANRQAYRT LLVTPPGLGN
54     YISGAILFEE TLYQSTVDGK KIVDILVEQG IVPGLKVDKG LVPLVGSNDE
104    SWCQGLDGLA SREAAYYQQG ARFAKWRTVV SIPNGPSELA VKEAAWGLAR
154    YAAISQDNGL VPIVEPEIML DGEHGIERTF EVAQKVWAET FYYMAQNNVM
204    FEGILLKPSM VTPGAECKDR ATPPEEVSAT LKLLQRRIPP SVPGIMFLSG
254    GQSEVEATLN LNAMNQAPNP WHVSFSYARA LQNTCLKTWG GRPENVAAGQ
304    EALLLRKAN SLAQLGKYTS DGEAAAAKEN MFVKNYSY

```

図4. nanoLC-MS/MS 解析により同定したタンパク質のアミノ酸配列と同定したペプチド鎖 (下線)。

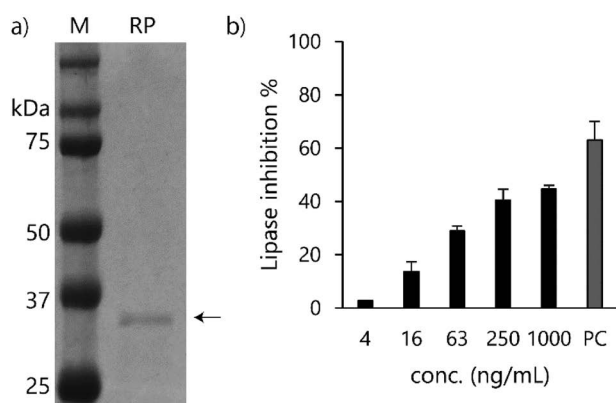


図5. リコンビナントタンパク質のSDS-PAGE分析結果 (a) と膵リパーゼ阻害活性 (b)。

MS解析を行ったところ、いくつかのペプチド配列が同定され、これをもとに Mascot search によりタンパク質の同定を行うことで Fructose-bisphosphate aldolase (*Hordeum vulgare*, Uniprot F2ELD1) がヒットした。しかしながら分子量が一致しなかったためバリエーションである A0A287NGA7 であると推定した (図4)。

続いて同定したタンパク質が大麦若葉エキス末中の膵リパーゼ阻害成分であることを確認するため、リコンビナントタンパク質を調製し、SDS-PAGE分析および膵リパーゼ阻害活性を測定した。その結果、いずれも精製した画分中のタンパク質と類似した結果を示したため (図5)、A0A287NGA7 が大麦若葉エキス末中の膵リパーゼ阻害成分であると決定した。

考察と展望

本研究では、大麦若葉エキス末の抗肥満作用について、なぜ抗肥満作用を示すのか？大麦若葉の中のどのような成分が抗肥満作用に寄与しているのか？の二点の解明を目指して研究を行い、膵リパーゼ阻害による脂質吸収抑制効果が抗肥満作用の作用機構であり、この作用に係る成

分の少なくとも一つが Fructose-bisphosphate aldolase (Uniprot A0A287NGA7) であることを明らかとした。

Fructose-bisphosphate aldolase は動物、植物ともに有するタンパク質であるが、A0A287NGA7 のアミノ酸配列を比較すると、各種植物の葉緑体由来のものと高い相同性を有する。大麦における A0A287NGA7 の局在部位は解析されていないが、植物のみが有し、青汁の「青」色の元でもある葉緑体のタンパク質が抗肥満作用に関わっているというのは、その効果として興味深い結果と考えられる。

3. 謝辞

本研究に助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。また本研究成果は学会誌[7]および支部会[8]において一部または全部を発表いたしました。

4. 成果報告および参考文献

参考文献

1. ATP産生促進剤 (特願2017-200782, 特開2019-073476)。
2. Keap1-Nrf2 システムによる生体防御遺伝子発現の活性化剤 (特願2018-124331, 特開2020-002082)。
3. 線維芽細胞の機能賦活用剤 (特願2018-215833)。
4. Asahi Minoshima, et al., Inhibitory Effect of Young Barley Grass Extract Powder on Body Weight Increase and Visceral Fat Accumulation in Mice Fed a High-fat diet. *Pharmacometrics*, 2017, 93, 13-18.
5. 大麦若葉由来の膵リパーゼ阻害剤、脂質吸収抑制剤、及びそれらを含む飲食品 (特願20020-116324)。
6. Eisuke Kato, Bioactive compounds in plant materials for the prevention of diabetes and obesity, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83, 975-985.
7. Eisuke Kato, et al., Proteinous pancreatic lipase inhibitor is responsible for the antiobesity effect of young barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf extract, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85, 1885-1889.
8. 鶴間あい, 佐藤浩志, 加藤英介, 大麦若葉由来膵リパーゼ阻害タンパク質の同定と in vivo 効果の検証, 2020年度日本農芸化学会北海道支部／第50回日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会。

オリーブ葉成分の微生物変換による高機能化と化粧品素材としての応用開発研究

研究代表者 岡山大学大学院環境生命科学研究科 神崎 浩
中小企業研究責任者 日本オリーブ(株) 菊地敬一

1. 背景

日本オリーブ(株)と岡山大学はオリーブ葉抽出物の微生物変換に関する共同研究を実施し、パン酵母がオリーブ葉

抽出物に含まれる化合物の一部の構造を変化させ、強力な抗酸化活性を示す新規の化合物を生成することを見いだしてきた。新規化合物を含む微生物変換オリーブ葉エキスに

は発酵臭の問題があり化粧品への利用が困難であったが、オリーブの花から単離した黒酵母を用いることで解決し、同時に新規化合物への変換効率を高めることができた。日本オリーブ(株)としては、この微生物変換オリーブ葉エキスを化粧品素材として開発することを計画しており、付加価値の高い素材開発のためには①微生物変換のスケールアップ、②素材としての機能性・安定性の評価が不可欠であり、更に効率の良い微生物変換のためには③微生物変換に関与する酵素についての科学的知見を集積することも不可欠と考えられた。それらの達成のために、岡山大学神崎研究室との共同研究の継続発展が必要であり、本事業に応募した。本事業実施の結果、葉の収穫・抽出・黒酵母培養・抽出物の微生物変換までの全工程のスケールアップに成功し、素材の機能性・安定性に関して新たな知見を得ることができた。また、微生物変換に関与する酵素を明らかにでき、付加価値の高い機能性化粧品素材開発が大きく前進した。

2. 研究成果

研究に関する背景

岡山大学と日本オリーブ(株)は、発酵食品微生物をスクリーニングした結果、パン酵母がオリーブ葉抽出物に含まれる化合物(3,4-Dihydroxyphenylethanol elenolic acid (3,4-DHPEA-EA, Oleuropein aglycon のアルデヒド型)の一部の構造を変化させ、強力な抗酸化活性を示す新規化合物(Reduced 3,4-DHPEA-EA)を生成することを見いだした(図1)。

岡山大学で、その変換基質と変換生成物を単離構造決定し、Reduced 3,4-DHPEA-EA が DPPH 法, ORAC 法, HORAC 法, ESR を用いる測定法のいずれにおいても既存の抗酸化剤として知られているアスコルビン酸やビタミン E より強力な抗酸化活性を有することを明らかにするとともに(特許1, 論文1), 日本オリーブ(株)においてシワ防止

効果(ヒト試験), 美白(B16 メラノーマ細胞), 抗老化(ヒト正常皮膚線維芽細胞)などの化粧品素材として開発が期待できる機能性を確認するとともに、経皮毒性がないことの確認も済ませている(ヒトパッチ試験)。

次に、パン酵母での反応条件検討を行ったが、その反応性が必ずしも高くないこと、パン酵母由来の特有の匂いが化粧品素材としての開発の妨げとなることから、パン酵母以外の微生物による変換反応の検討を行った。種々の花がよい酵母の探索源となることが知られていたことから、種々の花から微生物を単離しその変換能を検討した結果、オリーブ花から単離した菌株が非常に高い変換活性を有していることを明らかにし、その菌株が黒酵母として知られる *Aureobasidium* 属であることを同定し(特許2), その菌株を用いる反応で効率よく生成物の調製が可能であることを示してきた。

以上を踏まえ、本申請においては、オリーブ花由来菌株で、オリーブ葉抽出物を大量処理し、経済的に成り立つ新規生成物の生産条件の確立を行うとともに、得られた生成物の安定性の検討を行い、市販可能な化粧品素材の開発を目的とした。さらに効率の良い微生物変換実施に向けて、本変換反応に関与する酵素についての科学的知見を収集し、素材生産に活かすことにした。

研究の詳細

①オリーブ花由来微生物を用いたオリーブ葉抽出物大量調製

3,4-DHPEA-EA を高濃度で含むオリーブ葉抽出物の大量調製条件の確立

新たに設計製作した機械で葉の採取を実施することにより、手作業では約340 g/hrであった作業スピードが、約4.5 kg/hr に大幅にアップされ、合計約130 kgの乾燥オリーブ葉を採取した。その葉の粉碎は粉碎熱を抑えるためウイングミル式粉碎機にて行い、約120 kgの粉碎葉を得た。岡山大学で確立されている、微生物変換のための基質、

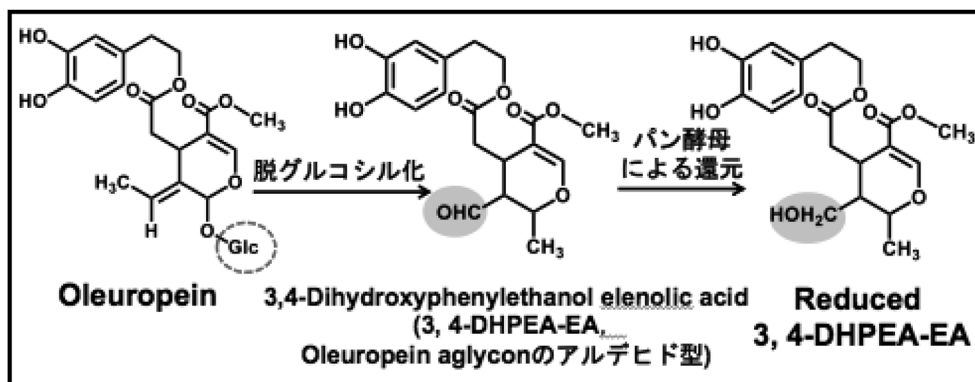


図1. オリーブ葉中の Oleuropein から Reduced 3,4-DHPEA-EA への変換反応。



図2. オリーブ葉から 3,4-DHPEA-EA を高濃度で含むオリーブ葉抽出物の調製.

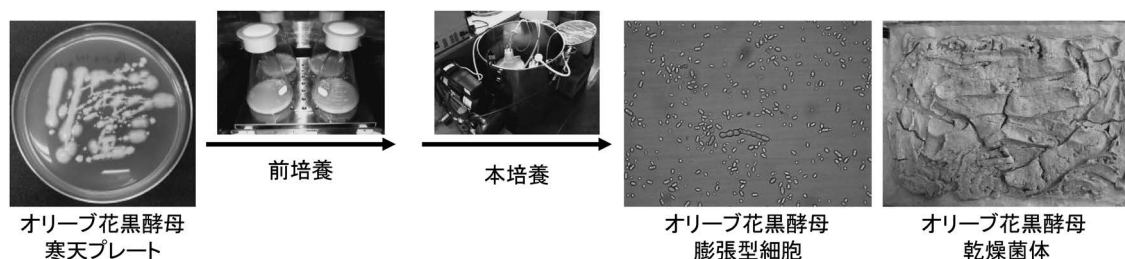


図3. 高変換活性を有するオリーブ花由来黒酵母の大量培養.

3,4-DHPEA-EA の抽出技術をスケールアップし、粉碎したオリーブ葉50kgから小スケールと遜色なく目的化合物を高濃度で含む抽出液を高収率で得ることができた。その調製過程の写真を図2に示す。

高変換活性を有するオリーブ花由来黒酵母の大量培養

オリーブ花由来黒酵母の試験管での小スケールでの培養では安定して活性菌体を得られていたが、フラスコレベルに拡大培養を進めるなかで、変換活性を示すと思われた培地で変換活性を示さない培養菌体を得られることが何度か生じていた。黒酵母は二形成（酵母型と菌糸型）の細胞形態をとる好気的微生物であり、培養条件（炭素源、窒素源、無機イオン、酸素、pH）などによる生育環境の変化や菌齢により複雑に細胞形態を変化させることが知られていることから、フラスコレベルでその形態と活性変化に着目して検討を行い、これまでの研究で「膨張細胞である菌糸型細胞を経る増殖サイクルが活発に回って増殖しているときに得られる菌体の変換活性が高い」ことを明らかにしていたため、その形態を保持できる培養条件を日本オリーブ（株）が導入した20Lポリタンク簡易微生物培養装置で検討し、その結果2本のポリタンク培養から高活性を保持している黒酵母乾燥菌体約280gを得ることに成功した。その調製過程の写真を図3に示す。

オリーブ花由来黒酵母菌体を用いるオリーブ葉抽出物大量処理

上述した方法で調製したオリーブ葉と黒酵母菌体を用いた微生物変換処理条件の検討を行い、新規抗酸化活性物質 Reduced 3,4-DHPEA-EA を高濃度で含む素材調製の条件検討を行い、80Lスケールでの反応で高い変換率での微

生物変換が達成でき、吸着樹脂による効率の良い生成物の回収に成功した。

②3,4-DHPEA-EA から Reduced 3,4-DHPEA-EA への変換反応を触媒する酵素

黒酵母は生育環境の変化や菌齢により複雑に細胞形態を変化させ、その形態変化と今回の素材調製に必要な微生物変換酵素の発現とが複雑に絡み合っていることが判明したが、上述のように、大量培養においてその活性型を得るための技術ノウハウを確立できた。しかしながら、今後安定的に高活性菌体を調製するためには、変換酵素の安定的な発現達成が必要であり、その目的達成のため、どのような酵素がこの反応を触媒していることを科学的に明らかにすることにした。当初3,4-DHPEA-EA から Reduced 3,4-DHPEA-EA への変換反応する微生物としてパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を見出しており、その活性酵素の詳細検討を行った。

岡山大学の守屋博士が有している *Saccharomyces cerevisiae* に任意の遺伝子を過剰発現させる技術を利用し、目的の変換反応を触媒すると推察される酵素遺伝子を過剰発現した酵母を用いて研究を行った。Reduced 3,4-DHPEA-EA は 3,4-DHPEA-EA のアルデヒド基がヒドロキシメチル基へと還元された構造であることから *Saccharomyces* genome database に示されている、アルコールをアルデヒドへと変換しうる *Saccharomyces cerevisiae* 由来の全ての遺伝子群を候補遺伝子としてスクリーニングを実施した。これらの遺伝子を高発現している酵母菌体を用いて還元反応を実施したところ、図4に示すようにコントロールの *Saccharomyces cerevisiae* と比較して活性が増加している

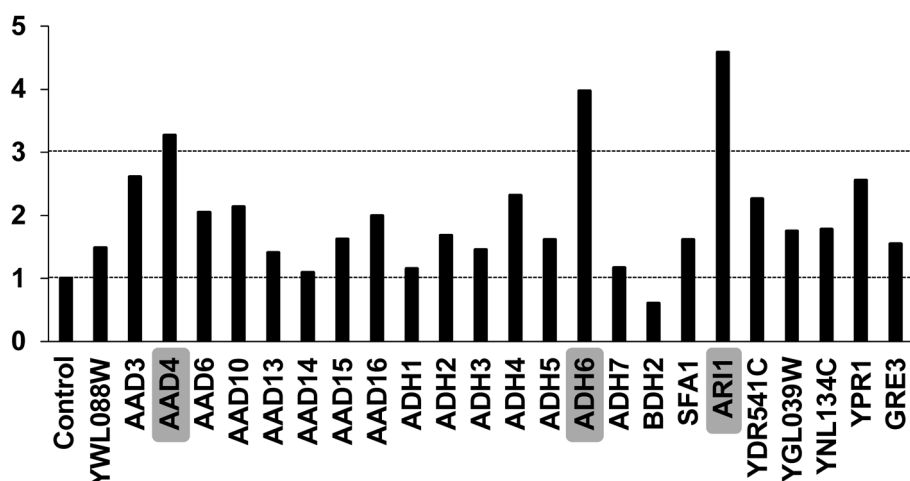


図4. アルデヒド還元酵素類高発現菌体の3,4-DHPEA-EA還元活性.

遺伝子が複数存在することが判明した。高活性を示した3つの遺伝子について、遺伝子破壊株を作成し菌体反応を実施したところ、いずれの破壊株もコントロール菌株より活性は低下しているものの完全には失われておらず、複数の酵素が目的の反応に関与していることが明らかとなった。

次に、Adh6酵素タンパク質を精製し、目的の還元反応を実際に触媒するかどうかの確認を行った。ガラクトースで誘導がかかる *GAL1* プロモーターによって glutathione S-transferase (GST)-融合タンパク質が高発現される菌体を作製し、アフィニティークロマトグラフィーで GST-Adh6 融合タンパク質を電気泳動的に単一に精製した。この精製 GST-Adh6 を用いて、Adh6 が本来触媒することが知られている cinnamaldehyde と Benzaldehyde の還元反応を補酵素 NADPH の減少で測定したところ、ともに良好に変換され、さらに 3,4-DHPEA-EA も還元されることが判明した。その変換活性は cinnamaldehyde の 6% であった。さらに、Glucose 6-phosphate dehydrogenase の NADPH 再生系を添加して 3,4-DHPEA-EA の還元反応を実施し、その反応液の HPLC 分析を行なったところ、3,4-DHPEA-EA の減少と Reduced 3,4-DHPEA-EA の増加が反応時間に伴って認められたことから、Adh6 が実際に目的の反応を触媒することが証明された。

③ Reduced 3,4-DHPEA-EA 高濃度含有素材の安定性

オリーブ葉の微生物変換で得られる Reduced 3,4-DHPEA-EA を有効成分とする化粧品を開発するために、安定性試験を試みた。Reduced 3,4-DHPEA-EA を 10% 程度含む化粧液としての他の成分を配合した試作品を作成し、4℃での冷蔵保存と 40℃で6カ月間の処理（一般的な加速処理条件の一つ）を行い、それら化粧品試作品の抗酸化活性の維持状況の確認を行った。抗酸化活性は、この素材の測定

にこれまで用いてきた、DPPH 法と ORAC 法の2種で判定した。その結果、いずれの抗酸化活性も7割以上の活性が検出され、化粧水という水分を含む状態でも安定に、有効成分としての活性が保持されることが明らかとなった。

考察と展望

岡山大学で見出した、オリーブ葉に含まれる 3,4-DHPEA-EA の高い抗酸化能を有する Reduced 3,4-DHPEA-EA への新規微生物変換反応、その反応を高効率で触媒するオリーブ花由来黒酵母の発見という研究シーズを活かして、化粧品素材を開発するために、日本オリーブ(株)と岡山大学は共同研究を実施してきた。今回その共同研究を継続した結果、オリーブ葉の収穫・3,4-DHPEA-EA 高含有抽出液の調製・微生物変換活性を有するオリーブ花由来黒酵母の大量調製とその菌体を用いる Reduced 3,4-DHPEA-EA への効率良い変換反応が小スケール反応と遜色のない形で実施でき、そのそれぞれのステップにおけるノウハウが蓄積できた。同時に Reduced 3,4-DHPEA-EA 素材を添加した化粧品試作品の抗酸化活性が長期安定して維持されることも明らかとなり、微生物変換オリーブ葉素材（2016年に *Aureobasidium Pullulans*/Olive Leaf Extract Ferment Filtrate として INCI 名（国際的表示名称）登録、2018年に「アウレオバシジウムプルランス／オリーブ葉エキス発酵液」として化粧品表示名称登録を済ませている）を含む化粧品開発の可能性を大きく増大させる知見が得られた。さらに、今回微生物変換に関与する酵素について科学的な知見が蓄積できたことから、これらの知見を有効活用することで、経済的に成り立つ素材の調製が達成可能となると考えられる。また、これらの酵素的データにはサイエンスレベルでも興味深い知見が含まれており、酸化還元酵素の研究の新たな展開が期待できる。

3. 謝辞

この研究は第1回農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成金により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。酵母由来の変換酵素の同定実験は、岡山大学環境生命科学研究科守屋央朗准教授と共同で実施したものであり、厚く御礼申し上げます。オリーブ葉成分の微生物変換研究は、岡山大学/岡山県工業技術センター/日本オリーブ(株)の3者で構築している「岡山オリーブ成分微生物変換高機能化研究コンソーシアム」で共同実施しており、本研究の一部も岡山県工業技術センターと共同で

実施したものであり、感謝申し上げます。

4. 参考資料

- 特許1：第4652355号オリーブ葉抽出物を酵母処理することにより得られる抗酸化物質、発明者：神崎浩、仁戸田照彦、服部恭一郎、吉田靖弘。
- 特許2：第6609132号抗酸化性化合物及びそれらを含有する組成物の製造方法、並びに、それに用いられる新規微生物。発明者：神崎浩・仁戸田照彦・徐恵美・菊地敬一。
- 文献1：微生物変換による新しい天然由来の化粧品素材開発を目指して—オリーブ葉由来抗酸化成分の微生物による高機能化、神崎浩、仁戸田照彦、フレグランスジャーナル、36, 63-66, (2008)。

久慈産琥珀抽出物のメラニン産生抑制物質の解明による 高度化粧品開発研究

研究代表者 岩手大学農学部 木村賢一
中小企業研究責任者 株式会社実正 鈴木 聡

1. 背景：企業からの説明

弊社は、化粧品のOEM企業として常々新しい化粧品素材の探索を進めていたところ、2012年のJSTの新技术説明会で、岩手大学農学部の木村教授の久慈産琥珀抽出物の発表内容を伺い、共同研究を開始した。その間、JSTやNEDOからの公的研究費、並びに弊社からの共同研究費で研究を進め、2015年には化粧品として上市した。その後、アルコールに代わるCO₂超臨界流体抽出物の配合も可能とした。これまでの研究過程で、両抽出物に化粧品で重要なメラニン産生抑制とコラーゲン産生促進活性を見出し、CO₂超臨界流体抽出物の方が強いことを明らかにしている。そこで、新たなメラニン産生抑制物質の単離精製と構造決定、並びに生物活性の測定を行い、新規構造であれば特許申請を行うべく、本研究費を申請した。単一化合物の特許を申請すれば、化粧品の付加価値向上と共に、特許実施許諾料等も得られることになる。費用対効果から鑑み

て、2年間で3種の新規物質を見出して特許申請できたことは、今後の弊社の躍進が大いに期待できるものと考え、

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

久慈産琥珀は、岩手県が世界に誇る地下天然資源であり、本研究者はそれを「ケミカルバイオロジー」の観点から研究を進め、久慈産琥珀からのみC1～C4が欠如した新規ノルジテルペノイドが単離されること（化学的特徴）、並びに単一物質はもちろん、抽出物でさえも動物レベルで臨床点鼻薬の約5倍の抗アレルギー活性を有すること（生物学的特徴）を明らかにしてきた。今般(株)実正と共同で、久慈産琥珀抽出物に化粧品にとって重要なメラニン産生抑制活性を新たに見出したため、本研究ではその活性物質を明らかにすることを進めた。その結果、既に単離しているspirolactone norditerpenoidに活性を見出すと共に、新たに3種のメラニン産生抑制物質を単離精製し構造を決定し

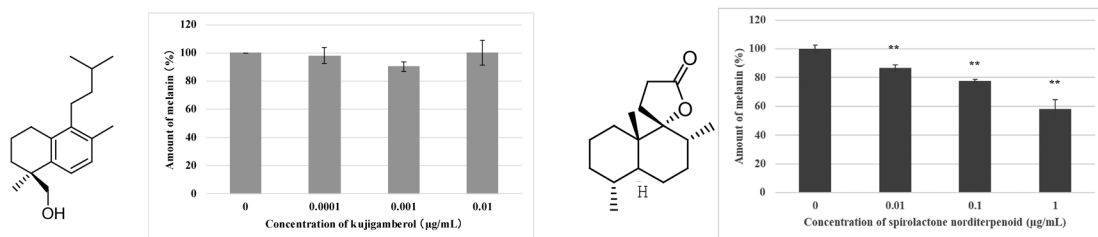


図1. Kujigamberol と spirolactone norditerpenoid のメラニン産生抑制活性.

たところ、3種共に新規物質であった。そこで、2種の特許を申請して今後の化粧品開発に大きな結果を残すと共に、基礎研究でも総説・解説2件、原著論文1報、国際学会発表2件、国内学会発表2件に結び付く内容となった。

研究に関する背景

第3回農芸化学研究企画賞[Ca²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母を用いたスクリーニングと活性物質の医薬品への活用 (2006)] から研究を開始し、久慈産琥珀から主要な新規生物活性物質 kujigamberol を見出し、同時に世界の琥珀も調べ、久慈産琥珀琥珀からは C1~C4 が欠如した新規ノルジテルペノイドが単離されることを明らかにしてきた。また、細胞と動物レベルで抗アレルギー活性を明らかにし、久慈産琥珀メタノール抽出物も kujigamberol も、臨床点鼻薬成分のモメタゾンの約5倍強力なことを明らかにしてきた。久慈産琥珀は、恐らく現在の久慈市周辺の9000万年間の特殊な続成作用という化学反応で、ロシア産やドミニカ産やミャンマー産琥珀などとは異なる新規物質となっていると推定している。この様なユニークな基礎研究と実用化研究に対し、2018年住木・梅澤記念賞を東北地方で初めて拝受した。これまでの、琥珀に関わる「ケミカルバイオロジー」研究の経験と結果の蓄積により、本研究では久慈産琥珀からメラニン産生抑制物質を単離精製し、構造を決定すると共に、単一物質での生物活性を測定することとした。

研究の詳細

本研究の詳細は、項目ごとに以下に詳細に示す。

1. Kujigamberol と spirolactone norditerpenoid のメラニン産生抑制活性

これまで、カルシウムシグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株 (*zds1Δ erg3Δ pdr1/3Δ*) の生育回復活性を指標に、久慈産琥珀メタノール抽出物から生物活性物質を単離精製し、構造を決定してきた。その中で、主要な2種の新規物質 kujigamberol と spirolactone norditerpenoid のメラニン産生抑制活性を調べた。その結果、後者に濃度依存的な阻害活性が認められた (図1)。同時に測定したコラーゲン産生促進活性は両者ともに認められたため、両活性を併せて特許申請と論文発表を行った。また、本結果に

より spirolactone norditerpenoid 以外の阻害物質の存在が示唆された。

2. 久慈産琥珀からのメラニン産生抑制物質の単離精製、構造決定、生物活性

(1) メラニン産生抑制物質の単離精製

久慈産琥珀CO₂超臨界抽出物と久慈産琥珀メタノール抽出物の含有成分は、HPLC分析と遺伝子変異酵母 YNS17株と細胞を用いた生物活性で、ほぼ同じであることがこれまでの研究で明らかになっている (活性物質の含量は、久慈産琥珀CO₂超臨界抽出物の方がやや多い)。そこで、単離精製には量が確保できる、1 kg の久慈産琥珀粉末のメタノール抽出物を用いて進めることとした。

①メラニン産生抑制物質の精製

約1 kg の久慈産琥珀粉末を、メタノールで3日間抽出し 51.0 g の抽出物を得た。それをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで、ヘキサン：酢酸エチル 20：1 から 1：3 まで

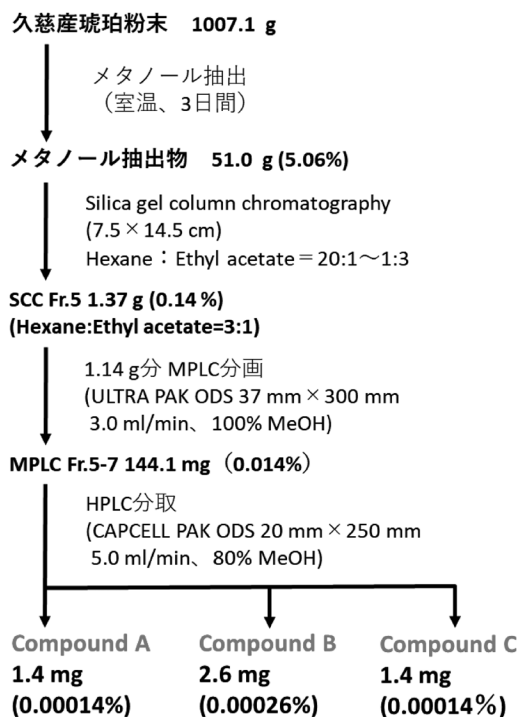


図2. 久慈産琥珀メタノール抽出物からのメラニン産生抑制物質単離精製スキーム。

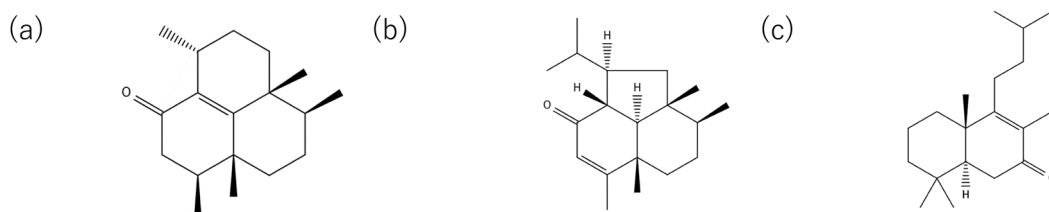


図3. 久慈産琥珀メタノール抽出物由来の3種の新規メラニン産生抑制物質の構造。

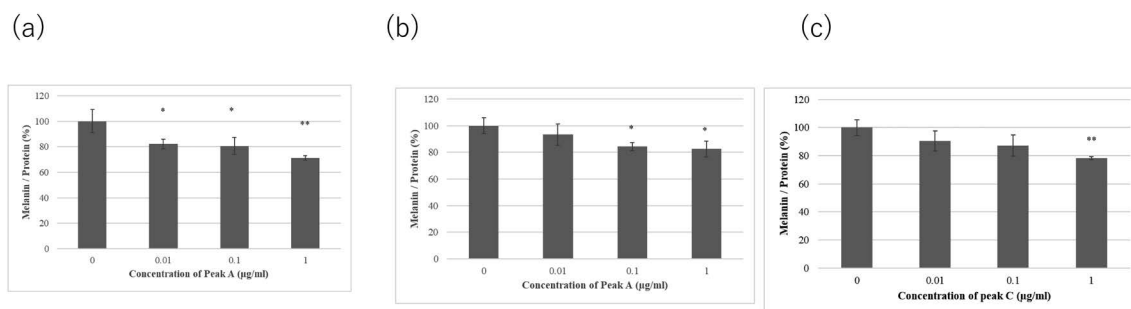


図4. 3種のメラニン産生抑制物質のマウス B16 メラノーマ細胞に対するメラニン産生抑制活性.
[対照 (添加濃度ゼロ) に対して有意差あり * p<0.05, ** p<0.01 (Dunnett 法)]

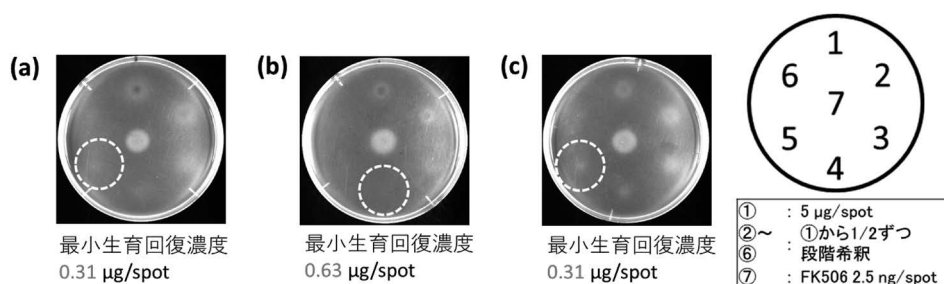


図5. 3種の化合物の Ca^{2+} シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性

展開し、最終的にメタノールで洗浄して17画分に分画した。それぞれの活性を、マウス B16 メラノーマ細胞を用いて評価したところ、SCCFr. 5 (1.37 g) に最も強い活性が認められた。さらに、逆相の中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) で11画分に分画し、活性が強い MPLC Fr. 5~5-7を得た。その中の MPLC Fr. 5-7 (144.1 mg) から、最終的に HPLC (ODS) で化合物 A, B, 並びに C をそれぞれ 1.4 mg, 2.2 mg, 並びに 1.4 mg 単離精製した (図2)。

②3種の活性物質の構造決定

単離精製した3種の化合物について、MSやNMRを中心とした機器分析により構造を決定したところ、化合物Aを 1,13-cyclo-14,15-dinor-1 (10)-cleroden-2-one (1,13 α -cyclo-14,15-dinor-1 (10)-cleroden-2-one), 化合物Bを 1,12-cyclo-15-nor-3-cleroden-2-one (1 α ,12 β -cyclo-15-nor-3-cleroden-2-one), 化合物Cを 15-nor-8-labden-7-one と決定し、3種全てが新規構造であることが明らかになった (図3)。特に A と B は、ノルラプダノイド構造が環化して三員環構造に変化した珍しい構造であった。なお、構造決定は、理化学研究所の越野広雪博士と共同研究にて行った。

③3種の活性物質の生物活性

単離精製した3種の化合物について、B16 メラノーマ細胞に加えてメラニン産生抑制活性を調べたところ、全てに同程度の濃度依存的な阻害が認められた (図4)。

また、遺伝子変異酵母株に対する生育回復活性も調べた

ところ、全てに同程度の濃度依存的な生育回復活性が認められた (図5)。

考察と展望

久慈産琥珀メタノール抽出物から、これまで遺伝子変異酵母 YNS17 株を用いて生物活性物質を単離精製してきたところ、全てが新規構造であった。今回用いた細胞でのメラニン産生抑制活性を指標としたスクリーニング系においても、これまで単離できなかった新規構造のメラニン産生抑制物質が単離精製され、特許の申請ができた。この結果は、久慈産琥珀が世界に類をみない付加価値の高い天然資源であることと、それを用いた今後の化粧品事業の発展が期待できる結果を示すものである。なお、特許を申請しているため、場合によっては他社からの特許実施許諾料収入も期待できる。

3. 謝辞

第1回農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成をしていただいた公益社団法人日本農芸化学会に、心より感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

〈特許〉

1. 木村賢一, 白井誠之, 鈴木聡 (2019): 肌用製品の素材, 特願2019-106168 (2019/6/6)

2. 木村賢一, 阿部純平, 越野広雪, 鈴木聡 (2020): 久慈産琥珀に含まれる新規メラニン産生抑制物質, 特願2020-131386.
- 〈総説・解説〉
1. 木村賢一, 白井誠之, 鈴木聡 (2019): 久慈産琥珀の超臨界CO₂抽出物の化粧品素材としての有用性, *Fragrance Journal*, 47, 57-64.
 2. 木村賢一, 鈴木聡 (2021): 久慈産琥珀の多彩な生物活性—コラーゲン産生促進活性の発見—, *BIO INDUSTRY*, 38, 40-52.
- 〈原著論文〉
1. S. Suzuki, J. Abe, Y. Kudo, M. Shirai, K. Kimura (2020): Inhibition of melanin production and promotion of collagen production by the extract of Kuji amber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 84, 518-525.
- 〈国際学会発表〉
1. K. Kimura, J. Abe, Y. Miura, H. Takahashi, N. Shimoda, Y. Kudo, M. Shirai, M. Ohnishi, S. Suzuki, H. Koshino (2019): The extract of Kuji amber is a fascinating natu-

ral source for cosmetics and medicines. The 10th Korea-Japan Chemical Biology Symposium and 30th Meeting for New Drug Discovery. Kanazawa, Oct. 3-5.

2. K. Kimura (2019): Kuji amber and kujigamberol are splendid gifts from planet earth. Iwate University's 70th Anniversary International Symposium (Contribution of Agriculture Research and Education to realization of SDGs), November 14, 2019. Faculty of Agriculture, Iwate University.

〈国内学会発表〉

1. 鈴木聡, 阿部純平, 白井誠之, 木村賢一 (2019): 久慈産琥珀抽出エキスに見出されたメラニン産生抑制活性とコラーゲン産生促進活性, 日本生化学会東北支部 第85回例会・シンポジウム, 6月9日(土)~10日(日), 東北大学星陵キャンパス, p42.
2. 阿部純平, 鈴木聡, 高橋俊哉, 越野広雪, 木村賢一 (2020): 久慈産琥珀から単離された新規メラニン産生抑制物質の構造と活性, 第62回天然有機化合物討論会(名古屋), 2020年9月22日(火)~24日(木), P2-16, 493-497.

重金属を吸着する多糖産生乳酸菌の雨水浄化への利用

研究代表者 石川県立大学 生物資源工学研究所 松崎千秋

中小企業研究責任者 バルテクス株式会社(旧 株式会社ホクコン) 技術本部 鈴木裕久

1. 背景：企業からの説明

背景

降り初めの雨には、車や工場の排ガス中の多くの重金属が溶け込み、それらの河川や湖沼への流入は水質汚濁の要因となっている。本研究開発企業である「バルテクス株式会社(旧株式会社ホクコン)」はこれまでに、持続的な水資源利用の観点から、雨水貯留槽、雨水の地下浸透システム、雨水簡易ろ過装置、水質浄化システムの開発などを行ってきており、雨水中の汚濁物質である浮遊物質(SS)や酸素要求量(COD または BOD)を低減するための様々な濾材を開発・応用してきている。しかしその一方で、有害物質として指定されている重金属イオンを効率的に除去する方法に関しては、微生物の物質代謝による金属イオン蓄積を利用した重金属イオンの捕集除去方法など検討されているが¹、重金属による細胞毒性による限界のため、未だ有効な除去方法は見いだされていない。

大学との連携研究の具体的内容

新たな重金属イオン除去法として、天然高分子多糖類の重金属イオン吸着能に着目した²。微生物は濾材への固定化が可能なことから、乳酸菌の産生する多糖類の研究が可能な、石川県立大学松崎千秋講師に相談し、本事業に応募することとした。

成果による事業への期待効果

本研究成果によって得られた重金属除去効果を有する濾材を用い、公共水域の環境に配慮した雨水ろ過装置の開発につなげていきたい。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

研究に関する背景

多糖類を産生する微生物の中でも、グルコシルトランスフェラーゼ(糖質分解酵素ファミリー70)およびフルクトシルトランスフェラーゼ(糖質分解酵素ファミリー68)の活性によって菌体の外にホモ多糖を分泌する *Leuconostoc* 属, *Weissella* 属, *Streptococcus* 属, *Lactobacillus* 属 の乳酸菌種は、多糖生産効率が高く、産業への応用が容易である。菌種によって異なる構造を呈するこれら多糖類の物理化学的特性により、様々な機能的が期待でき、*Leuconostoc* 属の産生するデキストランは代用血漿として医薬産業へ、レバンは食物繊維として食品産業へ応用されている^{3,4}。本研究開発の研究代表者はこれまでに、*Leuconostoc* 属が菌体の外に分泌する多糖類の機能性に関する研究を行っており⁵、多糖類の抽出および分析技術を有している。それを生かし、乳酸菌の多糖類を重金属イオン濾過材へと応用する本研究課題解決のため、連携研究を進めた。

表1. 解析に用いた乳酸菌株とその多糖産生能.

菌種	菌株	分離源	多糖産生能*
分離株			
<i>Leuconostoc citreum</i>	ISPU-415	かぶの切り漬け	++
<i>Leuconostoc citreum</i>	ISPU-388	かぶの切り漬け	++
<i>Leuconostoc citreum</i>	ISPU-402	かぶの切り漬け	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-357	山菜	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-359	山菜	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-392	かぶの切り漬け	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-411	かぶの切り漬け	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-418	きゅうりの糠漬け	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-432	きゅうりの糠漬け	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-464	自家製きゅうりの漬物	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-475	自家製きゅうりの漬物	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-500	自家製漬物	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-504	自家製漬物	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-517	山芋の醤油漬け	+
<i>Leuconostoc garlicum/lactis</i>	ISPU-431	きゅうりの糠漬け	++
<i>Weissella hellenica</i>	ISPU-323	いか黒造り	-
<i>Weissella hellenica</i>	ISPU-327	あじなれずし	-
<i>Weissella hellenica</i>	ISPU-344	うり糠漬け	-
分譲株			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	JCM6124		+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B152F		++
<i>Leuconostoc citreum</i>	NRRL B742		++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B1299		++
<i>Leuconostoc citreum</i>	NRRL B1355		++
<i>Leuconostoc citreum</i>	NRRL B1501		++

* -; 多糖産生なし、+; 培地25mlあたり多糖 10~300 mg産生、++; 培地25mlあたり多糖 300 mg以上産生

研究の詳細

本研究では、高分子多糖を産生する乳酸菌の中から、環境省によって公共用水域や地下水の環境基準、および排水基準の項目に挙げられている、カドミウム、鉛、銅、亜鉛、鉄を効率的に吸着する多糖産生菌を選抜し、その多糖を効率的に濾材に固定化することを目的とした。下記の方法で、本研究課題に取り組んだ。

①多糖産生乳酸菌の選抜

多糖産生菌のスクリーニングは、石川県立大学の保有する発酵食品より単離された乳酸菌ライブラリーを用いて行った。*Leuconostoc*属乳酸菌15株、*Weissella*属乳酸菌3株を2%スクロース含有MRS寒天培地に画線し、ムコイド状コロニーを形成した乳酸菌12株を多糖産生菌として選抜した(表1)。さらに、多糖産生能がすでに報告されている乳酸菌5株(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* B-512F, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* B-1299, *L. cit-*

reum B-742, *L. citreum* B-1355, *L. citreum* B-1501)をARS Culture Collection (NRRL)より、*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^Tを独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より購入し、多糖産生乳酸菌としてともに評価に用いた(表1)。

②乳酸菌の産生する多糖の精製

各多糖産生乳酸菌を25 mlのスクロース培地(15% スクロース, 0.5% bacto-peptone, 0.5% yeast extract, 1.5% K₂HPO₄, 0.001% MnCl₂, 0.001% NaCl, 0.005% CaCl₂)にて30℃, 24時間静置培養し、遠心にて菌体成分除去後、培養上清中に分泌した多糖を等量のエタノールによって沈殿させ、50%エタノールで2回洗浄して回収した。分離株ではISPU-415株, ISPU-388株, ISPU-402株, ISPU-392株, ISPU-431株, 分譲株ではNRRL B152F株, NRRL B742株, NRRL B1299株, NRRL B1355株, NRRL B1501株において300 mg以上の多糖が回収され、高い多糖産生能が認め

られた (表1)。

③乳酸菌由来多糖合成酵素を用いた多糖の合成

さらに、それぞれ構造の異なる多糖を合成することがすでに報告されている多糖合成酵素を乳酸菌よりクローニングし、大腸菌による組み換え酵素を用いて、構造の異なる多糖の合成を試みた。α-1,6結合グルコース鎖（デキストラン）を合成する酵素DsrSの遺伝子を *L. mesenteroides* NRRL B-512F株のゲノムより、α-1,6結合の主鎖にα-1,3結合の側鎖を含むグルコース鎖を合成する酵素LEUM1752の遺伝子を *L. mesenteroides* JCM6124株のゲノムより、α-1,6結合とα-1,3結合の繰り返し配列よりなるグルコース鎖（アルタナン）を合成する酵素ASRの遺伝子を *L. mesenteroides* NRRL B-1335株のゲノムより、PCRにて増幅した。得られた遺伝子断片を制限酵素NdeIとNotIにて切断したpET23bプラスミドにIn-Fusion HD PCR Cloning Kit (Clontech)を用いて挿入して発現プラスミドを構築し、*Escherichia coli* BL21 (DE3)へ導入して組み換え酵素発現株を作成した。これら発現株をアンピシリン

含有 (100 μg/ml) LB培地にて培養後、0.1 mM IPTG を添加して酵素遺伝子の発現を誘導し、20℃、20時間培養したのち遠心にて集菌した。ソニケーションにて菌破碎後、Ni-NTA カラム (HisTrap HP, GE Healthcare)を用いたHis タグ精製と、Hi-Trap Q HP カラム (GE Healthcare)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにて、各多糖合成酵素を精製した。精製酵素の至適pHおよびpH安定性を測定したところ、いずれの酵素もpH5.5で最も高い活性を有しており、また安定性の低下も認められなかったことから、多糖合成反応はpH 5.5で行った。

各酵素0.5 mg/mlを50 mM Sucrose, 0.1 mM CaCl₂, 100 mM Sodium Acetate (pH 5.5) にて28℃、12時間反応後、反応液中の多糖を等量のエタノールによって沈殿させ、50%エタノールで2回洗浄して回収した。各反応液8 mlより合成された多糖は、酵素DsrSは38 mg, 酵素LEUM1752は40 mg, 酵素ASRは11 mgであった。

④多糖による多糖の金属イオン吸着能の評価

乳酸菌培養液より精製した多糖、および乳酸菌由来酵素

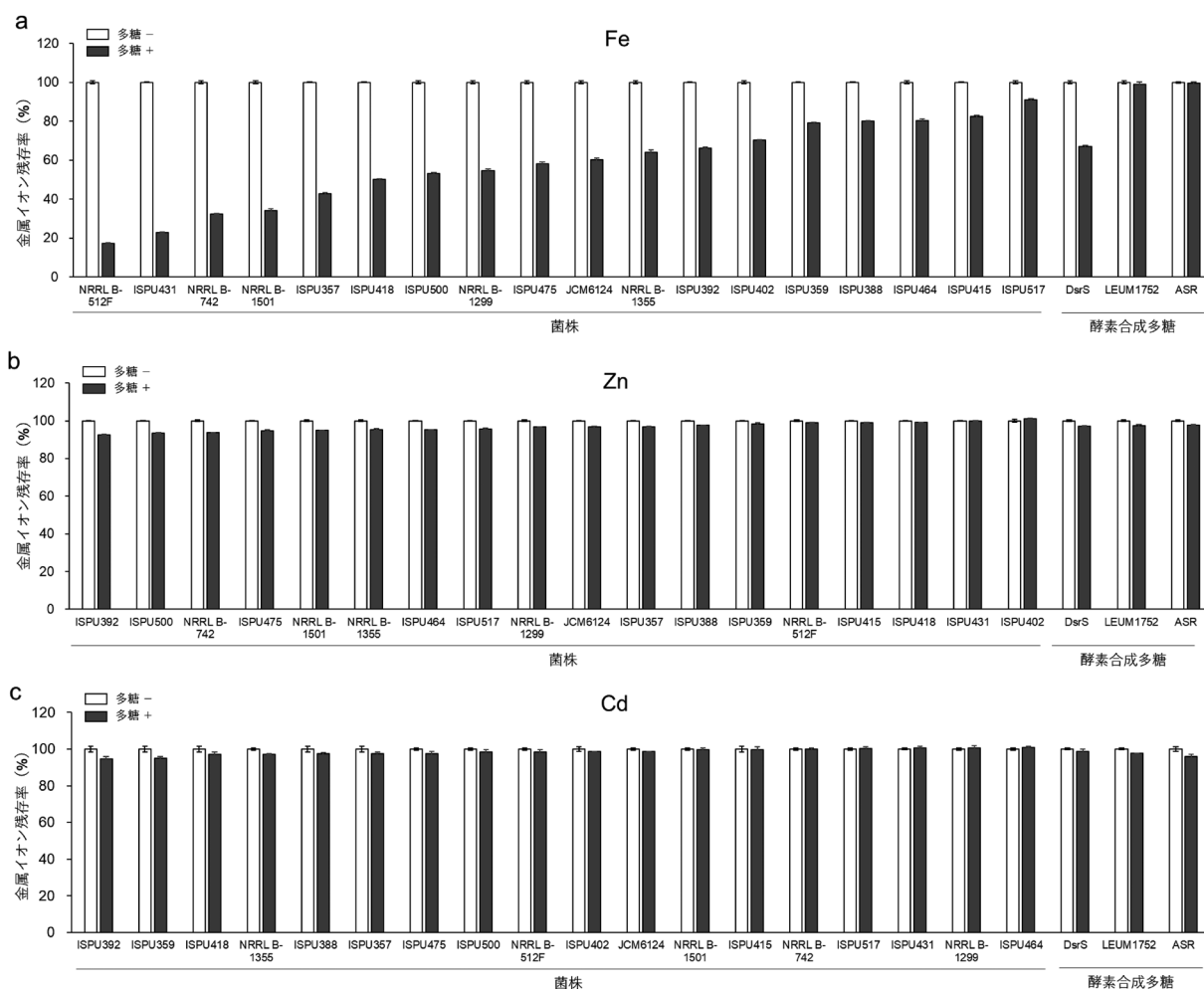


図1. 乳酸菌の産生する多糖および酵素合成多糖の、鉄 (Fe)、亜鉛 (Zn)、カドミウム (Cd) 吸着能の比較.

によって合成した多糖の、金属イオン吸着能を評価した。得られた多糖0.5 mg/mlを各金属イオン標準液（鉄5 ppm, 亜鉛3 ppm, カドミウム3 ppm）中で処理し、24時間後に50%エタノールで多糖を除去、フィルトレーション（0.45 μ m）したサンプル中に残存する金属イオン量を、原子吸光分析装置（ThermoFisher iCE 3500 AAS）にて測定した（図1a-c）。

多糖の鉄イオン吸着能には、菌株によって大きな差が認められた（図1a）。NRRL B-512F株の産生する多糖共存下では鉄イオンが83%吸着したのに対し、ISPU517株の多糖に吸着したのは9.0%のみであった。一方、いずれの多糖においても亜鉛およびカドミウムイオン吸着能は低く、もっとも吸着能の高かったのはISPU392株であり、亜鉛イオンは7.5%、カドミウムイオンは5.5%の吸着が認められた。

次に、ISPU392株の多糖（2 mg/ml）を用い、他の重金属イオン吸着能も評価した（図2）。鉄5 ppm, 亜鉛3 ppm, カドミウム3 ppm, 鉛7 ppm, 銅3 ppm中で同様に処理し、エタノールによる多糖除去後の金属イオン残存率を測定したところ、鉄イオン以外に銅イオンも15%減少しており、銅イオン吸着能も有することが示唆された。

⑤多糖の糖鎖結合様式の分析

金属イオン吸着能に影響する多糖構造を明らかにするため、得られた多糖体の糖鎖結合様式を比較した。多糖（100 μ g）をジメチルスルホキシドに溶解し、水酸化ナトリウム添加後ヨウ化メチルを加えてメチル化を行った。クロロホルム：水＝1：4にてクロロホルム層にメチル化糖を抽出し、酢酸・塩酸混合液で18時間、80℃で加水分解を行った。重水酸化ホ

ウ素ナトリウムで還元、無水酢酸・ピリジンでアセチル化し、GC-MS分析に供し、得られたMSパターンより糖鎖結合様式を同定した（表2）。*Leuconostoc*属の産生する α グルコース鎖の結合様式は、1,6結合、1,3結合、1,2結合の存在が報告されているが⁶、本研究の乳酸菌においては、1,6結合および1,3結合より構成される多糖を産生していた。しかし、多糖中の1,3結合の割合は、5%以下の多糖と、25%以上の多糖に大きく分類された。

そこで1,3結合グルコースの割合が鉄イオン吸着能に与える影響を解析したところ、1,3結合グルコースの割合が高い多糖の場合、いずれも70%以上の鉄イオンが残存しており、鉄イオン吸着能が低いことが示された（図3）。酵素DsrS, LEUM1752, ASRより合成した多糖においても同様に、1,3結合グルコースの割合が高いLEUM1752およびASR合成多糖においては99%の鉄イオンが残存していたことから、多糖中の1,3結合グルコース鎖の存在が鉄イ

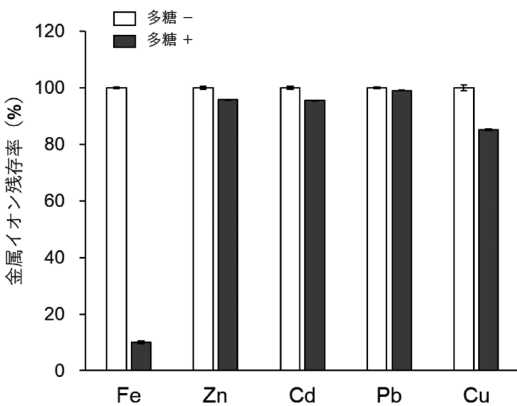


図2. 乳酸菌ISPU392株の重金属イオン吸着能。

表2. 乳酸菌の産生する多糖および酵素合成多糖の糖鎖結合様式の解析。

菌種	菌株	酵素	多糖の構成 (%)			
			T-Glcp-(1→	→3-Glcp-(1→	→6-Glcp-(1→	→3,6-Glcp-(1→
<i>Leuconostoc citreum</i>	ISPU-415		10	28	52	11
<i>Leuconostoc citreum</i>	ISPU-388		12	30	48	10
<i>Leuconostoc citreum</i>	ISPU-402		10	28	52	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-357		11	4	78	8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-359		8	5	81	7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-392		28	26	41	4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-418		12	4	78	6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-464		11	2	82	4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-475		13	ND	79	8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-500		12	ND	81	7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ISPU-517		14	4	71	11
<i>Leuconostoc garlicum/lactis</i>	ISPU-431		11	2	82	4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	JCM6124	LEUM1752	13	32	49	6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B152F	DsrS	7	3	77	13
<i>Leuconostoc citreum</i>	NRRL B1355	ASR	13	30	45	12

T-Glcp-(1→; 末端グルコース、→3-Glcp-(1→; 3位結合グルコース、→6-Glcp-(1→; 6位結合グルコース、→3,6-Glcp-(1→; 3,6位結合グルコース

オン吸着能を低下させることが強く示唆された。一方、1,3結合の割合が5%以下の多糖であっても鉄イオン残存率の高いものもあり、金属イオン吸着能に影響する要因は複数あることが推察された。

⑥担体への乳酸菌の固定化

乳酸菌 ISPU392株を固定化する担体を検討した。スクロース培地に ISPU392株を添加し、発泡ポリプロピレンまたは微生物固定化担体 APGCC-10B（日清紡ケミカル）と共に24時間培養後、50%エタノールで担体を洗浄して50℃で5時間乾燥した。菌添加なし（菌-）と菌添加あり（菌+）の担体の乾燥後重量を比較したところ、発泡ポリプロピレンにおいては約0.8%の重量増加が、微生物固定化担体においては7.0%の重量増加が認められ、微生物固定化担体に乳酸菌が固定化したと考えられた（図4）。

次に乳酸菌を固定化した担体 APGCC-10B を用い、重金属イオン吸着能を評価した（図5）。鉄イオン吸着能に関

しては、多糖による吸着能と同様30%程度の鉄イオンの吸着が認められ、担体に固定化した多糖によっても重金属除去が可能であることが明らかとなった。一方、亜鉛およびカドミウムイオンに関してはいずれも7.0%の吸着率であった。

考察と展望

本研究において、鉄イオンおよび銅イオン吸着能を有する *Leuconostoc* 属乳酸菌を見出し、乳酸菌の多糖構造の解析から、鉄イオン吸着能と多糖構造中の1,3結合グルコース鎖の関連性を明らかにした。また、微生物固定化担体に吸着させた乳酸菌においても鉄イオン吸着能を保持できることを明らかにした。しかしながら他の重金属イオンに関しては7.0%以上の吸着能を有する乳酸菌を見出すことはできず、よってこれらの吸着能を有する多糖の選抜が課題として考えられる。今後、他の重金属イオンも効率的に吸着させる方法を検討し、新たな雨水ろ過装置開発につなげていきたい。

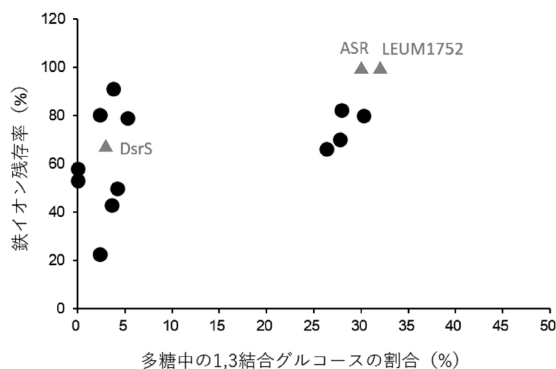


図3. 多糖の1,3結合の比率と鉄イオン残存率の関係。
●: 乳酸菌の産生する多糖, ▲: 酵素合成多糖。

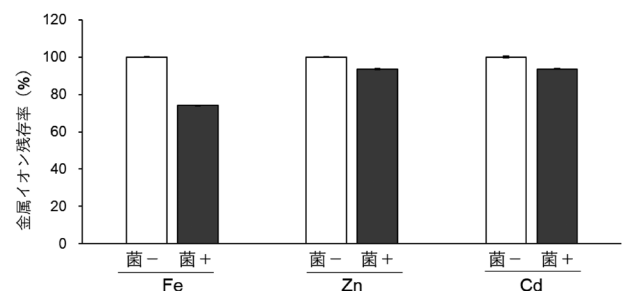


図5. 乳酸菌 ISPU392株固定化担体を用いた、重金属イオン吸着能の評価。

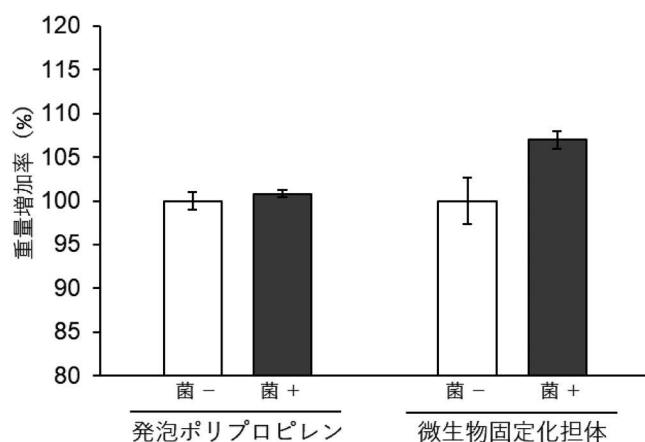
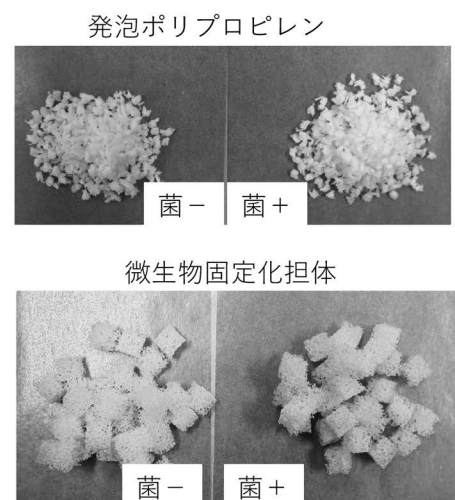


図4. 乳酸菌 ISPU392株の担体への固定化。

乳酸菌を発泡ポリプロピレンまたは微生物固定化担体 APGCC-10B（日清紡ケミカル株）とともに培養し、24時間後の重量増加量を比較した。



3. 謝辞

本研究助成をしていただいた公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。また、本研究に使用した乳酸菌 ISPU 株を提供していただいた石川県立大学食品科学研究科小柳喬准教授に御礼申し上げます。

4. 参考文献

1. 山岡到保, 滝村修, 布施博之, & 上村一雄. (1993): 水中の各種重金属類の吸着剤として微細藻類 (赤潮プランクトン) の利用. 日本化学会誌 (化学と工業化学), 1993 (4), 395-399.
2. Kanno, K., Fujita, Y., Honda, S., Takahashi, S., & Kato, S. (2014): Urethane foam of sulfated polysaccharide Ulvan derived from green-tide-forming chlorophyta: Synthesis and application in the removal of heavy metal ions from aqueous solutions. *Polymer Journal*, 46(11), 813-818.
3. van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I. G. (2006): Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157-176.
4. Torino, M. I., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015): Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6, 834.
5. 松崎千秋 (2021). 乳酸菌が産生する菌体外多糖の構造と機能性. 化学と生物, 59(1), 7-15.
6. Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016): Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121-1135.

5. 第46回研究奨励金報告書

第46回研究奨励金報告書

多価不飽和脂肪酸の直接酸化による 生物活性脂質メディエーターの集成的創出

富山県立大学工学部生物工学科
占部大介

背景と目的

魚油に含まれるオメガ3脂肪酸は、生体内で酸化的代謝を受け、生体防御機構に密接に関わる生理活性脂質メディエーターへと変換される。例えば、ドコサヘキサエン酸(DHA)は15-リポキシゲナーゼ(LOX)によって位置選択的に酸化された後、17-ヒドロキシドコサヘキサエン酸(以下、17-ヒドロキシDHA)へと変換される。生合成中間体である17-ヒドロキシDHAはさらに酵素的酸化を受け、共通のC13-C22構造をもつレゾルビンD類へ変換されると考えられている。生体内でDHAから生成する脂質メディエーター類は極微量ではあるが、抗炎症活性を持つ重要な生体内化学コミュニケーションターであり、がんや慢性炎症などの治療薬の候補化合物として注目されている^{1),2)}。

DHAのLOXによる酸化は高い位置選択的で進行し、生体内では脂質メディエーターが効率的に産出される。一方で、酸化がダブルアリル位のC-H結合の均等開裂から

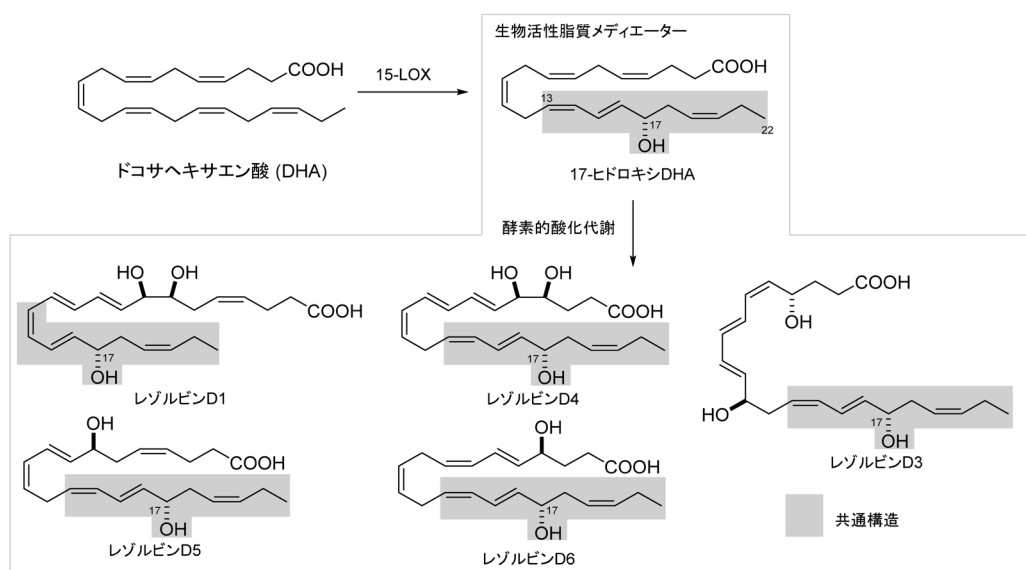
進行することを考慮すると、ダブルアリル位を複数有するDHAの化学的な酸化様式は多様であり、未だに同定されていないDHA酸化代謝物の構造異性体は数多く存在すると思われる。DHA由来の抗炎症活性脂質メディエーターの構造多様性と広い抗炎症活性を考慮すると、未同定の構造異性体も有望な抗炎症剤として機能することが期待される。

本研究では、有機合成化学的手法による、多様な酸化様式を持つオメガ3脂肪酸の酸化物の創出を目的とした。今回、ダブルアリル位の直接酸化戦略、および収束的戦略を活用した2つの集成的合成法の検討を行った。

結果と考察

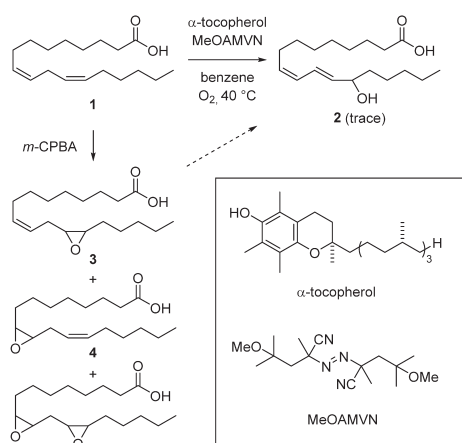
1) ダブルアリル位の直接酸化によるオメガ3脂肪酸の酸化物の合成研究

DHAのモデルとしてダブルアリル位を一つ有するリ

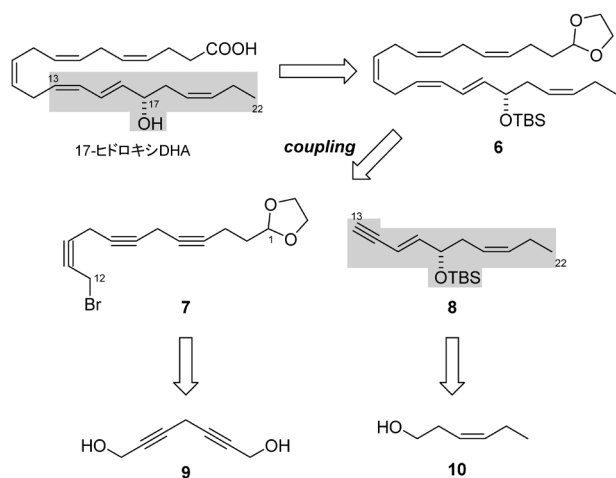


Scheme 1. DHAの酸化的代謝機構による抗炎症性脂質メディエーターの生成.

ノール酸 (**1**) を用いて、文献に報告されている多価不飽和脂肪酸の酸化法の妥当性を検証した (Scheme 2). すなわち、DHA が酸化されて *E,Z*-ジエン構造をもつ 17-ヒドロキシ DHA へと変換されるのと同様に、**1** が *E,Z*-ジエン **2** へと効率的に変換されるか否かを確認した. **1** に対して、ラジカル開始剤 (MeOAMVN) と酸素存在下に α -トコフェロールを作用させた³⁾. しかし、反応は複雑化し、目的としていた **2** は痕跡量で生成するのみであった. また、**1** を *m*-CPBA で酸化し **3** を合成した後、エポキシドを開環する方法により *E,Z*-ジエン構造の構築を試みたが⁴⁾、**1** の酸化は **3**, **4**, **5** の混合物を与え、**1** が有する 2 つの二重結合を位置選択的にエポキシ化することは困難であった. 以上の 2 つの酸化反応は最適化検討の余地を残しているものの、混合物から **2** を単離精製することが困難であったため、断念した. そこで収束的戦略を活用した脂質メディエーターの集成的合成を試みることにした.



Scheme 2. リノール酸 (**1**) の直接酸化の検討.

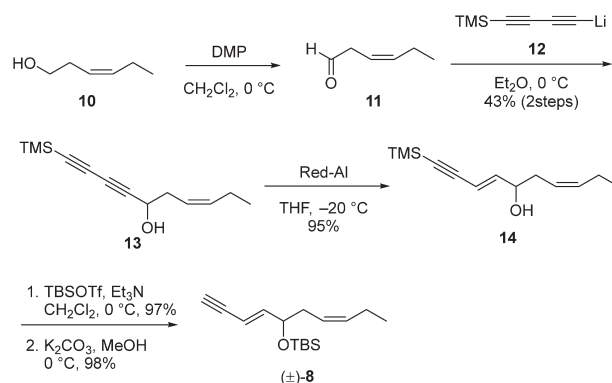


Scheme 3. 17-ヒドロキシ DHA の合成計画.

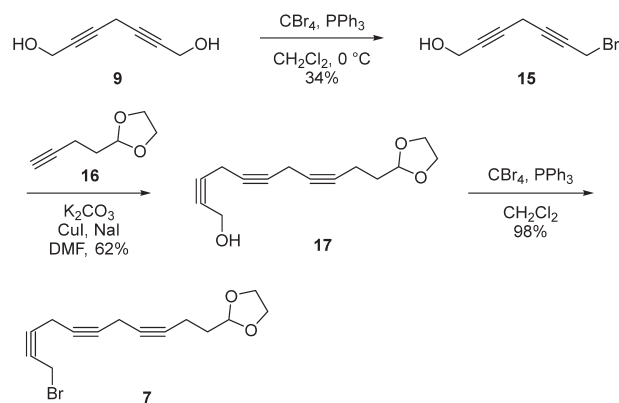
2) 収束的戦略による合成研究

Scheme 1 に示すように、生合成的に関連する脂質メディエーター類の構造は類似している. そこで、17-ヒドロキシ DHA、およびレゾルビン D 類が共通して有する C13-C22 部分構造を含む合成中間体を設計し、収束的戦略によって脂質メディエーターの集成的合成を試みる計画を立てた. Scheme 3 には最初の標的とした 17-ヒドロキシ DHA の合成計画を示した. 17-ヒドロキシ DHA は同一の炭素骨格をもつ合成中間体 **6** から得られると考えた. **6** は、C1-C12 フラグメント **7** および C13-C22 フラグメント **8** の S_N2 カップリングから得るものとした. C13-C22 フラグメント **8** は、*cis*-3-ヘキセン-1-オール (**10**) から、C1-12 フラグメント **7** は、ジオール **9** から合成することとした. この計画に従い 17-ヒドロキシ DHA が合成できれば、様々な構造を持つ C1-C12 フラグメントとカップリングさせてレゾルビン D 類の集成的合成が可能になると期待した. 今回、ラセミ体の 17-ヒドロキシ DHA の合成研究を行った.

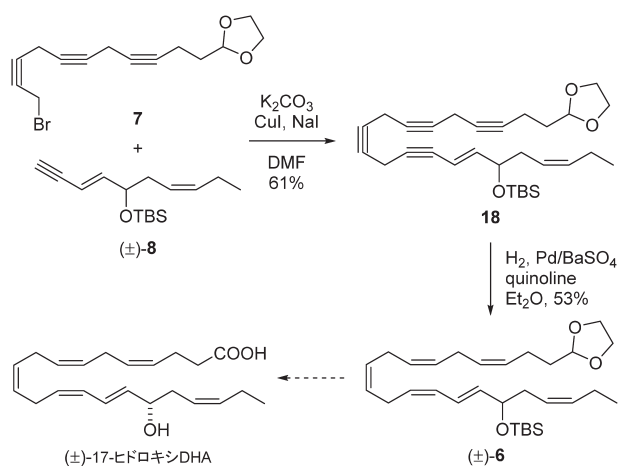
cis-3-ヘキセン-1-オール (**10**) を Dess-Martin 試薬で酸化しアルデヒド **11** とした (Scheme 4). アルデヒド **11** は不



Scheme 4. C13-C22 フラグメント (±)-**8** 合成.



Scheme 5. C1-C12 フラグメント **7** の合成.



Scheme 6. C13-C22 フラグメント (±)-**8** と C1-C12 フラグメント **7** のカップリング.

安定かつ揮発性であり、取り扱いが容易ではなかったが、アルキニルリチウム **12** を速やかに作用させることで、2 工程収率 43% でジイン **13** を導いた。ジイン **13** を Red-Al で還元し *E*-オレフィンを形成した後、ヒドロキシ基を TBS エーテルとして保護した。次いで、アルキンの TMS 基を除去し、C13-C22 フラグメント (±)-**8** を合成した。

C1-C12 フラグメント **7** はジオール **9** から合成した (Scheme 5)。ジオール **9** の一方のヒドロキシ基をジクロロメタン溶媒中トリフェニルホスフィン存在下で四臭化炭素と反応させプロミドとした。**15** を別途合成したアセタール **16** とカップリングさせ、トリイン **17** を導いた後、ヒドロキシ基をプロモ化し、**7** を合成した。

合成した C13-C22 フラグメント (±)-**8** および C1-12 フラグメント **7** を DMF 溶媒中炭酸カリウム、ヨウ化銅および、ヨウ化ナトリウムを用いてカップリングさせたところ、円滑に反応は進行し、テトライン **18** を収率 61% で与えることが分かった (Scheme 6)。得られた **18** に対して水素添加による部分還元を試みたところ、触媒を Pd/BaSO₄ としジエチルエーテル溶媒中で反応を行うと、望みのポリイ

ン (±)-**6** が収率 53% で得られた。これによって、17-ヒドロキシ DHA の炭素骨格をもつ中間体を合成することに成功した。

まとめ

本研究では、多様な酸化様式を持つオメガ 3 脂肪酸の酸化物の集合的合成法の確立に向け、2 つの戦略を検討した。まず、**1** を用いて多価不飽和脂肪酸の直接酸化を試みたが、*E,Z*-ジエン構造を持つ **2** はわずかに生成するのみであった。そこで、脂質メディエーターの共通構造に着目した収束的合成を検討した。17-ヒドロキシ DHA およびレゾルビン D 類が持つ共通部分構造を含む合成中間体を設計し、17-ヒドロキシ DHA の合成研究を行った。現在までに、C13-C22 フラグメント (±)-**8** と C1-C12 フラグメント **7** のカップリングを進行させ、17-ヒドロキシ DHA の炭素骨格をもつ中間体 (±)-**6** を合成することに至った。今後は 17-ヒドロキシ DHA の合成を完了させ、多価不飽和脂肪酸の集合的合成に向けた収束的合成戦略の妥当性を検証する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に感謝申し上げます。

参考文献

- Schwab, J. M.; Chiang, N.; Arita, M.; Serhan, C. N. *Nature*, 2007, 447, 869.
- a) Serhan, C. N.; Petasis, N. A. *Chem. Rev.*, 2011, 111, 5922. b) Serhan, C. N.; Levy, B. D. *J. Clin. Invest.*, 2018, 128, 2657.
- Lamberson, C. R.; Xu, L.; Muchalski, H.; Montenegro-Burke, J. R.; Shmanai, V. V.; Bekish, A. V.; McLean, J. A.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S.; Porter, N. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 838.
- Grabovskiy, S. A.; Kaba'nova, N. N.; Chatgililoglu, C.; Ferreri, C. *Helv. Chim. Acta*, 2006, 89, 2243.

ピレノシン A の抗腫瘍効果の検証及び作用点の解明

麻布大学獣医学部
紙透伸治

1. 研究の背景・目的

我々は、糸状菌から単離されたピレノシン A (図1) が培養細胞に対して単極紡錘体というユニークな現象を引き起こし、がん細胞の増殖を抑制することを明らかにしている。単極紡錘体は、細胞分裂期 (M期) に通常二極となる紡錘体が一つの極になる現象である。単極紡錘体を引き起こす化合物としては、キネシン Eg5 の阻害剤が知られているが、ピレノシン A は Eg5 の酵素活性を全く阻害しなかった。このためピレノシン A はこれまでに報告がないタイプの単極紡錘体を誘導する化合物と考えられる。また、単極紡錘体を誘導する Eg5 阻害剤は副作用の低い抗がん剤として注目されていることから、ピレノシン A も抗がん剤としての可能性が期待できる。そこで本研究では、以下の3つを目的とした。

- (1) ピレノシン A は各種がん細胞の増殖を抑制することが既にわかっている。そこでがん細胞を移植したヌードマウスを用いて *in vivo* で抗腫瘍効果を示すかどうかを検証する。
- (2) ピレノシン A を生産する糸状菌を様々な培養条件で培養し、ピレノシン A と構造が類似する類縁体を探索する。構造活性相関について調べる。
- (3) ピレノシン A の作用点を明らかにするために、ブルダウン法により細胞内の結合タンパク質を同定し、作用点を明らかにする。

2. 研究成果

(1) *in vivo* での抗腫瘍効果の検証

ヒト肺がん細胞 A549 をヌードマウスの皮下に移植し、担癌モデルマウスを作成した。担癌マウスにピレノシン A を 20 mg/kg の投与量で腹腔内投与した。14日間毎日投与し、腫瘍径を測定した。その結果、ピレノシン A 処理により腫瘍サイズの増加を抑制する傾向が見られ、35日目以降から有意な差を示した (図2)。また、ピレノシン A 投与による顕著な体重の変化は見られなかった。以上の結果から、ピレノシン A は、顕著な毒性がなく抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。今後は尾静脈中投与など、投与方法をさらに検討することでより高い抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討する。

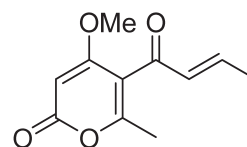


図1. ピレノシン A.

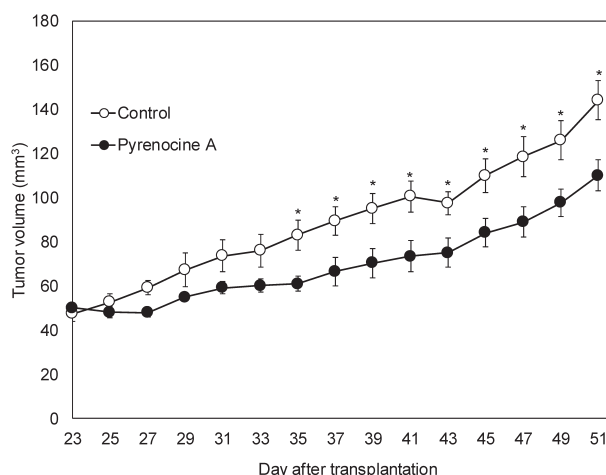


図2. ピレノシン A の抗腫瘍効果.

ヌードマウス (BALB/c nu/nu) に A549 細胞を移植し (Day 0)、生理食塩水に溶かしたピレノシン A を 14日間 (Day 23-36) 毎日 20 mg/kg で腹腔内に投与した。エラーバーは標準誤差を表す。n=4。*P<0.05 (Student's *t* test)。

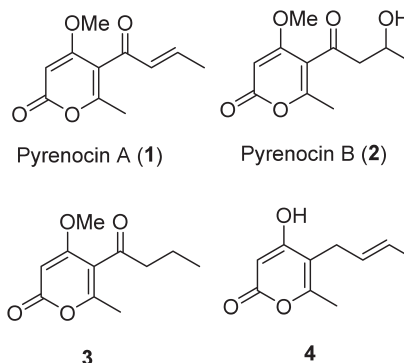


図3. ピレノシン類縁体の構造。

(2) ピレノシン A 類縁体探索と構造活性相関

ピレノシン A を生産する糸状菌の代謝産物から類縁体の探索を行った結果、ピレノシン B および化合物 3, 4 が得られた (図3)。得られた化合物について HeLa 細胞 (ヒト子

表1. HeLa細胞に対する細胞増殖抑制活性.

Compounds	IC ₅₀ (mM)
1	9.3±0.4
2	22.3±3.1
3	>100
4	>100

宮頸がん細胞)に対する増殖抑制活性を測定した(表1). その結果, ピレノシン B はピレノシン A よりも活性が低く, 化合物**3**及び**4**では増殖抑制効果が見られなかった. このため, ピレノシン A のエノン構造が活性に重要であり, ピレノシン A は標的タンパク質のチオールと共有結合することによって増殖抑制効果を示す可能性が示唆された.

(3) ピレノシン A の作用点の解析

ピレノシン A の標的タンパク質を同定するために, アルキン誘導体を合成した. このアルキン誘導体で HeLa 細胞を処理し, 細胞破碎液を作成後, アルキン部位にフイスゲン反応によりアジド基が結合したビオチンを導入した. アビジンビーズを用いて結合タンパク質を精製し, LC-

MS/MS によりタンパク質を解析した. その結果, アネキシン A2 が同定された. 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用いて, リコンビナントアネキシン A2 とビオチン化ピレノシン A の相互作用を解析した. ビオチン化ピレノシン A をセンサーチップに固定し, アネキシン A2 を添加したところ振動数の減少が見られた. このことからアネキシン A2 とピレノシン A が結合することが示唆された.

3. 発表論文

Myobatake Y, Kamisuki S*, Tsukuda S, Higashi T, Chinen T, Takemoto K, Hachisuka M, Suzuki Y, Takei M, Tsurukawa Y, Maekawa H, Takeuchi T, Matsunaga TM, Sahara H, Usui T, Matsunaga S, Sugawara F. (*corresponding author): Pyrenocine A induces monopolar spindle formation and suppresses proliferation of cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* 27(23), 115149 (2019).

根寄生植物による超高感度ストリゴラクトン認識メカニズムの解明

明治大学農学部

瀬戸義哉

研究の背景・目的

根寄生植物は, アフリカなどの地域を中心に甚大な被害をもたらしており, 年間被害額は1兆円にも上ると言われている. その生活環における一つの特徴は, 宿主の根から分泌されるストリゴラクトン (SL) という分子を認識して発芽する点である. これは, 宿主非存在下では生きていけない根寄生植物が獲得した緻密な生存戦略であると考えられる. 根寄生植物の SL に対する感受性は極めて高く, 1 pM 程度の低濃度の SL 存在下でも発芽することが可能である. 一方, SL は植物において枝分かれを制御するホルモン分子としても機能する. 近年, SL の生合成や信号伝達メカニズムの解明が進み, SL がホルモンとして機能する際の受容体タンパク質として, 加水分解酵素に属する DWARF14 (D14) が同定された. かつ, 根寄生植物の一種であるストライガには, D14 のパラログに相当する HTL ファミリー遺伝子が多数存在しており, それらのうちの幾つかが, 発芽時における SL 受容体として機能することが明らかとなった. また, 大変興味深いことに, そのうちの一つである HTL7 は, SL に対する感受性が極めて

高く, HTL7 を発現させたシロイヌナズナ組み換え植物の種子は, あたかも根寄生植物であるかのように, 低濃度の SL を感知して発芽することが報告された (Toh et al., *Science*, 2017). すなわち, 根寄生植物による超高感度な SL 認識を可能としているのが, この HTL7 受容体であると言える. しかしながら, なぜ HTL7 がこれほどまでに感度よく SL を認識可能であるのか, そのメカニズムは明らかとなっていない. 上記のように, シロイヌナズナにおいて発現した際に超高感度に SL 認識が可能となるのは, ストライガに多数存在する HTL のうち, HTL7 を発現した時のみであるが, 他の HTL とどのような違いがあつて, こういった大きな違いがもたらされているのかは, 本領域に残された一つの重要課題である. そこで, 本研究においては, 特に HTL7 との相同性が最も高いながらも, SL に対する感受性はさほど高くない HTL8 に着目し, 両者における生化学的な差異を明らかにするとともに, 両者の間で異なるアミノ酸に着目することで, 感受性の差を生み出す要因を分子レベルで明らかにすることを目的とした.

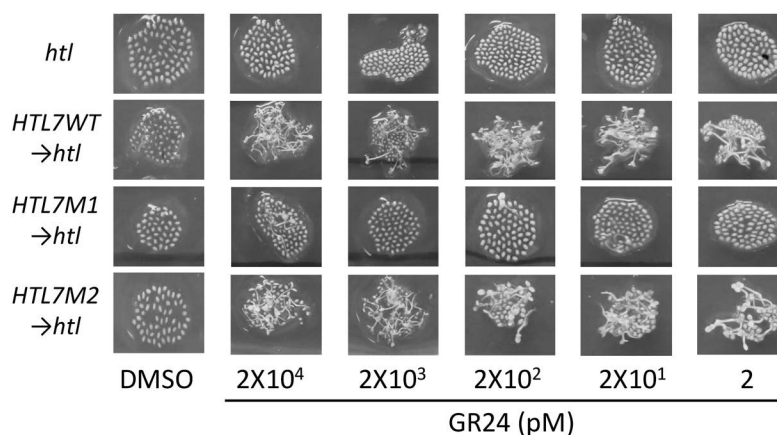


図8. HTL8型変異を導入したHTL7を発現させたシロイヌナズナ形質転換体種子を用いた高温発芽阻害回復試験。

これまでの研究経過

①HTL7とHTL8の生化学的差異の解析

HTL7とHTL8は、シロイヌナズナにおいて発現させた組み換え体種子を用いた試験においては、SL感受性に1000倍程度の差があることが明らかとなっているものの、生化学的な試験においては、そのような差を説明できるような大きな違いは報告されていない。そこで、大腸菌を用いて発現した組み換えタンパク質を利用して、両者の間の差異を詳細に調べることにした。それぞれのタンパク質を発現・精製し、タンパク質の熱変性温度の変化を指標に低分子との相互作用を解析することが可能なDifferential Scanning Fluorimetry (DSF)法を用いてSL分子との相互作用を調べた。通常、SL受容体の熱変性温度はSL依存的に低下することが知られているが、HTL7においては、SL依存的な変性温度の変化が十分に観察できなかった。この原因は明らかとなっておらず、タグを変更するなどして再度調べることを予定している。また、HTLは加水分解酵素としての働きがあることも知られているため、両者のSLに対する加水分解活性を調べたものの、大きな差を見出すことは出来なかった。

②HTL7とHTL8アミノ酸配列の比較による、感受性に関与するアミノ酸残基の同定

HTL7とHTL8のアミノ酸配列の同一性は約80パーセントであり、約45残基が両者の間で異なっている。両者に関する構造情報も参考にしながら、感受性に関わると思われるアミノ酸残基の特定を試みた。特に、リガンド結合

ポケット周辺を中心に、両者の間で異なるアミノ酸に着目し、HTL7をベースにHTL8型の変異を導入した変型HTL7を作成し、これらをシロイヌナズナの htl 変異体にて発現させた組み換え体を作成した。これまでに、二種類の変異導入型HTL7について解析を進めてきた(HTL7M1, HTL7M2)。シロイヌナズナの種子は通常30度を超える高温条件下では顕著に発芽が阻害される。一方、高温条件下での発芽阻害は、SLを外部投与することでHTL依存的に回復することが明らかとなっており、このアッセイ系を利用してHTL7が超高感度にSLを受容することが明らかになった。そこで、変異導入型受容体が発現させた組み換え体種子を用いて発芽試験を行ったところ、HTL7M2を発現した種子は、通常のHTL7を発現した種子と同様に低濃度のSL存在下でも発芽したのに対し、HTL7M1を導入した種子はSLに対する感受性が顕著に低下した(図参照)。すなわち、この変異型受容体で置換したアミノ酸こそが、HTL7の感受性に関わるアミノ酸であることが強く示唆された。現在、HTL8の該当アミノ酸をHTL7型に置換した変異型受容体が発現させた組み換え体も作成中であり、変異の導入により、SL感受性が上昇するか否かを解析してるところである。

以上のように、HTL7による超高感度なSL認識に関わると思われるアミノ酸残基の有力な候補を特定することができた。今後このアミノ酸がいかにしてSLの高感度な認識に関わるのか等をさらに調べていく予定である。

汽水域・土壌における巨大ウイルスの生態と進化の包括的理解

東京理科大学 理学部第一部 教養学科
武村政春

目的

巨大ウイルスは、これまでのウイルスの概念を覆し、翻訳に必要な遺伝子や、時にはバクテリアと同じような複雑な機能と粒子内構造をもつことから、一部の機能を欠く細胞性生物であるとさえ言え、生物の進化ならびに分類に新たな議論を投げかけている。様々な研究が進んでいる一方、個々のウイルスから脱却した生態系レベルの研究はほとんどない。ウイルスは海洋生態系において極めて重要な地位を占めており、巨大ウイルスもまた様々な海域に高頻度に存在し、活発に活動していることが知られている。一方、陸地の湖沼・河川・土壌・都市部の水環境などから分離された巨大ウイルスが“どのような経緯でそこにいるのか”に関しては、ほとんど研究は進んでおらず、これら巨大ウイルスがどのように共通祖先から分岐し、大陸間移動を経て現在の分布に至ったのか、たとえば日本列島に生息する巨大ウイルスがどのような進化、拡散を経て現在の分布に至ったのか、地誌学的な観点からの研究例も未だない。そこで本研究では、巨大ウイルスゲノムの SNS (single nucleotide substitution) に基づく分子系統解析を、その地理的分布と結びつけ、地域差の謎を解明すること、ならびに汽水域や土壌生態系における巨大ウイルスの生態的役割を、新規巨大ウイルスの分離実験などを通して解明することを目的とした。

ミミウイルス SNS 解析と地理的分布ならびに新規分類の提唱

(方法) これまで日本各地から分離した未発表の系統 A ミミウイルス株において、特定の領域を PCR により増幅し、そのシーケンスをおこなって SNS を調べた。同様に、これまでゲノムデータが明らかとなっている各種系統 A ミミウイルス株の該当する SNS を調べた。これらを比較し、ヒートマップにより系統 A ミミウイルスの系統関係を調べた。

(結果・考察) その結果、SNS のタイピングを指標にすると、系統 A ミミウイルスは大きく 3 つのタイプに分かれることが明らかとなった (Akashi and Takemura, 2019a)。さらにこのうち、日本の水環境から分離された系統 A ミミウイルスは、すべて同一のタイプ (type2) に分類される

ことも示唆された (図1)。一方において、フランスなど別の国から分離された系統 A ミミウイルスはどのタイプにも分類されることもわかった (Akashi and Takemura, 2019a)。これらのことから、系統 A ミミウイルスが、大陸移動や大陸隆起などに伴って、各地固有の分布状態を形成するようになったことが示唆された。今後は、マルセイユウイルス科、パンドラウイルス科などに調査対象を広げ、SNS タイピングを行って、その地理的分布と遺伝子との関係を明らかにしていく必要がある。

汽水域・土壌からの新規巨大ウイルスの分離

(方法) 東京・江戸川、新潟・鵜川河口などから淡水・汽水をサンプリングし、*A. castellanii* str. Neff を実験室宿主として巨大ウイルスをスクリーニングした。得られた巨大ウイルスの透過型電子顕微鏡解析によりその形態学的特徴を明らかにするとともに、MCP (major capsid protein) あるいは DNA ポリメラーゼ遺伝子のシーケンスならびに分子系統解析を行い、その帰属を明らかにした。

(結果・考察) 新潟・鵜川河口ならびに柏崎市内の貯水池から、マルセイユウイルス科の新規ウイルス 8 株を分離した。MCP 遺伝子の分子系統解析により、いずれもマルセイユウイルス科系統 B に属する新規ウイルスであることが示唆された (Aoki et al., 2019)。これらのウイルスはさらに

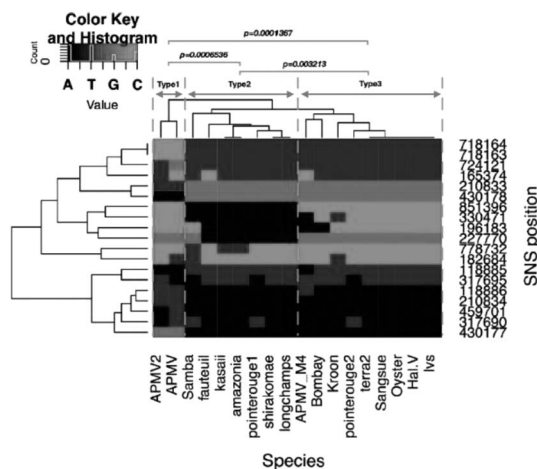


図1. SNSに基づく系統A ミミウイルスの分類。

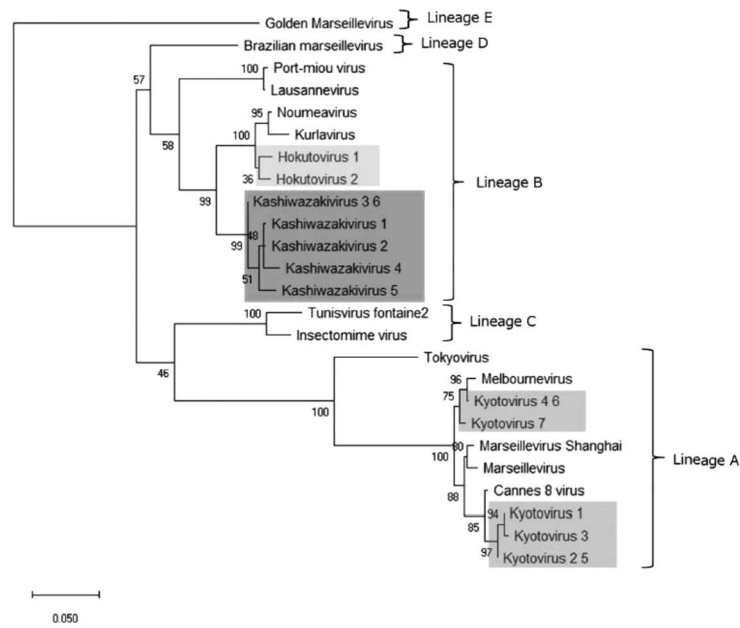


図2. マルセイユウイルス科MCP遺伝子の分子系統樹.

2つのタイプ（2株と6株）に分類されたことから、それぞれ hokutovirus, kashiwazakivirus と命名した（図2）。またこれら新規ウイルス株は、感染した *A. castellanii* 細胞株を凝集させる特徴があることがわかった（Aoki et al., 2019; Fukaya et al., 2020）。さらに埼玉、東京の水環境から複数のマルセイユウイルス科ウイルスを分離し、多くが系統Bに含まれることを見出したが、系統Aのウイルスもいくつか含まれていた。さらに同時期に、京都・戦川の水から、系統Aに属するウイルスも見つかり、kyotovirus と名づけた（図2）。現在までにほかの系統C, D, Eに属するものは日本からは分離されていない。これらのことから、マルセイユウイルス科の各系統の日本国内の分布にはある程度の偏りが存在する可能性が示された。また、東京・江戸川の河川敷の土壌から、日本では初めてとなるパンドラウイルス科の新規ウイルス2株を分離し、さらに同時にミミウイルス科の新規ウイルス1株を分離した（Akashi and Takemura, 2019b）。DNA ポリメラーゼ遺伝子の分子系統

解析により、この2株のパンドラウイルスは、これまで報告されていた海外で分離されたパンドラウイルスと異なることが示され、パンドラウイルス科が世界中に多様に分布していることが示唆された。今後は、さらに日本国内での分離株を増やすとともに、これらのゲノム解析により、地理的分布とゲノムの特徴との関連を明らかにしていく必要がある。

業績

- Akashi M and Takemura M. (2019a): Distribution of SNSs in mimivirus genomes and the classification of mimiviruses isolated from Japan. *Microbes and Environments*, 34, 451-455.
- Akashi M and Takemura M. (2019b): Co-isolation and characterization of two pandoraviruses and a mimivirus from a riverbank in Japan. *Viruses*, 11, 1123.
- Aoki K et al. (2019): Fifteen marseilleviruses newly isolated from three water samples in Japan reveal a local diversity of Marasviridae. *Frontiers in Microbiol*, 10, 1152.
- Fukaya S et al. (2020): Kinetic analysis of the motility of giant virus-infected amoebae using phase-contrast microscopic images. *Frontiers in Microbiol*, 10, 3014.

黄麹菌の固体培養における有用酵素高生産能の細胞生物学的解析

九州大学大学院農学研究院
樋口裕次郎

背景と目的

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本において古くから発酵・醸造産業に用いられてきた有用微生物であり、高い安全性でアミラーゼなどの有用酵素タンパク質を菌体外に大量に分泌する能力を持つ。そうした有用酵素の分泌生産性は、実際の発酵・醸造の現場で行われる米や麦を利用した固体培養の方が、液体培養に比べて高いことが知られている。しかし、有用酵素分泌生産の分子メカニズムについては、実験室レベルでの研究のし易さという点で、これまで液体培養において主に解析が行われてきた。黄麹菌が最も分泌生産する酵素である α -アミラーゼは、液体培養においては菌糸先端から主に分泌され、また一部は細胞と細胞を仕切る隔壁からも分泌されると考えられている。しかし、液体培養とは異なり、寒天培地で培養した際には、 α -アミラーゼは菌糸先端からのみ分泌し、隔壁からの分泌は起こらないことが示唆されている。これらのことから、培養条件によってタンパク質分泌経路が変化する可能性が考えられるが、固体培養におけるタンパク質分泌経路の解析はこれまでにほとんどなされておらず、固体培養による麹造りの条件と有用酵素の生産性については未解明な点が多い。そのため、固体培養での有用酵素の分泌生産性を細胞生物

学的なアプローチにより分子・細胞レベルで明らかにすることが肝要であると考えられる。さらに、黄麹菌の固体培養における有用酵素分泌について、タンパク質レベルだけではなく、mRNA レベルでの細胞生物学的な解析を行うことで、これまでに未解明であった固体培養におけるタンパク質分泌経路についての知見を得ることを目的とした。

方法と結果

黄麹菌の固体培養における詳細を細胞生物学的に解析するため、また時空間的に解析を行うためにライブセルイメージングの系を立ち上げた。固体培地としては、通常研究に使用される α 化米を用い、黄麹菌を1日培養した米麹を解析に用いた。また、実際に黄麹菌細胞が米麹という固体培養において生きた状態で解析することを目的に、緑色蛍光タンパク質EGFPに低分子量GTPaseであるAoRab5タンパク質を融合発現する株を用いた。EGFP-AoRab5は既に液体培養において、初期エンドソームに局在し、恒常的な動態を示すことがわかっている。そこで今回、固体培養においても動態を示すかどうか、そして動態を示す場合に生細胞解析が行われていることの確認の目的で使用した。TCS SP8 (Leica) 顕微鏡を用い、米麹の共焦点蛍光観察を

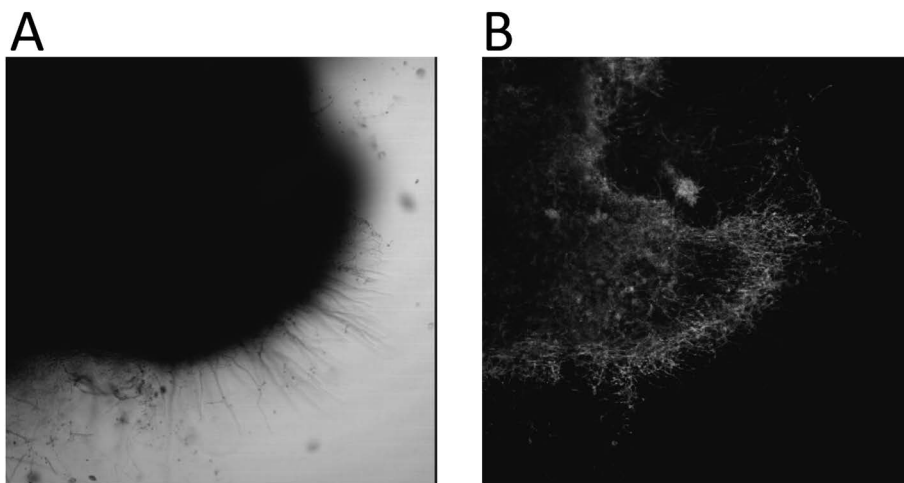


図1. 米麹における黄麹菌の観察。

A: 明視野観察。光を通さない黒い部分が米麹で、その周りに糸状の気中菌糸が見られる。B: 共焦点蛍光観察。米麹内を網目状に菌糸が張り巡らされている様子が見られる。

行った。その結果、EGFP-AoRab5 で可視化された菌糸細胞が米の内部に網目状に張り巡らされている様子が観察され、さらに EGFP-AoRab5 の動態も確認された (図1)。以上のことから、黄麹菌を用いた米麹において、黄麹菌を生細胞解析する実験系の構築に成功した。

さらに、主要な分泌タンパク質である α -アミラーゼが、固体培養のどの段階で時間・空間的に高発現されているのかを解析するために、mRNA 可視化系の導入を試みた。mRNA 可視化系として、バクテリオファージ MS2 由来の RNA ループ (MBS, MS2 binding sites) にコートタンパク質 (MCP, MS2 coat protein) を共発現させる系を用いた。24 コピーの MBS ループを α -アミラーゼをコードする

amyB の 3UTR に挿入し、蛍光タンパク質を付加した MCP が MBS に結合することで mRNA 分子が可視化される。現在、*amyB* の mRNA を可視化するための菌株作製のクローニングを行っている。今後、実際の発酵・醸造の現場における麹造りを模した培養条件において、有用酵素を転写・翻訳レベルで生細胞解析することで、固体培養における有用酵素生産性に関する新たな知見を得る。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会学術活動強化委員会に篤く御礼申し上げます。

6. 第47回研究奨励金報告書

第47回研究奨励金報告書

機能性リポソームを利用したオルガネラ育種技術の開発

鳥取大学・農学部
岩崎 崇

研究目的

本研究では、植物細胞に対する簡便なタンパク質導入法を開発することで、新しい農作物育種技術の創生を目指した。具体的には『植物細胞膜透過ペプチド』と『リポソーム』を組み合わせた独自の分子輸送キャリアーを利用して、植物細胞内の標的オルガネラにゲノム編集酵素Cas9を直接輸送することで、植物オルガネラのゲノム編集技術の開発を目指した。

研究方法

これまでに申請者が独自に開発した『植物細胞膜透過ペプチド修飾リポソーム (His20-Lipo)』(図1)を用いて、ゲノム編集酵素Cas9をタバコ BY-2細胞 (理研RPC: 00001)の核ゲノムに直接輸送することを試みた。

まず、核移行シグナル (NLS) を融合した NLS-Cas9(New

England Biolabs) と蛍光修飾した gRNA-ATTO550 (Integrated DNA Technologies) を混合し、RiboNucleoProtein 複合体 (RNP) を調製した。RNP と中性リン脂質: Phosphatidyl choline と中性脂質: Cholesterol を混合し、RNP 内包リポソーム {Lipo (RNP)} を調製した。Lipo (RNP) にステアシル基を修飾した $C_{17}H_{35}CONH-His20$ ペプチドをリン脂質濃度比20%となるように添加し、His20 (20%)+Lipo (RNP) を調製した。His20 (20%)+Lipo (RNP) をタバコ BY-2細胞に添加し、細胞内局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察するとともに、核ゲノムの標的遺伝子 (PDS 遺伝子) のゲノム編集効率を次世代シーケンサーにて評価した。

次いで、ミトコンドリアゲノムを標的としたゲノム編集酵素Cas9の輸送を実現するため、ミトコンドリア移行型リポソームを調製した。蛍光分子Fluoresceinを内包したリポソーム Lipo (Fluo) の表面に、ステアシル基を修飾した $C_{17}H_{35}CONH-His20$ ペプチドとミトコンドリア移行シグナル ($C_{17}H_{35}CONH-MLS$) を異なる比率で添加することで、His20+MLS修飾リポソームを調製した。前述と同様に、His20+MLS修飾リポソームをタバコ BY-2細胞に添加し、ミトコンドリア局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

研究成果

蛍光修飾した RNP がリポソームに内包されていることを確認するために、RNP内包リポソーム Lipo (RNP) を限外フィルター (300 kDa) にて限外濾過し、遊離 RNP を排除した。Western blotting にて、Lipo (RNP) 画分に Cas9を検出したと同時に、Lipo (RNP) 画分から RNP由来の蛍光を検出した。よって、Lipo (RNP) の調製を確認・完了した。次いで、His20 ペプチドを修飾した His20 (20%)+Lipo (RNP) をタバコ BY-2細胞に添加したところ、BY-2細胞の核内に RNP が輸送されることを確認し

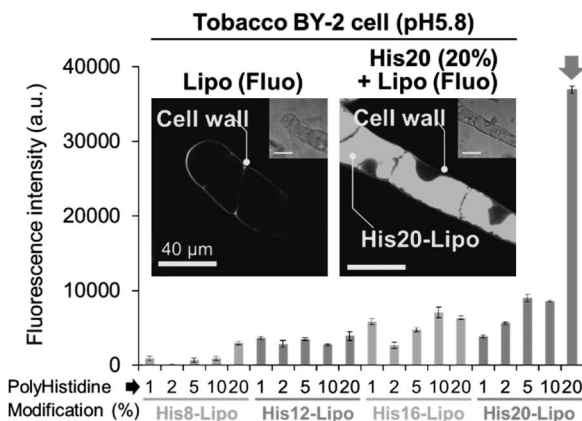


図1. 植物細胞膜透過ペプチド修飾リポソーム (His20-Lipo) の細胞膜透過。

緑色蛍光色素 (Fluorescein) を内包したリポソーム (Lipo) に、ステアシル基を修飾した細胞膜透過ペプチド ($C_{17}H_{35}CONH-His8$, His12, His16, His20) をリポソームの疎水領域に導入することで、植物細胞膜透過リポソーム (His8, His12, His16, His20-Lipo) を調製した。特に、His20-Lipo は極めて効率的に植物細胞内に移行する。

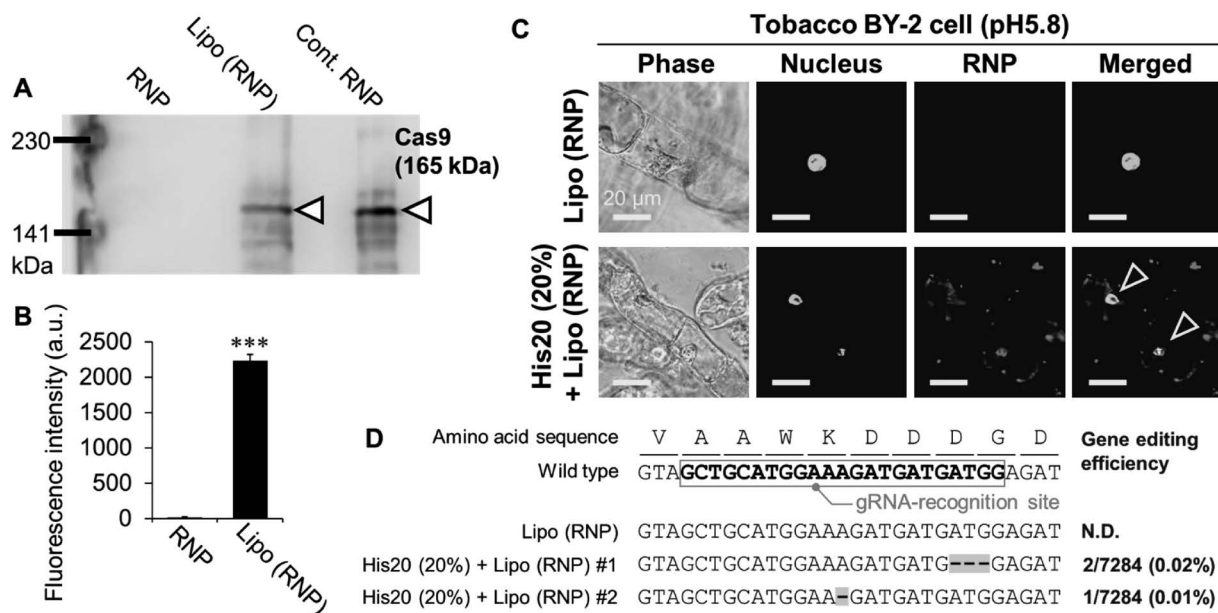


図2. His20-Lipo (RNP) を利用した植物核ゲノム編集.

A) Lipo (RNP) の Western blotting 写真. 矢頭は Cas9 を示す. B) Lipo (RNP) に内包された gRNA-ATTO550 由来蛍光強度. C) His20 (20%) + Lipo (RNP) の細胞膜透過と核移行. D) His20 (20%) + Lipo (RNP) による核ゲノム編集 (塩基欠失) の誘導. 黄色色ハイライトはゲノム編集 (塩基欠失) 領域を示す.

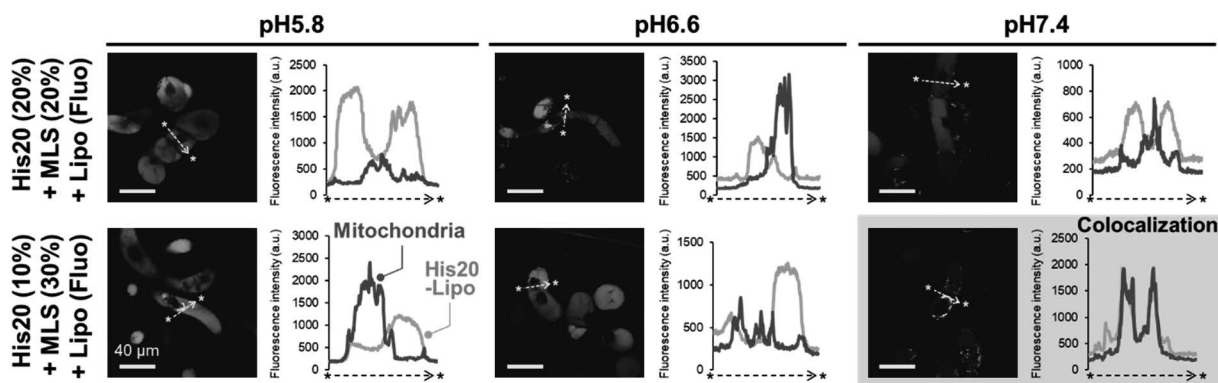


図3. His20 + MLS 修飾リポソームの細胞膜透過とミトコンドリア移行.

緑色蛍光はリポソームに内包された Fluorescein, 赤色蛍光は MitoTracker Red で染色したミトコンドリアを示す. ヒストグラムは, 各視野のアスタリスク間の破線部位における蛍光分布 (定量解析) を示す.

た. His20 (20%) + Lipo (RNP) を利用して, タバコ BY-2 細胞の核ゲノム遺伝子 (カロテノイド生成酵素 phytoene desaturase 遺伝子) を標的としたゲノム編集を試みた. 次世代シーケンス解析により, His20 (20%) + Lipo (RNP) 処理細胞において, 標的遺伝子領域に 2 パターンのゲノム編集 (塩基欠失) が誘導されていることを確認した (図2). 両変異ともに, ゲノム編集効率は 0.02% および 0.01% と低い数値ではあったが, 本研究成果は遺伝子組換えに頼らない植物細胞のゲノム編集に成功した稀有な例であり, His20-Lipo が植物細胞のゲノム編集において有力なツールであることを示すものである.

上記では His20-Lipo を利用することで, タバコ BY-2 細

胞の核ゲノムに RNP を輸送し, 遺伝子組換えに頼らないゲノム編集を実証した. そこで, 遺伝子組換えに頼らないミトコンドリアゲノム編集を実現させるべく, ミトコンドリアへの分子輸送ツールの開発を試みた. His20-Lipo にミトコンドリア移行シグナル (MLS) を修飾した His20 + MLS 修飾リポソームを調製し, ミトコンドリア局在を解析した. その結果, 培地 pH 7.4 の条件下において, His20 (10%) + MLS (30%) 修飾リポソームが細胞膜透過ならびにミトコンドリア移行を示した (図3).

以上の結果から, 細胞膜透過ペプチド (His20) とミトコンドリア移行シグナル (MLS) を利用することで, リポソームを植物細胞内のミトコンドリアへ送達させること

に成功した。今後は、RNP を内包した His20+MLS 修飾リポソームを利用することで、世界初の遺伝子組換えに頼らないミトコンドリアゲノム編集の実現を目指す。

謝辞

本研究課題に対し、多大なるご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に心より感謝申し上げますとともに、貴財団の益々の御発展を祈念申し上げます。

キャリアタンパク質結合型中間体の同定を基盤とした

抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成研究

北海道大学大学院工学研究院 応用化学部門
小笠原泰志

背景・目的

微生物や植物が生産する二次代謝産物は構造多様性があり、それらを生合成する酵素には興味深いメカニズムを有するものが数多く存在する。マイトマイシン類は、放線菌 *Streptomyces ardens* が生産する抗腫瘍抗生物質であり、ベンゾキノンとピロリジジンからなるミトサン骨格にアジリジンが縮環した四環性骨格を構造上の特徴とする (図1)¹⁾。特にマイトマイシン C は、抗がん剤として肺がん、膀胱がん、乳がんに対して有効性を示すため、臨床でも使用される重要な化合物であり、生体内での還元反応により活性化され二本鎖 DNA の架橋形成を介して DNA の複製を阻害することが知られている。その生合成について、標識体の投与実験から、3-アミノ-5-ヒドロキシ安息香酸 (AHBA) と D-グルコサミン (D-glucosamine) を前駆体とすることが明らかにされていた²⁾。また、1999年に生合成遺伝子クラスターも取得されており、AHBA がアミノシキミ酸経路で生合成されることも示されていた³⁾。しかし、AHBA 形成以降のミトサン骨格形成の反応については、長い間解明されていなかった。

当研究室では最近、組換え酵素を用いた *in vitro* 実験で、

AHBA がアシル CoA リガーゼ (MitE) によってアシルキャリアタンパク質 (ACP) である MmcB にロードされ、続いて MitB が UDP-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) を基質にグリコシル化することで GlcNAc-AHBA-MmcB が生成することを明らかにした (図2)⁴⁾。ACP は、脂肪酸合成酵素やポリケチド合成酵素、非リポソームペプチド合成酵素に見られる分子量1万程度のタンパク質であり、アシル基の担体として生合成中間体の厳密な認識や安定化の役割を担う。GlcNAc-AHBA-MmcB は、マイトマイシンの骨格形成に必要なすべての炭素原子と窒素原子を含む鍵生合成中間体であり、マイトマイシンの生合成ではグリコシル化以降も MmcB を担体として反応が進行すると考えられる。ミトサン骨格形成に脱アセチル化酵素 (MitC)、還元酵素 (MitH, MitF, MitK, MmcI, MmcJ)、酸化酵素 (MmcN)、ラジカル SAM 酵素 (MitD, MmcD) などの関与が予想されるが、クラスター中には機能未知遺伝子が多数存在し、配列解析からの経路の予想は困難である。そこで、本研究では遺伝子破壊実験と MmcB 結合型生合成中間体の迅速な精製、分析法を組み合わせたマイトマイシンの生合成経路の解明を目指した。

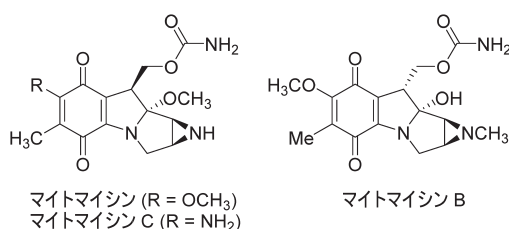


図1. マイトマイシンの構造.

結果・考察

生合成遺伝子クラスター中には機能未知遺伝子が多く、GlcNAc-AHBA-MmcB 以降の生合成について組換え酵素を用いた *in vitro* 解析は現実的ではない。そこで、遺伝子破壊実験による生合成の解明を試みた。前述のように、マイトマイシン生合成では、MmcB 上に AHBA 部のアシル基を介して中間体が結合したまま AHBA の修飾反応が進

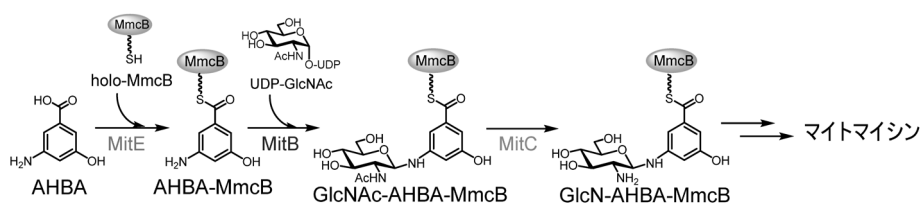


図2. マイトマイシンの生合成.

行してミトサン骨格形成が起こると考えられる。そこで、タンパク質精製用のタグを利用することで MmcB 結合型生合成中間体が精製可能であると考えた。具体的には、生産菌の *mmcB* 遺伝子を精製用タグ融合型 *mmcB* 遺伝子に置換した株を相同組換えにより構築後、さらに機能解析の標的遺伝子の破壊実験を行い、蓄積した MmcB 結合型生合成中間体の精製用タグを用いた精製と LC-MS 分析により中間体の構造を同定する。初めに、マイトマイシン生産菌の *mmcB* 遺伝子を in-frame で欠失した $\Delta mmcB$ 破壊株を構築した。得られた破壊株は、予想通りマイトマイシンの生産性が消失しており、MmcB が生合成に必須であるという *in vitro* 実験の結果と一致する。次に、精製用タグである Strep-タグを融合した *mmcB* 遺伝子 (*strep-mmcB*) を組み込んだプラスミドを導入し、得られた形質転換体を培養後、細胞破碎液からタグ融合型 MmcB の検出と精製を試みた。条件検討を行ったが、これまでのところタグ融合型 MmcB の検出には至っていない。また、*strep-mmcB* による遺伝子相補で、培養液にマイトマイシンの生産回復が見られていないことから、現在 *strep-mmcB* の発現に問題があると考えている。今後、用いるベクターや精製タグの検討も含めてタグ融合型 *mmcB* の発現条件を検討し、その精製・解析手法を確立する予定である。

次に、大腸菌 BL21 (DE3) を宿主に生合成遺伝子を逐次導入し共発現させることで、マイトマイシン生合成の再構築と反応経路の解析を試みた。初めに、MitB 反応生成物である GlcNAc-AHBA-MmcB を菌体内で one-pot 生

成する系の構築を目指し、大腸菌で最大8つの遺伝子を共発現可能な Duet-1 ベクターを用いて、*mitB*, *mitE*, タグ融合型 *mmcB* および MmcB のホロ化に必要なホスホパントテイル化酵素 Sfp を共発現し、AHBA 添加条件下で培養した。集菌後 MmcB を精製し、LC-MS で分析したところ、GlcNAc-AHBA-MmcB の生産が確認され、MitB によるグリコシル化反応までの生合成経路が再現できることが分かった。続いて、マイトマイシン生合成遺伝子クラスター中の各遺伝子をそれぞれ追加共発現させた。その結果、脱アセチル化酵素と相同性がある *mitC* 遺伝子を追加した場合に、LC-MS で GlcNAc-AHBA-MmcB の脱アセチル化体である GlcN-AHBA-MmcB と分子量が一致する新たな代謝産物が確認でき、MitB の次の反応は MitC が触媒する脱アセチル化反応であることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Hata, T.; Hoshi, T.; Kanamori, K.; Matsumae, A.; Sano, Y.; Shima, T.; Sugawara, R., *J. Antibiot.*, 1956, 9, 141.
- 2) Anderson, M. G.; Kibby, J. J.; Rickards, R. W.; Rothschild, J. M., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1980, 1277.
- 3) Mao, Y.; Varoglu, M.; Sherman, D. H., *Chem. Biol.*, 1999, 6, 251.
- 4) Ogasawara, Y.; Nakagawa, Y.; Maruyama, C.; Hamano, Y.; Dairi, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2019, 29, 2076.

微生物代謝の電気制御による発酵プロセスの促進

東京薬科大学生命科学部応用生命科学科
高妻篤史

背景と目的

現在、様々な化合物が発酵法により生産されているが、従来法では生産効率が低く、実用化に至っていないプロセスが多い。発酵プロセスの効率を下げる要因の一つは、原料の糖が菌の増殖や維持にも利用されてしまう点にある。また、原料よりも還元的で高エネルギーな物質を作る場合には、原料の一部から還元力や ATP を生産する必要があるため、さらに炭素収率が低下してしまう。微生物に原料以外からもエネルギーを供給すれば、理論上、原料内の炭素を全て生産物に変換することが可能になる。しかしその場合、プロセスの経済性を保つには、原料よりも安価にエネルギーを供給する必要がある。

一方、近年環境微生物学の分野において、電気化学的活性を持つ細菌 (electrochemically active bacteria, EAB) が注目を集めている。EAB は細胞外電子伝達系を介して、電極との間で電子の授受を行うことができる¹⁾。高電位の電極が存在する場合、これらの細菌は有機物の酸化分解によって発生する電子を電極に放出することで増殖する。一方、電極の電位が低い場合には、EAB は電極から電子を取り込み、細胞内の還元的代謝に利用することができる。電気はグルコースよりも安価であるため²⁾、電気の利用は発酵プロセスの低コスト化につながると期待される。

そこで本研究では、広く発酵プロセスの高効率化や多様化に利用可能な技術として、“電気制御発酵法”の基盤構築を目指した。具体的には、電極から EAB (遺伝子改変 *Shewanella*) に電気エネルギーを供給し、これにより発酵産物 (コハク酸) の生産収率を向上させるプロセスを構築することを目的に研究を行った。

方法と結果

Shewanella oneidensis MR-1 株は電極から電子を取り込み、細胞内の物質変換反応に利用する能力を持つため、電気発酵法のホスト菌株に適していると考えられる¹⁾。MR-1 株は糖 (グルコース) を代謝する能力を持たないが、本株にグルコースの取り込みとリン酸化に必要な遺伝子 (*galP* および *glk*) を導入すると、グルコースを代謝して増殖できるようになることが示されている³⁾。そこで本研

究ではこれらの遺伝子を導入した MR-1 株 (MR-1 (pBBR-*glk-galP*) 株) をベースに、電気制御発酵においてコハク酸を生産可能な遺伝子改変株を構築することとした。

先行研究では、MR-1 (pBBR-*glk-galP*) 株は酸素やフマル酸などの電子受容体存在下 (呼吸条件) でグルコースを資化できることが示されていた。一方、本株を電気制御発酵に利用しようとする場合、電子受容体の存在しない発酵条件下でグルコースを代謝させる必要がある。そこで、まず本株をグルコースを唯一の基質として含む最少培地に植菌し、発酵条件下で増殖できるかを検証した。その結果、本株はフマル酸を電子受容体とした呼吸条件ではグルコースを消費して増殖したが、発酵条件ではグルコースをほとんど消費せず、増殖を示さなかった。この理由として、MR-1 株は還元環境下では TCA サイクルの活性が低下することが知られているため、発酵条件では呼吸条件よりも TCA サイクルの活性が低下し、これにより増殖に必要なアミノ酸が合成できなくなっていることが予想された。そこでアミノ酸源として 0.1% のトリプトンを加えて同様に培養を行ったところ、発酵条件においてもグルコースの消費に伴って細胞の増殖が見られた。この結果を元に、以降の実験では MR-1 (pBBR-*glk-galP*) 株の培養には 0.1% トリプトンを添加した最少培地 (TM) を用いることとした。

次に、MR-1 (pBBR-*glk-galP*) 株に対し、コハク酸の発酵生産に必要な代謝改変を行った。コハク酸は図1に示し

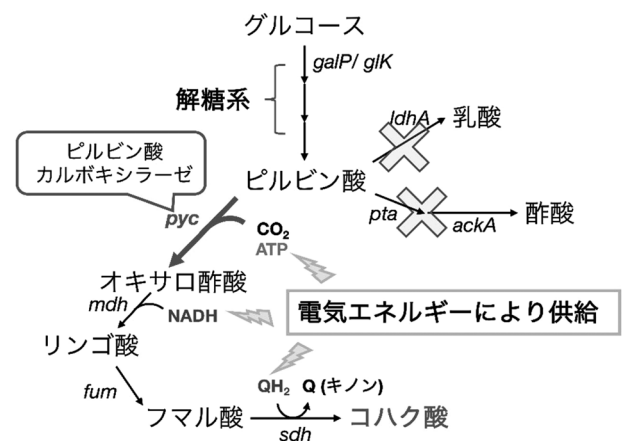


図1. 電気制御発酵によるコハク酸の生産経路。

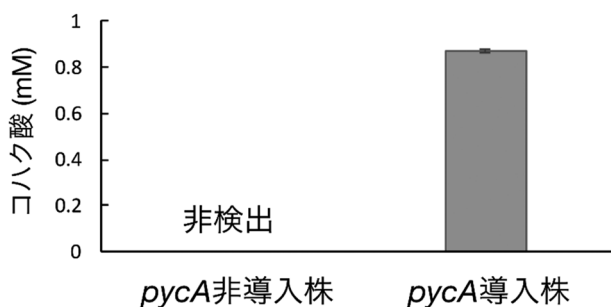


図2. *pycA* 導入株によるピルビン酸からのコハク酸生産.

た経路によって生産可能と考えられるが、MR-1株はピルビン酸からオキサロ酢酸への変換に必要な酵素遺伝子 (*pyc*) を保持していない。そこで本研究ではコハク酸を生産可能な遺伝子改変MR-1株を構築するため、*Bacillus* 由来の *pyc* 遺伝子 (*pycA*) をコドン最適化し、MR-1 (*pBBR-glK-galP*) 株に導入した。遺伝子導入の効果を確かめるため、作製した *pycA* 遺伝子導入株 (MR-1 (*pBBR-glK-galP*) (*pHSG-pycA*) 株) をピルビン酸を基質とした最少培地に接種し、発酵条件で培養した後、HPLCにより代謝産物を分析した。その結果、*pycA* 非導入株ではコハク酸が検出されなかったのに対し、*pycA* 導入株ではコハク酸が検出された (図2)。また、

pycA 導入株をグルコースを含む TM にて培養した結果、グルコースの代謝に伴ってコハク酸が生産されることも確認された。今後は、コハク酸の生産収率を高めるため、副生成物 (乳酸・酢酸) の生産経路を破壊するとともに、電気制御発酵においてコハク酸の生産収率が向上することを検証する予定である。

謝辞

本研究を実施するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Ikeda S, Takamatsu Y, Tsuchiya M, et al.: *Shewanella oneidensis* MR-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology. *Essays Biochem.* 2021. doi: 10.1042/EBC20200178
- 2) Rabaey K, Girguis P, Nielsen LK.: Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 22:371-377. doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.010
- 3) Nakagawa G, Kouzuma A, Hirose A, et al.: Metabolic characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. *PLoS One.* 2015 10:e0138813. doi: 10.1371/journal.pone.0138813

糖消費速度を感知する代謝センサーの探索

金沢大学新学術創成研究機構
栢植陽太

背景および目的

微生物は中央代謝経路を利用し、糖からピルビン酸を経由して乳酸などの有機酸やグルタミン酸などのアミノ酸を生産する。従って、生産性向上のためにはグルコースをはじめとした糖の消費速度を増加させることが重要である。

代謝酵素の活性は温度や pH などの環境因子と共に、補酵素や代謝物により影響を受ける。解糖系酵素では、多くの生物でフルクトース 6-リン酸 (F6P) をフルクトース 1,6-ビスリン酸 (FBP) に変換するホスホフルクトキナーゼ (PFK) が律速酵素として働くことが知られている。大腸菌の PFK はアデノシン二リン酸によって活性化し、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) により抑制される¹⁾ など、代謝酵素の「活性」は代謝物や補酵素の濃度変化に応答して制御されるフィードバック阻害の機構が存在する。一方、代謝遺伝子、特にハウスキープ遺伝子である中央代謝

経路遺伝子の「発現」が代謝物の濃度変化に応答して変動するかは未だ不明な点が多い。現に解糖系におけるグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*gapA*) は様々な生物で遺伝子発現解析のコントロールとして用いられていることから、中央代謝経路遺伝子の発現は一定であるという認識がある。

本研究ではアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌をモデルとして中央代謝経路遺伝子の発現レベルと糖消費速度の関係を調べることを目的とした。本菌は好気条件下と嫌気条件下では代謝経路が大きく変化する。そこで、好気、嫌気の 2 つの条件下で糖の消費速度が異なる株を用い、中央代謝経路の遺伝子発現量の変動を調べた。

結果

好気条件下におけるグルコース消費速度と代謝遺伝子の発

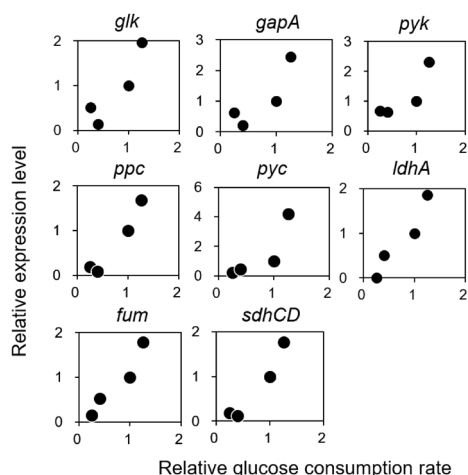


図4. 嫌気条件下においてグルコース消費速度の変化に応答して発現変動する代謝遺伝子.

ルコース消費速度が増加する³⁾. 一方、グルコース消費速度を減少させるために $\Delta ptsG$ 株と、ピルビン酸から乳酸に変換する乳酸デヒドロゲナーゼをコードする *ldhA* を欠損させた $\Delta ldhA$ 株の2株を用いた. コリネ細菌は嫌気条件下では増殖できない. そこでWT株を含めた3株を栄養培地 (BHI+2%グルコース) で増殖させた後、各菌体を用いて10% (w/v) の細胞懸濁液を調製し、10 h嫌気反応試験を行った. その結果、単位菌体量当たりのグルコース消費速度はWT株 (0.27 g/h/g-CDW) に比べ、 NaHCO_3 を添加したWT株 (0.36 g/h/g-CDW) では26%増加した. 一方、 $\Delta ptsG$ 株 (0.12 g/h/g-CDW)、 $\Delta ldhA$ 株 (0.07 g/h/g-CDW) ではWT株に比べてそれぞれ58%, 75%減少した.

次にqRT-PCRにより各株の中央代謝経路遺伝子の発現量を測定し、WT株と比較した. NaHCO_3 を添加したWT株では添加していないWT株に比べ、中央代謝経路の23遺伝子のうち、9遺伝子の発現が2倍以上増加した. 一方、 $\Delta ptsG$ 株ではWT株に比べ11遺伝子の発現が半分以下に減少し、 $\Delta ldhA$ 株では8遺伝子の発現が半分以下に減少し

た. それぞれの株におけるグルコース消費速度と各代謝遺伝子の発現量をプロットすると、正の相関を示した遺伝子は8遺伝子であった (図4). 好気、嫌気条件に共通してグルコース消費速度の変化に応答して発現レベルが変動する遺伝子は *pyk*, *ldhA*, *fum*, *sdhCD* の4遺伝子であった.

結言

本研究ではコリネ型細菌をモデルとして、好気条件下、嫌気条件下それぞれにおいてWT株に対しグルコース消費速度が変動する株・条件を用い、中央代謝経路の代謝遺伝子発現レベルを解析することでグルコース消費速度の変化に応答する代謝遺伝子の発現を解析した. その結果、好気・嫌気両方の条件下で多くの代謝遺伝子の発現レベルが変動した. 従って、好気・嫌気条件共に、グルコース消費速度の変化を感知して中央代謝経路の遺伝子発現レベルを制御する機構の存在が示唆された.

今後はそれぞれの条件で細胞内の量が変動する代謝物を特定することで、グルコース消費速度を感知するセンサーを同定することが期待できる.

謝辞

本研究にご理解とご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます.

参考文献

- 1) Evans et al. (1981): Phosphofructokinase: structure and control. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 293, 53-62.
- 2) Sawada et al. (2012): Mechanism of increased respiration in an H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.*, 113, 467-473.
- 3) Inui et al. (2004): Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 182-196.

緑色昆虫色素の構造解明

愛媛大学大学院農学研究科
西脇 寿

研究背景

昆虫は色とりどりの体色をしているが、体表がメタリックに輝くルリセンチコガネのように体表構造によって色づいているものもいれば、色素により色づいているものも存在する。昆虫由来の色素を生活に利用している例は古くからあり、例えばカイガラムシの生産する赤色色素コチニールは、食品や化粧品の着色料として利用されており、昆虫（生理機能）の有効利用の一つと言える。このように応用が見込める昆虫由来色素そのものに対する興味に加えて、昆虫には幼虫や成虫といった違うステージで体色が異なるものが存在するだけでなく、同じ成虫でも季節や周りの環境により体色が変わるものも多く、その体色の生理学的役割にも興味をもたれる。

クサカゲロウ科に属するニッポンクサカゲロウ（図1）の幼虫は小型害虫用の生物農薬として登録されている。緑色の卵から孵化した茶色の幼虫は3齢まで生育したあと繭の中で茶色のまま蛹化するが、変態がすすむにつれ徐々に緑色に色づいてきて、緑色成虫が羽化する。このように、クサカゲロウは幼虫と成虫で色が異なる完全変態型昆虫であり、この体色を構成する色素の構造や生合成経路に興味をもたれるが、現在までこれらに関連した研究はない。成虫の鮮やかな緑色に魅せられ、この色素は何であるのか興味を抱いた。

本研究の目的は、クサカゲロウ成虫の緑色色素を構成する物質の構造や性質、ならびにその生合成経路に関する基礎的な知見を得ることである。

結果

クサカゲロウ緑色色素の構造ならびに性質

継代飼育しているクサカゲロウ成虫を水ならびにアルコール中で磨砕し、緑色色素を抽出した。各種クロマトグ

ラフィーを駆使して精製を試みたところ、緑色を構成する成分には複数あり、青色と黄色の成分が混合して緑色になるものもあれば、単一物質として緑色を形成する成分も存在していることが明らかとなった。LC/Q-TOF MSやMALDI-TOF MS, SDS-PAGEを用いて、それらの質量を分析したところ、 m/z 700付近をはじめとする複数の低分子化合物に加えて、10 kDa程度の分子量の大きい物質も関与している可能性を明らかにすることができた。

また、熱やpHに対する安定性を調べたところ、熱やpH変動に対してある程度耐性があり、退色しにくいことを明らかにすることができた。なお、酸化剤や還元剤による処理は緑色を変色させた。

クサカゲロウ緑色色素の生合成経路

クサカゲロウの体色は生活環の中で、蛹初期から後期にかけて茶色が緑色に変化する。このことは、緑色生合成酵素の発現量が終齢幼虫から蛹初期にかけて増えていることを示唆している。一方、クサカゲロウには茶色の越冬型成虫（図2）が存在することが報告されており、この茶色の個体を自分たちの手で調達できれば、緑色色素の生合成経路の解明に役立つと考えた。そこで、越冬型成虫を得るべく、種々飼育環境を検討した結果、茶色の成虫を調達できる飼育条件を確立することができた。

そこで、この茶色の成虫個体と緑色の成虫個体のそれぞれからRNAを抽出し、次世代シーケンサーによるRNA seq解析を実施した。二つのデータを比較すること



図2. 茶色の越冬型クサカゲロウ。

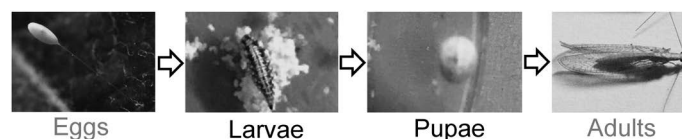


図1. ニッポンクサカゲロウ (*Chrysoperla nipponensis*) の生活環。

により、両個体で発現量の異なる酵素をいくつか絞り込むことができた。

また、候補遺伝子をひとつ選び、その発現を抑制するために幼虫に RNAi 処理を試み、成虫への変態時に緑色色素の形成が抑制されるのか検討したところ、遺伝子の発現抑制は確認されたものの、成虫個体は緑色であり、候補とした遺伝子は緑色色素の生合成に関与していないことが示唆された。

まとめ

本研究を通じて、クサカゲロウの緑色色素の構造や生合成経路を検討するうえで重要となる基礎的なデータを得ることができた。特に茶色の成虫個体を得る飼育条件は、今後につながる重要な知見と考えている。クサカゲロウは研究室で継代飼育していることから、今後生合成経路の解明

や発育ステージによる色素生成能の変化を追跡できる。現在、茶色成虫と緑色成虫の RNA seq を比較しているが、蛹の中でみられる色調の変化も検討すべき課題であり、RNAi による遺伝子発現の抑制を通して、各ステージにおける生合成経路に関する知見を得ていきたい。

また、緑色色素の生合成だけではなく、物質そのものにも興味があり、pH や温度変動に対する安定性、紫外線防止効果などをさらに詳細に調査すれば、緑色色素が昆虫生理学的に果たす役割について知見が得られるだけでなく、食品添加物や染料などの産業に有用となる可能性もある。今後さらに研究をすすめ、種々の問題を解決していきたい。

謝辞

本研究課題に対して助成いただきました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝いたします。

7. 第71回国際会議出席費補助金報告書

第71回国際会議出席費補助金報告書

14th Asian Apicultural Association Conference 2018 (第14回アジア養蜂協会会議)に参加して

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府 博士前期課程食品栄養科学専攻
石津英里子

2018年10月22日から24日までの3日間、インドネシア・ジャカルタのMerlynn Park Hotelで開催された14th Asian Apicultural Association Conference (AAA Conference, 第14回アジア養蜂協会会議)で発表する機会を与えて頂きました。ジャカルタはインドネシアの首都であり、都市圏人口では東京都市圏に次ぐ世界第2位の規模であることが知られています。2018年夏にはアジア競技大会も開催されており、街や人々からは活気が溢れ、これからの更なる成

長の雰囲気を感じました。

AAA Conferenceは1992年から2年に1度開催されており、14回目の開催となった本年度の会議のテーマは「Bees, environment and Sustainability」でした。現在、養蜂業は環境問題と持続可能性の問題に直面しています。本テーマはこれからの養蜂業の存続において非常に重要であると思いました。また、本会議内容はBee Biology, Bee Pest and Disease, Bees and Environment, Melliferous Flora Pollination, Bee Product and Apitherapy, Beekeeping Technology, Beekeeping Economy および Apicultural Extensionのセッションに分かれており、蜂に関わる幅広い分野の人たちの話を聞くことができました。

今回の私の口頭発表は、「Component analysis and anti-angiogenesis activity of Thailand stingless bee propolis」という演題です。Stingless bee（ハリナシバチ）とはタイやインドネシアをはじめとした世界の熱帯地域に存在する毒針を持たないミツバチのことです。ハリナシバチもセイヨウミツバチと同様にプロポリスを生産しますが、その含有成分や機能性、起源植物（プロポリスの起源となっている植物）に関する研究は少ないのが現状です。以上のような背景を踏まえ、タイ産ハリナシバチ由来のプロポリスに



写真1. 発表の様子。



写真2. 企業ブースの様子。



写真3. 指導教員と学会参加登録会場にて。

対し成分分析や機能性評価、さらにはその起源となる植物の解明を行い、タイのプロポリスに付加価値を付けることを目的として研究を行いました。東南アジア諸国ではLC-MSやNMRといった分析機器の普及があまり進んでいないため、これら機器を用いた成分分析に関しては聴講者に特に興味を持っていただけました。また、今回タイ産プロポリスの起源植物の解明に成功したことにも興味を持ってもらえ、起源植物の解明がプロポリスの生産量の向上や品質の安定性に繋がる事を伝えられました。さらに、会場で知り合った何人かの研究者ともディスカッションをすることができ、「タイ国内でもプロポリスの採取場所によって成分組成は異なるのか?」という質問を受けました。採取場所が異なっても、本会議で私が発表したプロポ

リス(タイ・チャンタブリー県の果樹園で採取)と同じ成分組成を示すプロポリスもあれば、違う成分組成を示すプロポリスもあります。タイ国内における採取場所の異なるプロポリスや他国のハリナシバチ由来のプロポリスに関する研究は、私が所属する研究室が現在進めているところです。

今回、AAA Conferenceに参加することで様々な分野の講演を拝聴し、また自分の研究発表を通じて多くの人とディスカッションをすることで、非常に有意義な時間を過ごすことができました。さらに、研究へのモチベーションも今まで以上に高まりました。最後になりましたが、本会議への参加にあたりご支援いただきました、公益財団法人農芸化学研究奨励会に厚く御礼申し上げます。

第6回天然物および伝承薬からの創薬に関する国際会議 (6th Biennial International Conference on New Developments in Drug Discovery from Natural Products and Traditional Medicines)

北海道大学大学院地球環境科学研究院
沖野龍文

2018年11月15日から17日まで、インド・パンジャブ州モハーリーの国立薬科教育研究院National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER)で開催された第6回天然物および伝承薬からの創薬に関する国際会議(6th Biennial International Conference on New Developments in Drug Discovery from Natural Products and Traditional Medicines)に参加し、Plenary Lectureとして3日目の冒頭に発表した。



図1.

モハーリーは州都チャンディーガルに近くIT企業が集積した地域である。また、チャンディーガルにはIM-TEC (Institute of Microbial Technology)もあり、モハーリーのNIPERと合わせて研究都市といってもよい落ち着いた街である。会場のNIPERのキャンパスは、緑あふれ広々としている。キャンパスを歩くと、クジャクに会うこともできるし、日本では見かけない鳥が出迎えてくれる。講演会場は講堂であったが、ポスター会場は屋外で気持ちのよい青空のもとで議論した。また、食事も屋外の大テントで提供され、日本ではあまりない雰囲気であった。

NIPERでは、分野別に国際会議を開催しており、天然物化学領域では2008年から隔年で開催し、今回が6回目で200名以上が参加した。組織委員の1人はInder Pal Singh教授で、静岡大学で学位をとられた方で、その後米国を経て京都大学でポスドクをしてNIPERに職を得た。NIPERと静岡大学は今年交流協定を締結したことから交流の一環として静岡大学から4名、静岡県立大学から1名の参加があった。

2日目の午前にミニシンポジウム Traditional Chinese Medicine & Ayurvedaが開催された。中国四川の伝統医

学院の院長が中国の伝承薬の現状を紹介し、インドの科学顧問であった Sharma 博士はアーユルヴェーダ（インド伝統医学）の現状を報告した。最後には、このミニシンポジウムのオーガナイザーでもある米国の Gautam 博士が天然物の抗ガン活性メカニズムの研究を紹介した。議論の中では、伝承薬の品質管理の問題がとりあげられ、企業と研究者と行政が協力し合う必要性が強調された。



図2.

私の講演は“Chemical and Biological Diversity of Marine Cyanobacteria”という題で、最近の海洋シアノバクテリアに関する研究成果を紹介した。細胞毒性、フジツボ幼生に対する付着阻害活性、抗マラリア活性などを精査することで、異なる構造活性相関を示すことを述べた。また、正確な構造決定、特に立体配置の決定をするための努力を示した。結晶スポンジ法やクライオ電子顕微鏡法の低分子への応用、化学シフトの予測計算の精度向上などにより自動的に構造がでてくることを期待して正確さに欠けることのないよう十分な解析が必要なことを強調した。さらに、不純物が活性試験の結果に影響することを、古くから知られることであるが、私たちの例により述べた。

インドからの発表では、特に有機合成で質の高いものがみられたが、会場近くの IMTEC からの発表も高いレベルのものであった。IMTEC では、放線菌からの探索に LC/MS と次世代シーケンサーの解析を組み合わせ、既知物質の単離に時間を浪費しないようにシステムを組んでいることが示された。また、感染症をターゲットとして ES-KAPE 病原体への治療薬開発に力を入れており、抗感染症薬に取り組む企業・研究者が少ない中で、その努力をぜひ成果に結びつけていただきたい。

静岡大学の河岸教授のフェアリー化合物の講演は圧巻で

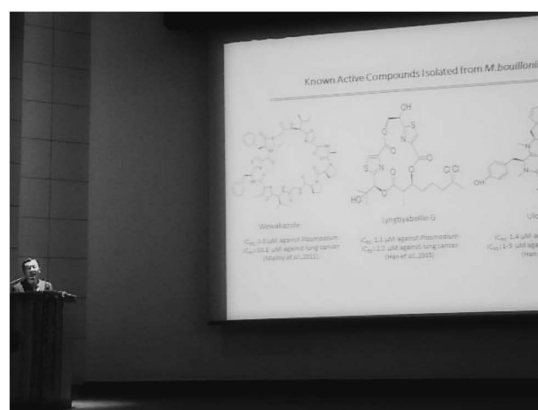


図3.



図4.

あったし、朴教授は機能性ナノ粒子によるデングウイルスの検出、鳴海准教授はクロロアルケン形ペプチド等価体、小谷准教授は放線菌のラッソペプチド、静岡県立大学の渡辺教授は大腸がんバイオマーカーのコリバクチンに関する最新の研究成果を発表された。

北海道大学を含む日本の大学で学位をとった、あるいはポストクとして研究したという多くのインド人研究者と会話することができた。話がはずんで楽しかった一方で、10年後、20年後にも同じような状況があるように、優秀な留学生を受け入れていく状況にしなければならないことを、あらためて考えた。さらには、10年後あるいはすぐにでも NIPER のようなインドの研究所あるいは大学でも多くの日本人が学んだり研究したりしてもらいたい。北海道大学も双方向の交流事業をインドとの間で進めているが、その重要性を強く感じた。

最後に、本会議に参加するための渡航費をご援助いただいた日本農芸化学会に感謝申し上げる。

International Congress on Pure & Applied Chemistry Langkawi (ICPAC Langkawi) 2018 に参加して

東京理科大学理工学部応用生物科学科
倉持幸司

2018年10月29日から11月2日までマレーシアのランカウイ島 Bayview Hotel で開催された ICPAC Langkawi において招待講演をさせていただきました。

ICPAC は化学全般に関する国際学会です。2018年度はマレーシア化学会 [Institut Kimia Malaysia (IKM)], 日本の公益法人総合工学振興財団 [Foundation for Interaction between Science and Technology (FIST)], Asia Chem Corporation (ACC) が共同で主催し, “Chemistry for Fourth Industrial Revolution and Beyond (第4次産業革命とその後のための化学)” をテーマに開催されました。本会には世界19カ国から参加者があり, 6件の総会講演 (plenary lecture), 9件の基調講演 (keynote Lecture), 9件の受賞講演 (Award Lecture), 200件程度の口頭発表 (Invited Lecture and Oral Presentation), 9件のポスター発表が行われました。発表は, 以下に示す5つの研究分野に分かれ, 6つの部屋で同時並行で進行しておりました。

- ・ Organic and Biomolecular Chemistry (OBC)
- ・ Physical Chemistry and Catalysis (PCC)
- ・ Inorganic and Coordination Chemistry (ICC)
- ・ Polymer and Materials Chemistry (PMC)
- ・ Analytical and Environmental Chemistry & Engineering (AEC)
- ・ ICPAC General Session (IGS)

私は “Bioinspired Syntheses of Natural Naphthoquinone Dimers” という演題で講演を行いました (発表番号 OBC 75)。1,4-ナフトキノンの二量化反応を鍵反応とした天然物 juglocombins A/B や juglorubin の世界初の全合成と物性評価に関する研究成果を発表させていただきました。今回, 私は大学院修士課程1年生の学生と共にこの学会に参加しました。学生にとっては初めての国際学会での英語口頭発表でしたので, かなり緊張しておりましたが, 無事に発表をすることができました。学生にとっても貴重な経験になったと思います。この学会でマレーシアの研究者とたくさんコミュニケーションを取ることができました。お互いの研究内容だけでなく, 両国の文化や研究・教育環境の違

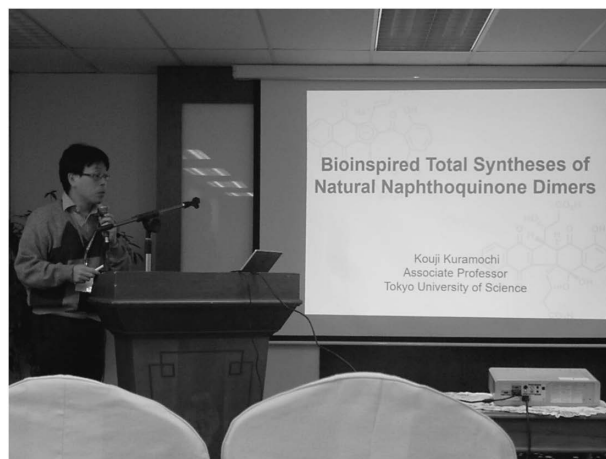


写真1. 発表時の写真。



写真2. 招待講演の賞状 (Certificate) を頂きました。

いなどを話し合うことができました。このように今回の学会発表および学会参加を通して, 研究～教育～文化に関する国際交流を行うことができました。

最後になりますが, 本学会に参加するためにご支援をいただきました日本農芸化学会に厚く御礼申し上げます。また本学会に招待していただいた北海道大学の高橋保先生に深く感謝を申し上げます。

7th Beneficial Microbes Conference 参加報告

北里大学薬学部微生物学教室

西山啓太

現所属：慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

開催期日：2018年11月26日～11月28日

開催場所：オランダ，アムステルダム，Hotel Casa Amsterdam

1. 学会の概要

7th Beneficial Microbes Conference が2018年11月26日から28日の3日間，オランダ・アムステルダムの Hotel Casa Amsterdam にて開催された。会場は，スキポール空港から電車で30分，アムステルダム中央駅からも地下鉄で10分というアクセスの良さで，土地勘のない筆者でも迷わずたどり着くことができた。アムステルダム市内はイルミネーションに彩られ，クリスマスマーケットが開かれるなど非常に賑わっていた（写真1）。



写真1. アムステルダム中心部（ダム広場付近）。

今年で7回目の開催となる本学会は，腸内細菌の基礎から応用研究までを対象とした国際会議であり，近年注目されている脳腸相関に関するセッションも設けられるなど演題は多岐にわたった。全参加者200名弱のうち日本からは15名が参加した。

プログラムは3日間にわたり構成され，1日目は，宿主の健康における mycobiome と archaeome の役割，ヒトと

家畜におけるプロバイオティクスの利用性の違いなど，当分野の重要なテーマについてディベート形式のレクチャーが行われた。

2日目は，各セッションに分かれレクチャーが行われた。特に，家畜や家禽を対象としたプレ・プロバイオティクスや腸内細菌叢に関する演題が多く，ヒトの腸内細菌叢に関する演題が多い国内での学会とは様子が異なった。また，線虫やカイコ，TIMなどの腸管モデルを用いたプロバイオティクスの評価系の構築に関しても報告があり，動物の代替モデルを積極的に導入していくヨーロッパの動向を感じることができた。各セッションの間には，ポスター発表が行われ，各所で議論する様子が見られた。

3日目は，脳機能と腸内細菌に関連するテーマが主であり，特定の細菌種によるアルツハイマー症状の緩和など，腸内細菌が脳機能に及ぼす影響を分子レベルで徐々に明らかにされつつあることは大変興味深く感じた。最後には，議長の Koen Venema氏より今回の学会での5つのトピックスが紹介され，ゲノム編集や動物代替モデルの重要性が強調された（写真2）。



写真2. 学会会場の様子。

2. 筆者の発表

筆者は、2日目の Session2, Pre- and probiotics, animals, and animal model において、“Preventing *Campylobacter* infection by *Lactobacillus gasseri*” という演題で講演を行った。内容は、*Lactobacillus gasseri* による *Campylobacter jejuni* の感染予防効果をヒト培養細胞と幼雛モデルを用いて証明したものである。また、その感染予防メカニズムとして、*L. gasseri* の表層タンパク質 aggregation-promoting factor (APF) が宿主の腸上皮に対する付着因子として機能することで、*C. jejuni* との付着部位の競合が生じ、その結果、感染予防が成立することを見出した一連の成果を発表した（写真3）。

講演後は、いくつか質問が寄せられたほか、ディナータイムにも声をかけていただき、講演内容について議論できなかったことは、大変有意義であった。また、今回発表した乳酸菌の表層タンパク質を介した感染予防のように、分子レベルでその機構を明らかにしていく我々の研究スタイルもアピールできたと考えている。

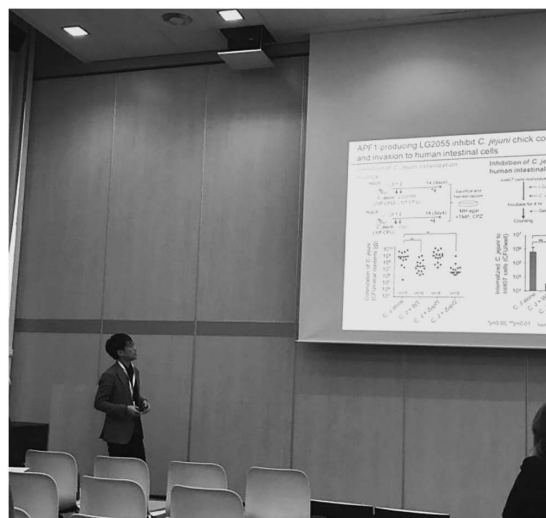


写真3. 筆者の発表の様子。

最後に、本学会への参加にあたり、ご支援いただいた公益社団法人日本農芸化学会に厚く御礼申し上げます。

32nd EFFoST International Conference

岐阜大学大学院自然科学技術研究科
細井友加里

フランスのナントで、2018年11月6日から8日まで開催された 32nd EFFoST International Conference にてポスター発表をしてきました。1986年に設立された EFFoST は IUFoST の構成組織の1つで、ヨーロッパ全域の130個以上の組織、学会、大学が加盟し、ヨーロッパ全土で10万人のメンバーがいます。ナントにはセントレアから香港、香港からパリへ飛行機を乗り継ぎ、TGV に乗り約3時間移動しました。開催場所は La Cité Nantes EVENTS CENTER（写真1）で、市街地から歩いて10分の距離にあります。ロワール川の流れる町ナントには、ブルターニュ大公城（写真2）、サン・ピエール・サン・ポール大聖堂、三階建の商店街「パッサージュ・ポムレイ」など数々の歴史的な建造物があり、美しい街並みでした。

本会議では、消費者のニーズに対応した食品の構造と機能のイノベーションというテーマのもと、Reformulation and new sourcing, Structure and function, Innovative conventional and non thermal process, Additive manufacturing, Cereal processing and baking, Biotechnology, biopro-

cesses in food and nutrition, Safety, microbiology, Modeling and process control, Food oral processing and sensory perception, The future of foods の10個のトピックスに分かれて会場内の4つのホールで口頭発表が行われました。世界中から約400名の参加者があり、口頭発表は



写真1. 会場。



写真2. プルターニュ大公城.

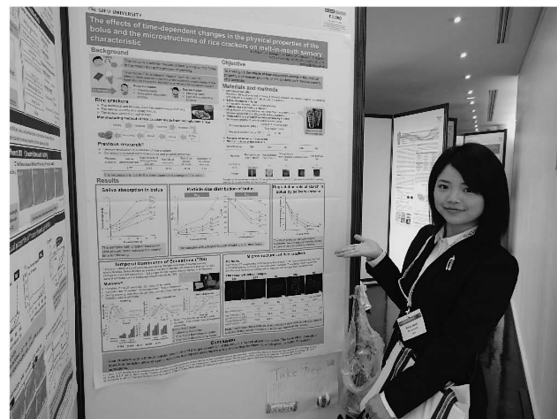


写真4. ポスター発表.



写真3. 参加したラボのメンバー.

約120件、ポスター発表は約400件でした。ヨーロッパでは食品に関する学際的な研究が盛んに行われていて、中でも日本での研究例がまだ少ない3Dプリンターを用いた食品製造に関する研究発表が5件もあることに驚きました。国際学会に参加して特に印象に残ったことは、海外では多くの女性研究者が活躍していること、修士課程よりも博士課程の学生、博士号を持つ研究者が多いことです。日本の女性研究者数は毎年増加傾向にありますが、OECD加盟国等間での女性研究者割合は産業、政府、高等教育において最下位であり、修士号・博士号の取得者数も諸外国に比べて低いことが報告されています。多くの女性の活躍振りを肌で感じ、私も就職後も研究者として活躍したいという思いが強くなりました。

国際学会での発表は今回が初めてでした。ラボからは私を含め3名が発表を行いました(写真3)。英語での会話は

ラボ内の留学生とはするものの、海外に赴く機会はめったにないため、現地の人と英語で話すことに緊張していました。楽しむ気持ちを忘れないようにして、なんとか緊張を乗り切ることができました。

私の発表演題は、The effects of time-dependent changes in the physical properties of the bolus and the microstructures of rice crackers on melt-in-mouth sensory characteristicでした(写真4)。米菓咀嚼中の食塊物性と官能特性および米菓の内部構造が口どけ感に及ぼす影響を調査しました。これまでに米菓の口どけ感に関する研究報告はほとんどなく、会場にも米菓に関する研究発表は見受けられませんでした。それでも米菓に馴染みのあるアジアの研究者や、官能評価の専門家の方々とディスカッションすることができました。口どけという言葉は日本独自の表現であり、チョコレートやアイスクリームの食感にはよく用いられますが、米菓の口どけ感はイメージしづらく、わかりやすく説明する必要がありました。実際にサンプルとして用いている赤ちゃん用の煎餅と硬い煎餅を現地まで持って行き、試食してもらうことで食感の違いを理解してもらうことができました。私の研究では、複数の食感や風味を経時的に評価するTDSという官能評価を実施しています。米菓の口どけ感評価に使われた例は未だありません。そのため、TDSで同時に評価する属性の数などについて、いろいろディスカッションできました。ここで頂いた意見を生かし、さらなる研究の発展に繋げていきたいです。

最後になりましたが、本学会への参加にあたりご支援いただきました、公益財団法人農芸化学研究奨励会に厚く御礼申し上げます。

19th IUFOST World Congress of Food Science and Technology

2018に参加して

日本大学生物資源科学部
山口勇将

IUFOST World Congress of Food Science and Technology は、IUFOST (International Union of Food Science and Technology, 邦訳：国際食品科学工学連合) による食品科学および食品工学分野における国際学会大会である。発表演題は、食品のフレーバーや分析方法、抗酸化性、血糖調整、物性、官能評価、加工・製造技術、鮮度保持など多岐にわたる。1962年に英国・ロンドンで第一回目が開催されて以来、2～4年に一回、最近では2年に一回のペースで開催されている。毎回、2000名近くの参加者が集う大規模な学会である。2018年大会はアジア有数の大都市であるインド・ムンバイの新市街として開発されたナビムンバイ（新ムンバイ）で行われた。ナビムンバイはムンバイ東のターナー川を挟んですぐの所に位置し、ムンバイの空の玄関口であるチャトラパティ・シヴァージー国際空港から車で一時間ほどの距離にある。10月後半のナビムンバイは日中の最高気温が35℃近くになるものの湿度は50%を下回り、日本の真夏よりも幾分か過ごしやすそうに感じた。

本学会への参加目的は2つあった。1つ目は研究成果の発表である。筆者は食品アレルギー、特に小麦アレルギーの研究に取り組んでおり、本会においては小麦アレルギーの治療法の問題点を克服する新たな食品素材について発表させていただいた。発表演題は Administration of wheat gliadin deamidated by cation-exchange resins induces oral tolerance in a mouse model of wheat allergy である。発表はポスター形式であったが、コアタイムは2時間あり、筆者は2時間を一杯使って20人以上もの研究者と議論を交わすことができた。小麦アレルギーへの関心の高さもあるが、本研究の成果は別の食物アレルギーの治療にも応用できる可能性があるため多くの研究者の目に止まったと思われる。食物アレルギーの患者数は年々増加しており、患者は厳しい食事制限を強いられる。これは必要な栄養素の摂取を妨げるだけでなく、食の楽しみを大きく奪うものである。今後も継続して研究し、食物アレルギーの撲滅に貢献したい。

本学会に参加した2つ目の目的は、日本の代表（voting delegate）として総会へ参加し一票を投じることである。

本来ならば日本における IUFOST の adhering body である IUFOST-Japan に所属する先生が参加するものである。今回、IUFOST-Japan の理事であり、私が所属する研究室の教授でもある熊谷日登美先生の代わりに総会へ参加する機会を得た。筆者はインドへ行く又と無い機会であると考え、この学会および総会への参加を決めたのであった。総会は大会の初日に行われ、各国の著名な食品科学研究者が集まるなか和やかな雰囲気で行われた。詳しい内容については割愛するが、総会参加者、特に IUFOST の理事クラスの方々どうしは良好な関係を築いているのが印象的だった。この輪の中に日本人が少ないことは残念であり、食品科学工学分野における世界的なルールやこれからの重要課題を議論する場で日本人研究者がリーダーシップを発揮す



写真1. 学会会場。

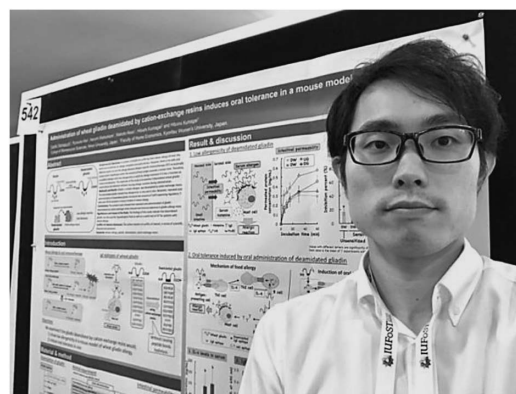


写真2. 学会発表の様子。

ることで、世界の中で日本のプレゼンスを高めることができる。私自身も研究発表だけではなくこのような場においても活躍できる研究者を目指していきたいと思うし、そのような日本人研究者が増えてほしいと思った。

次回の IUFoST World Congress of Food Science and Technology は2020年にニュージーランドのオークランド

で開催される。オークランドは温暖で過ごしやすく、アクセスも良い。ぜひとも日本からの研究発表および総会参加をお願いしたい。

最後になりますが、本学会への参加にあたり厚いご支援をいただいた公益社団法人日本農芸化学会に深く御礼申し上げます。

8. 第72回国際会議出席費補助金報告書

第72回国際会議出席費補助金報告書

シアノヒドリンクリプトラセメートの合成と絶対配置決定： 固体状態におけるエナンチオ選択的ストレッカー反応

東京理科大学理学部応用化学科
川崎常臣

研究の背景と目的

アミノ酸に代表される生体関連化合物の多くは、二つの可能な鏡像異性体のうち一方のみから成り立っている。このホモキラリティーは、あらゆる生命に共通で、その起源は未解決の謎である。

一方、ストレッカー型反応は、前生物的環境下でのアミノ酸生成プロセスの一つと考えられてきた。この反応では、カルボニル化合物とアミンが縮合して得られるイミンにシアン化水素が付加することにより α -アミノニトリル（アミ

ノ酸前駆体）が生成し、カルボニル化合物にシアン化水素が直接付加した場合には、シアノヒドリン（ヒドロキシ酸前駆体）が生成する（図1）。

これまでに、コングロメレート形成する α -アミノニトリルの固体状態における不斉発生・増幅を報告した¹⁾。本研究では、クリプトラセメートを形成するシアノヒドリンを見出し、その絶対配置を決定したので報告する。さらに、アミンとシアノヒドリンとのエナンチオ選択的な固固反応、引き続く不斉増幅²⁾によって高鏡像体過剰率のアミノニトリルを合成した³⁾。シアノヒドリンの固体状態におけるキラリティーと、アミノニトリル（アミノ酸）のキラリティーとを関連づけることに成功した（図2）。

実験方法

アキラルな芳香族アルデヒドとシアン化ナトリウムを、酢酸存在下で反応し、自発的結晶化によりシアノヒドリンのラセミ化合物結晶を得た。得られた結晶は、ラセミ化合物結晶でありながらキラル空間群 $P2_12_12_1$ に属するクリプトラセメートであった。単結晶X線構造解析によって結晶の絶対配置を決定することができ、シアノヒドリンは、ヒドロキシ基とシアノ基との間で水素結合を形成し、二分子で一周期のらせん状であった。すなわち、 P もしくは M 体の鏡像結晶を確認した。さらに、KBr法による固体CD

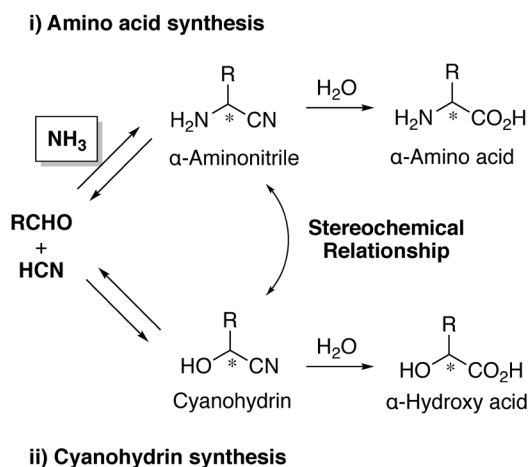


図1. ストレッカー型反応機構。

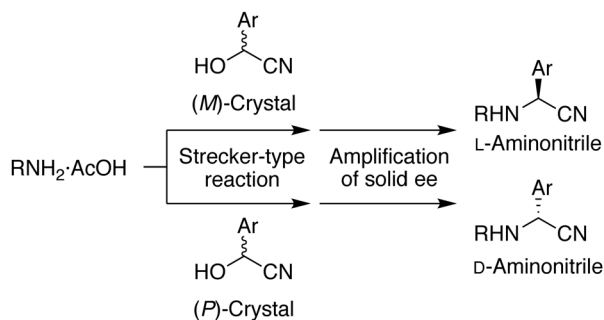


図2. エナンチオ選択的ストレッカー反応（固固反応）。

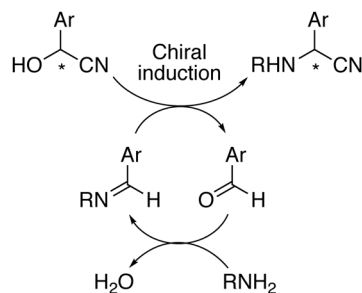


図3. ストレッカー型固固反応。

スペクトルを測定し、235 nm付近に正もしくは負のコットン効果が観測され、シアノヒドリンラセミ化合物結晶の絶対配置（らせん方向）との相関を明らかにした。

シアノヒドリンが形成するキラルな (*P/M*)-ラセミ化合物結晶（クリプトラセメート）とアキラルアミン酢酸塩とを乳鉢で混合しつつ細かく摺りつぶした。それを密閉容器に静置することによって、固体同士のストレッカー型反応を経て、アミノニトリルを合成した（図3）。引き続き、溶液中にエナンチオマー間の平衡を導入したアミノニトリル懸濁液を温度サイクルに付すことによって、顕著な不斉増幅を行い、高鏡像体過剰率のアミノニトリルを合成した²⁾。

結果と考察

ストレッカー型固固反応は、室温付近では約20日で8割程度の進行率であった。（*M*）-シアノヒドリンのストレッカー型反応、引き続き不斉増幅²⁾によってL-アミノニトリルが、（*P*）-シアノヒドリンを反応に用いるとD-アミノニトリルが再現性を持って生成した。シアノヒドリンが形成するキラルラセミ化合物結晶の不斉と、それを基質とするストレッカー型反応によって生成するアミノニトリル（アミノ酸）に立体相関性を見出した。本結果は我々の知る限り、結晶中の分子配向⁴⁾に基づくエナンチオ選択的（ストレッカー型）固固反応の初の例である。

シアノヒドリンとアミノニトリルは、ストレッカー型機構でイミンおよびカルボニル化合物を経る平衡にあり（図1）、双方の分子不斉は関連しないものと考えられてきた。本結果は、両者に立体相関性を初めて見出したものであり、キラルアミノ酸やヒドロキシ酸の（前生物的）合成に関連する興味深い結果と言える。

未発表の成果であるため、具体的な化合物構造の掲載を差し控えさせていただいた。公表後に改めて報告させていただきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Kawasaki, T., Takamatsu, N., Aiba, S., Tokunaga, Y.: *Chem. Commun.* 2015, 51, 14377-14380.
- 2) Aiba, S., Takamatsu, N., Sasai, T., Tokunaga, Y., Kawasaki, T.: *Chem. Commun.* 2016, 52, 10834-10837.
- 3) Miyagawa, S., Aiba, S., Kawamoto, H., Tokunaga, Y., Kawasaki, T.: *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17, 1238-1244.
- 4) Miyagawa, S., Yoshimura, K., Yamazaki, Y., Takamatsu, N., Kuraishi, T., Aiba, S., Tokunaga, Y., Kawasaki, T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 1055-1058.

ガン抑制タンパク質 TSC2 の新規メチル化修飾は、TSC2安定化に寄与する

東京農業大学大学院 農学研究科 農芸化学専攻
玄 成秀

背景・目的

細胞内シグナルタンパク質は、細胞外からのホルモンや栄養素などの様々な情報を標的機関へと適切に伝達する。その際、その機能制御は、シグナルタンパク質がリン酸化やメチル化などの化学修飾を受けることで行われる。一方で、こうした化学修飾の不全はがんなどの疾病と深く関わることが多く、こうした疾患における治療標的とされてきた。

ガンの一種で、てんかんや過誤腫の形成などを呈する疾患に、国指定難病である結節性硬化症がある。TSC2はその原因タンパク質として同定されており、インスリンシグナルにおいて、Rhebを介して細胞増殖を司るmTORC1

を抑制する。一方で、このTSC2の機能は、化学修飾の一種であるリン酸化を介したインスリンや成長因子、エネルギー代謝などによって解除され、mTORC1の活性化を通じて細胞増殖が促進する[1, 2]。そのため、TSC2タンパク質の安定化メカニズム解明は重要である。これまでTSC2の化学修飾には、リン酸化をはじめとして、アセチル化やユビキチン化が知られており、このような修飾によってTSC2の多様な機能は制御される。一方で、ヒストンなどで知られるメチル化修飾に関してTSC2のメチル化は実験的に確認された報告はない。

タンパク質をメチル化する酵素にPRMTsがある。PRMTsは、ヒストンメチル化をはじめとして、メチル基供与体

TSC2 Methylation Sites	
Position	Flanking Residue
458	FFRRSES <u>R</u> GAVRİK
653	DYMEPE <u>R</u> RGSEKKT
751	KTLERL <u>R</u> GAPEGF
1122	AGQQVS <u>R</u> GARDRV
1355	AEELVG <u>R</u> GIIPIER
1438	ASGEDS <u>R</u> GQPEGP
1459	PSGLRPR <u>G</u> YTISD
1471	DSAPSR <u>R</u> GKRVVER

図1. TSC2 メチル化の予想サイト.

SAM から基質中のアルギニン残基にメチル基を転移する酵素である。生体において9種類 (PRMT1~PRMT11) 存在し、その機能や局在によって分けられる [3, 4]。興味深いことに、メチル化予想サイトにより、TSC2 のアミノ酸配列を解析したところ、TSC2 がメチル化される可能性のある部位が散見された。

そこで、本研究は、TSC2 の新規翻訳後修飾としてメチル化修飾に着目し、「TSC2 のメチル化修飾の解析ならびにその機能」の解析を目的とした。

結果・考察

TSC2 のメチル化予想サイトにより予測された部位 (図1) を含む TSC2 ペプチドを作製し、これらが主要なメチル化酵素 PRMT1 に修飾されるか in vitro methylation assay に供して解析した。その結果、Arg1457 を含むアミノ酸配列 1432-1460 のペプチドにおいてのみメチル化が確認された。次に、同様に TSC2 ペプチドのどの Arg 部位が PRMT1 によってメチル化されるか解析した。その結果、TSC2 の Arg1457 と Arg1459 をそれぞれ変異させたペプチドにおいて PRMT1 によるメチル化が減少した。これらの結果は、TSC2 が PRMT1 によって新規メチル化修飾を受けることを示し、その部位が TSC2 の Arg1457 と Arg1459 であることを初めて確認した。

本研究で明らかにした TSC2 のメチル化部位 (Arg1457/59) は、AKT によるリン酸化部位 (Thr1462) に近接する。そのため、TSC2 メチル化は AKT によるリン酸化を妨害するのではないかと考えた。これを in vitro kinase assay にて検証したところ、メチル化 TSC2 ペプチド (アミノ酸配列 1455-1469 の Arg1457 と Arg1459 をメチル化した) は AKT によるリン酸化を妨害した。さらに、これを細胞内で解析すべく、PRMT1 阻害剤 AMI-5 および SAM 合成酵素 MAT2a 阻害剤シクロロイシンを 293T 細胞に添加し、TSC2 の Thr1462 のリン酸化レベルを解析した。結果、それぞれの阻害剤添加によって TSC2 のリン酸化

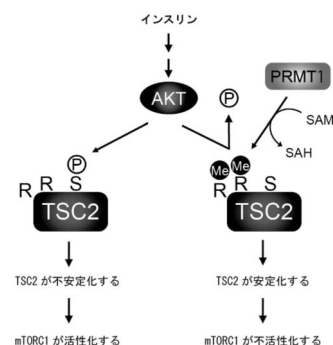


図2 本研究の概要図.

化レベルが上昇した。本結果は、TSC2 のメチル化レベルの変動は AKT によるリン酸化レベルに影響することを示した。

TSC2 メチル化が TSC2 の機能にどのように影響するか検証した。興味深いことに、AKT による TSC2 のリン酸化は TSC2 の分解を促進する [5]。その上で、TSC2 のメチル化レベルの変動は AKT によるリン酸化に影響を及ぼす。そこで、PRMT1 による TSC2 のメチル化が TSC2 の安定化に関与するか、PRMT1KD 細胞・PRMT1 阻害剤を用いて解析した。その結果、PRMT1KD 細胞・PRMT1 阻害剤において TSC2 タンパク質の減少が確認された。メチル基供与体 SAM は SAM 合成酵素 MAT2a によって必須アミノ酸メチオニン (Met) から代謝される。本解析は、細胞に MAT2a 阻害剤を添加し、TSC2 のタンパク質量を解析した。その結果、MAT2 阻害剤の添加においても TSC2 タンパク質発現量が低下した。本結果より、TSC2 の安定化に PRMT1 によるメチル化が関与することが示された。

TSC2 は細胞増殖を司る mTORC1 を制御し、またその欠損は mTORC1 の活性を介して細胞増殖を促進する。そこで、本解析では、TSC2 メチル化阻害時のリン酸化 S6K (mTORC1 の活性指標) を解析した。その結果、PRMT1 阻害時に、TSC2 タンパク質が減少すると共に、リン酸化 S6K が上昇した。本結果は、TSC2 メチル化の抑制がその不安定化を介して mTORC1 を活性化することを示した。

本研究は結節性硬化症の課題である TSC2 の安定化メカニズムの一端を明らかにした。特に、TSC2 の安定化において PRMT1 によるメチル化修飾が、その安定化に寄与し、さらに下流因子である mTORC1 活性の制御にも影響する可能性を示した (図2)。

謝辞

本研究は、公益社団法人日本農芸化学会学術活動強化委員会のご支援に深謝します。

引用文献

- 1) Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC (2002) Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 10: 151-162.
- 2) Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD (2014) Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell*, 156: 771-785.
- 3) Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell*, 33: 1-13.
- 4) Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 11: 204-220.
- 5) Plas DR, Thompson CB (2003) Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 12361-12366.

9. 第73回国際会議出席費補助金報告書

第73回国際会議出席費補助金報告書

グルコノ- δ -ラクトン存在下でのオボアルブミン及び カゼインナトリウム混合ゲルの特性

日本大学 短期大学部食物栄養学科
太田尚子

背景・目的

著者らはこれまで、熱安定性の異なる種々の食品タンパク質の混合システムを用い、加熱誘導ゲル形成時のタンパク質間相互作用について、種々の機器分析（超音波分光分析、動的粘弾性測定、赤外分光分析および電子顕微鏡観察など）を通して解析を行ってきた。

本研究では、従来より豆腐の凝固剤として広く用いられてきたグルコノ- δ -ラクトン（GDL）を用いて、常温下で徐々に混合系全体の酸性化を誘導し、種々の加工食品製造工程で多用されているカゼインナトリウム（SC）と卵白アルブミン（OVA）を材料として、その酸性化過程におけるタンパク質間相互作用を調べた。

熱安定性を異にするタンパク質が協調的に作用しあうことができるか否かを明らかにする為、数種の物理化学的分析手法に加えて、タンパク質ごとに染め分けを行った試料を用いて、共焦点レーザー走査顕微鏡観察することによりその存在状態を可視化し、より具体的に評価することを目的とした。

研究の方法

（1）超音波分光分析

超音波分光分析装置（ウルトラサイエンティフィックス社製HR-US102型、アイルランド）を用い、超音波速度並びに減衰の時間依存性を2.5, 5, 8 MHzの周波数にて測定した。

（2）動的粘弾性測定

動的粘弾性測定装置（レオグラフゾル、東洋精機社製、東京）を用いて時間経過（pH低下）に伴う貯蔵弾性率及び損失弾性率の挙動を調べた。

（3）共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM）観察

異なる励起波長と蛍光波長を持つ、2種類の蛍光ラベル化剤（N-hydroxysuccinimide ester）がタンパク質の一級アミンと共有結合することを利用し、SC及びOVAをそ

れぞれ標識した。即ち、サーモフィッシャー社製DyLight 405（Ex/Em: 400 nm/420 nm）をSCのラベルに、また、DyLight 633（Ex/Em: 638 nm/658 nm）をOVAのラベルに用いた。装置はLSM 780（ZEISS社製、スイス）、解析ソフトはZEN 2012を使用した。

（4）走査型電子顕微鏡観察（SEM）

pH低下過程でのゲル表面の微細構造を観察するため、CLSM観察に並行して、試料ゲルのサンプリングを行い、化学固定、導電染色、脱水及びトブタノール乾燥後、金蒸着処理、SEM（日本電子社製JSM-6010LA型、東京）による観察を行った。

結果および考察

（1）超音波分光分析

本研究で使用した超音波分光分析計では超音波速度と減衰の2つのパラメータ変化を観察することができる。まず、超音波速度は系中の圧縮率変化をモニターすることによりそれと反比例する超音波速度を求めることが出来る。通常、超音波は金属のような固体中は液体中よりも速く進むが、タンパク質溶液がゲル化しゲル状凝集体を形成する際、タンパク質ネットワーク間に水分子の入り込めないような隙間を多数形成しながら三次元ネットワークの構築が進行するため、系の圧縮率は増加すると考えられる。実際にその変化を観察したところSC単独及びSC+OVA混合懸濁物のpH低下に伴う圧縮率増加が観察された。またその変化速度は5% SC+5% OVA混合系が最も速やかで早く平衡に達した。

更に、超音波速度と相補的に、系中に現れる凝集体の大きさや系中の存在状態（偏りの有無）などを反映する超音波減衰の変化をモニターしたところ、超音波速度同様、5% SC+5% OVA混合系が早期に平衡に達することが判った。

また、SC単独及び8% SC+2% OVA混合系の変化挙動

は超音波速度、減衰ともに非常に良く類似していた。

(2) 動的粘弾性測定

そこで、OVA の混合割合の高い試料の超音波特性の挙動変化が早く観察された要因を探る為、動的粘弾性の時間依存性測定と同時に試料の pH 変化をモニターした。その結果、3種類に試料ともに等電点に近い pH 4.5 付近で、弾性率の立ち上がりが起こっていることが判った。しかしながら、その pH に至るまでの時間が顕著に異なることが判った。即ち、5% SC+5% OVA 混合系は 10% SC 単独系のおよそ 60% の時間で弾性率の立ち上がりが始まっていることが判った。

(3) CLSM 観察

上記方法の項で述べたように、本研究ではタンパク質の種類ごとに異なる励起波長と蛍光波長を有する蛍光剤を用いてタンパク質をラベルし、ゲルネットワーク中でのタンパク質の分布状態を可視化した。即ち、SC 単独、OVA 単独、SC:OVA=8:2 混合系、SC:OVA=5:5 混合系の 4 種類の構造観察を行った。更に本研究では pH を緩やかに低下させることが可能な GDL による酸性化を導き、pH の低下と伴にどのような構造変化が認められるかを観察した。

その結果、OVA 単独では相分離が生じてしまったものの、SC 単独、SC:OVA=8:2 混合系、SC:OVA=5:5 混

合系の 3 種類の試料については相分離を引き起こすことなく均質な構造を構築していることが観察された。また、pH の変化と伴にその微細構造を構築する粒子のサイズに変化が見られ、両タンパク質の等電点付近では CLSM では構造を観察することが困難な程度まで粒子の微細化が進んでいることが伺われた。

(4) 走査型電子顕微鏡観察

そこで、上記 CLSM 観察で、観察が困難であった、等電点付近の 3 種類のゲルの微細構造を SEM 観察・比較した。その結果、10%SC 単独ゲルでは、小さな粒子が密に集合した構造、これに対し OVA が混合されるとネットワークに偏りが生じ全体として粗密な構造に変化していることが判った。

結論

以上、超音波分光分析をはじめとし数種の機器分析を通して、熱凝固性の異なるタンパク質が分子間で相互作用し充分混和され、新規なテクスチャーを有するゲルが形成されることが判った。またこの物性変化がゲルネットワーク構造の差異に深く関連していることが確かめられた。更に、CLSM と SEM 観察の相補的な実験の有用性が明らかになり、今後より広範な食品タンパク質ゲルの研究に活用したい。

10. 第74回国際会議出席費補助金報告書

第74回国際会議出席費補助金報告書

Report of JSBBA International Conference Attendance Subsidy

3rd year Ph.D. Student

Graduate School of Environmental & Life Science, Okayama University

岡山大学大学院環境生命科学研究科博士後期課程3回生

Uswatun Hasanah

On October 2, 2020, I attended an international conference entitled Symposium on Application of Advanced Technologies in Agriculture (AATA) or 農業分野の先端技術の応用に関するシンポジウム (AATA). This conference was held by the committees from two universities in Vietnam (Van Hien University and Can Tho University) and in Japan (Okayama University). Previously, this conference was planned to be held on August 7-8, 2020 in Vietnam. Due to the concern about Covid-19, the conference was postponed to October and conducted hybrid. The main venue was still in Tan Son Nhat Hotel, Ho Chi Minh City, Vietnam. At the same time, the conference was also broadcasted online (web-based conference) so that the participants from outside Vietnam still can join the conference through Quickom website.

Participants in this conference were students and professors from VHU, CTU, Okayama University, and University of Tokyo. Other than that, officers from Ministry of Agriculture, Vietnam also attended this conference. Before officially starting the conference, we watched introduction video of VHU, CTU, and Okayama University. The video of VHU and CTU were impressive and attractive because I got to know more about Vietnam universities, culture, and their focus on agricultural research. After that, there were opening speech which informed about the focus of the conference, mainly about technologies related to agriculture. Opening speech was followed by keynote speeches, and the speakers were Prof. Bui Chi Buu from Vietnam, Prof. Hiroaki Funahashi from Japan, and Prof. Katleen Raes from Belgium.

The presentation session was divided into two rooms, Room 1 about crop and animal science, and Room 2 about food science and other relative object. The participants

from Okayama University were gathered in a room in Faculty of Agriculture, Okayama University. I participated and delivered my oral presentation online in Room 2. In this opportunity, I presented the result of research about ability of human intestinal bacteria to convert mangiferin into norathyriol. I listened to the other interesting presentations in Room 2 as well. At the end, there was a closing remarks and certification. I received my certificate of participation via e-mail after the conference finished (attached below).

By participating in this conference, I learned how to deliver my research works in an academic conference, and more importantly, I obtained a new international experience by attending a conference held in other country. I would like to thank JSBBA for the grant so that I can participate in this Symposium on AATA. Because of the change of the conference method, usage of attendance subsidy from JSBBA that previously planned to cover flight and accommodation were diverted into equipment to support the presentation via online. In this



Fig. 1.

international symposium, the participants were from various countries; not only Japan and Vietnam, but also Indonesia (myself), Kenya, Myanmar, and Afghanistan. In my country, I work as a lecturer in Bogor Agricultural University (IPB University). Attending this international symposium also gave me a new perspective and informa-

tion update about the researches related to agriculture in other countries. After completing my doctoral degree and return to Indonesia, I can share about this experience. The new connections that were built in the conference are useful and I would maintain the good collaboration in the future.

11. 2018年度農芸化学女性研究者賞報告書

2018年度農芸化学女性研究者賞報告書

海洋微生物からの有用機能の探索とその応用

群馬大学食健康科学教育研究センター 大田ゆかり

1. はじめに

2018年3月、栄えある農芸化学女性研究者賞に選んで頂きました。身に余る光栄と存じます。当時、(国研)海洋研究開発機構(JAMSTEC)に在籍しておりましたが、いろいろなことがあり、ほどなく同組織からの退職が決まりました。

2019年4月、現職の群馬大学へ着任し、新しい研究教育活動をスタート致しました。本賞より賜りました多くの側面を持つ支援が私の研究継続への大きな救いとなりました。本日に至るまでの研究活動についてここに謹んで報告致します。

2. 本賞受賞で変わったこと、変わらないこと

受賞で顕著に変わったのは招待講演の依頼を多く頂くようになったことでした。日本農芸化学会という歴史に皆様の信頼がどれほど蓄積されているのかを知り、受賞者としての責務を強く感じました。そこで普遍だと感じたのは、受賞を機に新しく出会う研究者の方々の常に変わらない、そして新鮮であり続ける科学に対する興味と愛着でした。

3. 退職と着任

旧所属では液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)装置を中心とした分析機器を活用し、深海より単離したバクテリアやそれらの酵素に関する研究を行っておりました。自らが代表者を務める受託研究、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業・先端的低炭素化技術開発

(ALCA)チーム型研究の継続中でもあり、複数の外部機関との共同研究も行っておりました。退職時、本課題関連に限らず全研究の契約を終了とする手続きとなりました。

研究継続を強く祈る日々はひどく長く感じました。図1は長い間JAMSTECで多くの実験や私自身に、いつも変わらないサポートをくださったグループメンバーの黒澤佳奈子さんとの記念撮影(上)、2001年からの17年間にわたり、私の研究生活のほとんどを過ごした実験室でLCMS装置が解体され搬出された2019年12月の風景です(下)。



図1. JAMSTECで長く一緒に研究したスタッフとの記念撮影(上)とLCMS装置解体・搬出作業(下)。



図2. 群馬大学で立ち上げた新しいラボ(左)と再起動で稼働を始めたLCMS装置(右)。

新たに着任した群馬大学では新しいラボを立ち上げる機会を頂き（図2）、研究機器や研究課題の機関間移管をご支援頂きました。群馬大学学長 平塚浩士先生、研究センター長 粕谷健一先生に深く感謝申し上げます。諸手続きと研究環境整備には長時間を要しましたが、2020年に入り漸くその一通りを終えることができました。

4. 研究進捗

現在、群馬大学で進行中の研究について以下に報告します。多大なるご支援を頂いた皆様のおかげで継続が実現した研究課題に「海洋微生物酵素群によるリグニン分解高度化と人工漆材料への展開」（ALCA 課題）（図3）があります。海洋から単離した細菌が持つ酵素を利用して、木材などの陸上植物の主要成分であるリグニンからプラスチックなど高機能化学品をつくりだす課題です。

リグニンは、植物に物理的な強度を与え、同時に生物学的攻撃を防ぐ働きをしています。私は2015年に、深海沈木からリグニンの主要結合である β -O-4結合を分解する細

菌ならびに酵素群を発見、2017年には、5種類の酵素を組み合わせることで木材から取り出したリグニン部分分解物からフェニルプロパノン骨格を持つ芳香族モノマーを直接生成させることに初めて成功しました。フェニルプロパノンはこれまであまり注目されてこなかった物質ですが、医薬品やプラスチックの原料になる利用価値の高いものであることも示しました。この研究は、日本学術振興会の最先端・次世代研究開発支援プログラムへの採択に始まり、ALCA、科研費の支援を受け、京都大学生存圏研究所の渡辺隆司先生、西村裕志先生、同大学エネルギー理工学研究所の片平正人先生、同大学化学研究所の中村正治先生との共同研究によって得た成果です。

ALCA プロジェクトの西村グループでは、リグニンの酵素変換に適した原料リグニンの調製を目的として、酢酸・過酢酸（Acetic Acid-Peracetic Acid/AAPA）とマイクロ波加熱を用いた環境調和型リグニン調製法を開発しました。AAPA リグニンに上記酵素群を作用させることで、10%w/w以上の収率（リグニンベース）でフェニルプロパノンモノマーの生産を可能とし、他のリグニン調製法では得られない高収率を達成しました。

前述のモノマーの高度利用を目指して、中村グループでは人工ウルシの原料となるスーパーウルシオール合成ルート进行デザインし、合成途中での異性化を防ぐ保護基を検討することで、当初のデザイン通りのウルシオール類縁体モノマーを複数種得ることに成功し、人工漆材料における構造-物性相関研究も実施しました。

これまでの難分解性有機物の微生物分解に関する研究を進展させる新たな課題として、「海洋環境を利用する新しい海洋生分解性プラスチック創出」プロジェクト（NEDO 先導研究／エネルギー・環境新技術先導研究プログラム、代表：粕谷健一）のなかで、新たにデザインするプラスチックが海洋の環境微生物によってどのように分解されるかを分析する役割を担っています。所属研究センターのバ

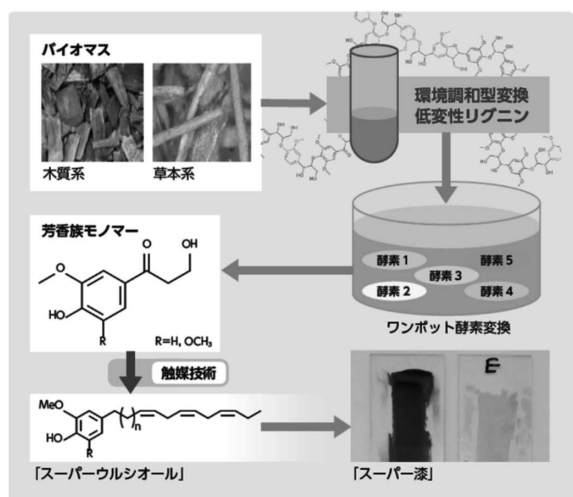


図3. JST-ALCA 大田課題紹介（ALCA ホワイトバイオテクノロジー領域リーフレットからの抜粋）。

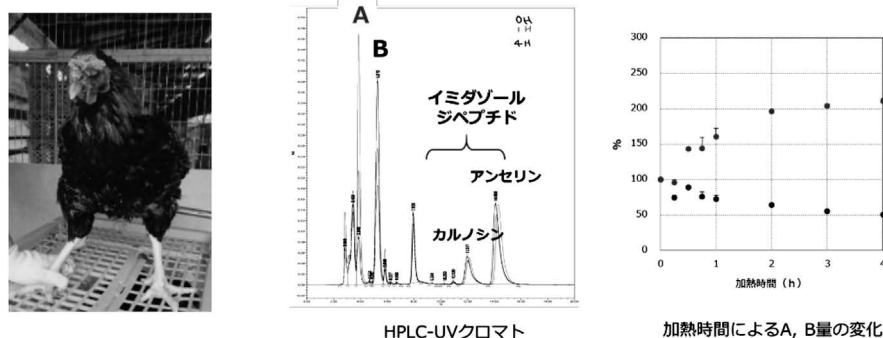


図4. 群馬県産ブランド「上州地鶏」に含まれる機能性ジペプチドやその他の未同定成分の調理中挙動（群馬大学食健康科学教育研究センター地域連携課題の成果）。

イオプラスチック研究グループが主導する本研究が発展し、既存の難分解プラスチックが引き起す地球規模の深刻な環境問題の解決につながる画期的な新材料を生み出すことが期待されます。

当センターは食に関する生産加工から機能性、健康科学の研究、さらにマーケティングに至るまで幅広いテーマを扱います。研究をとおして地域産業活性化に寄与することもミッションの一つです。着任初年度に技術相談を受けた企業と共同で、機能性アグリ素材のバイオ生産法の開発、地域の特色ある素材、上州地鶏（図4）やお茶の実オイルの持つおいしさや健康の科学的実証を目指した3つの課題をスタートさせました。

5. 教育への参加

大学教員として教育への参加機会を頂きました。まだ少数ですが講義を担当し、卒業研究生、修士学生を受け入れました。毎日が新しい発見や勉強ばかりです。

今年度は感染症対策としてオンライン講義が始まりました。どんな状況でも学生に良質な教育を提供するため、精力的な活動を連日続けておられる群馬大学教職員の方々に感銘を受けました。講義開始前にはネットを通じた学生を遠くに感じましたが、届いたレポートを読み、リアル講義室にいるときよりもむしろ教員と1対1で対面している感覚を持つ学生が多いことに気付きました。新しい意思疎通のスタイルには、これまで以上に深く人と向き合える可能性も感じます。

謝辞

本賞に推薦くださった先生方、審査くださった先生方、研究活動を支えてくださった皆様に感謝致します。いつも不足ばかりの私ですが、研究継続と新しいキャリアスタートの両方を辛抱強く支えてくださった恩師の先生方に心よりお礼申し上げます。

参考資料

- [1] 「海洋性細菌の酵素で木材成分リグニンからプラスチックをつくる」Blue Earth, 2017, 149, pp. 24-27.
- [2] 大田ゆかり「海洋微生物からの有用機能の探索とその応用—生活や環境保全に微生物酵素を役立てる—」化学と生物, 2019, 57(3), pp. 167-172.
- [3] 大田ゆかり「木材成分からプラスチックをつくる」群馬大学研究活動報「水源」, 2019, 4, pp. 12-13.
- [4] 大田ゆかり, 西村裕志, 片平正人, 磯崎 勝弘, 中村正治「海洋微生物酵素群によるリグニン分解高度化と人工漆材料への展開」リグニン利活用のための最新技術動向, シーエムシー出版, 2020, 第4章（第11節）, pp. 201-207.
- [5] 磯崎勝弘, 縣亮介, 松田博, 池 誠, 橘洋一, 大田ゆかり, 中村正治「人工漆材料の最前線：再生可能バイオマスを原料とする人工漆材料の創製」塗装工学, 2020, 55(1), pp. 18-26.

研究助成金使途報告

JAMSTEC から群馬大学へ移管する装置の運搬・設置料の一部として、群馬大学内予算と合算し、全額使用しました。

細菌の環境応答と適応に関する分子生物学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 古園さおり

アセチル化やスクシニル化に代表されるタンパク質リジン残基のアシル化修飾は、細菌の栄養環境や増殖フェーズに応じてダイナミックに変化する。アシル化修飾はアシル CoA やアシルリン酸など代謝より生じるメタボライトを利用するため、代謝を介して栄養シグナルと細胞応答をつなぐ分子メカニズムとして働く可能性が考えられる。細菌の栄養環境応答の観点から、翻訳因子や代謝酵素のアシル化修飾に関する研究を進めた。

1. *Bacillus subtilis*由来翻訳伸長因子 (*BsEF-Tu*) のダイナミックなアシル化修飾変化とその意義に関する研究¹⁾

翻訳伸長因子 *BsEF-Tu* (*TufA*) は存在量の多いタンパク質であり、LB やグルコースを炭素源とする栄養条件ではアセチル化され、コハク酸やクエン酸を炭素源とした条件ではスクシニル化が起こる。LB 培養では対数期でアセチル化されるが、定常期に入ると速やかに脱アセチル化され、培養後期ではスクシニル化が起こる。筆者は、ダイナミックに変化するアシル化修飾が *EF-Tu* の機能調節にどのように関わるかを明らかにするために、アセチル化／スクシニル化部位の機能解析を行った。*BsEF-Tu* における

14箇所のアセチル化／スクシニル化部位に対して、アセチル化模倣 (K to Q)、スクシニル化模倣 (K to E)、非アシル化模倣 (K to R) の変異を導入し、増殖および翻訳活性に与える影響を調べた。その結果、tRNA との相互作用に関わるドメイン3に位置する複数のスクシニル化部位 (K306, K308, K316) にスクシニル化模倣変異を導入した株は、野生株や非アシル化模倣変異株と比較して増殖が阻害されていることを見出した。作成した変異株より調製したリボソーム及びEFTuを含むS30画分を用いてin vitro翻訳活性を検討したところ、スクシニル化模倣変異体は野生型や非アシル化模倣変異体に比べて翻訳活性が30%にまで低下していた。以上の結果より、ドメイン3のスクシニル化は翻訳活性を負に制御し、増殖を阻害することが示唆された。その生物学的意義として、スクシニル化が活発に起こる定常期においてエネルギー消費の大きい翻訳活性の抑制に寄与する可能性が考えられた。

Gドメイン内に高頻度のアセチル化部位 (K42) を見出した。K42の脱アセチル化酵素としてZn²⁺依存型のAcuCとNAD⁺依存型のSrtNを同定した。複数のリジン残基がアセチルリン酸依存的にアセチル化された一方で、K42アセチル化はアセチルリン酸に依存せず、未知のアセチル化酵素の関与が示唆された。一方、K42におけるアセチル化／非アシル化模倣変異はいずれも増殖およびin vitro翻訳活性に影響を与えず、この部位のアセチル化はEFTuの翻訳機能に必須ではないと考えられた。この高頻度なアセチル化の意義は不明だが、特定のmRNAの翻訳に関わり栄養状態に応じた翻訳制御のメカニズムとして働く可能性を考えている。

2. *Corynebacterium glutamicum* における PDH-ODH ハイブリッド複合体に関する研究²⁾

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) と2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ (ODH) は炭素中心代謝の要となる

酵素であり、アセチル化とスクシニル化修飾の基質となるアセチル CoA とスクシニル CoA の主要な供給経路でもある。*C. glutamicum* ではPDHとODHがハイブリッド複合体として存在するユニークな特徴を持つ。筆者らは超遠心を用いた解析により、*C. glutamicum* 由来PDH-ODHは大腸菌由来PDH (~5 MDa) やODH (~3 MDa) と比べてコンパクト (約1 MDa) なハイブリッド複合体として存在することを見出した。また各サブユニット (CgE1p, CgE1o, CgE2, CgE3) の大腸菌組換えタンパク質を用いたin vitro再構成に成功し、複合体のサブユニット組成を明らかにした。1つのコンパクトな複合体が2つの酵素活性を担うとの事実から、サブユニット組成変化によりPDHとODH活性のバランス制御が行われる可能性が示唆された。複合体の中核をなすCgE2のサブユニット結合ドメインにアシル化部位を見出しており、アシル化修飾がサブユニット会合を介して代謝フローを制御する可能性が考えられた。

以上、栄養環境に応じて変化するタンパク質アシル化修飾が翻訳活性や代謝酵素活性に影響を及ぼすことを明らかにすることができた。今後の展望として、アシル化修飾が代謝酵素の集合体形成を介して代謝をグローバルに制御するメカニズムの可能性を追求していきたい。

最後に本研究の遂行にあたりご支援をいただいた本助成に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Suzuki S, Kondo N, Yoshida M, Nishiyama M, Kosono S: Dynamic changes in lysine acetylation and succinylation of the elongation factor Tu in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2019, 165: 65-77.
- 2) Kinugawa H, Kondo N, Komine-Abe A, Tomita T, Nishiyama M, Kosono S: In vitro reconstitution and characterization of pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase hybrid complex from *Corynebacterium glutamicum*. *MicrobiologyOpen*, 2020, 9: e11113.

有機合成を基軸としたフラバン-3-オール誘導体の機能性解明研究と栽培現場への貢献を目指した研究展開

大阪電気通信大学工学部環境科学科 齊藤安貴子

研究背景と目的

フラバン-3-オール誘導体は、カテキン類とも呼ばれフラボノイドの一種として知られる。一般的にも食機能性を発揮する化合物として認知され、近年機能性食品の成分とし

て期待が高まっている。構造的には水酸基、糖、その他の官能基によって置換された様々な誘導体が存在し、その中でもフラバン-3-オール誘導体がオリゴマー化した骨格を持つ化合物群をプロアントシアニジン (構造は図1参照)

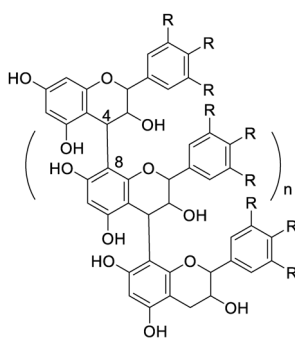


図1. プロアントシアニジンの構造.

と呼び、フラバン-3-オール単体よりも多種多様な高い生物活性が報告されている。この化合物群は、水酸基の数やオリゴマーの長さ、さらには様々な官能基や分子団による修飾により、多くの類似の構造を持つ化合物の混合物として存在し、それぞれの化合物を単離・構造決定が難しい化合物として知られる。そのため、生物活性試験に十分な純粋な化合物を確保すること、また、適した対照化合物を同時に入手することが困難である。それゆえ定量的な構造-活性相関研究が難しく、混合物としての機能性で評価されることが多い。しかし、どの化合物がどれくらい含まれていて、それぞれがどの程度の活性を有するののかという情報は、機能性表示をする場合に重要となると考えられる。

複雑な混合物として存在し、かつ、さわめて類似の構造を持つこれらの化合物は、通常分析手法での化合物同定が困難である。また、各化合物を定量するには標準化合物が必要となる場合も多い。そこで我々は、精密有機合成の技術を用いて純粋な化合物を確保すると同時に類似の化合物群も合成して、その生物活性評価系において適した対照化合物を提供してきた¹⁾。またそれら対照化合物を用いた構造-活性相関研究は、フラバン-3-オール誘導体の機能性は、化合物の微細な構造に大きく影響されることを証明してきた²⁾。すなわち、様々な作物に含まれるフラバン-3-オール誘導体は、「混合物としてどれくらいの総量が含まれているか」よりも「どの構造をもつ化合物がどれくらい含まれているか」が重要であることが示唆される。化合物レベルの分析と機能性解析のエビデンスが簡単に利用できるならば、作物の高機能化、高付加価値化が可能となる。しかし、栽培の現場などで、これらの化学的知見を直接利用するのは難しく、より利用しやすい形で研究成果を提供する必要があると考えた。

1. ラズベリーを用いた栽培条件とフラバン-3-オール誘導体生産量に関する研究

ラズベリー (*Rubus idaeus*) は、フラバン-3-オール誘導体

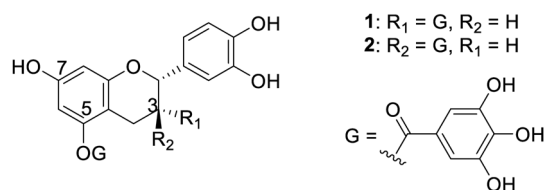


図2. 3位と5位にガロイル基を導入した化合物群.

をはじめ、エラジタンニン系化合物、フラボノール系化合物など多種類のポリフェノール化合物を含む。果実が食用であることに加え、葉もリーフティーとして多くの国で食経験が豊富である。また日本内でもラズベリー果実やその加工品のニーズは増加しているが、ほとんどが輸入品であり国産は少ない。この作物を実験植物として用いることで様々なポリフェノール化合物について同時に研究が実施でき、かつ、新たな地域産業・産学連携に結び付くと考えた。微量成分を分析するためには日照条件などを揃える必要があるが露地栽培では難しい。そこで植物工場ユニット中で環境制御下におけるラズベリー果実と葉のフラバン-3-オール誘導体の分析研究を行った。様々な検討（水分量や気温、植物ホルモン噴霧など）を実施したが、中でも照射光によってフラバン-3-オール誘導体生産量が変化した。ラズベリー栽培時にLED波長（赤と青）・照射光量や温度を制御した結果、葉の場合は青色LEDを照射し栽培した時が最もフラバン-3-オール誘導体量の増加が見られ、赤色LEDを照射したときはエラジタンニン系化合物が増加した³⁾。果実では成熟するにつれてフラバン-3-オール誘導体量が減少する傾向があるが、詳細に分析した結果、単量体量に大きな変化はなく、機能性が高いオリゴマー構造を持つプロアントシアニジン系化合物が果実の成熟に従って減少していることが確認された。この傾向は赤色LEDの照射量が多い場合に抑えることができた。この結果を受けて、現在は協力農場においてよりフラバン-3-オール誘導体を多く含むラズベリーを栽培する実証実験の準備を進めている。

さらに、上記検討中に次項で報告するガン細胞増殖抑制活性を有する化合物1がラズベリー中に含まれていることを見出した。

2. フラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関研究

前述したようにフラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関研究のために合成した化合物群³⁾を標準化合物としてラズベリー中に含まれるポリフェノール化合物の定量分析を行った結果、図に示すフラバン-3-オール構造の3位と5位にガロイル基を導入した化合物1、および、2が含まれていることが確認された。ラズベリー中のポリフェノール化合物の分析に関する文献は数多く存在するが、これらの化合

物が見出された例はなく初めての知見である。量としてはごく微量であるが、標準化合物を用いなければ見出すことができなかったと考えられる。

この化合物群については、ガン細胞を用いた検討においてこれまでに3位と5位にガロイル基 (G) を導入した化合物**1**の細胞増殖抑制活性が高いが、3位の立体が反転した化合物**2**は活性を示さないこと²⁾、また、化合物**1**の5位の代わりに7位にガロイル基を導入した化合物や、水酸基の数が多い化合物 (構造は示していない) は化合物**1**のような活性を示さないことを明らかにしてきた。このように、フラバン-3-オール誘導体の活性は、微細な構造によって大きく異なり、水酸基の数や化合物の総量では、その機能性を評価することが難しいことが示唆されている。この化合物**1**について詳細な活性発揮メカニズムを検討した結果、ガン細胞の細胞周期をM期で停止しアポトーシスを引き起こすことによって細胞死を誘導していることが確認できた⁴⁾。さらに、化合物**1**をリードとしてフッ素化誘導体を合成したところ、化合物**1**とは全く異なるメカニズムで細胞死を誘導することが確認された。フッ素化化合物はミトコンドリアの膜電位を低下させるがアポトーシスとは異なる経路で活性を発揮していた。

3. 生体触媒によるフラバン-3-オール誘導体の合成研究

精密有機合成だけでなく生体触媒を用いた誘導体の合成を試みた。有機合成では合成スキームが長くなる化合物も生体触媒を用いることで短工程の合成が可能な場合がある。特に、フラバン-3-オールの複数ある中で特定の水酸基を有機合成で選択的に配糖化誘導体をえるのは難しい。そこで、ポリフェノール化合物を多く生産する植物体から構築した未分化細胞 (カルス) を用いて誘導体合成を検討した。用いた細胞はブドウ細胞、ラズベリー細胞であったが、それぞれの細胞により様々な誘導体を得ることができた。特にブドウ細胞をもちいたとき、配糖体以外にもオリゴマー (プロアントシアニン等) が生成する条件を見出した。有機合成で得たフラバン-3-オール誘導体を生体触媒で

配糖化することで効率的に貴重な化合物を確保することができる。

4. タンパク質との相互作用を利用した研究

ここまで述べてきた化合物ごとの検討に加え、機能性を持つフラバン-3-オール誘導体をタンパク質に吸着させて分離・濃縮し応用することを視野に入れた研究を実施した。フラバン-3-オール誘導体はゼラチンと強く相互作用することが知られており、ワインの澱下げ剤や皮なめしなどに使用されている。この相互作用が化合物の構造で異なるか、保有している化合物群を用いて検討を行った。その結果、機能性が高い化合物 (ガロイル基を有する、オリゴマー構造を持つ) がより強くゼラチンと相互作用していることが確認でき、また、ゼラチン上に吸着させた状態で抗酸化活性を発揮できることも確認した⁵⁾。

まとめ

有機合成した化合物を軸に、作物中での定量分析、機能性評価、および新たな誘導体の合成を実施した。ラズベリーに微量成分として含まれる化合物**1**が高い機能性を持つことも確認できた。さらにゼラチンにより濃縮する検討も実施した。

引用文献

- 1) 最近の報告としては: Y. Higashino, *et al.*: "Regioselective synthesis of procyanidin B6, a 4-6-condensed (+)-catechin dimer, by intramolecular condensation", *Molecules*, Vol. 23, p. 205 (2018).
- 2) R. Kobori, *et al.*: "Flavan-3-ols content in red raspberry leaves increases under blue LED-light irradiation", *Metabolites*, Vol. 9, p. 56 (2019).
- 3) K. Mori, *et al.*: "Role of 2,3-*cis* structure of (-)-epicatechin-3,5-*O*-digallate in inhibition of HeLa S3 cell proliferation", *Nat. Prod. Chem. Res.*, Vol. 3, p. 172 (2015).
- 4) 論文投稿準備中.
- 5) M. Hirai *et al.*: "Efficient concentration of functional polyphenols using their interaction with gelatin", *Foods*, Vol. 10, p. 698 (2021).

12. 2018年度農芸化学若手女性研究者賞 報告書

2018年度農芸化学若手女性研究者賞報告書

微生物を活用した N 型糖鎖代謝酵素の機能解明とその応用

三重大学大学院生物資源学研究科 梅川碧里

報告者は、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母) を用いて、細胞内における糖質代謝と糖質応答の分子機構の解明に取り組んできた。当該研究期間内に得られた研究成果は下記の通りである。

報告者はこれまでの研究において、酵母が栄養飢餓にさらされると、細胞内で高マンノシル糖鎖の代謝分解経路が活性化されることを見出し、その分子メカニズムを明らかにした。栄養飢餓によって、高マンノシル糖鎖の代謝分解を担う糖加水分解酵素であるマンノシダーゼが、栄養応答に重要な TOR キナーゼの下流で転写誘導されるとともに、液胞プロテアーゼによるプロセッシングを受けることによりさらに活性化されることを明らかにした [Biochim Biophys Acta. 1860: 1192-1201 (2016)]。また、細胞外糖質シグナルを細胞内の TOR キナーゼに伝達する経路に関わる新たなタンパク質を同定した [FEBS Lett. 591: 3721-3729 (2017)]。

当該研究期間に報告者は、酵母における糖質飢餓応答の分子機構の解明を目的として、以下の研究を行った。糖質飢餓に応答して細胞内で活性化されるマンノシダーゼ酵素の細胞内活性を簡易的に定量することによって、酵母の遺

伝子欠損株ライブラリーの中から、糖質飢餓条件においても細胞内マンノシダーゼ活性が上昇しない遺伝子欠損株のスクリーニングを行った。その結果、細胞周期の制御に関わると考えられているサイクリンの一つである Clb4 が出芽酵母の糖質飢餓応答において重要な役割を担うことを見出した。Clb4 の遺伝子欠損株を 2 種類の異なる実験室酵母株で作製し、Clb4 の遺伝子欠損株においては、糖質飢餓条件においても細胞内マンノシダーゼの活性が殆ど上昇しないことを確認した [図1]。また、野生株では、マンノシダーゼの細胞内活性は炭素源の枯渇のみならずアミノ酸の枯渇によっても著しく上昇することを報告者は明らかにしているが、Clb4 の欠損株では、糖質飢餓条件におけるマンノシダーゼ活性のみが損なわれており、アミノ酸飢餓条件におけるマンノシダーゼ活性は野生株と同程度まで上昇した [図1]。この結果から、Clb4 は糖質飢餓に特異的に応答して細胞内代謝経路の制御に関わることが示唆された。さらに、Clb4 以外の他のサイクリンの欠損株においては、糖質飢餓条件におけるマンノシダーゼ活性の上昇は損なわれなかったことから、Clb4 は他のサイクリンとは異なり、糖質飢餓に応じた細胞内代謝経路制御に不可欠の役割を持つことがわかった。さらに、マンノシダーゼ酵素を制御する TOR キナーゼの活性が、Clb4 の欠損によって糖質の有無に関わらず亢進しており、制御不全が生じていることを示唆する結果が得られた。そして、TOR キナーゼの下流で制御されており、炭素源に応じて細胞周期の G2/M 期移行を制御する転写因子 Sfp1 の核局在の制御が Clb4 の欠損により損なわれていることがわかった。Clb4 の欠損株では富栄養条件における細胞増殖は野生株と同程度であったが、糖質飢餓条件における経時寿命が野生株と比較して著しく低下していることがわかった [図2]。以

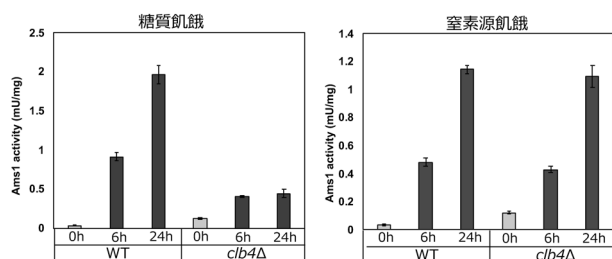


図1. 酵母の野生株と Clb4 欠損株の細胞内マンノシダーゼ活性。糖質飢餓条件 (左)、窒素源飢餓条件 (右)。

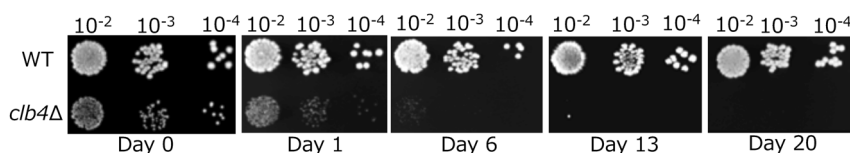


図2. 糖質飢餓条件で 20 日間培養した酵母の野生株と Clb4 欠損株の生菌数。

上の結果から、サイクリン Clb4 が酵母の糖質・糖質飢餓応答に重要な新たなタンパク質であることが見いだされた。そして、Clb4 は糖質・糖質飢餓に応じた TOR キナーゼおよびその下流の転写因子を介して細胞内代謝経路と細胞周期を制御する役割を有することが示唆された。

上記の成果は FEBS letters 誌に掲載され、当該号の

Highlight article に選抜された [FEBS Lett. 594: 1329–1338 (2020)]。本研究を通じて得られた知見をもとに、酵母の糖質応答と細胞内糖質代謝の分子機構解明に引き続き取り組み、複雑で重要な真核生物の細胞内糖質代謝制御機構の解明に貢献していきたい。

味覚受容体の新しい機能解析技術の開発と味覚受容の分子機構の解明

明治大学（日本学術振興会 特別研究員 PD） 戸田安香

味は甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の五基本味からなる。これらの味を呈する味物質は口腔内に発現するそれぞれの味質に対応した味覚受容体で受容される。そのうち、嗜好味である甘味と旨味は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である T1R ファミリーのヘテロ 2 量体で受容される (図 1)。一般的に甘味受容体 T1R2/T1R3 は糖を、旨味受容体 T1R1/T1R3 はアミノ酸及びヌクレオチドを検出する役割を担う (Chandrashekar et al., *Nature*, 2006)。一方、代表

者は、鳥類は T1R2 が偽遺伝子化して甘味受容体を失っているが、花蜜食鳥類であるハチドリにおいては旨味受容体 T1R1/T1R3 が糖受容能を獲得していることを明らかにした (Baldwin*, Toda* et al., *Science*, 2014) (図 2)。この結果から、動物の食性に応じて T1R 受容体が柔軟に機能を変化させてきた可能性が示された。

ヒトの感覚と一致して、ヒト旨味受容体はグルタミン酸に特化したアミノ酸選択性を示す (図 3)。一方、マウス (Nelson et al., *Nature*, 2002) やメダカ (Oike et al., *J. Neurosci.*, 2007) の旨味受容体はグルタミン酸ではほとんど活性化されない。そこで本研究では、ヒト旨味受容体はなぜ必須アミノ酸でもないグルタミン酸の受容に特化したのかを明らかにすることを目的として、食性の異なる複数の系統に属する霊長類を対象に、旨味受容体の塩基配列解析、機能解析を行うこととした。

これまでに、代表者らはヒトとマウスの比較解析から、ヒト旨味受容体のグルタミン酸受容能の獲得には、T1R1 のアミノ酸結合部位に存在する 170 番及び 302 番のアミノ酸残基の負電荷の消失が重要であることを明らかにした (Toda et al., *J. Biol. Chem.*, 2013)。そこで、狭鼻猿類 3 種 (ヒト、アカゲザル、マントヒヒ) 及び新世界ザル 3 種 (リスザル、マーモセット、クモザル) の旨味受容体の塩基配

	甘味受容体	旨味受容体
		
	T1R2 + T1R3	T1R1 + T1R3
リガンド	天然糖 人工甘味料 甘味タンパク質 など	アミノ酸 ヌクレオチド (イノシン酸、 グアニル酸など)

図 1. 甘味・旨味受容体。

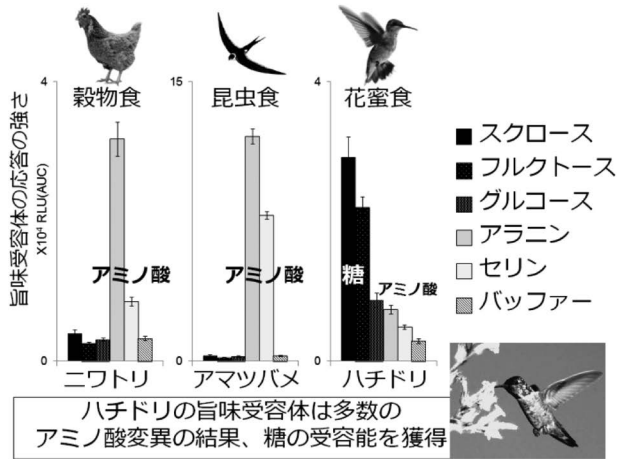


図 2. ハチドリの糖の味受容機構。

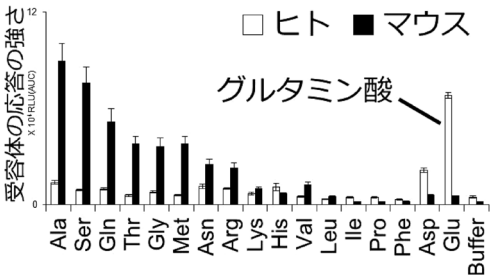


図 3. ヒトとマウスの旨味受容体におけるアミノ酸選択性の違い。

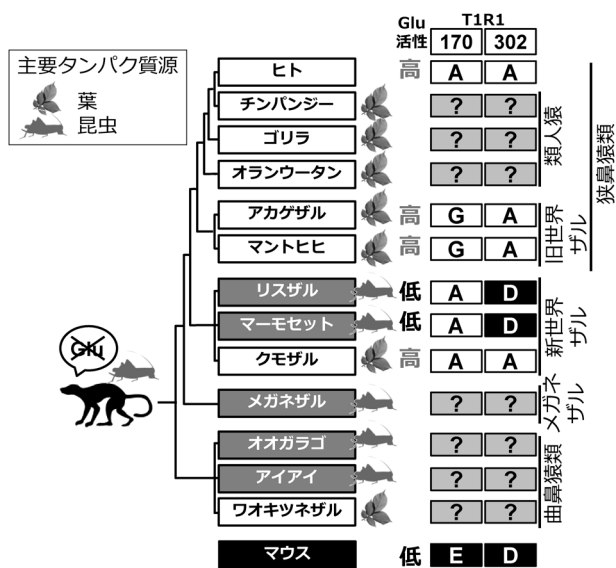


図4. 霊長類T1R1/T1R3におけるグルタミン酸活性の違いと食性の比較。塩基配列を解析済みの霊長類は、T1R1/T1R3の170番・302番のアミノ酸も示した。

列解析を行ったところ、ヒト、アカゲザル、マントヒヒ、クモザルでこの2アミノ酸残基の負電荷が消失している一方、リスザルとマーモセットは302番のアミノ酸残基がマウスと同様にアスパラギン酸残基であることが明らかになった(図4)。

また、これらの霊長類の旨味受容体を機能解析した結果、アカゲザル、マントヒヒ、クモザルの旨味受容体がヒト旨味受容体と同様に高いグルタミン酸活性を有する一方、リスザルとマーモセットの旨味受容体はグルタミン酸活性が低いことが明らかになった(図4)。以上より、霊長類の旨味受容体が高グルタミン酸活性を獲得するためには、T1R1の170番、302番の2アミノ酸残基の負電荷が共に消失する必要があると示唆された。今後、解析する霊長類の種類を増やし、行動実験、食物成分分析なども行うことで、ヒト旨味受容体がグルタミン酸を選択的に受容する生物学的意義を明らかにしたいと考えている。

旨味は日本人にとって馴染みのある味質だが、世界的には未だに認知度が低い。その原因として、昆布だし(グルタミン酸)や鰹節(イノシン酸)といった日本食材から、旨味成分が初めて抽出されたことが挙げられる。一方、代表者らはチーズやトマト、醤油に共通な主要香気成分であるメチオナールが、旨味受容体活性化能を有することを近年明らかにした(Toda et al., *Sci. Rep.*, 2018)。このことは旨味が、日本だけではなく、世界中でヒトがおいしいと感じるのに重要な役割を果たしてきたことを示している。本研究により旨味受容体の機能と霊長類の食物の関わりを明らかにできれば、旨味感覚のより根源的な理解に繋がると期待される。

プロシアニジンの高血糖・抗肥満予防効果に関する研究

神戸大学大学院農学研究科 山下陽子

【背景・目的】

近年、生活習慣病患者が急増しており、エネルギー代謝促進に寄与する食品因子の探索およびその作用機序の解明が求められている。食品因子の機能発揮には、日内変動の生体リズムを生みエネルギー代謝を調節する時間遺伝子の制御も密接に関わる。これまでに、プロシアニジンなどの重合体ポリフェノール類が、糖代謝や脂質代謝の促進効果を有する可能性を見出してきたが、そのほとんどが末梢組織での作用機序解明に留まっているとともに、摂取するタイミング(体内時計)の関与については検討されていない。本研究では、本研究は、体内時計による生体リズムを考慮して、重合体ポリフェノールのエネルギー代謝促進作用とその作用機構を解明を目的とした。

【方法】

マウス由来横紋筋細胞のC2C12を筋管細胞に分化させ、forskolin (Fsk)を用いて概日リズムを誘導した。すなわち、10 μ MのFskを2時間処理した後、36時間まで4時間毎に細胞を回収し、時計遺伝子*Bmal1*と*Per2*の発現量をRT-qPCR法で測定した。この細胞を用いて、*Bmal1*の発現量が最大または最小となるタイミングで、カカオ由来プロシアニジン高含有組成物(CLP)またはそれに含まれる主要なflavan-3-olである(-)-epicatechin, procyanidin B2, procyanidin C1, ならびにcinnamtannin A2の各化合物をC2C12細胞に作用させ、2-deoxy-D-glucose (2DG)の細胞内への取込み活性を評価した。また、CLPと上記の化合物をC2C12細胞に作用させた後、細胞膜画分と総タンパク質画分を抽出し、GLUT4の膜移行量とその上流因子の活性化を評価した。次に、マウスを用いた実験では、

明暗周期12/12時間の条件下で飼育した。なお、明期開始時刻をZeitgeber Time 0 (ZT0) と定義した。C57BL/6N マウスを3時間間隔で24時間後までの8つのタイミングで屠殺し、腓腹筋を採取して時計遺伝子の発現量を測定した。*Bmal1* の発現量が最大または最小となるタイミングである ZT1 と ZT13 にそれぞれ CLPr を強制経口投与した後、経口糖負荷試験を行い、高血糖抑制効果を評価した。さらに、その作用機構を解明するために、ZT1 と ZT13 に CLPr を投与したマウスを屠殺し、腓腹筋における GLUT4 の膜移行量とその上流因子の活性化を評価した。

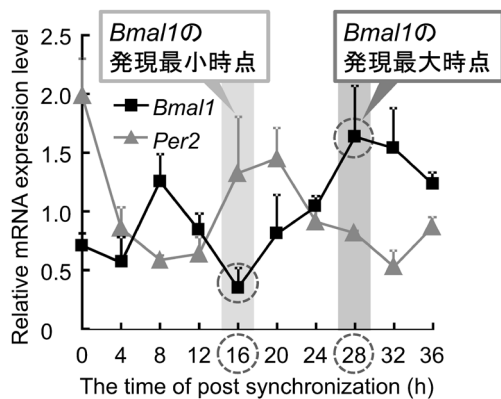


図1. C2C12の時計遺伝子発現量。

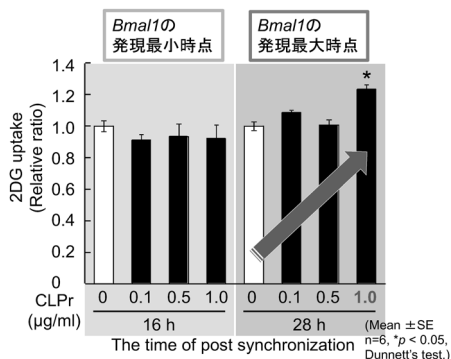


図2. C2C12細胞のCLPrによる2DG取り込み量。

【結果及び考察】

C2C12細胞にFskを処理すると、時計遺伝子の発現に概日リズムが誘導されることを確認した(図1)。*Bmal1* の発現量は、Fsk処理後16時間目に最小値に、28時間目に最大値に達した(図1)。そこで、以降の実験では、これらのタイミングを用いることにした。高血糖抑制の指標として2DG取込み量を測定したところ、*Bmal1* の発現量が最大のタイミングでのみCLPr作用により有意な増加が認められた(図2)。同様に、*Bmal1* の発現量が最大のタイミングでのみ、GLUT4の細胞膜移行量とAMPKのリン酸化も認められた。CLPrはAMPKの上流因子であるliver kinase B1 (LKB1) のリン酸化を促進したが、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2には影響を与えなかった。また、CLPrに含まれるflavan-3-olのうちprocyanidin B2が、これらの効果を最も強く発揮する化合物であることが判った(図3)。次に、動物実験でマウス腓腹筋における*Bmal1* の発現量を24時間の8つのタイミングで測定したところ、ZT1で最大となり、ZT13で最小になることが判った(図4)。これらのタイミングで糖負荷試験を行ったところ、CLPrをZT1で投与した

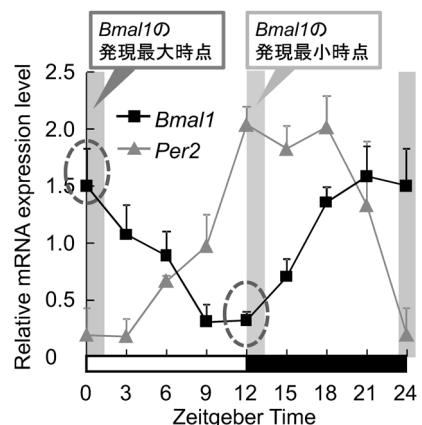


図4. マウス筋肉における時計遺伝子発現量。

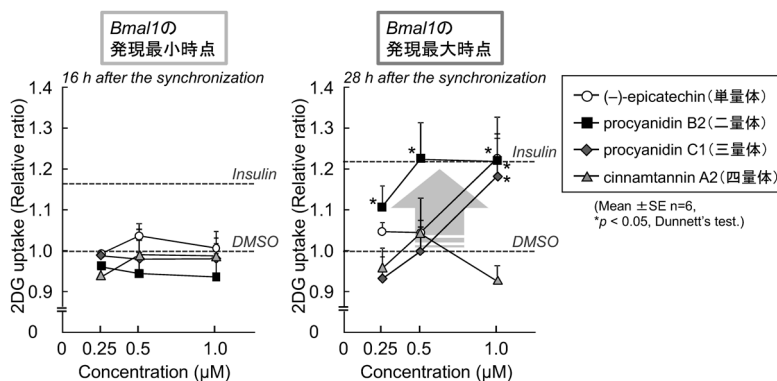


図3. C2C12細胞のflavan-3-olによる2DG取り込み量。

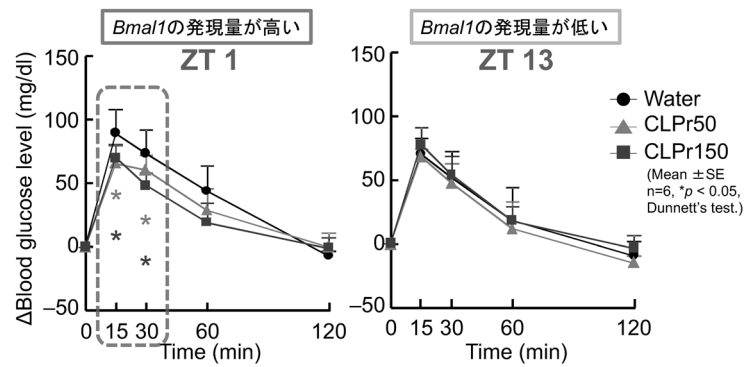


図5. マウスでの糖負荷試験.

時にのみ、血糖値の上昇が有意に抑制されたが、ZT13ではCLPrは効果を発揮しなかった(図5)。また、腓腹筋におけるGLUT4の膜移行量とLKB1とAMPKのリン酸化も、ZT1にCLPrを投与した際に有意に増加し、ZT13では変化はなかった。GLUT4の発現量に対する概日リズムには日内変動は認められなかったことから、CLPrの作用

タイミングの違いによる糖取り込み促進効果の違いには、LKB1/AMPK経路の制御機構が概日リズムの影響を受けていることが示唆された。マウスでの*Bmal1*の発現量が高いタイミングは、ヒトでは就寝時刻に相当することから、CLPrは就寝時刻前の摂食により起こりやすい高血糖を抑制できる可能性を示唆する知見を見出した。

13. 2019年度農芸化学女性研究者賞 報告書

2019年度農芸化学女性研究者賞報告書

植物性食品の香りを主とする質的特性に対するその因子探索と フードメタボロミクスによる展開

神奈川工科大学応用バイオ科学部栄養生命科学科（現工学院大学先進工学部応用科学科） 飯島陽子

目的

我々は、食品の種類や鮮度、発酵、調理過程などにおける質的变化について、「フードメタボロミクス」をキーワードとした、多成分一斉解析から見えてくる現象ならびに鍵成分とその生成要因について探索している。本助成において、以下の研究成果が得られたので報告する。

キノコの鮮度評価におけるメタボロームの活用

キノコは、食物繊維の豊富な食材として人気があり、そ

の風味も好まれる食材であり、鮮度がよいほどおいしいと言われている。しかし保存中の見た目の変化が分かりにくいものも多く、その鮮度について判断することは難しい。本研究ではマイタケを中心に、鮮度と水溶性成分の変化について着目し、メタボローム解析によって成分組成の変化について調べた。

主成分分析の結果、保存温度及び保存期間で水溶性成分組成に変化が見られた（図1）。アミノ酸では glutamic acid や phenylalanine, leucine 等の 16 種類のアミノ酸が経時的に増加していた。これはマイタケの高いプロテアーゼ活性による自己消化が起こり、アミノ酸が生成されたと考えられた。一方、aspartic acid のみが減少していた。糖・糖アルコールでは inositol や mannitol, meso-erythritol の増加、glucose, arabitol の減少が見られた。さらに有機酸では succinic acid が増加し、fumaric acid が減少することがわかった。

味噌の種類および調理における風味特性と成分変化

味噌は醤油やみりと並んで日本の伝統発酵食品の一つである。我々は味噌のメーカーの違いや発酵過程、調理過程におけるフレーバー変化について、サンプルの官能特性を維持した網羅的揮発性成分分析法を構築し、詳細に調べ

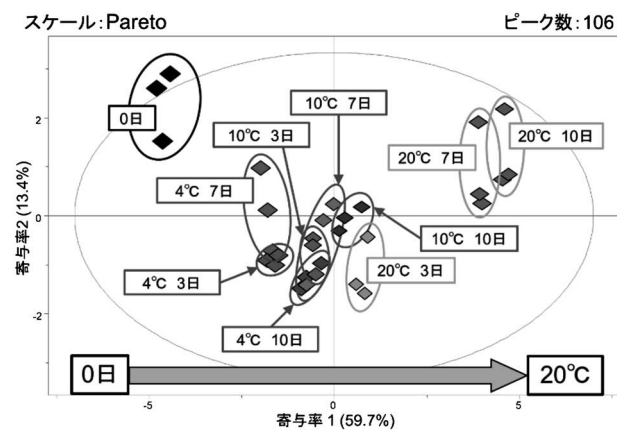


図1. マイタケの保存温度と保存日数による主成分分析結果。

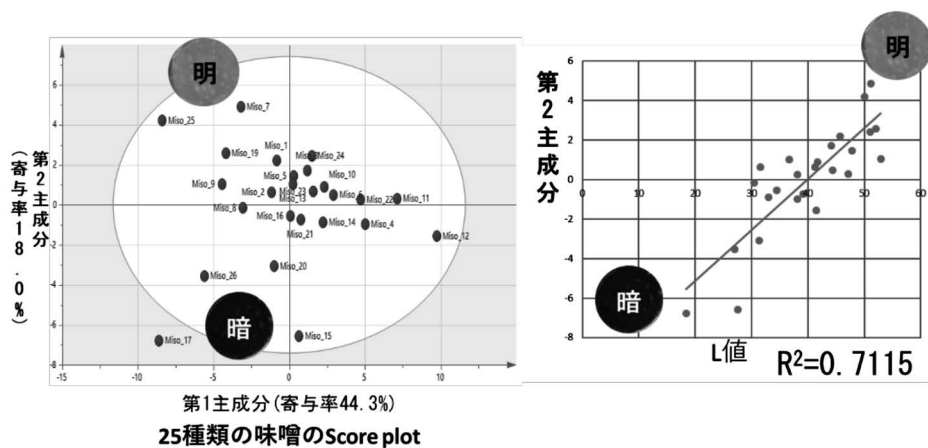


図2. 味噌の香り成分組成に基づく主成分分析とL値との相関性。

た。地域や製造元の異なる市販の味噌（25種）の香気成分の比較を行ったところ、535 ピークを検出した。これらを使って主成分分析を行ったところ、特に大きな特徴をもった味噌は見いだされなかった。しかし、味噌の明度、色彩を表す L, a, b 値と主成分分析結果を照らし合わせたところ、スコアプロットの第2主成分と L 値（明度）に相関が高く、L 値が高い味噌の香気成分ほど第2主成分が高値であることが分かった（図2）。さらに、これらに寄与する成分を精査したところ、明度の高い味噌では、4-vinylphenol や 2-methoxy-4-vinylphenol といったフェノール類が多く、色の暗い味噌では、アミノカルボニル反応由来の香気成分が検出された。味噌の主要香気成分として HEMF (4-hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3 (2H)-furanone) がよく知られるが、本成分は味噌の色彩とは相関がみられなかった。

さらに、味噌の熟成過程と揮発性および不揮発性成分の変動について、同一麹および大豆を用いて網羅的に調べた。大豆のみ、仕込み後0日～77日まで経時的にサンプリングを行った。また、長期熟成味噌も比較対象にして解析に用いた。その結果、タンパク質の分解と思われる各種アミノ酸類の増加がみられた。また、麹由来と思われる maltose や melibiose などのオリゴ糖の増加も大きかった。一方、大豆オリゴ糖である sucrose や raffinose, stachyose は経時的に減少していた。この結果から熟成によりオリゴ糖類が分解し、より低分子の糖が増加することがわかった。揮発性成分については、特に isoamyl acetate や 2-ethoxyethyl acetate, ethyl phenylacetate, 2-phenylethyl acetate などのエステル類が増加していたことから、耐塩性酵母などの微生物の作用によりアセチル化が進んでいると考えられた。

抗生物質ストレプトスリシンおよびその類縁化合物の生合成研究で見出した新規ペプチド合成酵素

福井県立大学生物資源学部 丸山千登勢

微生物から見出された天然由来の生理活性物質の多くは、有用な生理活性を持ちながらも様々な理由から未利用のままである。このような未利用資源を医薬品として実用化できれば、現代社会が求める創薬スピードを加速させることが可能である。数多くの放線菌が生産する抗生物質 streptothricin (ST, 図1) とその類縁化合物 glycythricin (GT, 図1) もその一例であり、強力な抗菌活性を示すにも関わらず、ヒトなどの真核生物への毒性が強く医薬品として利用されていない。ST 類縁化合物の化学構造は共通して、アミノ糖とアミノ酸誘導体からなる streptothrisamine 骨格（図1）を有し、アミノ酸側鎖として、1～7残基の β -lysine (β -Lys) または β -Lys oligopeptide [oligo(β -Lys)],あるいは glycine (Gly) または Gly 誘導体が結合することで数多くの類縁化合物が存在する。streptothrisamine 骨格は全く抗菌活性を示さないのに対し、アミノ酸側鎖構造を有する ST 類縁化合物は強力な抗菌活性を示すことから、ST 類縁化合物の生理活性には、アミノ酸側鎖構造が重要な役割を担っていると言える。また興味深いことに、これまでに天然より単離された ST 類縁化合物の側鎖構造は、 β -Lys タイプまたは Gly タイプの2種類しか見つからず、これら以外のアミノ酸を側鎖に持つ化合物は見

つかっていない。従って、側鎖構造の生合成メカニズムの解明は、その応用利用による新規 ST 類縁化合物の創製を可能にすると考えた。

そこで我々は、ST および GT の各生産菌より生合成遺伝子群を取得し、oligo (β -Lys) および Gly 側鎖の生合成メカニズムの解明を試みた。その結果、ST が有する oligo (β -Lys) 構造は、新奇反応メカニズムを有する非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成されるのに対し¹⁾ (図2A)、側鎖に Gly を持つ ST 類縁化合物 GT 生合成遺伝子群においては、NRPS をコードする遺伝子が存

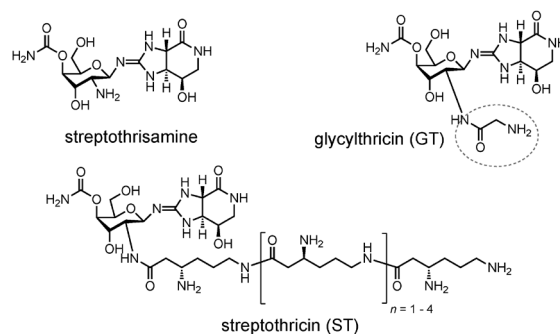


図1. ST および ST 類縁化合物の化学構造.

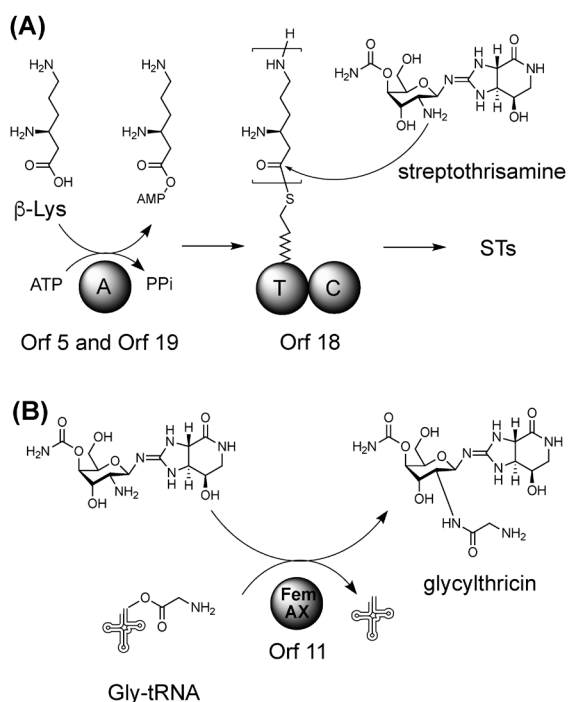


図2. (A) NRPSによるoligo (β-Lys) 側鎖生成.
(B) tRNA^{aa}依存型アミド合成酵素によるGly側鎖生成.

在しておらず、FemAX familyに相同性を示すOrf11が、tRNA依存的にGly側鎖の生成を担っていることを明らかにした²⁾(図2B)。したがってSTとGTは非常に似た構造を持つ化合物でありながら、それぞれのアミノ酸側鎖構造においては、全く異なるメカニズムによって生成されることを明らかにした。

またタンパク質翻訳システムにおいては、Gly-tRNA^{Gly}を含め20種のaa-tRNA^{aa}が存在する。そこで我々は、天然にはGly以外のaa-tRNA^{aa}を基質認識するOrf11ホモログ酵素が存在すると考え、放線菌ゲノムデータベースより探索を行った。その結果、最近、Orf11ホモログ酵素Sba18を見出し、Orf11と同様に機能解析を行ったところ、Sba18は、Gly-tRNA^{Gly}以外にもAla-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser}を基質として認識し、GTだけでなく、AlaやSerを側鎖に有する新規ST類縁化合物を生成することを明らかにした。従ってOrf11とSba18は高い相同性(75%)を示しながら、その基質特異性は大きく異なり、Sba18はaa-tRNA^{aa}におけるtRNA^{aa}構造、アミノアシル基構造の両者に対して基質認識が広いアミド合成酵素であることが判明した。そこでより詳細にSba18の基質認識機構を調べるために、まず、tRNA^{Gly}、tRNA^{Ala}、tRNA^{Ser}をそれぞれ*in vitro*合成し、人工RNA触媒Flexizyme³⁾を利用してGlyでアミノアシル化した非天然型Gly-tRNA^{aa}を調製し(図3)、*in vitro*酵素反応を行った。その結果、Sba18は全てのGly-tRNA^{aa}を

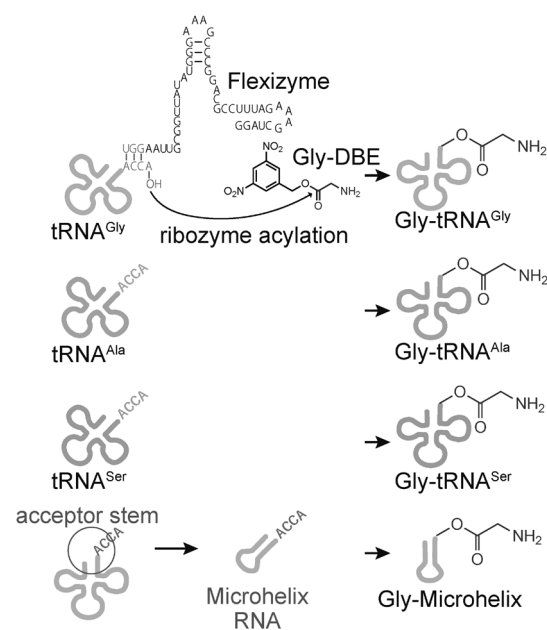


図3. Flexizymeを利用した非天然型Gly-tRNA^{aa}人工合成.

基質認識し、GTを生成した。また興味深いことに、tRNA^{Gly}のacceptor stem構造のみからなるtRNA mimic基質Microhelix RNA(図3)を使った人工基質を用いた場合においても、Sba18はGTを生成したことから、Sba18のtRNA^{aa}基質認識には、acceptor stem構造が重要であることが判明した。さらに、アミノアシル基への基質認識機構を調べるために、これまでに、様々なアミノアシル基を有するMicrohelix RNA合成基質を用いて反応を行ったところ、Sba18はアミノアシル基に対しても幅広く基質認識し、これまですでに20種類を超える新規ST類縁化合物を創成した。現在、Sba18のX線結晶構造解析を進めており、Sba18の基質認識に関わる活性部位の同定により、さらに基質認識の広い変異型酵素の構築が可能になると考えている。今後は、我々が必要とする生理活性を持つST類縁化合物をデザインし、論理的に酵素合成できるような応用に挑戦していきたい。

謝辞

本研究は福井県立大学生物資源学部濱野研究室において行われたものであり、濱野吉十教授ならびに研究遂行に携わった学生諸氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) C. Maruyama, J. Toyoda, Y. Kato, M. Izumikawa, M. Takagi, K. Shin-ya, H. Katano, T. Utagawa, and Y. Hamano, A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in

- streptothricin biosynthesis, *Nat. Chem. Biol.*, 8(9), 791-797 (2012)
- 2) C. Maruyama, H. Niikura, M. Izumikawa, J. Hashimoto, K. Shin-ya, M. Komatsu, H. Ikeda, M. Kuroda, T. Sekizuka, J. Ishikawa, and Y. Hamano, t-RNA-dependent aminoacylation of an amino sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotics, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(12), 3640-3648 (2016)
- 3) M. Ohushi, H. Murakami, and H. Suga, The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11(5), 537-542 (2007)

食品由来フラボノイドの生体利用性に関わる 化学構造の特徴と生体内代謝物の同定

島根大学学術研究院農生命科学系 室田佳恵子

フラボノイドは植物性食品に含まれる機能性成分の1つであり、ポリフェノールの1種である。植物中に存在するフラボノイドは、主にフラボン、フラボノール、フラバノン、フラバン-3-オール、イソフラボン、アントシアニンの6つに分類され、その基本骨格に結合するフェノール性水酸基の位置と数の異なる多彩な分子が存在する。さらに、ほとんどのフラボノイドが、水酸基の1つあるいは複数に糖が結合した配糖体、あるいは有機酸と結合した形態を取っており、その結合位置や糖鎖構造も様々である。一般的には配糖体は加水分解された後に吸収され、体内では抱合反応の基質となって様々な抱合体として存在している。

フラボノイドの機能性は、多くの分子が示す強い抗酸化性との関連が期待される抗動脈硬化作用をはじめとした心疾患の予防、肥満や糖尿病、脂質異常症の予防、免疫機能調節、中枢神経への作用など、幅広い疾病予防、健康効果が期待されている。フラボノイドを含め食品成分が体内で機能性を発揮するためには、適切な量の活性を有する代謝物が標的となる臓器に必要な時間滞在することが必要であり、このような「生体利用性」は食品中のフラボノイド分子が効果的に生理機能を発揮できるかどうかを左右する。しかし生体利用性の詳細は、多彩な分子集団であるフラボノイドについて、十分に解明されているとは言い難い。我々の研究グループでは、小腸におけるフラボノイドの吸収経路と腸管細胞や肝臓による代謝による構造変換に着目してこれまでに研究を行ってきた。特にフラボノイドが腸管細胞によって抱合体となった後、門脈を介して肝臓へ輸送されるとともに、一部がリンパ管へと輸送されることを示したことが評価され、本研究助成期間においては、「第9回ポリフェノールと健康国際会議 (ICPH2019)」においてシンポジストとして講演を行い¹⁾、当時の最新情報を総説として発表した²⁾。現在はラットをモデルとしてアピゲニンとその配糖体の腸管吸収後の輸送経路を解析しており、こ

れまでに報告していたケルセチンとその配糖体の場合との比較を行った結果を2021年度日本農芸化学会大会で報告した³⁾。ケルセチンとアピゲニンでは、分子の疎水性を示すLogP値に違いがあることが、それぞれのアグリコンと配糖体の吸収性に影響をもたらす原因の1つとして推定されている。アピゲニンとその配糖体から生じる代謝物の構造についても引き続き分析を実施しているところである。

また、我々はポリフェノールを豊富に含む物質としてプロポリスにも着目した。プロポリスにはフラボノイド類とともに、桂皮酸誘導体も豊富に含まれている⁴⁾。これらの吸収性をヒトにおいて調べ、プロポリス由来ポリフェノールの吸収代謝性の詳細を明らかにした⁵⁾。興味深いことに、プロポリス中の含有割合と血漿中代謝物の割合は一致せず、個々の分子により吸収代謝性に違いがあることが示唆された。そこで、ラットを用いて詳細を明らかにすることとし、現在までの結果の一部を2021年度日本農芸化学会大会で報告した⁶⁾ (現在論文投稿準備中)。

ここまで述べたような研究を通して、フラボノイドの吸収代謝動態を評価してきたが、フラボノイドの吸収率は栄養素と比べるとかなり低いことが明らかである。我々はこれまでも、吸収されずに消化管内に存在するフラボノイドやそれらの腸内細菌による異化代謝物の少なくとも一部は、消化管粘膜に対して抗酸化力を発揮して、消化管自体を守る役割を果たしている可能性を示してきた。そこで現在は、フラボノイドをはじめとするポリフェノール類の吸収代謝性に加えて、消化管を標的とした機能性発揮の可能性についても研究を展開している。同時に摂取する食品成分や消化管内に存在する各種酵素や輸送担体、さらには腸内細菌との相互作用による生理作用の解明に向け、*in vitro*や細胞培養系による成分間(または酵素-基質間)相互作用解析、動物モデルを用いた腸内細菌代謝関連分子の探索を実施している。

最後になりましたが、本研究助成をいただいた日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。

- 1) K. Murota: Lymphatic transport of flavonoid glycosides after intestinally administration in rats. The 9th International Conference on Polyphenols and Health (2019).
- 2) K. Murota: Absorption pathway of dietary flavonoids: the potential roles of the lymphatic transport in the intestine. *Func. Foods Health Dis.*, 10, 274 (2020).
- 3) 川本実佳, 室田佳恵子: アピゲニンアグリコンおよび配糖体の腸管吸収における輸送経路の解明. 2021年度日本農芸

化学会大会 (2021).

- 4) 山家雅之, 谷央子, 室田佳恵子: プロポリスの多様性とその機能性に基づいた品質規格の取り組み. 日本ポリフェノール学会誌, in press.
- 5) M. Yamaga et al.: Pharmacokinetics and metabolism of cinnamic acid derivatives and flavonoids after oral administration of Brazilian green propolis in humans. *Food Func.*, 12, 2520–2530 (2021).
- 6) 山家雅之, 谷央子, 室田佳恵子: ラットにおけるブラジル産グリーンプロポリス由来桂皮酸誘導体の代謝. 2021年度日本農芸化学会大会 (2021).

14. 2019年度農芸化学若手女性研究者賞 報告書

2019年度農芸化学若手女性研究者賞報告書

生理活性ペプチドの機能解明に向けた生物有機化学的研究

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 岡谷（永井）千晶

1. 背景・目的

心房性ナトリウム利尿ペプチドは、心臓への急性的・慢性的な負荷に伴い心筋細胞から産生・分泌され、心保護因子として働く主要な循環調節ホルモンである。この生理活性ペプチドの前駆体から活性型へのプロセッシングには、II型1回膜貫通型のセリンプロテアーゼである Corin が関与することが知られている。Corin は主に心筋細胞にて発現しており、細胞膜に局在するほか、細胞外領域が切断されて生じる可溶型が血中で検出される。ヒト Corin (hCorin) には配列上19か所の推定N型糖鎖付加部位があり、N型糖鎖の付加位置によって細胞膜へのトランスロケーションや酵素活性化、分子シャペロンによるフォールディングが個別に制御されており、その機能発現における糖鎖修飾の重要性が示されている (*Curr Opin Nephrol Hypertens* 16: 67-73, 2017)。しかし、各付加位置にどのような構造のN型糖鎖が付加しているのかは明らかになっていない。また、心不全を含む心疾患患者では、細胞外領域が切断されて生じる可溶型 corin の血中濃度が心機能低下と相関して減少しており、心疾患マーカーとして注目されている。そのため、本研究により可溶型 Corin 上の疾患関連糖鎖変化を同定できれば、タンパク質のみの検出よりも鋭敏な疾患糖鎖マーカーとなると期待できる。

そこで本研究では、レクチンマイクロアレイ (LMA) による心肥大モデル細胞の糖鎖プロファイル解析により、正常および心肥大状態の心筋細胞における Corin の糖鎖修飾の特徴を明らかにすることを目的とした。

2. 開始当初の研究計画

hCorin を一過的に発現させたラット心筋細胞あるいは未処理の不死化ヒト心筋細胞に対し、薬剤処理により肥大刺激を与える。この心肥大モデル細胞と非処理（正常）細胞の細胞ライセートまたは培養上清から免疫沈降によりリコンビナント hCorin (rhCorin) または内在性の hCorin を回収する。そして、抗体オーバーレイ LMA 法 (*Mol Cell Proteomics* 8: 99-108, 2009) により、45種類のレクチンとの結合性により示される hCorin の糖鎖プロファイルを、心肥大モデル細胞と正常細胞とで比較する。

3. 方法・結果

3-1. 心筋細胞における心肥大に伴う糖鎖変化の解析

まず、心肥大モデル細胞の作出条件を検討した。細胞面積およびアクチンフィラメント染色により肥大の程度を評価することで、最適な培養条件（培地組成、コーティング剤および播種密度）、薬剤濃度および薬剤曝露時間を最適化した。次に、最適化した条件にて培養した肥大刺激 (+)/(-) 細胞から、培養上清（分泌タンパク質画分）、細胞親水性画分、細胞疎水性画分、および細胞膜画分を調製した。そして、LMA を用いた糖鎖プロファイリング技術により、各画分のグライコームを比較解析することで、肥大刺激による糖鎖変化を検討した。その結果、ラット心肥大モデル細胞の細胞膜画分では、肥大刺激により複数の糖鎖構造の変化が認められた。その糖鎖変化は肥大刺激として使用した薬剤（angiotensin II, endothelin-1, phenylephrine, isopro-

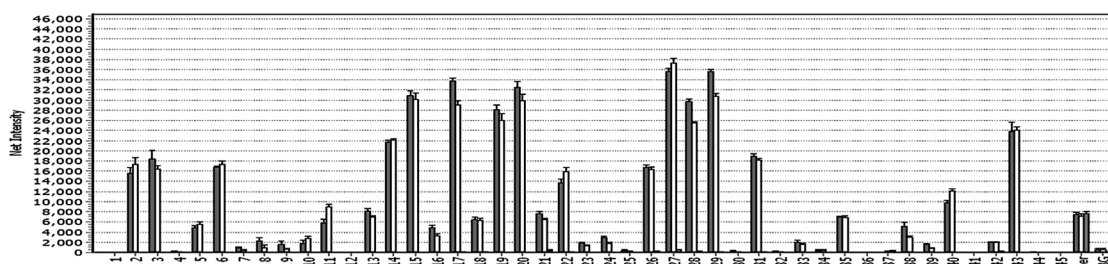


図. rhCorin の糖鎖プロファイル (抗FLAG抗体使用)。

赤色バーは非変性条件、黄色バーは変性条件、桃色バーはネガティブコントロール。

terenol) によって異なっており、特に isoproterenol について肥大刺激 (+)/(-) 細胞間の糖鎖プロファイルに顕著な差が認められた。

3.2. hCorin の糖鎖プロファイル解析

次に、抗体オーバーレイ LMA 法によるヒト corin の糖鎖プロファイル解析法の確立のため、3種の市販 anti-hCorin 抗体のオーバーレイ抗体としての使用可否を検討した。その結果、1種の抗体を用いた場合のみ、10 ng/well の非変性 rhCorin から糖鎖プロファイルが取得できた。しかし、当該 anti-hCorin 抗体では変性 rhCorin は検出されなかったことから、当該抗体を用いて免疫沈降法により回収した rhCorin や内在 hCorin を分析することは困難であると示唆された。一方、rhCorin に付加する FLAG タグの特異的抗体を用いた場合、1 ng/well の rhCorin から糖鎖プロ

ファイルを取得できた (図)。anti-hCorin 抗体を用いた場合と比較して、タグ抗体を用いた場合では、より多くのレクチンにてシグナルが検出された。

4. まとめ

以上の結果から、ヒト不死化心筋細胞の内在 hCorin の糖鎖プロファイル解析は困難であると考えられた一方で、ラット心筋細胞にて発現させた rhCorin の心肥大刺激による糖鎖変化の変化を解析するためのプロトコルを確立できた。今後、心肥大刺激の有無や程度を変えた細胞において発現させた rhCorin の糖鎖プロファイルを比較解析することにより、心肥大による糖鎖修飾の変化を明らかにする予定である。

キノコ由来の生物活性2次代謝産物に関する化学的研究

静岡大学グリーン科学技術研究科 呉 静

生物には、それぞれに特有なホルモンが存在するが、キノコにおけるホルモンは一切明らかにされていない。キノコを発生させる菌類は、胞子から菌糸、菌糸から子実体、子実体から胞子という生活環を持っている。我々は、「キノコ生活環の各段階はキノコ特有のホルモンによって制御されている」という仮説を抱き続けてきた。キノコ研究者にはキノコホルモンの存在そのものに懐疑的な人が多く、キノコホルモン発見の糸口になる研究成果は国内外を通じて一切無い。本研究では、「キノコホルモン (キノコに共通に内生し、共通のメカニズムによって生活環を制御する分子)」特に「子実体発生ホルモン」の発見を目指した。子実体発生ホルモンであれば、キノコの中に普遍的に存在すること及び各種キノコに対する子実体形成誘導活性あるいは促進活性を有することが必要となる。そのため、以下の3つの全く異なるアプローチからキノコの生活環制御ホルモンを探索し、その構造、活性、生合成経路を明らかにして、キノコホルモンの存在を証明する。

1. 「キノコホルモンの一つはステロイドホルモンである」という仮説の証明

筆者自身が発見した strophasterol 類と当研究室で発見された chaxine 類を候補とし、キノコにおける内生を証明するため、多数のキノコを入手し、エタノールで抽出した。各抽出物を LC-MS/MS に供した。目的物質が検出できな

い場合は、これら画分を HPLC で画分し、その画分を LC-MS/MS に供した。110種のキノコ抽出物の LC-MS/MS 分析の結果、分類学的には異なった 82種に strophasterol A、53種に strophasterol C が存在することが明らかになった。85種に chaxine B、80種に chaxine C、26種に chaxine D、35種に chaxine E が存在することが明らかになった。一方、子実体形成時の2次代謝産物・遺伝子・タンパク質の発現の変化を網羅的に解析するため、strophasterol 類と chaxine 類を産生するサケツバタケとチャジュタケの菌糸体及び子実体の RNAseq 解析を、次世代シーケンサーを用いて行い子実体で発現する遺伝子を探索した。

2. フェアリー化合物のキノコにおけるホルモンとしての証明

フェアリー化合物のキノコにおける普遍的な内生を証明するため、多数のキノコをエタノールで抽出した。抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水可溶部に分けた。エタノール可溶部と水可溶部を LC-MS/MS に供した。マツタケ (子実体と菌糸体) とトリュフを含む 16種のキノコに内生していることが判明した。

3. 「Fruiting liquid (FL)」からのキノコホルモンの探索

様々な菌類が子実体を発生させる直前に液体を分泌する。我々はこの液体が子実体形成に深く関与していると考

え, fruiting liquid (FL) と命名した. ヤマブシタケ FL はエノキタケの子実体形成を誘導した. プナシメジ, ヤマブシタケ, クリタケ, シイタケ, エリンギとエノキタケの FL を大量に入手した. キノコ発生実験の結果を指標に, 各 FL から各種クロマトグラフィーを用いて, 化合物を単離精製し, NMR 等の各種機器分析により, 構造決定を行った. ヤマブシタケ FL から新規化合物を含む 9 種化合物, クリタケ FL から 1 種新規化合物, シイタケ FL から 2 種新規化合物を単離された (論文作成中).

4. 候補化合物のキノコの成長に対する効果

Strophasterol 類, chaxine 類, フェアリー化合物, FL 化合物を対象に, マツタケ, ヤマブシタケ, プナシメジとエノキタケなど菌株を用いて, 恒温恒湿のキノコ栽培室で, 子実体形成に対するバイオアッセイをシャーレやポットを用いて行った. これらの化合物はヤマブシタケとマツタケの菌糸成長を促進し, エノキタケとプナシメジの子実体形成を誘導することを明らかにした.

以上の得られた結果を取りまとめ学会発表を行った. Strophasterol 類, chaxine 類, フェアリー化合物, FL 化合物に子実体形成活性を見出し, これらの化合物がキノコ

に普遍的に存在する可能性を示した. 我々の目的である子実体形成機構の分子レベルでの解明 (発芽ホルモンの発見) に一歩近づいたことを意味する.

研究発表: 2019 年度~2020 年度

論文特許: 研究室のその他の研究にも積極的に参加し, 論文 15 報, 総説 2 報を発表し, 1 つ特許を出願した.

学会発表:

- 1) 日本農芸化学会 2019 年度大会, 「ヤマブシタケの生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索」(2019. 3).
- 2) 日本きのこ学会第 23 回大会, 「ヤマブシタケの生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索」(2019. 9).
- 3) 第 61 回天然有機化合物討論会, 「キノコからの免疫チェックポイント阻害物質の探索」(2019. 9).
- 4) 日本農芸化学会 2020 年度大会, 「キノコからの免疫チェックポイント阻害物質の探索」(2020. 3).
- 5) 第 62 回天然有機化合物討論会, 「高等菌類におけるホルモンの探索」(2020.9).
- 6) 第 64 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 「キナメツムタケ由来の免疫チェックポイント阻害物質の探索」(2020.10).
- 7) 日本農芸化学会 2021 年度大会, 「マコモに感染する黒穂菌に関する化学的研究」(2021.3).

受賞: 第 62 回天然有機化合物討論会奨励賞 (2020 年, 口頭発表).

アミノ酸代謝酵素を中心とした機能と調節に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 吉田彩子

研究報告

1. 研究の背景及び目的

生物は細胞内の代謝の恒常性維持のため, 複雑な代謝制御機構を有している. 筆者らはアミノ酸関連の代謝酵素を中心として, 低分子結合によるアロステリックなフィードバック調節機構やタンパク質間相互作用を介した機能発現機構を, 構造生物学的手法などを用いて明らかにしてきた. 代謝制御機構には, 遺伝子発現調節や酵素のフィードバック調節などがよく知られるが, タンパク質の翻訳後修飾が代謝調節と密接にかかわることが近年示唆されつつある.

タンパク質の翻訳後修飾のうちリジンアセチル化はヒストン修飾の一つとして真核生物において盛んに研究が行われてきたが, 核を持たないバクテリアや古細菌においても多くのタンパク質中のリジン残基がアセチル化修飾を受けていることがプロテオーム解析により見出されている. アセチル化タンパク質に代謝酵素が多く存在することや, アセチル化修飾の基質としてアセチル CoA などが, また脱

アセチル化酵素の基質として NAD^+ といった細胞内の代謝状態を反映する鍵となる化合物が用いられることから, タンパク質アセチル化修飾と代謝調節との関連が示唆されている. 筆者らは高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を対象にタンパク質アセチル化修飾によるアミノ酸生合成酵素や代謝酵素の調節機構を明らかにすることを目的とし, 研究を行った.

2. 方法と結果

まず, 高度好熱菌 *T. thermophilus* を対象に抗アセチルリジン抗体による濃縮と LC-MS/MS 分析を組み合わせたアセチローム解析と呼ばれる手法により, アセチル化タンパク質の同定を行った. 結果, 208 のアセチル化タンパク質を同定し, 他の生物と同様に多くの代謝関連のタンパク質やリボソームタンパク質などの翻訳関連タンパク質が含まれていた. これまでアミノ酸生合成経路における調節機構に興味を持ってきた経緯から, 同定されたアセチル化タンパク質のうち, ロイシン生合成の初発酵素でありロイシ

ンによるフィードバック阻害を受ける 2-isopropylmalate synthase (IPMS) に着目した。IPMS のアセチル化修飾部位は、触媒ドメインと活性制御ドメインの間に存在し、基質結合やロイシンによるフィードバック阻害に重要だとされるリンカードメインに位置していた。IPMS のアセチル化機構を解析したところ、高濃度のアセチル CoA 存在下で非酵素的にリンカードメイン中の特定のリジン残基 (K332) がアセチル化され、脱アセチル化酵素 (KDAC) によってアセチル基が脱離することで、アセチル化が可逆的に制御されることが明らかとなった。さらに K332 のアセチル化により IPMS の活性が低下し、脱アセチル化により活性が回復したことから、IPMS がロイシンによるフィードバック阻害だけでなく、IPMS の基質でもある細胞内のアセチル CoA 濃度依存的なタンパク質アセチル化によっても活性調節を受けるという複雑な制御機構の存在を明らかにできた。なお本成果は *Extremophiles* 誌に掲載された (Yoshida A. *et al.* (2019) *Extremophiles*, 23, 377-388)。

上述の通り、様々な生物において多くのタンパク質がアセチル化されることが示されているが、その多くにおいて (脱) アセチル化機構やアセチル化による調節機構が明らかとなっていない。筆者らはタンパク質アセチル化酵素 (KAT) 依存的にアセチル化されるタンパク質を探索し、アセチル化制御機構やその調節機構を明らかにすることを目指した。抗アセチルリジン抗体を用いた KAT 破壊株のアセチル化レベルの比較により、アシル CoA 代謝にかかわる CoA 転移酵素 (CoAT) が KAT と KDAC によって

可逆的にアセチル化されるタンパク質であることを見出した。さらに CoAT が NAD (H) 結合タンパク質である制御タンパク質と相互作用し、制御タンパク質との相互作用を通じて NAD⁺ 依存的に CoAT 活性が阻害されることを明らかにした。また、CoAT のアセチル化によって制御タンパク質・NAD⁺ による阻害は緩和されることも分かり、CoAT がタンパク質間相互作用とタンパク質翻訳後修飾によって複雑に制御されることを明らかにした。NADH は制御タンパク質存在下において CoAT 活性に影響を与えないため、この制御タンパク質が NAD⁺/NADH 比のセンサーとして働き、細胞内の酸化還元状態に応じて CoAT 活性を調節することが示唆される。アセチル CoA 濃度に応じたアセチル化修飾と酸化還元状態に応じた制御タンパク質による CoAT の活性調節が、細胞内の脂肪酸代謝やエネルギー代謝の恒常性の維持に寄与していると予想している。現在、CoAT や制御タンパク質およびそれらの複合体の結晶構造決定を目指しており、構造生物学的にも制御機構の詳細を明らかにしていきたいと考えている。

3.謝辞

本研究は東京大学生物生産工学研究センター (現東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター) 細胞機能工学研究室で行ったものであり、西山真教授をはじめ研究に関わった研究室員の皆様に感謝申し上げます。また、農芸化学若手女性研究者賞の助成金により、本研究を発展させることができました。日本農芸化学会の関連の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。

Copyright © 2021 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry.

公益社団法人日本農芸化学会助成金受領者報告書（2021）

2021年12月15日発行

非売品

発行者 公益社団法人日本農芸化学会 113-0032 東京都文京区弥生2-4-16 学会センタービル内
電話 03(3811)8789 <http://www.jsbba.or.jp/> kouhou@jsbba.or.jp

印刷者 株式会社国際文献社 162-0801 東京都新宿区山吹町358-5 電話03(6824)9360
