

公益社団法人日本農芸化学会 助成金受領者報告書 (2022)



—— 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17回農芸化学研究企画賞報告書	5
3. 第1回夢にチャレンジ企画賞報告書	13
4. 第2回中小企業産学・産官連携研究助成報告書	33
5. 第48回研究奨励金報告書	55
6. 第75回国際会議出席費補助金報告書	63
7. 2020年度農芸化学女性研究者賞報告書	69
8. 2020年度農芸化学若手女性研究者賞報告書	73

1. 助成金交付実績一覧

農芸化学研究企画賞、中小企業产学・産官連携研究助成の交付実績

年 度	農芸化学研究企画賞	夢にチャレンジ企画賞	中小企業产学・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	6件 180万円	7件 690万円	1470万円
3年	2件 400万円	2件 100万円	7件 695万円	1195万円

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

年 度	研究奨励金		国際会議出席費補助金		計
平成元年	18件	894.7 万円	15件	449.7 万円	1,344.4 万円
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
3年	5件	250 万円	3件	414,797 円	2,914,797 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17回農芸化学研究企画賞報告書

第17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：ミミズ細胞を用いた全く新しいバイオ医薬品生産宿主の開発

長岡工業高等専門学校物質工学科
赤澤真一

研究の背景

バイオ医薬品である糖尿病治療薬インスリンは、遺伝子組換え大腸菌により生産されているが、一般的にバイオ医薬品・動物性タンパク質を原核生物である大腸菌で生産することは翻訳後修飾が無いことにより困難である（表1）。そのため、酵母やカビ、昆虫細胞等様々な異種遺伝子発現系（宿主）が長い年月をかけて開発してきた。しかしながら昆虫細胞で生産出来ないものは、コストや生産性が大腸菌や酵母より大きく劣っていても、動物細胞で生産するしかなかった。特に、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）は、大腸菌では生産困難で有る腎性貧血治療薬ヒトエリスロポエチン（hEPO）等ヒトタンパク質の生産宿主としてよく用いられているが、動物細胞の操作は煩雑で、CO₂インキュベーターが必要等製造コストが高くなることが課題となっている。つまり、昆虫細胞とCHO細胞の間には操作・コスト面で大きな壁が存在している。したがって、この壁を越えるあるいは間を埋める宿主が求められており、多様な用途に対応出来る宿主の整備が呼ばれている。そこで、従来の微生物・細胞にとらわれない、生産調整も容易でコスト削減が可能である次世代型物質生産法として、動植物個体を用いた「ヒューマノイドアニマル／プラント（ヒト化動物／植物）」の創出が研究されてきた^{1, 2)}。この新しいシステムは、オーファンドラッグ（希少疾病用医薬品）やワクチン等の生産宿主として期待されている。

この一環として我々は、世界中で入手可能であるミミズ

Eisenia fetida 及び類縁種である *Eisenia andrei* の個体を新規宿主として開発する事を目指した。これらのミミズはヒトタンパク質生産に必要な翻訳後修飾機構を備え^{3, 4)}、世界経済協力開発機構（OECD）が土壤毒性試験のモデル生物として認定し⁵⁾、さらにはアミラーゼやセルラーゼ等様々な消化酵素を有することが明らかになっているため⁶⁾、世界中で研究されている。さらに、我々は本ミミズを加工し健康食品を既に開発している^{7, 8)}。したがって、医薬品等の組換えタンパク質を食して摂取することが可能である。

Kim らは *Peronyx excavatus* の遺伝子組換え方法を作出し、hEPO を生産したと報告しているが、特許のため詳細は不明であった⁹⁾。*Eisenia* 属は広く世界に分布しており、上述したように盛んに研究されているが、トランスフェクション技術はなかった。そこで、我々は *E. fetida* 及び *E. andrei* のトランスフェクション法の開発をまず行った。その結果、マイクロインジェクションとエレクトロポレーション法を組み合わせて、部分的ではあるが、*E. fetida*においては生存率79.2%、トランスフェクション効率29.2%、*E. andrei*においては生存率95.8%、トランスフェクション効率50.0%でトランスフェクション法を構築することができた^{10, 11)}。さらに、腎性貧血治療薬ヒトエリスロポエチン（hEPO）の発現と ELISA によるタンパク質の検出に成功する等成果を上げてきたが¹⁰⁾、個体を用いた物質生産は多量生産系としてはやや心許ないなど課題もある。

表1. 推定高発現プロモーター候補領域。

Database ID (Sample name)	Annotation	Cloning target 5' upstream length (bp)
EFC000047_3 (Lumbrokinase)	Lumbrokinase-7T2 precursor, <i>Lumbricus rubellus</i>	906
EFC000009_6 (Actin1)	RecName: Full=Actin-1; Flags: Precursor, <i>Lumbricus terrestris</i>	980
EFC000009_35 (Actin)	L. terrestris mRNA for actin, <i>Lumbricus terrestris</i>	2,909
EFC000179_16 (Alpha amylase)	alpha-amylase, <i>Eisenia fetida</i>	1,012

研究の課題

本研究では前述した課題を解決するため、ミミズ細胞を使用した全く新しい動物性タンパク質生産系の開発を目指し、宿主としてのミミズ *E. fetida* 及び *E. andrei* 細胞のポテンシャルを明らかにする事を目的とした。

ミミズ細胞によるタンパク質生産性や細胞の増殖能等も未だ不明で細胞株も樹立されていないため、本研究では、ミミズの体腔細胞長期保存法の検討やミミズ由来高発現プロモーター領域のクローニング、プロモーター・アッセイ系の構築並びに臓器細胞からの細胞株取得を目指した臓器細胞培養法の構築を行った。

研究の結果

1. 細胞の長期保存法の構築

実験の効率化や細胞株を樹立した際の保存のために、臓器及び体腔細胞凍結保存法の検討を行った。

E. andrei を絶食後洗浄し、殺菌・麻酔処理を行った後、解剖し取得した精液囊を用いて、CELLBANKER2 (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) による細胞保存条件の検討を行った。その結果、 -80°C で10日間保存後の臓器細胞から生細胞が検出された。今後さらに長期保存可能な条件を検討していく。

次に体腔細胞を用いた長期保存条件の検討を行った。凍結保護剤として、10%DMSO 及び CELLBANKER2 を用いた。その結果、約8ヶ月間の長期保存において、どちらの凍結保護剤を用いても 80%以上の生存率を示したことから、より安価な 10%DMSO が使用可能なことが明らかとなった(図1)。

2. ミミズ由来高発現プロモーターの取得

これまで個体でのトランスフェクション技術を開発してきたが、ウイルス由来CMV プロモーターを用いているためか遺伝子の発現効率が低いという課題があった。ミミズプロモーターで唯一報告されているメタロチオネインプロモーターは重金属で誘導されるため異種遺伝子発現用としては不適切であるという問題がある。そこで、本研究では、ミミズが有する恒常的に発現し、安全な基質で制御できる強力なプロモーターの取得を目指した。

独自に構築した *Eisenia andrei/fetida* ゲノム・遺伝子データベースより、発現量の高い4つの推定プロモーター領域を見出した(表1)。このうち、Actin (EFC000009_6) 以外の3つについてクローニングを行い、デュアルルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター・アッセイを行った。その結果、恒常的に発現するプロモーターとして Actin (図2) と Lumbrokinase プロモーターを得た。

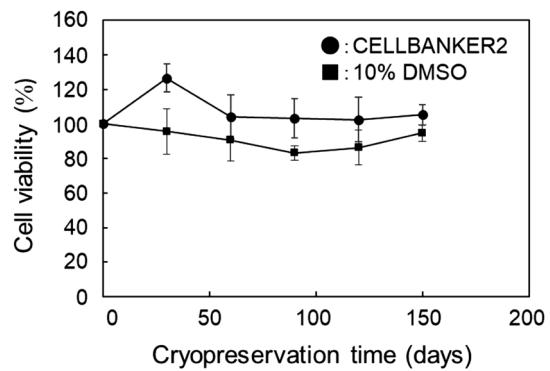


図1. 長期凍結保存条件下における体腔細胞の生存率の経時変化。

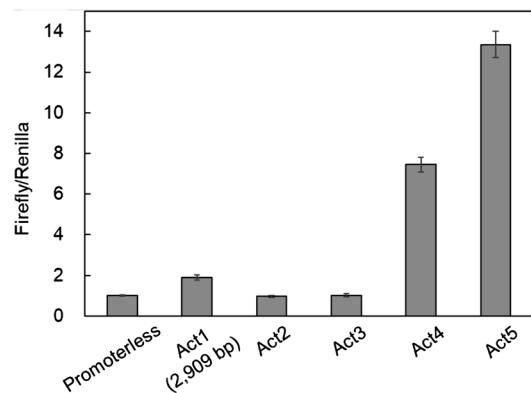


図2. Actin (EFC000009_35) 推定プロモーター領域のデュアルルシフェラーゼアッセイ結果。

3. 細胞が増殖する培地条件の検討

1ヶ月程度安定に細胞を保持できる条件を見出しているが、増殖条件は未だ見出せていない。そこで、培地など条件検討を行ったが、いまだ増殖条件は不明である。今後は温度や培養条件等さらに条件を検討していく。

今後の実用化への展望

細胞の長期安定保存法や恒常に発現するプロモーターをミミズで初めて取得した。さらに、臓器細胞を取得し10日程度であるが保存可能な条件を見出し、細胞を活用した研究ができる条件を整えた。しかしながら、細胞が増殖する培地条件が未だ見出せていないことから、さらなる条件検討が必要である。細胞へのトランスフェクション技術はまだ未完成な部分があるが、プロモーターが取得できたことから、細胞株を樹立することで、ミミズ細胞を用いた物質生産系に1歩近づいたと言える。論文執筆中のためいくつかの項目では詳細は割愛したがご了承頂きたい。

おわりに

企画賞の助成金を元に、ミミズプロモーター・アッセイ系を構築しプロモーターを取得することができた。さらに、

細胞培養系の基盤を構築することができた。選考委員並びに運営委員の皆様に厚くお礼申し上げます。

参考文献

1. Tripathi, N. K. and Shrivastava, A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: Expression hosts and process development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2007; 7: 420–455.
2. Matsui, T., Asao, H., Ki, M., Sawada, K. and Kato, K. Transgenic lettuce producing a candidate protein for vaccine against edema disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009; 73: 1628–1634.
3. Wu, J. X., Zhao, X. Y., Pan, R. and He, R. Q. Glycosylated trypsin-like proteases from earthworm *Eisenia fetida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2007; 40: 399–406.
4. Wang, F. et al. Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component B: A novel, glycosylated two-chained trypsin. *J. Mol. Biol.* 2005; 348: 671–685.
5. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. 207 (Organization for Economic, Paris, France. Paris; 1984).
6. Tracey, M. V. Cellulase and chitinase of earthworms. *Nature*. 1951; 167: 776–777.
7. Akazawa, S. et al. High-pressure tolerance of earthworm fibrinolytic and digestive enzymes. *J. Biosci. Bioeng.* 2018; 125: 155–159.
8. Akazawa, S., Wakimoto, S. and Watanabe, T. Method for producing dry earthworm powder. 2014; Japan. Patent 5548931.
9. Kim, H. K., Ahn, C. H. and Tak, E. S. Method for producing transformed earthworms using earthworm gonad-regeneration capability, transformed earthworms thereof, and method for producing recombinant proteins from transformed earthworm body fluids. 2010; Patent US2012/0123100 A0123100.
10. Akazawa, S., Machida, Y., Takeuchi, A., Wakatsuki, Y., Kanda, N., Kashima, N., and Murayama, H. Development of a novel heterologous gene expression system using earthworms. *Sci. Rep.* 2021; 11: 8190.
11. Akazawa, S. Method for producing transformed earthworms, recombinant proteins, and recovering the recombinant proteins. 2018; Japan. Patent 6448294.

重点研究領域：グリーンバイオテクノロジー

受賞テーマ：クチナーゼ Cut190 の PET 分解能向上による実用化のための基盤及び実証研究

京都府立大学大学院生命環境科学研究所
織田昌幸

研究の背景

ポリエチレンテレフタレート（PET）をはじめとするプラスチック廃棄物処理は、世界的な環境問題となっている。酵素を利用する PET 分解の実用化を目指して、関連研究が活発化しているが、未だ実用化には至っていない。その主要因の一つとして、PET のガラス転移温度の 70°C 付近でも、酵素が安定で、高分解活性を示す必要性が挙げられる。本研究対象の *Saccharomonospora viridis* AHK190 由来クチナーゼ (Cut190) は、PET に対して高い分解活性を持ち、その活性や熱安定性が Ca²⁺ 存在下で上昇することを、本申請者らは明らかにした [1]。Ca²⁺ による機能制御は関連酵素の中でも Cut190 に特徴的である。さらに Cut190 の結晶構造を高分解能で決定し、Ca²⁺ 結合と他の 2 値金属イオン結合による影響評価から、Cut190 の構造機能相関を解明した [2–6]。また、Ca²⁺ 結合に伴う安定性上昇の熱力学的要因を明らかにし、各種アミノ酸置換体の研究を通して高機能化変異体を創製した [5–8]。Ca²⁺ 結合や基質結合、熱安定化機構については、計算化学的手法も用いて、結果の予測や検証を行い、さらなる高機能化酵素デザインに向けたシミュレーションも行った [3,7,9]。以上の一連の研究、特に Cut190 の立体構造に基づく高機能化変

異体創製を通じて、分子内にジスルフィド結合を導入した変異体で、その熱変性中点温度が飛躍的に向上し、PET のガラス転移温度付近でも高い分解活性を示した [6]。PET 分解の効率的反応条件に関しては、加圧の有効性も示唆された [10]。

研究の課題

酵素による PET 分解の実用化に向けて、さらなる高機能酵素の創製が求められる。同創製に向けて、酵素の立体構造情報に基づくラショナルデザインが有効である。本申請研究でも、Cut190 変異体と脂肪族ポリエステル様基質との複合体結晶構造は得られたが [3]、PET 様基質との複合体の立体構造解析は未達である。そこで PET 様基質を合成し、その複合体の結晶構造解析を目指した。得られる構造基盤情報に加えて、関連酵素の各種変異体とその構造活性相関に関する知見などを活用して、実用化に向けた高機能化酵素の創製とその検証が必要となる。また本対象酵素は、高圧 (400 MPa 程度) に耐えうることを示したので [10]、PET のガラス転移温度での反応条件に加えて、高圧下での反応も有望と考えられる。温度と圧力の組み合わせで、PET の分解条件を検討し、費用的にもエネルギー

的にも効率の良い反応条件を見いだせば、実用化に向けて前進する。PETの分解はプラスチック処理と同時に廃プラスチックからのテレフタル酸（TPA）、あるいはモノヒドロキシエチルテレフタル酸（MHET）、ビス-2-ヒドロキシエチルテレフタル酸（BHET）の生産を考えることができ、これらはPET原料として再利用可能で、SDGsの実現としても有望である。また、対象酵素は Ca^{2+} により活性化する特徴にも着目し、金属イオン結合に伴う酵素の構造変化と機能発現の相関解明も興味深い。これまでの結果を踏まえると、 Ca^{2+} 結合の「弱い結合」が重要で、金属イオン結合に伴う酵素の準安定構造間の転移、あるいは動的構造分布の変化が鍵となる可能性が考えられる。既存の解析手法では観測できていない真実が、酵素全般の本質として示唆され、その解明は生命科学全般に大きく貢献する。

研究の結果

Cut190分子内にジスルフィド結合を導入した高機能化変異体 Q138A/D250C-E296C/Q123H/N202H/S226P/R228S (Cut190**SS) を鋳型として [6]、Cut190 の C 末端 3 残基 (Lys305, Leu306, Asn307 : Cut190 発現系構築時に付加) の欠損により高機能化する先行知見 [5]、及び類縁クチナーゼの leaf-branch compost cutinase (LCC) とのアミノ酸配列比較により、Cut190**SS (Cut190**SS_K305del/L306del/N307del)、及び Cut190**SS_Q138G の大腸菌発現系を構築して、各酵素を精製した。酵素の N 端部には、His タグを付加し、集菌した大腸菌を超音波破碎して、遠心分離、その可溶性画分を Ni-NTA カラムを用いて精製した。発現酵素の His タグは、PreScission プロテアーゼで外れるようデザインしており、同プロテアーゼ処理後、Ni-NTA カラム、陰イオン交換カラムを用いて対象酵素部分を精製し、各種実験に供した。精製酵素が、立体構造として適切にフォールドしているかを、円偏光二色性 (CD) スペクトルにより検証し、さらに温度上昇に伴う 222 nm での CD 値を追跡することで、個々の熱安定性を解析した。Cut190**SS の熱変性温度 T_m は 82.1°C に対して、Cut190**SS_Q138G の T_m は 88.3°C であった。また、示差走査熱量計 (DSC) を用いた解析でも、同様の結果が得られ、分子内にジスルフィド結合を導入した変異体では、熱安定性が大きく上昇するとともに、 Ca^{2+} 添加に伴う安定化の程度は小さいことも明らかになった。先行研究結果として、Cut190 には 3カ所の Ca^{2+} 結合部位があり、site 1 は主に活性に、site 2 は主に安定性に寄与するが [3, 8]、D250C-E296C によるジスルフィド結合導入が安定化に大きく寄与し、site 2 への Ca^{2+} 結合の寄与を代替することが示唆された。さらに

等温滴定熱量計 (ITC) を用いた解析の結果、ジスルフィド結合導入前の Cut190 変異体では観測された Zn^{2+} や Mn^{2+} の結合熱が認められず、ジスルフィド結合導入により site 2 以外の結合部位への影響も示唆された。 Ca^{2+} 結合熱は、いずれの Cut190 変異体でも観測されず、ジスルフィド結合導入変異体でも Ca^{2+} 存在下でのみ PET 分解活性が認められたことから、結合力が弱く結合熱も極めて小さい Ca^{2+} 結合が、Cut190 の機能発現に重要であることが支持された。

既得変異体のうち、最も安定性の高い Cut190**SS_Q138G について、70°C で静置後、脂肪族基質の poly (butylene succinate-co-adipate) (PBSA) に対する活性測定を 37°C で行い、70°C 静置無しに対する残存活性を求めたところ、24 時間静置後で 75% であった (図1)。ジスルフィド結合導入前の Cut190** (Cut190_S226P/R228S/K305del/L306del/N307del) では 1% 以下であったことから、PET ガラス転移温度付近での分解実用化に向けて大きく進展した。さらに微粉化した非晶質 PET に対して、同様に 70°C での分解反応を行い、分解産物を逆相 HPLC で分析したところ、主産物は MHET で、BHET は、ほとんど認められなかつた。経時的に分解が進む結果も得られた。さらなる高機能化を目指し、Cut190**SS_Q138G を鋳型として、LCC との比較から、L136F/F255I の追加変異体の取得を試みたが、

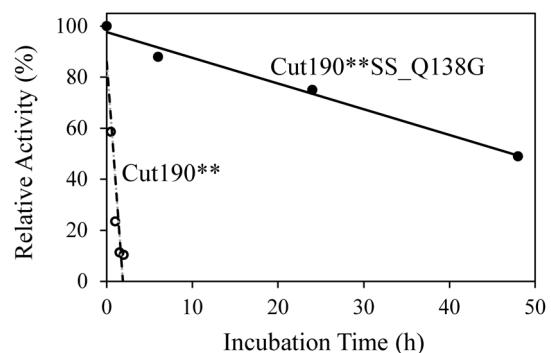


図1. 70°C 静置後 (時間を横軸)、脂肪族基質 PBSA に対する相対活性 (縦軸)。

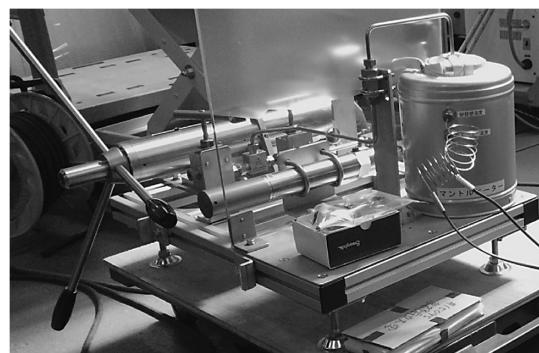


図2. 超高压試験装置。

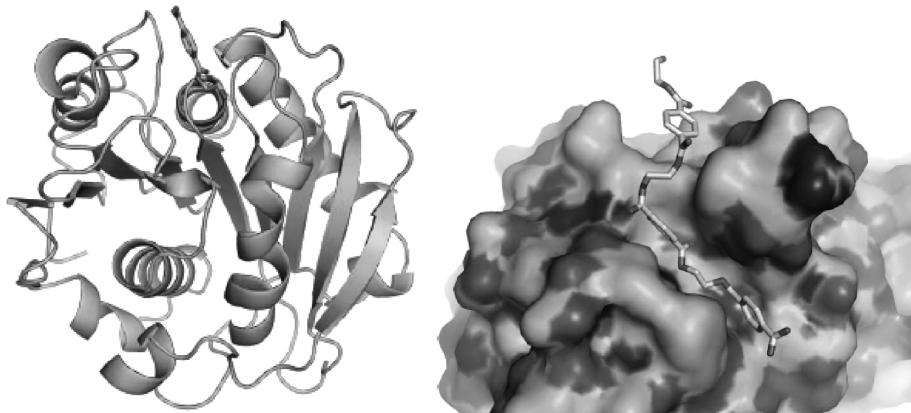


図3. X線結晶構造 (左)MHET複合体(全体構造) (右)合成基質複合体(部分構造).

大腸菌での発現量が乏しく、物性機能評価に至っていない。F255Iのアミノ酸置換が要因と考えられることから、L136F, F255Iの各変異を個別に導入して、その効果を検証する。

PET分解反応における圧力効果を検証すべく、50°Cの条件下で300 MPaまでの圧力範囲でCut190**SSによる反応実験を行った。反応溶液0.15 mLに対して加圧し、反応後溶液を逆相HPLCにより分析した結果、常圧下に比べて反応産物のMHETが減少し、TPAが増加する傾向が認められた。より定量的、かつ実用化に即した研究を行うべく、試料セル容量：10 mL、圧力：常圧～300 MPa、温度：常温～70°C、での反応できる超高压試験装置を設置し、現在、解析を進めている(図2)。

PET様基質との複合体の立体構造を解明すべく、MHETや、芳香環を複数もつ合成基質を用いて、Cut190**SSやその不活性型変異体との各複合体の結晶化を行った。その結果、MHET複合体をソーキング法により、合成基質との複合体を共結晶化により、高分解能でのX線結晶構造解析に成功した(図3)。現在、結晶構造をリファインメント中で、さらに計算科学的手法により、基質との結合、及び加水分解反応に関する構造基盤を解析中で、これらの成果をまとめて国際誌に論文発表する予定である。なお基質の合成は、近畿大学の山下光明博士、飯田彰博士に、X線結晶構造解析は、東京医科歯科大学の沼本修孝博士、伊藤暢聰博士に、ご協力いただいた。

今後の実用化への展望

2020年4月、フランスのCarbios社からのグループから、LCC変異体を用いたPET分解に関する論文が発表された(Nature 580, 216-219, 2020)。その後、2022年4月に同社が公開した情報によると、PET世界最大手のIndorama(タイ)と共同でフランスにリサイクル工場を建設し、

2025年に稼働予定(処理量5万トン/年、20億PETボトルに相当)とのことである。LCCとCut190の構造は似ており、高機能化において、分子内にジスルフィド結合を導入した点、同導入部位ともに同じである。現状、酵素の高機能化レベル、PET分解反応効率レベル、ともに、LCCに先行されているが、公開された知見も参考に、実用化に向けた研究開発を進める。特に高圧の利用は、酵素全般で活性向上に寄与することが報告されているが、本PET分解反応への適用は、本申請者らの報告のみで【10】。今後、実用化に向けた活用が期待される。超高压試験装置(図2)を用いて、温度と圧力の組み合わせを含む効率的反応条件を検討する。また基盤研究として、Ca²⁺結合に伴う酵素の動的構造変化や、PET様基質との結合・反応機構の解明を目指し、その成果を論文などで発表する。

参考文献

- 【1】 Kawai, F., Oda, M., Tamashiro, T., Waku, T., Tanaka, N., Yamamoto, M., Mizushima, H., Miyakawa, T., and Tanokura, M. (2014) A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. Appl. Microbiol. Biotech. 98, 10053-10064.
- 【2】 Miyakawa, T., Mizushima, H., Ohtsuka, J., Oda, M., Kawai, F., and Tanokura, M. (2015) Structural basis for the Ca²⁺-enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase from *Saccharomonospora viridis* AHK190. Appl. Microbiol. Biotech. 99, 4297-4307.
- 【3】 Numoto, N., Kamiya, N., Bekker, G.-J., Yamagami, Y., Inaba, S., Ishii, K., Uchiyama, S., Kawai, F., Ito, N., and Oda, M. (2018) Structural dynamics of the PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 in substrate-bound states elucidates the Ca²⁺-driven catalytic cycle. Biochemistry 57, 5289-5300.
- 【4】 Senga, A., Hantani, Y., Bekker, G.-J., Kamiya, N., Kimura, Y., Kawai, F., and Oda, M. (2019) Metal binding to cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 and its effects on enzyme activity and stability. J. Biochem. 166, 149-156. (*equal contributors)

- [5] Senga, A.*; Numoto, N.*; Yamashita, M.; Iida, A.; Ito, N.; Kawai, F., and Oda, M. (2021) Multiple structural states of Ca^{2+} regulated PET hydrolase, Cut190, and its correlation with activity and stability. *J. Biochem.* 169, 207–214. (*equal contributors)
- [6] Emori, M.*; Numoto, N.*; Senga, A.; Bekker, G.-J.; Kamiya, N.; Kobayashi, Y.; Ito, N.; Kawai, F., and Oda, M. (2021) Structural basis of mutants of PET-degrading enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 with high activity and thermal stability. *Proteins* 89, 502–511. (*equal contributors)
- [7] Kawabata, T., Oda, M., and Kawai, F. (2017) Mutational analysis of cutinase-like enzyme, Cut190, based on the 3D docking structure with model compounds of polyethylene terephthalate. *J. Biosci. Bioeng.* 124, 28–35.
- [8] Oda, M., Yamagami, Y.; Inaba, S.; Oida, I.; Yamamoto, M.; Kitajima, S., and Kawai, F. (2018) Enzymatic hydrolysis of PET: Functional roles of three Ca^{2+} ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity. *Appl. Microbiol. Biotech.* 102, 10067–10077.
- [9] Inaba, S.; Kamiya, N.; Bekker, G.-J.; Kawai, F., and Oda, M. (2019) Folding thermodynamics of PET-hydrolyzing enzyme Cut190 depending on Ca^{2+} concentration. *J. Therm. Anal. Calorim.* 135, 2655–2663.
- [10] Hantani, Y.; Imamura, H.; Yamamoto, T.; Senga, A.; Yamagami, Y.; Kato, M.; Kawai, F., and Oda, M. (2018) Functional characterizations of polyethylene terephthalate-degrading cutinase-like enzyme Cut190 mutants using bis (2-hydroxyethyl) terephthalate as the model substrate. *AIMS Biophysics* 5, 290–302.

3. 第1回夢にチャレンジ企画賞

報告書

第1回夢にチャレンジ企画賞報告書

惑星保護と宇宙農業の両立を目指した 陸棲シアノバクテリアの制御研究

宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究所 特任助教
木村 駿太

1. 研究成果の概要

本研究はシアノバクテリアを材料に、その生活環、特に休眠を制御する化学物質を探査した。休眠の人為的な制御が可能になれば、必要な時には活かして利用し、必要がないとき、あるいは飛散の危険性があるときには確実に滅菌する、といった、宇宙農業と惑星保護が両立した生物利用に近づけると期待している。シアノバクテリアは、明確な生活環と優れた環境耐性を備え、乾燥処理により生存細胞を休眠細胞(akinete)のみにできることを申請者が見出した *Nostoc* sp. HK-01 を用いた。これまでに、培養後の培地の抽出液から、akinete の発芽を抑制する活性を予備的に見出していた。今年度の新たな成果として、既に確立した休眠細胞の単離法を用いて、発芽試験による生物検定を指標に、高速液体クロマトグラフィーをはじめとした各種分離技術により当該成分の精製を進め、複数のステップを経て活性画分を特定するに至った。さらに、各種機器分析を用いていくつかの構造情報を取得した。引き続き大量培養と分離・精製を繰り返し、各種分析に供することで、活性物質の構造決定が可能であると考えている。シアノバクテリアの陸地における生存のために、細胞分化を伴う細胞の役割分担、特に休眠の制御は必須である。akinete の休眠を制御する化合物はこれまで明らかにされていない。当該活性物質は乾燥に曝される陸地環境において、休眠と増殖のバランスをとる鍵として働いている可能性が期待できる。

2. 研究実施内容

(2-1) 研究実施内容

研究のねらい

将来の大規模宇宙居住においては、宇宙農業のような再生型の生命維持システムの導入が望まれる。一方で、地球由来の生命による他天体の汚染を防ぐため、惑星保護方針の遵守も必須である。宇宙農業のような大規模な生物システムに関する惑星保護方針はまだ規定されていないもの

の、できる限り汚染リスクの小さいシステムの構築を目指すことは重要であると考えられる。

微生物は、同じ生物種であってもその細胞の状態によって環境耐性が著しく異なる。枯草菌の芽胞などではそれが有名であるが、宇宙農業への導入も期待されている光合成微生物であるシアノバクテリア(藍藻)においても(Arai et al., *Biol. Sci. Space*, 2008; Verseux et al., *Int. J. Astrobiol.*, 2016), 休眠状態の細胞が特に耐性に優れることが報告されている。本研究はシアノバクテリアを材料に、その生活環、特に休眠を制御する化学物質を探査した。休眠の人為的な制御が可能になれば、必要な時には活かして利用し、必要がないとき、あるいは飛散の危険性があるときには確実に滅菌する、といった、宇宙農業と惑星保護が両立した生物利用に近づけると期待している。

研究提案者は、光合成・窒素固定により陸地生態系・作物収量に多大な影響を与えるシアノバクテリアの陸地における生存のために、細胞分化を伴う細胞の役割分担、特に休眠細胞への分化が必須であることを示し¹⁾、休眠細胞の耐性機能に関わる機能性物質を示してきた^{2,3)}。休眠細胞への分化は生存に必須であるがゆえに厳密な制御機構が存在すると予想されるが、その分化・発芽に関する環境条件の報告において、栄養細胞の糸状体の全てではなく、その中のいくつかの細胞のみが休眠細胞に分化する(図1)。このため、環境要因以外にもトリガーがあると推測されるが、分化を直接制御する物質等は明らかにされていない(Sukenic et al., *In Cyanobacteria*, Academic Press, 2019)。植物においては、ジベレリンやアブシジン酸といった生長調節物質(植物ホルモン)類が休眠・発芽を調節していることがよく知られている(Hilhorst and Karssen, *Plant Growth Regul.*, 1992)。他方、藍藻類においてはいくつかの植物ホルモン生産の報告例があるが(Lu and Xu, *Trends Plant Sci.*, 2015)、その生理機能はほとんど解明されていないことから、既知あるいは未知の物質が藍藻の休眠を制御している可能性を考えた。

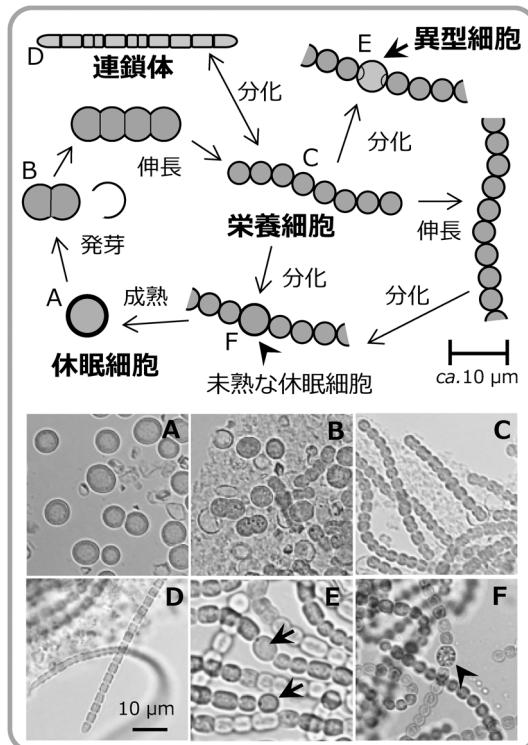


図1. *NosHK* の生活環と顕微鏡写真.

これまでの研究内容

生物材料は、多細胞性シアノバクテリアは、明確な生活環と優れた環境耐性を備え、乾燥処理により生存細胞を休眠細胞(akinete)のみにできることを申請者が見出した *Nostoc* sp. HK-01(以降*NosHK*)を用いた。これまでに、*NosHK*が既知の植物ホルモンである cytokinin類に対して高等植物と類似した構造活性相関で応答し、発芽が促進されている可能性を見出してきた⁴⁾。他の既知の植物ホルモン類からは、明確な活性は認められなかった。一方で、*NosHK*培養後の培地の抽出液から、akineteの発芽を抑制する活性を見出した(図2、画分B)。これは cytokininと逆の活性であり、cytokininと競合して akineteの発芽を調節している可能性が考えられた。

研究進捗状況、研究成果等

今年度の新たな成果として、既に確立した休眠細胞の単離法を用いて、発芽試験による生物検定を指標に、高速液体クロマトグラフィーをはじめとした各種分離技術により、培養後の培地に含まれる発芽抑制物質の精製を進め、複数のステップを経て活性画分を特性・単離するに至った(図3)。さらに、各種機器分析を用いていくつかの構造情報を取得した。引き続き大量培養と分離・精製を繰り返し、各種分析に供することで、活性物質の構造決定が可能であると考えている。

シアノバクテリアの陸地における生存のために、細胞分化を伴う細胞の役割分担、特に休眠の制御は必須である。

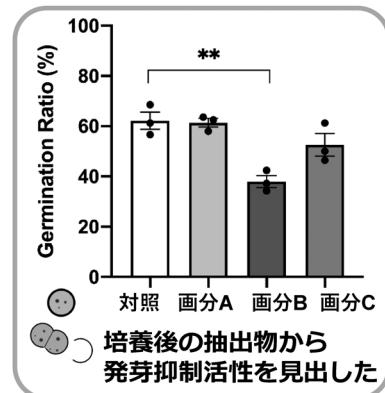


図2. シアノバクテリア抽出物から見出した生理活性.

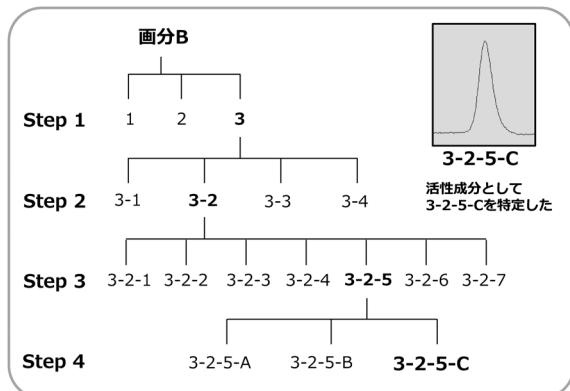


図3. 活性物質の単離フロー.

akineteの休眠を制御する化合物はこれまで明らかにされていない。当該活性物質は、細胞外に分泌され、cytokininと競合あるいは協働して、乾燥に曝される陸地環境において、シアノバクテリアの休眠と増殖のバランスをとる鍵として働いている可能性が期待できる。

今後は、構造解析を行った後、遺伝子発現解析や、時空間的な動態の追跡を行いたい。これにより将来的には、見出した活性化合物の受容体の同定、最終的には受容体の改変による人為的な生長制御も可能になると考えている。

引用したこれまでの業績

- 1) "The heat tolerance of dry colonies of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01," *Biological Sciences in Space*, vol. 29, pp.12-18, 2015
- 2) "Complete life cycle and heat tolerance of dry colonies of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01," *Biological Sciences in Space*, vol. 31, pp.1-8, 2015
- 3) "Compatible solutes in the akinetes of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. HK-01 contribute to its heat tolerance," *American Journal of Plant Sciences*, vol. 8, No. 11, pp.2695-2711, 2017
- 4) "Cytokinins affect the akinete-germination stage of a terrestrial filamentous cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01," *Plant Growth Regulation*, vol. 92, No. 2, pp.273-282, 2020

トリプトファン誘導体を利用した新規根寄生植物自殺発芽誘導剤の開発

明治大学大学院農学研究科
来馬道生
明治大学大学院農学研究科
鈴木泰輝

研究開始当初の背景

根寄生植物は吸器と呼ばれる特殊な器官を用いて、宿主植物の根に侵入し、水や栄養分を奪う植物であり、この植物による農業被害は世界各地で報告されている。特にアフリカにおいては、魔女の雑草と呼ばれるストライガがリクイネ、トウモロコシ、ソルガムなどの主要穀物に寄生し深刻な農業被害をもたらしている。その被害額は年間1兆円を超えるともいわれている。日本国内においては、30年ほど前に外来したと考えられているヤセウツボ (*Orobanche minor*) が様々な地域で観察されているが、これまで農業被害に関する報告はほとんどない。しかしながら、今後国内においてもこれら外来の根寄生植物により農業被害がもたらされる可能性は否定できない。

根寄生植物の種子発芽は、宿主の根から分泌される化学シグナルによって誘導されることが明らかになり、その原

因物質として strigol (図1) が単離・構造決定された。その後、類似の化学構造を有する分子が様々な植物から単離、同定され、現在ではストリゴラクトン (SL) と総称されている。2005年に、SLは共生微生物であるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導することや、2008年には植物の枝分かれを制御する植物ホルモン分子として機能することが報告された。植物は土壤中のリン等の無機栄養が不足した際に、SLを合成することで自身の枝分かれを適切に制御し、かつ、同様の分子を根圏に放出することで、不足した栄養を植物に供給してくれるAM菌との共生を促進していると考えられている (図1)。

現在、根寄生植物防除に向けた効果的な防除法として、作物を植える前の圃場に SL などの発芽誘導剤を撒布し、根寄生植物を強制的に発芽させる自殺発芽誘導法が考案され、その有効性も確認されている。しかし、SLは化学構

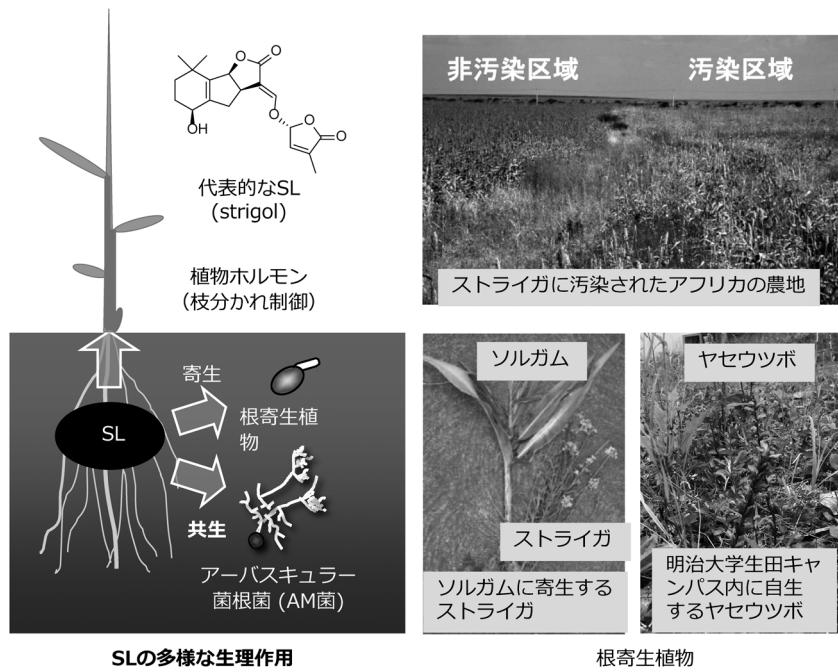


図1. SLの多様な生理作用と根寄生植物による農業被害.

造が複雑であるため、有機合成にはコストや技術が必要とされる。この問題を克服するために、天然のSLと同様に根寄生植物の発芽誘導活性を残したまま、構造を簡略化したSL合成アナログも多数報告されてきている。しかし、上記の問題を十分にクリア出来ているとは言い難く、実用化には至っていない。

一方で、報告者らは、SLと化学構造が類似しないアミノ酸誘導体(*N*-acetyl-tryptophan誘導体)がヤセウツボ種子の発芽を誘導することを見出した。この分子は市販で入手可能な化合物から、1段階の反応で合成可能である。この分子を構造展開することで、容易に合成可能、かつ活性の強い自殺発芽誘導剤を新たに開発できる可能性を考えた。また、報告者らは、根寄生植物の発芽誘導と幼根の伸長阻害を同時に引き起こすことが可能な分子の設計に成功した。このような分子は、宿主植物が存在する状態でも、根寄生植物を発芽させ、かつ幼根伸長を阻害することで、宿主に寄生することなく枯死に至らせる事のできる画期的な分子の開発につながる可能性を考えた。

研究課題のブラッシュアップ

報告者らは、当初の研究課題に加え、SL様分子の発酵生産による供給を目的に、SL様分子生産微生物のスクリーニングを行ってきた。さらに、スクリーニングで見出した酵母菌体抽出物をヤセウツボ種子に投与した結果、発芽を誘導することを見出していた。この微生物の培養液を土壤中に散布し、微生物農薬のように用いることが可能になれば、根寄生植物防除の新たな基盤構築になる可能性も考えられた。また、先生方からヤセウツボが属するハマウツボ科の植物が漢方の原料として用いられていることをご教示いただいた。根寄生植物を利活用するという逆転の発想には報告者らは大変驚いたが、防除した植物を活用することで、新たなビジネスチャンスが生まれる可能性を教え

ていただいた。そこで、本研究課題では、報告者らが申請した研究課題に加えて、微生物代謝物に含まれる根寄生植物発芽誘導分子の単離、および根寄生植物中に含まれる成分研究についても取り組むことにした。以上を踏まえて、2021年3月に行われた产学官学術交流フォーラム内のピッチコンテストにおいて、「アフリカ農業を豊かにする」という大きな枠組みで、以上の3点を提案した。

本研究の目的

先述の通り、アフリカにおいては根寄生植物によって甚大な被害が発生している。しかし、現在までに根寄生植物の防除に関する実用的な方法は提案できていない。また、これら寄生植物の成分研究についても十分に進んでいっているとは言い難い。報告者らは、1. 酵母代謝物中に含まれる発芽誘導分子の単離、同定、2. トリプトファン誘導体を利用した新規根寄生植物自殺発芽誘導剤の開発、3. 根寄生植物の利活用、の3つのアプローチにより、新しい根寄生植物の防除法、活用法の基盤研究になることを目的とした。

研究の成果

1. 微生物代謝物中に含まれる発芽誘導分子の単離、同定

報告者らが見出したヤセウツボの発芽誘導活性を指標にスクリーニングから見出された酵母を大量培養し(16 L)，培養上清に含まれている有機化合物を合成吸着剤(Diaion HP-20, Mitsubishi Chemical)に吸着させ、水および有機溶媒(メタノール、アセトン、トルエン)により溶出させた。その結果、メタノールやメタノール／アセトンを1:1で混合させた溶媒で溶出した画分に、ヤセウツボの発芽誘導活性があることを確認した。以降、水／有機溶媒による液々分配、種々クロマトグラフィーにより活性分子の単離を試みたが、活性分子の同定には至らなかった。精製を進めていく中で、活性が分散する現象が確認されたため、活

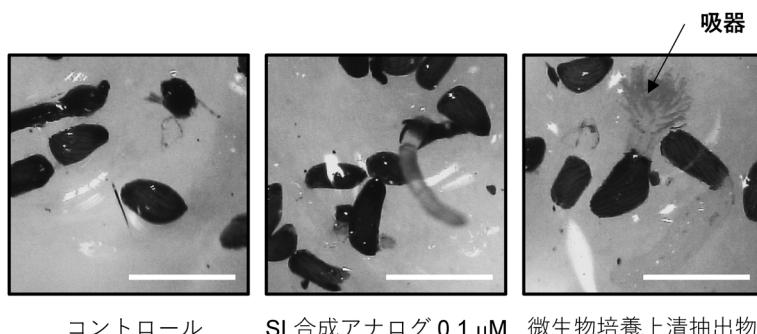


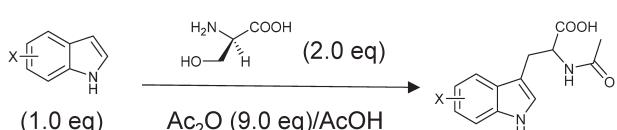
図2. 微生物培養上清抽出物をストライガ種子に投与した発芽試験。
培養液を遠心分離により菌体と上清に分けたのち、上清を水／酢酸エチルで液液分配し、酢酸エチル抽出物をストライガ種子に投与した。抽出物投与後1日後のストライガ種子の写真。スケールバーは1 mmを表す。

性分子が複数存在しており、個々の分子の量が少ない可能性が考えられる。また、精製を進めていく段階で、活性分子が壊れてしまった可能性についても考えられる。

一方で、培養上清を酢酸エチルで抽出した粗抽出物は、根寄生植物ストライガに対しても発芽誘導活性を示すことに加え、吸器の形成を誘導できることを見出した（図2）。吸器は、発芽後の寄生植物が、宿主に侵入する際に必要となる特殊な器官であり、従来宿主に由来するリゲニン分解物などによってその形成が誘導されることが知られている。ヤセウツボにおいては吸器の形成は見られなかったことから、ストライガとヤセウツボでは吸基形成誘導分子に対する構造要求性が、異なる可能性が示唆された。

2. トリプトファン誘導体を利用した新規根寄生植物自殺発芽誘導剤の開発

報告者らは、以下に示したスキーム1により、インドール環上にメチル基、メトキシ基、クロロ基、ブロモ基、ヒドロキシ基を導入した*N*-acetyl-tryptophan類縁体を合成した。これらの分子をヤセウツボ種子に投与した結果、インドール環上5位にメトキシ基を導入した分子が試験した化合物の中で最も発芽誘導活性が強いことが明らかになった。しかし、最近になって、本分子を再度合成し、ヤセウツボ種子に投与したところ、発芽誘導活性に関する再現性を確認することができなくなった。アッセイ試験に利用しているヤセウツボ種子のロットが変わったということもあるため、ヤセウツボの収穫した時期や場所によって活性が異なる可能性も考えられる。もしくは、合成時に生成され



スキーム1. *N*-acetyl-tryptophan類縁体の合成スキーム
(X=OMe, Me, Cl, Br, OH)

た副生成物が発芽誘導分子である可能性も考えられる。また、一連の試験中にSL等の発芽誘導分子がコンタミネーションした可能性も否定できないため、現在その原因を調査中である。

IAA-SLの構造展開においては、実験的に広く用いられる合成オーキシンである2,4-DとNAAにD環をカップリングさせた分子(2,4-D-SL, NAA-SL)を合成した（図3）。続いて、これらの分子の活性の評価を、ヤセウツボ種子を用いて行った。その結果、新たに合成した2,4-D-SLとNAA-SLは、IAA-SLとは異なる発芽誘導活性と幼根阻害活性を有することが明らかとなった。2,4-D-SLはIAA-SLと比べ、発芽誘導活性が約100倍低く、そのため、幼根伸長阻害活性を評価することができなかった。NAA-SLに関しては、IAA-SLよりも約10倍強い発芽誘導活性を有するものの、幼根伸長阻害活性の強さは、IAA-SLの1/10以下であった（図4）。以上のことから、現時点では、発芽誘導活性と幼根伸長阻害活性の2つの活性を有する分子としては、IAA-SLが最も優れていると考えられる（図4）。

続いて、IAA-SLの2つの活性を、フィールドに近い環境で評価するために、ライゾトロン法という方法での活性の評価を試みた。ライゾトロン法とは、根圏の様子を観察するために、根をシャーレ内に詰めたロックウール上に置いたら紙面に這わせるようにして植物を生育させる方法である。実際には、赤クローバーを宿主植物として生育させ、その根の周辺にヤセウツボ種子を撒き、その発芽率や寄生成功率の測定を試みた。しかしながら、実際に実験を行う

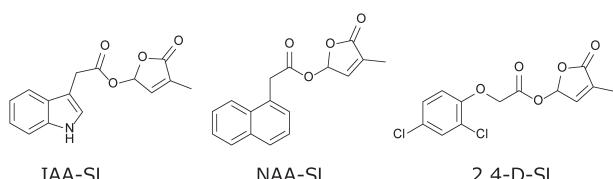


図3. 合成したオーキシン-SLハイブリッド化合物。

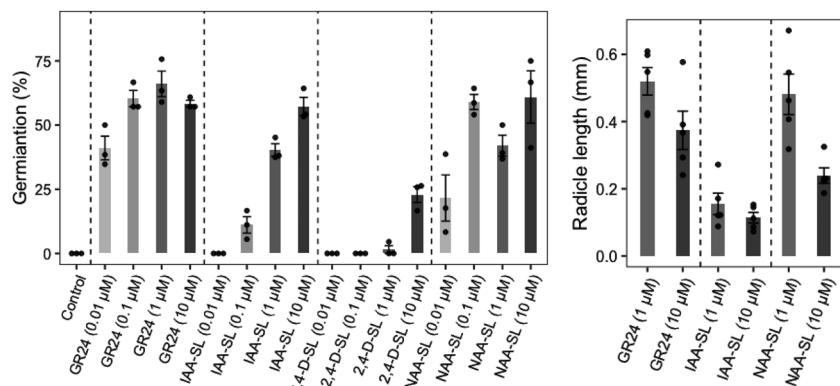


図4. 左) ヤセウツボ種子に対する、オーキシン-SLの発芽誘導活性の評価。
右) ヤセウツボ種子に対する、オーキシン-SLの幼根伸長阻害活性の評価。

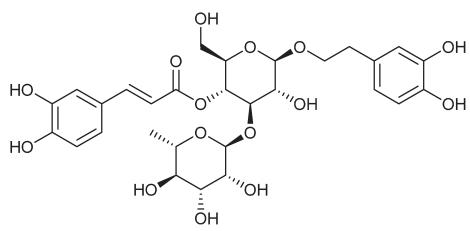


図5. acteoside の化学構造.

と、IAA-SL が赤クローバーにも強く作用してしまい、IAA-SL 处理区とコントロール区で、寄生成功率を正確に比較することが困難であるということが問題となつた。宿主植物にも作用してしまうという問題は、フィールドに散布する際にも生じることが予想されるため、宿主存在下で使用可能な自殺発芽誘導剤の創出には、一般的な植物には作用しない IAA 類縁体を骨格とする必要がある。そのため、今後は、根寄生植物に選択性のある IAA 類縁体を見つけるためのスクリーニングを行う予定である。

3. 根寄生植物が生産する有用成分の探索

川崎市長沢浄水場で採取したヤセウツボを地上部と地下塊に分離した。地下塊 (80 g) をアセトンで抽出した後、水／酢酸エチルによる液液分配により酢酸エチル層粗抽出物 (311 mg) を得た。粗抽出物を ODS オープンカラムクロマトグラフィー (水／メタノール 1/1 ⇒ 0/1) に供し、溶媒の極性に応じて、4つの画分に分けた (Fr.1-4)。Fr. 1 (293 mg) は逆相HPLC (水／メタノール 6/4) により精製した。254 nm における吸光度の値を指標に4つの画

分に分け (Fr.1A-1D)，そのうち 1A (7.1 mg) については、各種機器分析によりフェニルエタノイド配糖体の acteoside と同定した (図5)。この結果は、ヤセウツボに含まれる有用成分について調査し、単離構造決定を行つた先行論文と同じ分子であった (Kurisu et al. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2013)。acteoside はアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド β の凝集を阻害することが知られている。その他の 3 画分については、構造決定までには至らなかつた。

謝辞

本研究に際し、研究助成および助言をいただいた日本農芸化学会、企業の皆様に心より感謝申し上げます。また、議論を通じて多くの知識や示唆をご教示いただいた東京大学 浅見忠男教授、神戸大学 杉本幸裕教授、筑波大学 繁森英幸教授に心より御礼申し上げます。

本研究は明治大学農学部農芸化学生物機能化学研究室（現、植物制御化学研究室）において行われたものです。本研究室を主宰されている瀬戸義哉准教授、および根寄生植物の利活用に関する研究を遂行してくださつた大野春香氏に心より感謝申し上げます。根寄生植物種子を提供していただいた宇都宮大学 謝肖男准教授、Kenyatta University Steven Runo博士に御礼申し上げます。最後に、ヤセウツボのサンプル採取にご協力いただきました川崎市上下水道局長沢浄水場の皆様に感謝申し上げます。

光合成細菌を活用した“アクアバイオティクス”による 安心安全な養殖の実現

崇城大学生物生命学部応用生命科学専攻細胞工学講座博士課程卒業
古賀 碧

解決したい社会課題

我国のクルマエビ養殖は病原性のウイルス、細菌、カビによる慢性的な病害に悩まされています。最近では沖縄県のバナメイエビ養殖場にて「AHPND（急性肝すい臓壊死症）」によるバナメイエビの大量死も確認されました。しかしながら、エビ養殖における病害改善のため有効な対策はありません（外国でしばしば用いられる薬剤使用は消費者に受け入れられないため不可です）。そこで薬剤を使用せず病害を抑制できるプロバイオティクス技術（有用微生物利用技術）を提案します。これにより、これまで薬剤の

投与により汚染されていた水質を守ることにも繋がります。

本提案の光合成細菌により病気に強いエビを育て、安全安心なクルマエビの供給とクルマエビ養殖業の発展への貢献とともに、以下の発展が期待できます。

- (1) 今後この技術が国内のクルマエビ養殖の現場、海外のバナメイエビ、ブラックタイガーなどの養殖現場で「環境負荷が少なく、低コストな養殖技術」として普及することが期待できます。
- (2) 日本のクルマエビ養殖では薬剤は使用されていません

- が、東南アジアなどの外国では抗生素質の多用が問題になっています。本技術が今後海外で普及することによりエビ養殖による環境への悪影響が軽減できます。また、消費者には薬剤を利用していないより安全なエビを提供することに繋がります。
- (3) 病害を減らし、健全なクルマエビを育てることで、日本のクルマエビ養殖産業の安定的発展に貢献します。
 - (4) 波及効果として、エビだけではなく病害や生残率が低いことで困っている他の魚種（ハマチ、フグ、マグロ、など）での利用も今後期待できます。

課題解決のための着想に至った研究成果

養殖エビの病害は、日本ではクルマエビ、東南アジア他の海外ではバナメイエビ、ブラックタイガー（ウシエビ）などのウイルス病、ビブリオ病が大きな問題となっています。この対策としては化学物質に頼らず環境に配慮した技術である有用微生物（プロバイオティクス）の利用が有望です。

研究室（崇城大学生物生命学部応用生命科学科・細胞工学講座）ではクルマエビ養殖での病害対策として、プロバイオティクス（善玉菌）利用について検討しています。これまでの研究で熊本県上天草市の海岸から分離した海産性光合成細菌 *Rhodovulum* (ロドラム) sp. KKKM01を、餌に0.01% (湿重量) 添加、または飼育水に直接添加 (終濃度 1×10^3 菌/mL) してクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) に与えると以下の効果があることがわかってきます。

- 1) 200トン規模の水槽実験(写真1)で、エビの生残率(歩留り)がおよそ10ポイント向上する(約58%から約67%に上昇)(図1および写真2参照)。
- 2) 病原性ビブリオを強制感染したエビの生残率が向上する(病気に強くなる)。
- 3) エビの自然免疫系の遺伝子(活性酸素発生系、活性酸



写真1. 試験を行った200トン水槽(株)海老の宮川(沖縄県うるま市)

素消去系、抗菌ペプチド、自然免疫制御系、レクチン、等)の発現が顕著に活性化される(表2参照)。

免疫反応には、獲得免疫系(抗原-抗体反応、等)と自然免疫系(食細胞、抗菌ペプチド、活性酸素発生、等)があり、哺乳類から魚類までは両方の免疫系を持っていますが、節足動物(エビなど甲殻類、昆虫類、等)は、獲得免疫系を持たず、生体防御は自然免疫系のみに依存しています(表1)。したがって、エビの病害抵抗性には自然免疫の活性化が極めて重要と言えます。

また、飼育水への添加濃度(1×10^3 菌/mL)は従来技術に比べて1,000分の1の極めて低濃度です(詳細は「研究の特色」を参照)。

研究の特色

これまでに実験室および養殖現場で効果が実証されている光合成細菌について、その有効性のメカニズムを解明することを本活動の目的としました。光合成細菌の効果のメカニズムが明らかになるとことにより、今後さらに国内および東南アジアで、養殖エビの病害対策として、化学物質に

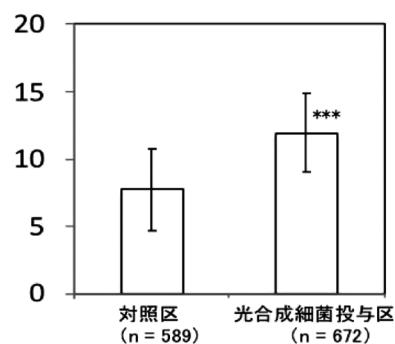


図1. うるま市クルマエビ飼育実験平均体重(飼育期間137日). ***: P<0.001

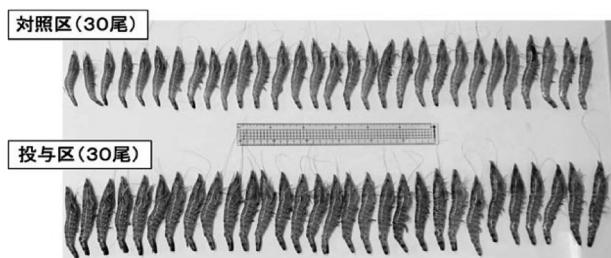


写真2. 光合成細菌投与試験の結果。

表1.

	獲得免疫	自然免疫
哺乳類	あり	あり
魚類	あり	あり
節足動物 (エビ、昆虫、等)	なし	あり

表2. 光合成細菌 *Rhodovulum* sp. KKM101 を投与したクルマエビにおける自然免疫系タンパク質をコードする遺伝子の発現量変化（無投与対照区を 1 とした相対値）

	自然免疫系タンパク質	餌に0.01%添加して投与	水槽に直接投与 (1×10^3 菌 / mL)
活性酸素発生系	Dual oxidase	5.8	5.5
	Nitric oxide synthase	5.7	3.6
	NADPH oxidase	8.2*	3.6
活性酸素消去系	SOD-2	39**	13*
	SOD-5	4.0	4.9
熱ショックタンパク質	HSP60	4.1	9.1*
自然免疫制御系	IMD (Immune deficiency)	3.3	7.1*
レクチン	Lectin D	5.0	7.8*

**: P < 0.01. *: P < 0.05

頼らず、環境負荷も低く、投与量が少ないためコストも低い技術として普及することが期待できます。また将来は、エビだけではなく生残率が低いことが問題となっている他の魚種（マグロ、フグ、ウナギ、等）での応用も期待できます。

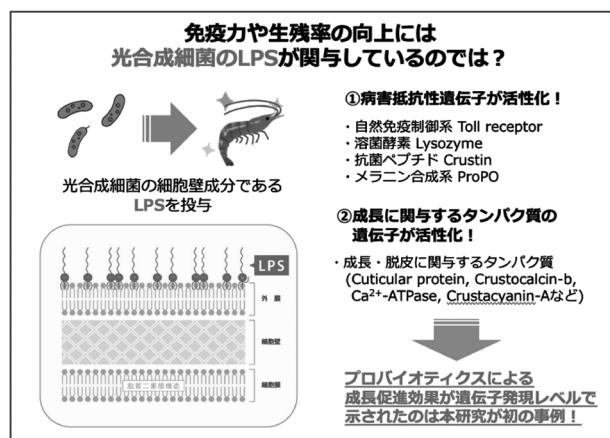
（他の類似技術と比べた特色）本研究シーズの光合成細菌の一一番の特徴は、極めて低い濃度 (1×10^3 菌/mL) で効果があることです。現在、東南アジア諸国では、EMS/AHPND (Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) というビブリオ感染症の甚大な被害が出ています。そのためエビのプロバイオティクス研究は近年盛んに行われ、効果がある菌も多数報告されています。しかしそのほとんどが飼育水に添加する場合の有効菌濃度が 1×10^6 菌/mL 程度です（参考文献1-4）。培養して得られる一般的な菌濃度は 1×10^9 菌/mL なので、この濃度だと 1,000 倍 (10^3 倍) 希釈で投与する必要があります。例えば面積 $5,000 \text{ m}^2$ 、水深 2 m の養殖池の水量は $5,000 \times 2 = 10,000 \text{ m}^3$ (1 万トン) であり、1,000 倍希釈で投与するなら $10 \text{ m}^3 = 10,000$ リットル (10 トン) の菌液が必要となります。これは到底経済的に許容できる量ではないので、従来技術はエビの育苗水槽 (200 m³程度) 規模に限定されます。一方、本提案の *Rhodovulum* sp. KKM101 は 1×10^3 菌/mL で効果があるので、同規模の養殖池への投与量も 10 リットルでよく、極めて有効かつ低コストな対策技術として今後世界各地での普及が期待できます。

（文献）

1. Benef. Microbes, **6**, 525–533 (2015)
2. Probiotics Antimicrob. Proteins, **7**, 118–125 (2015)
3. Fish Shellfish Immunol., **28**, 837–844 (2010)
4. Mar. Biotechnol., **20**, 512–519 (2018)

本活動の取り組み

本活動では、病害抵抗性（自然免疫関連）遺伝子発現を



活性化するメカニズムについて検討しました。これまでの研究から光合成細菌の細胞壁成分である LPS (lipopolysaccharide) が病害抵抗性遺伝子発現に関与しているのではないかと予想しています。有効成分を LPS と予想する理由は以下の通りです。

- ・光合成細菌は死菌でも効果があるので、細胞構成成分が有効物質として作用している。
 - ・光合成細菌が活性酸素 (ROS) 発生系・消去系を活性化する。（ROS 発生は典型的な LPS の効果である。）
 - ・ニジマスで LPS による免疫活性化の報告がある。
- （文献）

Enhancement of disease resistance against penaeid acute virae-mia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS) Fish & Shellfish Immunology (2000) **10**, 555–558 doi:10.1006/fsim.2000.0268

■ lipopolysaccharide (LPS) の有効濃度の検討

図2に、定量 RT-PCR による病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現の結果を示します。LPS濃度が発現レベルに及ぼす影響は、遺伝子によって異なりました。そこで、代表的な病害抵抗性タンパク質である Prophenoloxidase (ProPO) で最も高い発現促進効果がみられた 100 ng/L を投与濃度に設定して以降の実験を行いました。

■ 様々なグラム陰性菌の lipopolysaccharide (LPS) の比較

次に、LPS投与濃度を 100 ng/L とし、*Rhodovulum* sp. KKM101, *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC 17023), *Pantoea agglomerans*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* の LPS を使用して病害抵抗性タンパク質等の遺伝子発現に及ぼす影響を比較しました。また、*Rhodovulum* sp. KKM101 の死菌についても、 1×10^3 菌相当/mL (約 5 ng cell dry weight/mL) の濃度で投与を行いました。

図3に、定量RT-PCRによる病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現の結果を示します。LPSの典型的な作用は活性酸素（reactive oxygen species: ROS）発生の促進であるため、クルマエビへのLPS投与により、ROS発生系/消去系の遺伝子発現が上昇することを予想していましたが、本研究ではROS発生系のNADPH oxidase, ROS消去系のSOD (superoxide dismutase)ともに発現上昇は見られませんでした。しかし濃度設定実験ではNADPH oxidaseで上昇傾向が確認できました。一方、自然免疫制御系のIMD (Immune deficiency)およびToll-like receptor 1 (TLR1), メラニン化に関与するProPOではLPS投与により発現上昇の傾向が見られ、様々な菌のLPSの中では*Rhodovulum* sp. KKMI01のLPSで最も高い上昇傾向が確認できました。今回の結果から光合成細菌がエビの病害抵

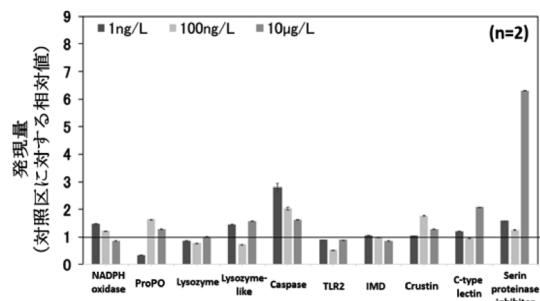


図2. 定量RT-PCRによる病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現。

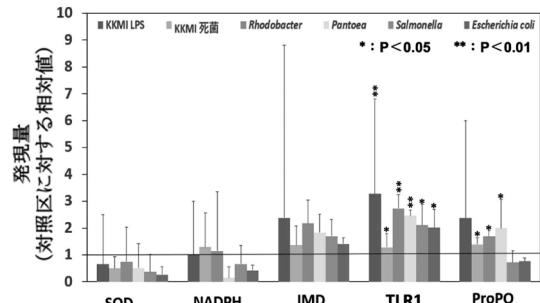


図3. 定量RT-PCRによる病害抵抗性タンパク質の遺伝子発現。

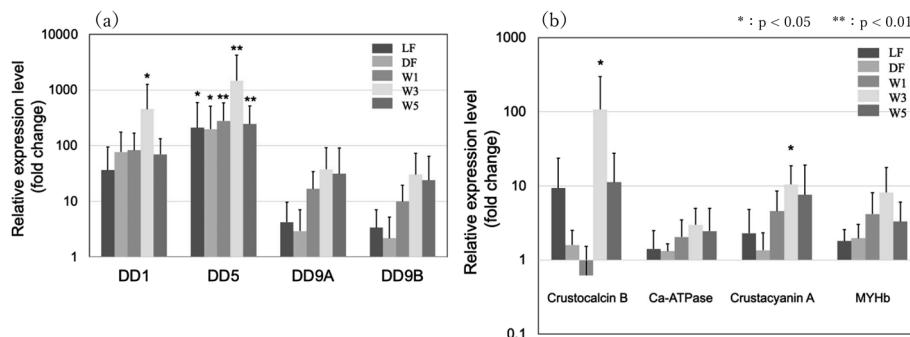


図4. 定量RT-PCRによる成長関連タンパク質の遺伝子発現。

抗性遺伝子の発現を活性化する原因物質の一つがLPSである可能性が示されました。

さらに、クルマエビの成長促進効果が確認できたことから、光合成細菌による脱皮に関する遺伝子発現への影響について調べました。海産性光合成細菌である*R.sulfidophilum* KKMI01が、クルマエビの遺伝子発現に及ぼす影響について、小規模な水槽実験で検討を行いました。光合成細菌は3日間投与し、光合成細菌投与区については、2つの方法(5条件)で行いました。1つは、*R.sulfidophilum* KKMI01の生菌(10^6 colony forming unit (cfu)/g)または死菌(10^6 相当 cfu/g)を含む飼料をエビに与えました。もう1つの方法は、生菌を最終濃度 1×10^1 cfu/mL, 1×10^3 cfu/mL, 1×10^5 cfu/mLとなるよう飼育水に直接添加しています。

■光合成細菌による脱皮に関する遺伝子発現への影響

エビなどの甲殻類は、柔らかい体の部分を覆うクチクラで構成された層状の硬い外骨格を持っています。クチクラは、炭酸カルシウムと、キチン、タンパク質、脂質、グリコサミノグリカンなどの有機物質で構成されています。成長による脱皮は、新しいクチクラの形成を意味します。そこで本研究では、光合成細菌投与によるクチクラ形成に関するいくつかの遺伝子発現への影響を確認しました(図4(a)および(b))。

DD1, DD5, DD9A, およびDD9Bは、キチンに結合してキチン/タンパク質複合体を形成するクチクラタンパク質です。これらのクチクラタンパク質は、5条件の投与区において、顕著な遺伝子発現の上昇が確認されました(図4(a))。特にDD5の遺伝子発現は100倍以上向上しました。今回調べたクチクラタンパク質に関わる遺伝子について、5条件で比較すると、W3で顕著な上昇が確認されました。

図4(b)は、光合成細菌がクチクラ合成に関与するタンパク質の遺伝子発現におよぼす影響を示します。炭酸カルシウムはクチクラに硬軟を与え、 Ca^{2+} 結合部位を持つCrustocalcin proteinは外骨格の石灰化に重要な役割を果足します。本研究では、Crustocalcin proteinはLF, DF,

W3, W5 の 4 条件で遺伝子発現の上昇が確認されました。さらに、筋小胞体 Ca^{2+} ATPase は、5 条件すべてにおいて遺伝子発現の上昇が確認されました。このタンパク質は、脱皮過程でのカルシウム代謝に重要な役割を果たします。カロテノイドは甲殻類による外部着色として働き、Crustacyanin は甲殻類の外骨格に見られるカロチノタンパク質複合体です。Crustacyanin は、すべての投与条件で上昇傾向が確認されました。

クチクラ合成に関わる遺伝子発現の向上は、光合成細菌の成長促進効果を示唆しました。したがって、光合成細菌による筋ミオシン遺伝子の向上が期待されます。本研究では、最も高発現している骨格筋ミオシンの 1 種である Myosin heavy chain b (MYHb) に対する光合成細菌の影響を調べ、すべての投与条件で MYHb の 2~8 倍の遺伝子発現の上昇を確認しました (図 4(b))。この結果は、光合成細菌の成長促進効果を裏付けています。4 つの遺伝子につ

いて光合成細菌の影響を比較すると、W3 条件で最も顕著な上昇が確認されました。

本研究において、プロバイオティクスによる成長促進効果が本研究で初めて遺伝子発現レベルで示されました。

本研究テーマに関する学術論文

本活動を通して、論文を 2 本掲載いたしました。

■ Aoi Koga, Midori Goto, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto, and Hitoshi Miyasaka, Probiotic effects of a marine purple non-sulfur bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum* KKMI01, on kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*), *Microorganisms*, **10**, Special issue: *Biotechnological Appication of Photosynthetic Bacteria*, 244–258 (2022)

■ Aoi Koga, Shinsuke Takiguchi, Yusaku Tani, Ken-ichi Ozaki, Takaaki Maki, Hiroshi Okuhata, Satoshi Tanaka, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto, and Hitoshi Miyasaka, Comparison of the probiotic effects of freshwater and marine photosynthetic bacteria in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) culture, *Journal of Applied Aquaculture* (2022)

次世代酵素創生技術“酵素パーツモデリング”により バイオ産業の創出を加速させる

研究予算：夢にチャレンジ企画賞助成金
研究期間：2021 年度～2022 年度
静岡県立大学大学院博士後期課程 1 年
小塚康平

はじめに

酵素の機能を最大限活用した有用物質生産が脚光をあびつつある今日、目的に応じた酵素機能の改良が試みられている。酵素を設計する手法は、①Energy calculations (構造安定性計算), ②Machine learning (教師あり機械学習), ③Phylogenetics (生物進化情報の活用) の大きく分けて 3 つの手法がある⁽¹⁾。いずれの手法にもそれぞれ特徴や利点があるため、極めて複雑な酵素の機能制御を行うためには、多彩な手法を適切に使い分けることが重要である。従って、酵素改変に利用可能な新たな技術や既存技術の改良が求められる。本企画賞では、酵素を“車のパーツ”的に捉えて機能を改良するという新しい概念“酵素パーツモデリング” (Fig. 1) を提唱した。まずは酵素パーツモデリングの基盤となるツールの開発と複数の酵素における検証実験を行い、基盤ツールの利点と欠点、展望について報告する。

概念

本研究では、酵素パーツモデリングを提唱した。酵素も

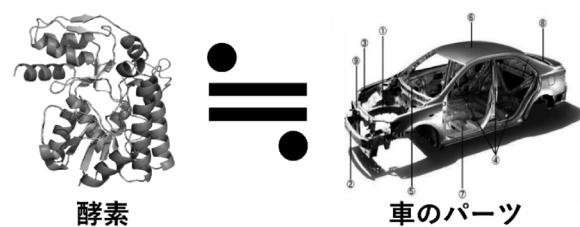


Fig. 1 酵素パーツモデリング。

車同様にパーツごとに設計図が存在し、パーツごとの特徴を捉え、配列という設計図を構築できると仮説を立てた。そこで中心部位(＝エンジン)だけの改変ではなく、全パーツ(各外殻部分のパーツ)を改変対象とすることで大幅な機能改変を目指す。

背景

酵素改変は一般的に分子の中心部分、いわゆる活性中心や基質結合部位などの反応に直接関与する領域において改変が行われてきた (Fig. 2)。一方で、それ以外の領域、い

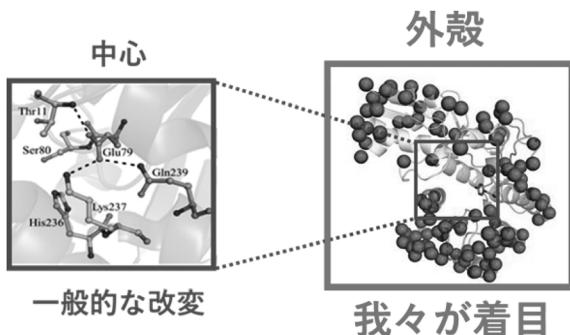


Fig. 2 酵素の改変対象について.

わゆる外殻部分においては、機能改良に重要であるにも関わらず、改変の対象にならないことが大半である。

外殻部分を改変対象に含めた手法の一つとしてフルコンセンサス設計 (FC) などを代表とする配列ベースの設計法が挙げられる。配列ベースの設計法では、対象酵素に少數の点変異を導入するか、もしくは全領域のアミノ酸残基を再設計する方法が用いられる。前者の場合は、個々の変異は安定性にほとんど寄与しないことから⁽²⁾、大幅な機能変化は望めないことが多い。後者の場合は、多点変異により大幅に機能が変化することもあるが^{(3)~(5)}、1つの深刻な不安定化変異が他のすべての変異で得られる利益を損なう可能性があり⁽⁶⁾、高い予測精度が必要である。事実、FC法では中立的もしくは不安定化に寄与する変異が全体の50%程度であることや、報告されている酵素の種類や分子サイズが限定的であることが挙げられる^{(7)~(9)}。要するに、大幅な機能変化を求めて多点変異を導入する場合には、導入する変異のなんらかの取捨選択を行うことが、酵素改良の鍵となる。

目的

本研究では、鋳型酵素に導入する変異の取捨選択方法として、①ある規則に従い領域ごとに分割して変異導入の可否を決定する、②導入する変異をスコア化し一定の閾値で変異導入の可否を決定する、2つの方法でアプローチすることが有効な手段の一つであると考えた。そこで、上記2つの方法を検証する基盤となる酵素改変ツールの開発と、有用性を検証するために複数の酵素でツールを適用しその機能を定量的に評価することを目的とした。

研究1—方法

ある規則に従い領域ごとに分割して変異導入の可否を決定する方法を検討した。第一に外殻部分を構成する二次構造単位に着目し、配列ベースの変異導入法に基づいたパート交換型設計ツールの開発を行った。ツールの適用には当

パートごとに設計するツール (二次構造 (Helix, Strand, Loop) ごと)

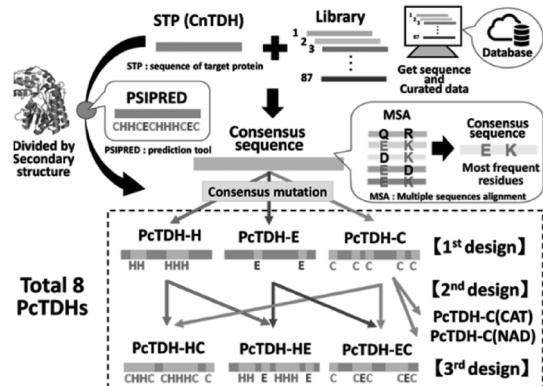


Fig. 3 パーツ交換型設計ツールの適用.

研究室にて実験系が確立している L-スレオニン脱水素酵素 (TDH) を対象に、6種類の酵素 (PcTDHs) を設計した (Fig. 3)。

対象酵素をアミノ酸配列データから予測される二次構造要素 (α -Helix: H領域, β -Strand: E領域, Loop: C領域) で分割、それぞれに変異を一定のルールで導入する方法である。具体的には、二次構造予測ツール “PSIPRED” により出力される対象酵素の二次構造情報を記載したデータ、対象酵素の類似配列 (数十配列以上) が記載されたライブラリデータの2つを入力値とし、対象酵素の二次構造ごとに変異を導入した6種類のパートツリモデリング酵素 (対象酵素の H, E, C, HE, HC, EC の領域に変異を一定の閾値で導入) の配列を設計するツールを開発した。導入する変異は第一にコンセンサス変異とし、対象酵素とライブラリデータ中の全配列をマルチプルシーケンスアライメント用ソフトウェア “MAFFT” を用いて解析し同定した。

研究1—結果

6種類の設計酵素PcTDHに導入された変異はそれぞれ、-H: 45点、-E: 9点、-C: 45点、-HE: 54点、-HC: 90点、-EC: 54点であった。6種類すべてについて大腸菌発現系での可溶性発現を確認でき、2段階のクロマトグラフィー精製により、いずれも 95%以上の純度で精製酵素を大量に得ることに成功している (>10 mg/L)。酵素の諸性質についての検討では、C領域 (Loop) への変異で耐熱性の向上や至適pHが拡大した (Fig. 4-A, B)。この結果は一概に分子全体に導入された変異の総合的な機能向上ではなく、ある特定領域への変異が目的機能向上に大きく関与している可能性を見出した。さらに、耐熱性などの機能が向上しなかった-H や-E の変異と-C の変異を組み合わせて変異を導入した結果、相加的な機能の向上がみられた (Fig. 4-C, D)。

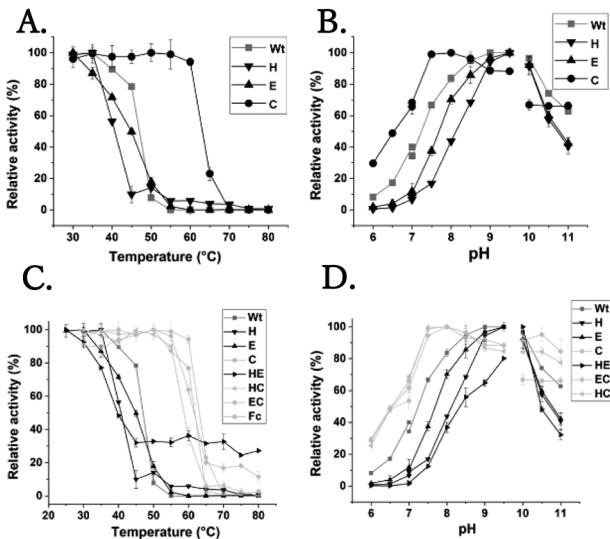


Fig. 4 PctDHs の諸性質の検討.

Wt: 変異前の鋳型酵素, Fc: フルコンセンサス設計酵素. A, B) 二次構造で分割した 1 つの領域にコンセンサス変異を導入した結果. C, D) 二次構造で分割した 2 つの領域にコンセンサス変異を導入した結果. C 領域の変異が導入された変異酵素を赤で示した.

この結果を踏まえ、特徴的な C 領域での変化を他酵素でも検証するために、2種類の酵素、エステラーゼ (EST) と L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) で C 領域変異体を設計し、定量的な機能評価を行った。上記 2 種類への導入変異には、コンセンサス変異ではなく、祖先型設計に由来する変異を導入した。まず EST では、3種類の C 領域改変酵素 PaEST19, 22, 29-C を設計した。設計した 3 種類の酵素は、大腸菌にて発現させ、SDS-PAGE を用いて可溶性発現を確認した。酵素の諸性質の検討では、2つ (PaEST19, 29-C) は耐有機溶媒性や耐熱性 ($T_{1/2}$) が低下し、1つ (PaEST 22-C) の耐熱性は 20°C 以上向上した。この結果は、パーツ交換型のアプローチにて C 領域を改変した場合、耐熱性などが必要もし向上するわけではなく、導入変異の種類や分子全体の相互作用の影響など、改変方法のなんらかの改善が必要であることを意味している。一方で PaEST 22-C は、変異前の鋳型酵素 (STP) と比較して、耐有機溶媒や耐熱性が大幅に向上した。さらに従来法である祖先型設計法（系統樹を作製し配列全体を再設計）により作製した設計酵素 AncEST-22 の耐有機溶媒や耐熱性と比較しても高い結果となった (Fig. 5)。同様に C 領域に祖先型設計に由来する変異を導入した PaLAAO-C においても、STP の耐熱性と比較したところ、耐熱性 ($T_{1/2}$) が約 20°C 向上している結果となった。

研究 1—まとめ

3種類の酵素 (TDH, EST, LAAO) においてそれぞれ耐

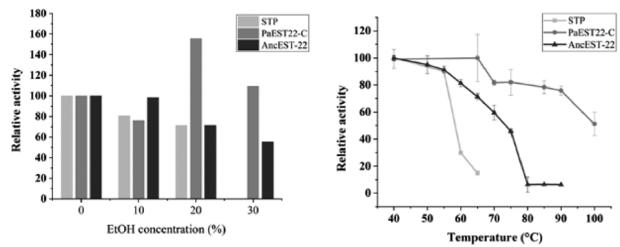


Fig. 5 PaEST22-C の諸性質の検討.
変異前の鋳型酵素 (STP) を灰色で、PaEST22-C を赤色で、AncEST-22 を黒色で示した。

熱性等の機能が向上した知見を得たが、C 領域への変異によって必ずしも耐熱性等の機能が向上するわけではない。また、C 領域への変異で耐熱性等の機能が向上しても、発現量や活性等の他の機能が低下してしまう現象もみられた。よって、変異を導入する領域の改善と導入する変異の選抜が必要である。研究 2 では、導入する変異の選抜について議論する。

研究 2—方法

変異選抜のために、導入する変異をスコア化し一定の閾値で変異導入の可否を決定する方法を検討した。詳細は割愛するが、アミノ酸の各種物理化学的パラメータや、相同配列の MSA から抽出される規則性などを数値化、変化させたい機能（例えば安定性など）と関連するであろうパラメータを組み合わせ、in silico で変異を評価するツールを開発した。本ツールの有効性を検証するため、企業 M 様との共同研究において対象としている酵素 X に適用し、まずは点変異での改変を検討した。変異スコアの閾値を設定し、合計 29 個の点変異体を選抜した。STP を含む、30 種類の酵素 X を PCR により作製し、大腸菌にて発現させ、粗酵素液当たりの比活性や耐熱性を測定した。

研究 2—結果

30 種類の酵素 X について可溶性発現量を定量したところ、酵素の発現量は 1 つを除き、顕著な変化 ($\pm 30\%$) はなかった。一方で、変異体の粗酵素液の比活性を STP (灰色) と比較すると、全体の約 90%

で向上、中でも 7 個の変異体で 2 倍以上向上した (Fig. 6)。さらに耐熱性 ($T_{1/2}$ 値) においても、3 個の変異体で 3°C 以上の向上がみられた。

研究 2—企画賞を通じて

企画賞の活動を通じて、複数の企業様と意見交換することができた。中でも協和発酵バイオ株式会社様には強い興味を持って頂き、共同研究契約も締結、先述したツー

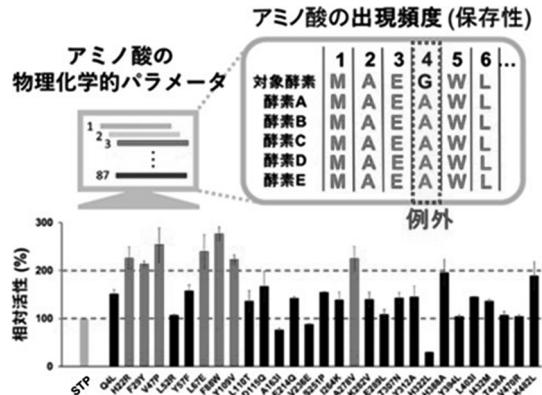


Fig. 6 研究2の概要と結果。

ルを活用する貴重な機会を頂いた。開発対象の酵素Yは、可溶性発現と、目的産物の生産性に課題があった。研究1のパーツ交換型アプローチは技術的な課題があると考えていたため、研究2で開発した *in silico* 点変異設計ツールや、その他既存の手法を用い、15個程度の変異候補を提案した。検証実験の結果、目的の機能が向上したいくつかの変異体を得ることができた。機能が低下した変異体もあったが、1ラウンドの検証により結果が出た事から、コロナ渦で活動制限がある中、研究開発の効率化に有効であると考えている。今後も様々なアイデアをプログラムに実装し、精度よく改変ができるよう、努力したい。

最後に

本企画賞では、酵素パーツモデリングという新しい酵素改良の概念を提唱した。提唱する技術は、大幅な機能改良を目指す方法の1つであり、車のように各パーツに捉えて設計図である配列を構築するというものである。そこで、2つの基盤となる設計ツールの開発と検証を行った。研究1では二次構造ごとに変異を導入するツールを開発・検証し、C領域(Loop)に導入する変異が、耐熱性等の機能向上に関与している可能性を見出した。さらに、C領域の変異とH領域(α -Helix)やE領域(β -Strand)の変異を組み合わせた場合、相加的に機能が向上した知見を得たことで、領域ごとに改変した高機能なパーツを組み合わせることでより優れた酵素を設計できる可能性を示した。研究2では、各残基ごとに変異のスコア化を行うツールを開発・検証し、耐熱性や比活性の向上に有効な方法を探索した。

スコア化に使用するアミノ酸物理化学的パラメータの重みづけを改良していくことや前後配列の保存性度を加味することで有用変異予測精度が向上できることを見出しつつある。現状の上記2つの基盤ツールは、従来法の配列ベースの設計法よりも全体的な機能改変として優れているとまでは言えないが、酵素改変の選択肢を増やす1つの方法になりうる。さらに、変異導入部位の再検討やスコア化や閾値の改良などを行うとともに開発したツールを組み合わせていくことが優れた酵素改良ツールの開発に繋がると考える。

展望

本技術の確立には、様々なツールの開発や多くの実験データの蓄積が精度向上に必要であり、開発した基盤ツールを様々な酵素に適応し検証実験を進める。加えて、大学/企業様との共同研究などを通して実験データを収集していくことや、異なる観点からの指摘や議論をいただくことで、目指す技術の確立を目指す。

参考文献

- (1) Computational Design of Stable and Soluble Biocatalysts. *ACS Catal.*, **9**, 1033–1054 (2019)
- (2) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein eng.*, **12**, 47–53 (1999)
- (3) Benjamin T. Porebski *et al.*, Structural and dynamic properties that govern the stability of an engineered fibronectin type III domain. *peds.*, **28**, 2867–78 (2015).
- (4) Anja Paatero *et al.*, Crystal Structure of an Engineered LRRTM2 Synaptic Adhesion molecule and a model for neurexin binding. *Biochemistry*, **6**, 914–26 (2016).
- (5) Matt S. *et al.*, Consensus sequence design as a general strategy to create hyperstable, biologically active proteins. *PNAS*, **116**, 11275–11284 (2019).
- (6) Protein stability: computation, sequence statistics, and new experimental methods. *Curr Opin Struct Biol.*, **33**, 161–168 (2015).
- (7) Leila K Mosavi *et al.*, Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **10**, 16029–34 (2002)
- (8) Daniel C. *et al.*, Design and analysis of immune-evasive enzymes for ADEPT therapy. *Protein Eng. Des. Sel.*, **25**, 613–624 (2012)
- (9) From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng.*, **13**, 49–57 (2000)

骨形成型オリゴDNAによる骨リモーデリング制御の基盤研究

信州大学大学院
二橋佑磨

研究背景

医療の発達による高齢化は今後も加速し、「人生100年時代」に突入すると言われている。超高齢社会において、健康寿命の延伸は、個人や家族の幸福に加え、社会全体が健全に機能するためにも極めて重要である。21世紀の国民病とも言われる骨粗鬆症は、健康寿命を阻害する要因の一つである。骨粗鬆症は、日常生活動作（ADL）を傷害し、生活の質（QOL）を低下させ、健康寿命や生命予後にも大きな影響を及ぼす。骨粗鬆症には、閉経・加齢による原発性のものと、糖尿病・慢性腎臓病・動脈硬化などの代謝性疾患や、がん治療によるホルモンバランスの攪乱などを原因とする続発性のものがある。このように、骨粗鬆症による骨量・骨密度の低下は、老化や多様な疾患と連関している。また、宇宙のような無重力環境下では、地上の10倍の速さで骨量が減少する。無重力下における骨量の維持は、長期間の有人宇宙探査、ひいては宇宙旅行の実現に不可欠である。このように、骨量の維持・増進は、健康寿命の延伸や長期の宇宙滞在にとって重要な課題である。

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が進んでいる。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、骨形成を担う骨芽細胞を直接の標的とする核酸医薬シーズを探した。マウス骨芽細胞株の分化を指標としたスクリーニングの結果、乳酸菌ゲノム配列に由来する18塩基のオリゴDNA（ODN）が骨芽細胞の分化・石灰化を著明に誘導することを見出し、この新奇配列を「骨形成型オリゴDNA（osteodN）」と命名した。さらに最近、osteodNは、骨吸収を担う破骨細胞の分化を抑制することが明らかになってきた。osteodNは、化学的に大量合成が可能な安定したDNA分子であり、骨系細胞に作用する核酸医薬品として、骨粗鬆症等の骨代

謝疾患の予防・治療薬として応用が期待される。

報告者が同定した osteodN の作用機構は不明である。そこで本プロジェクトでは、osteodN の作用機序を解明し、動物・ヒト試験につながるエビデンスを蓄積することを目指した。

研究の結果

本研究では、報告者が同定した osteodN である iSN40 (5'-GGA ACG ATCCTCAAGCTT-3') を用いた。

iSN40 が骨分化関連遺伝子の発現に及ぼす影響の解析】

はじめに、マウス骨芽細胞株（MC3T3-E1）における骨形成遺伝子発現に対する iSN40 の効果を qPCR で調べた（図1）。

増殖培地に iSN40 を添加して 24 時間から 48 時間後の遺伝子発現解析で、iSN40 は、骨形成タンパク質2（BMP2）シグナル伝達を介して骨形成を促進するホメオボックス転

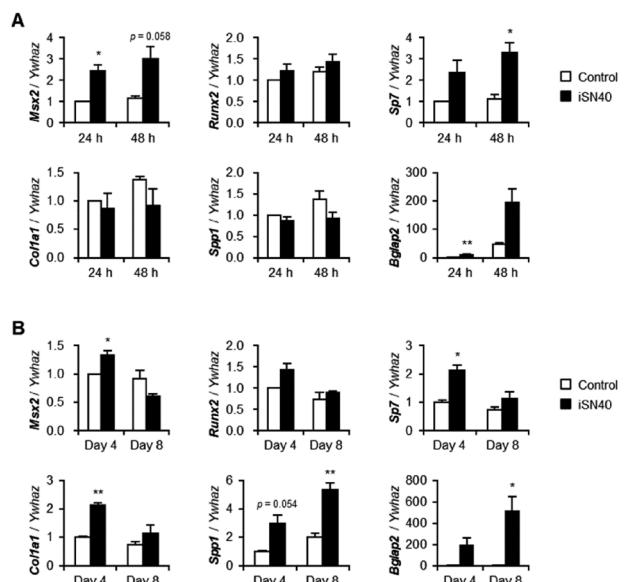


図1. iSN40 は MC3T3-E1 の骨形成遺伝子発現を誘導する。

(A) 15 μg/mL アスコルビン酸を含む増殖培地に、10 μM iSN40 を添加して培養した MC3T3-E1 の 24 時間または 48 時間後における遺伝子発現を定量した。
(B) 15 μg/mL アスコルビン酸を含む分化培地に 10 μM iSN40 を添加して培養した MC3T3-E1 の 4 日または 8 日目における遺伝子発現を定量した。* p<0.05, ** p<0.01 vs. 各時点での対照群 (Student's t-test). n=3.

写因子 *Msx2* の発現量を増加させることができた。対照的に、iSN40 は、骨芽細胞のマスター転写因子 *Runx2* の発現量を変化させなかつた。興味深いことに、iSN40 は、*Runx2* の下流標的である *osterix* (*Sp7*) の発現量を有意に増加させた。iSN40 は、初期骨芽細胞マーカーである I 型コラーゲン α (*Colla1*) および *osteopontin* (*Spp1*) の mRNA 発現量を増加させなかつた。一方で、iSN40 は骨から放出されるホルモンである *osteocalcin* (*Bglap2*) の発現を顕著に誘導した。

iSN40 が骨芽細胞の分化後期に及ぼす影響を調べるために、iSN40 を含む分化培地で 4 日から 8 日間処理した（図 2B）。iSN40 添加群では、4 日目で *Msx2* の発現量が有意に上昇したが、*Runx2* の発現量は増加しなかつた。8 日目では、iSN40 添加群において、*Runx2* シグナル経路の下流に

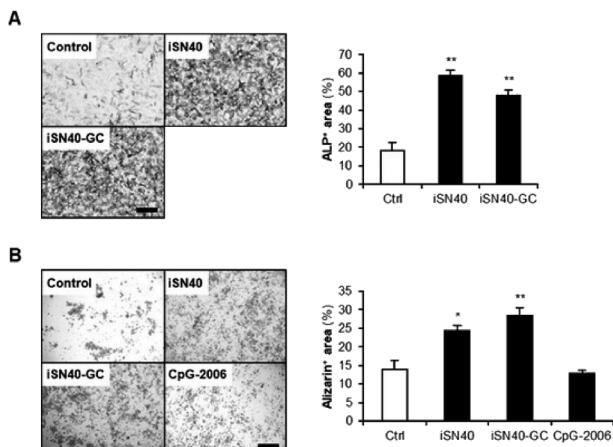


図2. iSN40 の作用は TLR9 非依存的である。

(A) 50 μ g/mL アスコルビン酸を含む分化培地に 10 μ M の iSN40 または iSN40-GC を添加してから 48 時間後の MC3T3-E1 を ALP 染色し、ALP で染色された面積を定量した。スケールバー、100 μ m。** p < 0.01 vs. 対照群 (Student's t-test)。n = 4。 (B) 50 μ g/mL アスコルビン酸を含む分化培地に 1 μ M ODN を添加してから 9 日後の MC3T3-E1 をアリザリン染色し、アリザリン陽性細胞の面積を定量した。スケールバー、200 μ m。* p < 0.05, ** p < 0.01 vs. 対照群 (Scheffe's F test)。n = 4。

ある *Sp7*, *Colla1*, *Spp1*, および *Bglap2* の発現量が増加した。分化初期段階の結果と比較して、これらの遺伝子発現に対する iSN40 の効果は、分化後期段階でより有意であり、iSN40 の長期的な活性が示唆された。これらのデータは、iSN40 は骨分化シグナルの活性化を介して骨形成を促進することが明らかになった。また、iSN40 が *Runx2* ではなく転写因子 *Msx2* を介して骨形成遺伝子発現を調節することによって骨芽細胞分化を促進することを示唆された。

【変異 iSN40 を用いた TLR9 への依存性に関する評価】

iSN40 (5'-GGA ACG ATC CTC AAG CTT-3') は、CpG モチーフを含んでいる。非メチル化 CpG モチーフ (CpG-ODN) を有する ODN が TLR9 リガンドとして機能し、自然免疫系誘発炎症反応を誘起することが報告されている。iSN40 内の CpG モチーフが骨形成に及ぼす影響を調べるために、CpG モチーフを GC で置換した iSN40-GC (5'-GGA AGC ATC CTC AAG CTT-3') を構築した。骨分化は、アルカリリフォスマターゼ (ALP) 染色とアリザリン染色によって評価した。iSN40-GC は、iSN40 と同程度に MC3T3-E1 の ALP 活性および石灰化を増強した（図 2A, B）。一方で、TLR9 リガンドである CpG-2006 は、骨芽細胞の石灰化を促進しなかつた（図 2B）。これらの結果は、iSN40 の骨分化促進作用が CpG モチーフおよび TLR9 とは無関係であることを示している。

【iSN40 の局在の可視化】

iSN40 の作用機構を明らかにするために、蛍光タグ (6-Carboxyfluorescein : 6-FAM) を結合させた 6-FAM 結合型 iSN40 および iSN40-GC を作製した。それらを、MC3T3-E1 を培養する増殖培地に添加し、蛍光を観察した。その結果、FAM-iSN40 添加後 30 分以内に自律的に細胞質に取り込まれたこと確認した（図 3）。本実験結果は、iSN40 が細胞内分子を標的として作用することを示唆している。

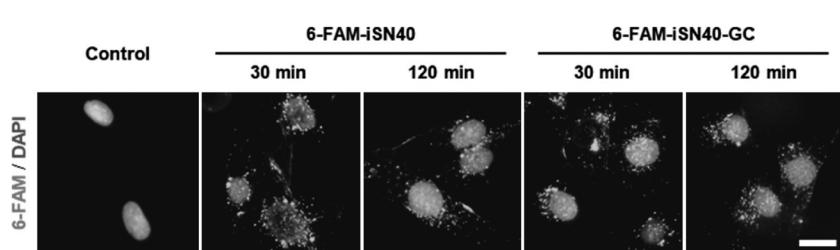


図3. iSN40 の細胞内への取り込み。

増殖培地に 5 μ g/mL の 6-FAM-iSN40 および 6-FAM-iSN40-GC を添加して培養した MC3T3-E1 を 30 分または 120 分後に観察した際の代表的な蛍光画像。スケールバー、25 μ m.

【今後の展望】

本研究の成果により、iSN40 が、TLR9非依存的に骨分化を促進することが示された。また、iSN40 は細胞内の分子を標的として骨分化を促進していることが示唆された。

iSN40 は、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。今後さらなる解析によって、18 塩基の iSN40 と同等の活性を示す短縮化 osteoDN の開発を目指したいと考えている。

osteodN 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。iSN40 の標的分子は不明であるが、今後の解析で標的分子を同定し、その分子メカニズムの核心に迫りたい。

osteodN は、体性幹細胞である骨芽細胞の運命を制御する。発生学的に、骨組織は Runx2 の制御によって形成されることが報告してきた。一方で本研究では、Msx2 を介して Runx2 下流に存在する分化シグナル活性化する

ことが示唆されたことから、骨分化制御機構の詳細を明らかにする新たな研究につながることが期待される。

学会発表

二橋佑磨, 三好 愛, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英, 骨形成型オリゴ DNA は TLR9非依存的に骨芽細胞の石灰化を促進する. 第21回日本抗加齢医学会（京都）, 2021年6月27日.
池田玲奈, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士, 高谷智英, 破骨前駆細胞の分化における骨形成型オリゴ DNA の作用. 第21回日本抗加齢医学会（京都）, 2021年6月27日.

学術論文

Nihashi Y, Miyoshi M, Umezawa K, Shimosato T, Takaya T. Identification of a novel osteogenetic oligodeoxynucleotide (osteodN) that promotes osteoblast differentiation in a TLR9-independent manner. *Nanomaterials*. 2022; 12: 1680.

出願特許

高谷智英, 二橋佑磨, 梅澤公二, 下里剛士. 骨分化促進オリゴヌクレオチド. 特願2021-122713.

微生物触媒を用いた電気と空気からの持続的物質生産

東京薬科大学生命科学研究所
山田祥平

1. 研究開始当初の背景

近年、人口増加に伴う食糧不足や化石燃料の枯渇、それに伴う大気中の二酸化炭素濃度の増加による温室効果が深刻化しており、地表にある資源を循環して利用する持続可能な物質生産プロセスの確立が急務である。本夢にチャレンジ企画賞では、これらの社会課題を解決すべく化石燃料に依存した工業生産を改善するための新たなプロセス構築に向けた提案を行った。

近年、細胞外の導電性物質と電気的な相互作用を行うことが可能な電気化学活性細菌 (electrochemically active bacteria, EAB) が相次いで発見されている。太陽電池と EAB を組み合わせた物質生産プロセスを構築することで、光合成と比較して約5~10倍高いエネルギー変換効率を達成できると試算されている。EAB を利用した物質生産プロセス (微生物電気合成; MES) では、電極から電子が供給され、CO₂ から有機物合成のための還元力として利用される。また窒素固定能を有する EAB を用いれば大気中の窒素からアンモニアを電気合成することも期待される。アンモニアは化学肥料の主成分であり、食糧生産に必須な物質であるが、現状のアンモニア生産法 (ハーバー・ボッ

シュ法) は莫大な化石燃料を要する課題がある。一方、EAB を用いれば省エネ型アンモニア電気合成プロセスを開発できる可能性がある (図1)。

EAB の中でも MES に利用できる有望株として、電極からの電子を受容し大気中の CO₂ と N₂ を固定する好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* に着目した。A. *ferrooxidans* は低pH で培養可能なために、コンタミネーションのリスクが低く、また物質生産に必要なプロトンを効率よく供給できるという利点を持つ。A. *ferrooxidans* のこれらの特性を活かせば、空気と電気を主原料にした持続的な含窒素有機化合物の生産が可能になると期待される。最初のステップとして、本研究ではアンモニアの微生物電気合成プロセスの生産能の向上を目指した研究を行ってきた。

これまでに我々の研究グループではアンモニア同化酵素のグルタミン合成酵素の阻害剤 L-methionine sulfoximine (MSX) を添加し、図1のような二槽式電気化学セルを用いて A. *ferrooxidans* を電気培養することで、電位依存的に培養液中にアンモニアを分泌させることに成功している (特許6919880号)。しかしながら、高価な MSX の添加が

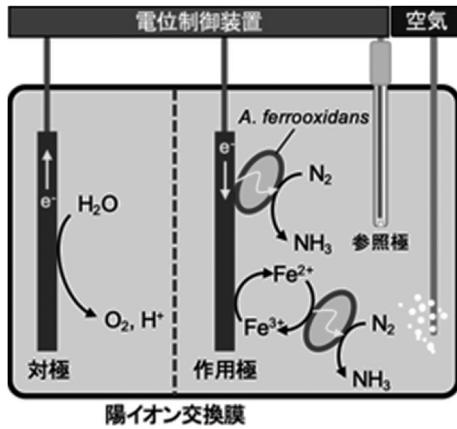


図1. アンモニアの微生物電気合成.

必要である点が問題であり、MSXを添加しない条件下でのアンモニア生産が求められる。そこで以前の申請者の研究では、窒素固定に重要なニトロゲナーゼを活性化するためにNifA転写因子に着目し、遺伝子改変(*nifA*過剰発現)によるアンモニアの電気合成(MSX非添加時0.015 μmol/L/day)、および培養槽の改良を行なってきた。しかしながら、実用化を目指す上ではアンモニアの生産速度を飛躍させる必要がある。現状では*A. ferrooxidans*の窒素固定制御メカニズムの解明が不十分である点や、高効率な遺伝子操作技術や電気化学培養法が十分に確立されていないことが、上記のプロセスを確立する上で障壁となっている。実用化を見据えた場合、これらの課題をクリアすることによって、少なくとも1,000倍以上の生産速度の向上は期待できる。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究ではこれまでに得た知見を元にした*A. ferrooxidans*の遺伝子改変や、高効率電気化学培養法を開発することで、アンモニア電気合成プロセスの基盤を確立することを目的とした。本賞活動期間中に得た研究成果の概要を以下に記す。これらの研究成果はEABを用いた空気と電気を主原料にした持続的物質生産系の構築に向けた第一歩になるものと考えられる。

3. 研究成果

1) *A. ferrooxidans*における遺伝子抑制技術の確立

*A. ferrooxidans*によるアンモニア生産速度の向上には、高い窒素固定能を持つ遺伝子改変株の作出が重要となる。しかし、本細菌は遺伝子操作が困難であり、遺伝子機能の解明や分子育種がほとんど行われていない。そこでゲノム編集法(CRISPR/Cas9)の応用技術であるCRISPR干渉法(CRISPRi)を用いて、*A. ferrooxidans*の遺伝子発現抑

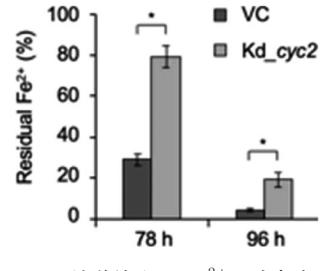


図2. 培養液中の Fe^{2+} の残存率.

制技術を開発を試みた。本手法の確立にあたり、標的遺伝子として *nifH* (ニトロゲナーゼ還元酵素) および *cyc2* (鉄酸化に関与する外膜シトクロム) を選定した。まず、広宿主プラスミド pBBR1MCS-2 に、スクレアーゼ活性を欠損させた Cas9 (dCas9) をコードする遺伝子、および標的遺伝子に対する single-guide RNA をコードする配列をクローニングした。次に構築したプラスミドを接合伝達によって *A. ferrooxidans* へ導入したところ、これらのプラスミドを保持した形質転換体 (Kd_nifH 株と Kd_cyc2 株)を得ることに成功した。Kd_nifH 株の表現型を調査した結果、対照株 (VC 株) と比較して窒素源枯済条件で *nifH* の発現が 50% 減少し、増殖も同様に低下した。また Kd_cyc2 株表現型を調査した結果、Kd_cyc2 株は Fe^{2+} を含む無機塩培地において VC 株に比べて明らかな鉄酸化の遅延を示すことが確認された(図2)。これらの結果から、本研究で開発したCRISPRiシステムによって *A. ferrooxidans* の遺伝子発現が抑制され、本細菌の表現型が変化したことが示された。本研究は鉄酸化独立栄養細菌において初めて CRISPRi を適用した例であり、これにより CRISPRi システムが *A. ferrooxidans* の遺伝子解析に有用な遺伝子発現抑制株を構築するための効率的な技術であることが示された(発表論文1)。

2) ニトロゲナーゼの不活性化によるアンモニアの電気合成

A. ferrooxidans のアンモニア生産能力を高めるために、上記で構築したCRISPRiシステムを用いて窒素固定制御系の解除を試みた。ある種の窒素固定細菌において、DraTによる翻訳後修飾によりニトロゲナーゼ活性が抑制されることが知られている。*A. ferrooxidans* のゲノムにも *draT* 遺伝子が存在するため、本細菌においても DraT がニトロゲナーゼ活性の制御に関与していると予想される。このことから、CRISPRiによって *draT* 遺伝子の発現抑制株 (Kd_draT 株) を作出した。まず CRISPRi による遺伝子発現抑制の効果を検証した結果、VC 株と比較して Kd_draT 株では *draT* の発現量が約 60% 抑制されていた。次に Kd_draT 株をこれまでの研究段階で最適化を図った一槽式電気化学セル(図3)を用いて電気培養し、MSX 非

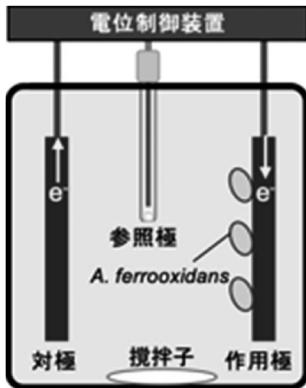


図3. 一槽式電気化学セル.

添加時のアンモニアの生産量を評価した。その結果、非通電条件ではアンモニアの蓄積が見られなかったのに対して、通電条件 (+0.2 V vs. 標準水素電極) に印加した条件下では Kd_draT 株は VC 株の 2 倍量のアンモニアを生産した ($1.6 \mu\text{mol/L/day}$)。この結果から、draT の発現抑制によってアンモニアの電気合成が促進されることが示された。また、一槽式電気化学セルを用いた場合の VC 株のアンモニア生産速度は二槽式電気化学セルを用いた場合よりも高かったことから、一槽式電気化学セルの使用によりアンモニアの微生物電気合成を高効率化できることが示された。

3) 新規微生物電気合成用装置の開発

実用化を目指す上ではさらなる培養効率の飛躍が求められる。微生物電気合成に適した装置構造、電極素材に注力した検討実験を行った。その結果、これまでに使用していた電気化学セルと比較して、*A. ferrooxidans* 菌体増殖におけるエネルギー効率（増殖した菌体が持つエネルギー量／電極から供給した電気エネルギー量）が顕著に向上了（特許出願準備中）。この新たに開発した培養装置を用いることで、アンモニアの生産速度がさらに向上する可能性を見出すことができた。

全体を通して当時の二槽式セルを用いたシステムと比較して、培養槽を改良し、CRISPR システムによる育種株を用いることでアンモニア生産速度が約 100 倍向上することが明らかとなった (MSX 非添加条件下)。これらの成果は、遺伝子改変 *A. ferrooxidans* を用いたアンモニアの電気合成法を世界で初めて提供し、実用化に向けた研究開発の基盤となるものであると考えられた (図4)。

今後はさらなるアンモニア生産の向上を図るとともに、合成したアンモニアを発酵生産に利用することで含窒素有機化合物の合成を試みていきたい。近年、太陽光発電などの再生可能なプロセスの技術革新によって化石燃料よりも安価な電気エネルギーの創出が達成されようとしている。

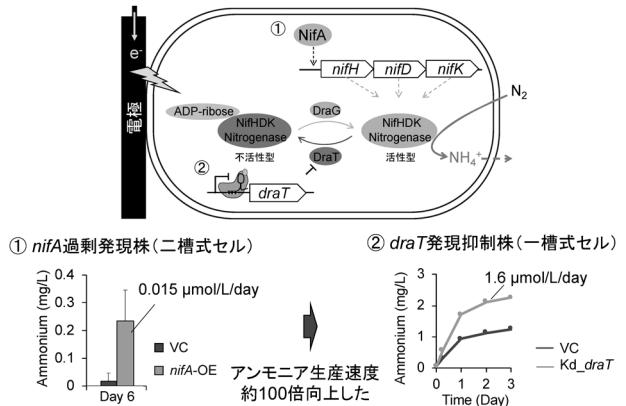


図4. 遺伝子改変 *A. ferrooxidans* を用いたアンモニアの電気合成.

EAB と再生可能なプロセスを組み合わせることで、将来的に脱炭素社会を実現する技術の一助となることを期待したい。本研究活動で得たことを活かして今後も本研究をさらに発展させ、将来的に地表に豊富に存在する物質を原料とした持続可能な工業生産を実現することが目標である。

謝辞

本研究は、公益社団法人日本農芸化学会様のご支援のもと実施することができました。本活動を通して、産学官学術交流委員会委員長の阿部圭一先生をはじめとして多くの研究者と有意義な議論を交わすことができました。本賞をきっかけに研究に対するディスカッションをしてくださいました、先生、企業研究者、同受賞者の皆様に深く感謝申し上げます。本賞を受賞したことによって、外部研究者との人脈形成や、研究に対する視野の拡大を図ることができ、今後の研究人生に繋がるこの上ない活動となりました。そして、日頃より多大なサポートをいただきました東京薬科大学の渡邊一哉先生と高妻篤史先生に深く感謝申し上げます。最後に研究を遂行するにあたりご支援ご協力いただきました皆様に心より感謝申し上げます。

本活動期間の発表論文等

[発表論文]

1. Yamada, S., Suzuki, Y., Kouzuma, A., Watanabe, K. (2021). Development of a CRISPR interference system for selective gene knockdown in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133 (2), 105-109.
2. Yamada, S., Takamatsu, Y., Ikeda, S., Kouzuma, A., Watanabe, K. (2022). Towards application of electro-fermentation for the production of value-added chemicals from biomass feedstocks. *Frontiers in Chemistry*, 9, 805597.

[学会発表]

1. ○ Yamada, S., Kouzuma, A., Watanabe, K. Development of a CRISPR interference system for specific and efficient

- gene knockdown in *Acidithiobacillus ferrooxidans*, World Microbe Forum, June, 2021
- 2.○山田祥平. 糖鎖認識基盤に応じる電気化学活性菌, 第23回比較グライコーム研究会, 2021年8月, 招待あり
- 3.○山田祥平, 高妻篤史, 渡邊一哉. 電気化学活性を持つ鉄酸化細菌の産業利用に向けて, 日本微生物生態学会第34回大会微生物電気化学研究会定例会, 2021年10月, 招待あり
- 4.○Kouzuma, A., Yamada, S., Watanabe, K. Bioelectrochemical nitrogen fixation by engineered chemolithotrophic bacteria, International Conference on Materials and Systems for Sustainability (ICMaSS), November, 2021, Invited
- 5.○山田祥平, 高妻篤史, 渡邊一哉. 遺伝子改変鉄酸化細菌によるアンモニアの電気合成, 日本農芸化学会2022年度大会, 2022年3月
- 6.○山田祥平. 微生物触媒を用いた電気と空気からの持続的物質生産, 日本農芸化学会2022年度大会産学官学術交流フォーラム夢にチャレンジ企画賞最終報告会, 2022年3月
[産業財産権]
1件出願準備中

4. 第2回中小企業产学・産官連携 研究助成報告書

第2回農芸化学中小企業产学・産官連携研究助成報告書

「ポリγグルタミン酸イオンコンプレックスの先端機能材料化」

研究代表者 高知大学農林海洋科学部 芦内 誠
中小企業研究責任者 シンワ株式会社 永峰 圭

1. 背景

ポリγグルタミン酸（PGA）の生体適合や環境調和に資する機能性を活かした新たなバイオ繊維材料の開発が求められている。

PGA の吸湿性の高さは繊維材料化の大きな妨げになっていた。最近、PGA の画期的な吸湿性制御／耐水化技術⁽¹⁾を開発した高知大学・芦内教授との产学連携を深めるなかで、本事業に応募し研究のさらなる推進を図ろうとした。

PGA イオンコンプレックス（PGAIIC）と呼ばれる「バイオ超分子プラスチック」⁽²⁾のナノファイバー製造法を確立した。また、PGAIIC には感染予防と環境問題の解決に資する機能が報告されているが、水暴露により材質不問の接着性を回復する「水性接着性ナノ繊維（moisture-induced gluey nanofiber）」としての用途性が新たに追加された。今後、創傷のヒーリング機能に着目した医用接着部材化や、抗菌・抗ウイルス性を備えたバイオ接着剤（環境配慮型超分子部材）の開発への応用などにも貢献できるものと期待している。

2. 研究成果

研究の背景：PGA は持続生産可能なバイオ高分子でありながら、石油からつくられる「ナイロンとポリアクリル酸」双方の優れた構造特性をも有する唯一無二のハイブリッド材料である（図1）。納豆のネバ成分であることを背景に、食品産業に関わる用途化が進み、安全性や生体適合性への認知度も高い。一方、その固形材料化（プラスチック繊維化）を妨げてきた最大の要因は類稀な親水性（水分散性）

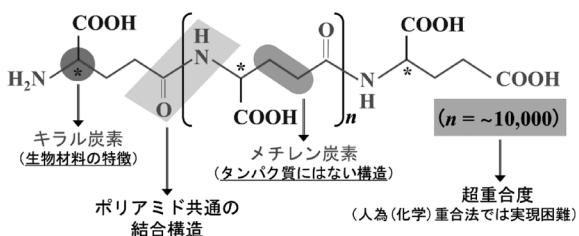


図1. ポリγグルタミン酸の構造特性。

にある。PGA は「加熱溶融」よりも「加湿溶解」の方がはるかに進みやすい。結局、いくら精密に成形してもその形状は簡単に失われてしまう。その特徴的な分子構造を材料開発に活かすには、過剰な親水性をいかに制御するかが重要であった。さらに、PGA の耐水化を実現する新技術は簡易で効率的、かつ優れた人体への安全性・環境との調和性という今日的な社会要請にも応えられる形にする必要があった。今回、歯磨き粉の薬用成分「ヘキサデシルピリジニウム（HDP）」と PGA の間で発生する選択性の高い会合現象「イオンコンプレックス（IC）化」により新製されるイオン結合性複合体「PGAIIC」（図2）に着目し、機能開発研究に着手した。

研究の詳細：PGAIIC は優れた耐水性を示す一方、含水率は凍結乾燥や真空乾燥後も総重量の 10% を超えるとされる。各熱分析により、水分子の蒸発に起因する重量減少が 150°C を超えた温度域で発生することが示されている。そのため PGAIIC は基本的に水分子がかなり強固に結びついた形で合成されることが分かる。当該含水率は繊維物性や製造規模にも影響するため、無水状態に近い PGAIIC での紡糸条件の検討が求められた。今回、PGAIIC の中級脂肪族アルコールに対する超溶解性を利用した無水 PGAIIC の調製を試みた。例えば、エタノールに対する溶解度については、重量%（容量%ではない）換算で最大 80% に達する。低級アルコールにゲル・ゲル性を帯びさせることも可能である。ただし、エタノールは水に対する相分離性を示さず、溶解度も任意 ($<\infty$) となるため、PGAIIC の無水化およびその状態維持には適さない。引き続きアルコール溶剤の調査を進める中で、水への溶解度が 2.2 重量%（疎水パラメータよ

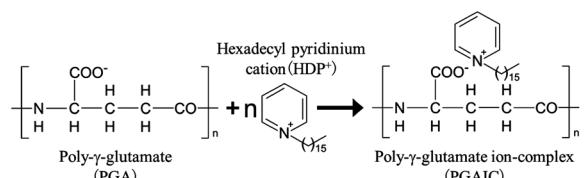


図2. ポリγグルタミン酸イオンコンプレックスの合成反応。

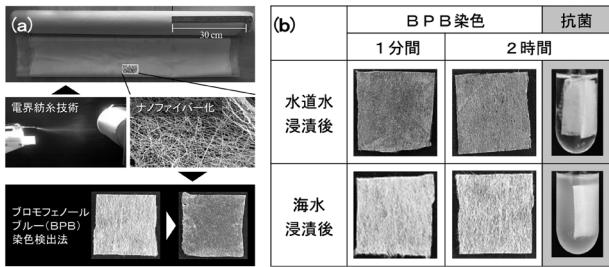


図3. (a)PGAIC ナノファイバーの製造と検出、および (b) 海水分解加速試験の結果。

り換算；相分離を生じる）の中級アルコール「ペンタノール」であれば、無水PGAICの高濃度溶液（～50重量%）の調製も可能であることが判明した。そこでPGAIC／ペンタノール溶液を電界紡糸し、ナノファイバー不織布（規格90 cm×40 m；目付0.6 g/m²）の製造法を確立した（図3a）。

また、不織布内に存在するPGAICの検出にはプロモフェノール染色法⁽³⁾を利用した。図3a（下段）の通り、鮮明な青色を呈したことから充分量のPGAICナノファイバーが合成されていることが分かった。さらに、PGAICナノファイバーを一定時間水道水に曝すと（本件では2時間浸漬）、材質不問の接着性を回復することが判明した。このような「水性接着剤」としての性質を利用して、マスク表面に貼ることで抗菌性能が付与できるかどうか確かめたところ、図3bに示すように顕著な抗菌性（試験対象は水系微生物「大腸菌」）が認められた。PGAICナノファイバーには抗菌性をも備えた「水性接着剤」として、新たな用途化の可能性が見えてきた。

考察と展望：共有結合で重合する化成プラスチック繊維がPGAICと同程度の「抗菌・抗ウイルス効果」と半永久的な「環境（外部刺激）耐久性」を持ち得た場合、自然流出により、分解者たる微生物群の活力を根本から奪う恐れがある。特に難培養微生物が大半を占める海洋においては、一元的な発想に頼って作り続けられる抗菌・抗ウイルス製

品が別次元の海洋破壊の引き金になる恐れがある。そこで、ここではPGAICナノファイバーの海水分解加速試験も実施した。海水暴露後、BPB染色不能なレベルまでPGAICが分解し抗菌性も消滅することが分かった（図3b）。PGAICは高度な耐水性（水不溶性）を示すことから、そのまま海水中に溶解されたとする可能性は低い。一方、PGAICがイオン結合性複合体であるため、海水特有の高塩環境に曝されると超分子構造の殻となる「イオン結合」が解除され、加速度的にPGAICが分解したと考えるのが妥当である。このような応答機能を備えた高分子材料は「スイッチング・プラスチック繊維」と呼ばれ、SDGsの達成や環境問題の解決に向けて開発が急がれている。これ以後、現在進行中の「PGAICプラスチックの社会実装化」の取り組みに加え、水性接着性ナノファイバー等まで見据えた「改質PGAIC」の実用化研究にも拍車がかかるものと期待される。

3. 謝辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました「公益社団法人日本農芸化学会」に心からお礼申し上げます。

4. 参考文献

- (1) M. Ashiuchi, M., Fukushima, K., Oya, H., Hiraoki, T., Shibatani, S., Oka, N., Nishimura, H., Hakuba, H., Nakamori, M. & Kitagawa, M. 2013. Development of antimicrobial thermoplastic material from archaeal poly- γ -L-glutamate and its nanofabrication. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**: 1619–1624.
- (2) 芦内 誠2021. バイオ超分子プラスチック新素材「ポリ γ グルタミン酸イオンコンプレックス」：感染予防と環境問題の解決に資するアーキアポリマーの先端機能材料化. 化学と生物 **59**: 549–555.
- (3) Ashiuchi, M., Hakumai, Y., Nakayama, S., Higashiuchi, H. & Shimada, K. 2018. Engineering antimicrobial coating of archaeal poly- γ -glutamate-based materials using non-cova-lent crosslinkages. *Sci. Rep.* **8**: 4645 [p. 1–9].

淡路産ハチミツと豆乳を用いた新規スイーツの開発

研究代表者 武庫川女子大学食物栄養科学部（旧生活環境学部） 有井康博
中小企業研究責任者 株式会社ハートスフードクリエーツ 西脇 章

1. 背景：企業からの説明

弊社が有していた淡路島で日本ミツバチが集蜜したハチミツを使用する用途について探っていた中、公益財団法人新産業創造研究機構（NIRO）の職員の方から、研究代表者がハチミツで豆乳を固める技術を有していることを知

り、研究代表者から技術の説明を受けた。ハチミツによって豆乳を固める能力が異なるということであったため、弊社のハチミツを提供させていただき、凝固能を検査してもらった結果、非常に高い凝固能を有していることが明らかとなった。そこで、地域産業の活性化やハチミツの使用用

途として有用であり、弊社の有する技術を活かすことができると判断し、新しいスイーツの共同開発に踏み切った。開発が始まってしばらく後に、研究代表者から本事業への応募に関する提案があり、商品化や販売促進を目指す経費として使用が可能であることから、本事業への応募に同意した。大学との連携研究において、とくに商品レベルに押し上げる部分で大きく貢献した。すなわち、商品価値の創造という部分である。これまでにないスイーツの開発であったため、弊社パティシエが試作を繰り返し、大学生と意見交換をしながら、学生の意見をできる限り反映しながら、商品化した。既に商品化し、弊社主導による販売促進会も実施した。今後は、より多くの消費者に届けることができるよう工夫したい。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

豆腐の加工法の一つに、豆乳にグルコノデルタラクトン（GDL）を添加する方法がある。この方法は、GDLがグルコン酸（GA）に変化し、pHを低下させることで、豆乳タンパク質を凝固させることに因る。一方、ハチミツにはGAが豊富に含まれることが知られており、GAがハチミツ酸と呼ばれる由縁でもある。筆者らは、これらの情報から、ハチミツで豆乳を固めることができると仮説を立てた。日本食品成分表に記載されているハチミツのGA量は、ハチミツ100gあたりに0.3gであり[1]。豆腐の加工において0.1%以上のGDLを添加すると豆乳が固まることから[2]、理論上は豆乳に約30%のハチミツを添加することで、固めることができると思った。

この仮説を証明するために、2014年にスーパーで売られているハチミツを購入し、豆乳に添加する予備的実験を実施したが、豆乳が固まることはなかった。後に、本ハチミツのGA含量が低く、豆乳を固めるために必要なGA含量に達していなかったことが分かった[2]。

使用したハチミツが加熱ハチミツであることを突き止めて、生ハチミツであれば、豆乳を固めることができるのでないかと期待し、本件のシードとなる研究が立ち上がった。

当初の研究では、加藤美蜂園本舗の百花蜜（サクラ印ハチミツ）、株式会社山田養蜂場様にご提供いただいた、アカシアハチミツ、コーヒーハチミツ、ヒルガオハチミツ、ソバハチミツを用いて、ハチミツの添加濃度の違いによる豆乳タンパク質の凝固の違い、ハチミツ種による違い、GA含量の測定を行った。これらの結果をもとに、特許を申請した[3]。また、試験管レベルの凝固ではなく、商品化に向けたサイズで凝固をさせる方法を明らかにし、その食感がえん下困難者用食品の基準を満たすことを明らかにしたこれらの科学的な根拠をもとに、商品化を目指すこと

にした。これらの結果の詳細については、米国の科学雑誌 Heliyonに報告している[2]。

上述の5つのハチミツのうち、コーヒーハチミツとソバハチミツは凝固能が高く、スイーツの開発に有用に思えた。しかし、これらのハチミツには、色、味、アレルギーのイメージ、コストなどの問題があり、実用化が難しいと判断された。この時点では、凝固能が低いハチミツでも添加量を増やすれば、豆乳が凝固することが分かっていたが、添加量を増やすと甘味、ハチミツ独特の風味、喉を通る際の痛みなどが増えてしまうという問題が生じた。すなわち、なるべく低い添加量で豆乳を凝固できるハチミツを見つけることが、本開発の鍵を握ることとなった。そこで、豆乳凝固能の高いハチミツのスクリーニングを始めた。その一つに、ハートスフードクリエーツ株式会社（以下、ハートスと略する）が持ち込んでくれた淡路島で採れた百花蜜があった。ハートスとは、関西みらい創造合同・商談会で筆者らの展示を観にきてくれた公益財団法人新産業創造研究機構の職員の方が引き合わせてくれた。こうして、淡路産ハチミツの利用方法を模索していたハートスのニーズともマッチし、共同開発を始めることになった。

淡路産のハチミツは、ハートスと契約している藤堂ファームが日本蜜蜂を用いて、自重落下、無濾過、無加熱によって採蜜した希少なハチミツである。まずは、淡路産ハチミツによる豆乳の凝固能を調べた（図1A）。その結果、ハチミツの容量濃度が15%で固まることが分かった。この濃度は、先のソバハチミツと同じ濃度、コーヒーハチミツ（20%）よりも低く、多くのハチミツが30-50%である[4-6]中で、本ハチミツが非常に高い凝固能を有することが明らかとなった。また、本ハチミツの添加量を増やすことで、凝集が上層で起こることも示された（図1A）。また、ハチミツ添加量を重量濃度で20-30%で試作した（図1B）。この結果から、淡路産ハチミツは商品レベルの大きさにおいても豆乳を固めることができあり、見た目も悪くないことが分かった。本試作品についてテクスチャー解析を行なった結果[4-6]、いずれの濃度においても、かたさ、付着性、凝集性が日本介護食品協議会のユニバーサルデザインフードの規格基準で「かまなくてよい」の判定となり、消費者庁のえん下困難者用食品の規格基準において、規格基準Ⅱに相当することが分かった[4-6]。これらの結果は、淡路産ハチミツが新規スイーツの開発に役立つこと、えん下困難者用食品として機能する可能性をもつことを示した。本結果をもとに、2020年3月にハートスのパティシエによる商品化が本格的に始動した。

本開発におけるスクリーニング作業を通じて、「ハチミツのグルコン酸含量と糖含量に負の相関性がある」ことに

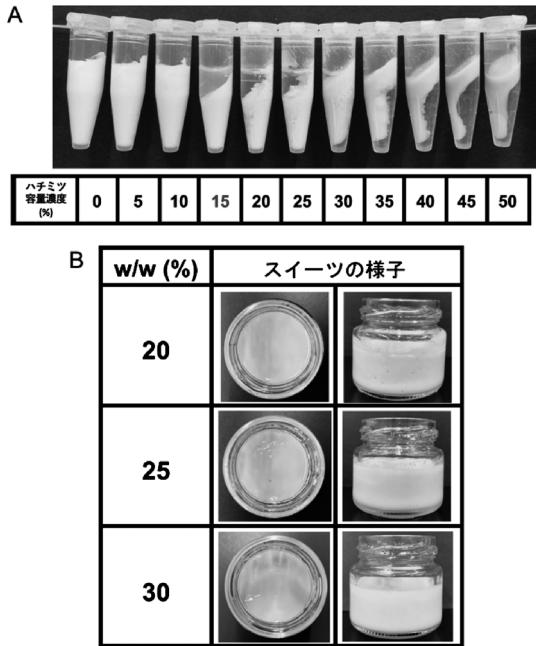


図1. 淡路産ハチミツの豆乳凝固能（A）とスイーツの試作（B）。

気がつき、論文にまとめて投稿した[7]。一方で、豆乳を塩化マグネシウムで固める現象とグルコノデルタラクトンで固める現象について直接的に比較した研究報告がないことに気がつき、開発に必要な科学的知見を得るために直接比較する研究を行い、論文にまとめて報告した[8]。紙面の都合上、ここでは詳細を割愛させていただく。ご興味ある方は、論文を参照いただきたい。

商品開発本格化の前に立ちはだかったのが、新型コロナの流行である。未知の伝染病が流行する中での活動は、人が集まることが大切である商品開発においては困難を極めた。商品開発の第一弾として、ハートスのパティシェによるスイーツ試作が始まった。自由な接触が難しい中で、感染対策を十分に行い、試作と試食を繰り返し、たくさんの問題点を解決することで、商品の原型が完成した。この間、淡路島に集蜜体験に行くことで、淡路産ハチミツの貴重さを再認識した。ついで、商品のネーミング、ラベルのデザイン、容器の形、栄養成分表示に必要なデータの計算などを実施した。商品の名前は、豆乳とハチミツから「豆蜂」と名付け、中国語読みでトーファンと呼ぶことにした。英語のつづりは、Tofunと決めた。ラベルのデザインと容器の形は、高級感を持たせるように工夫した。2020年度はこれらの活動を行い、商品が完成した（図2）。価格は税込480円とした。一方で、えん下困難者用食品の表示許可をいただくためには、えん下困難者による食経験が必要となる。しかし、新型コロナ禍において施設に本件をお願いするのは迷惑であること、価格が高く実用性に乏しいこ



図2. 完成した豆蜂（トーファン）。

とを理由に、えん下困難者用食品の表示許可の取得申請は見送ることとした。本件の目標の一つであるえん下困難者用食品の創出については、今回の経験をもとに別途新しいプロジェクトを立ち上げて、始動し始めている。今後の成果に期待していただきたい。これらの商品化に関わる一部の詳細は、SSRN Electronic Journal および Heliyon で報告しているので、ご参照いただきたい[4,5]。

販売開始の時期を伺ったが、新型コロナの動向がネックとなり、販売が何度も延期となった。そんな中、2021年3月に武庫川女子大学栄養科学研究所主催の第9回公開シンポジウムで紹介、6月に大学プレスセンターに記事を掲載、その記事が朝日新聞デジタルマガジン、読売新聞オンライン、毎日新聞、紀伊民報、沖縄タイムズ、北海道新聞など15件のメディアに転載された。さらに、朝日新聞兵庫県版（2021年6月27日朝刊）や神戸新聞（2021年7月19日朝刊）にも紙面として取り上げられた[9-11]。販売はハートスの御影店舗TOKINONEにおいて2021年7月16日から開始された。また、FM大阪の湊かなえのことば結びにて、ご紹介いただいた。2021年11月22~28日にはKOBEそらゆめマルシェにおいて販売促進を行った。この際、2021年の気候の影響もあり、ハチミツの採取量が少なく、1日限定20個（計140個）の販売を実施したが、1週間で130個の豆蜂が購入された。また、開発に関する内容を、SSRN Electronic Journal や Heliyon に掲載することで、国際レベルで新しいスイーツの開発を報告することができた[4,5]。現在、更なる販売促進を計画している。

当初の目標を概ね達成できたと考えている。大学の一研究室が知財をもとに商品を開発し、販売にまで携わることができ、非常に嬉しく思っている。一方で、このような活動の遂行における問題点が見えたのも事実である。そして、新型コロナが活動の妨げになったのも記しておくべきことだろう。本件の助成期間中が全て新型コロナ禍であったが、無事に完遂することができたことは感涙の極みである。何

よりも、活動を通じての学生の成長は目を見張るものがあり、実学として同様な活動を続けることができるよう、シードとなる基礎研究も一層頑張りたい。

3. 謝辞

本件を助成いただいた公益財団法人日本農芸化学会に感謝を申し上げます。また、本件の完遂の原動力は、本学の学生として本件に携わってくれた皆様、株式会社ハートスマートクリエーツの皆様、藤堂ファームの皆様です。また、試料をご提供いただいた、株式会社山田養蜂場、赤穂化成株式会社にもお礼申し上げます。学内の様々な部署の皆様にもお世話になりました。末筆ながらお礼申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

1. 文部科学省. 食品成分データベース. (2022年3月閲覧)
2. Arii Y., Nishizawa K. (2020). *Heliyon*. 6, e03673.
3. 豆乳タンパク質凝集物の製造方法、およびそれを利用して蜂蜜のグルコン酸量および糖量を判別する方法 (国内) 特願2018-211706 (2018年11月9日), 特開2020-74735 (2020年5月21日). 発明者: 有井康博, 西澤果穂. 出願人: 学

校法人武庫川学院.

4. Arii Y. & Nishizawa K. (2022). SSRN Electronic Journal, 4046804.
5. Arii Y. & Nishizawa K. (2022). *Heliyon*. 8, e10454.
6. 有井康博, 西脇章, 獅子原里実, 西澤果穂, 佐野由倫. 日本農芸化学会2022年度本大会.
7. Nishizawa K., Sano Y., & Arii Y. (2021). *J. Apic. Res.*, Online published.
8. Arii Y., Sano Y., & Nishizawa K. (2021). *Heliyon*. 7, e07239.
9. 神戸新聞NEXT.「蜂蜜と豆乳で新スイーツ甘みあるのに低カロリー 武庫川女子大と神戸の食品会社開発」(2021年7月19日)
10. 朝日新聞デジタル.「豆乳×蜂蜜のスイーツ「豆蜂」武庫川女子大学などが開発」(2021年6月27日)
11. 大学プレスセンター.「特許申請中の新技術から生まれたスイーツ豆蜂（トーファン）発売へ」大学ニュース／先端研究 (2021年6月2日); 朝日新聞デジタルマガジン; 読売新聞オンライン; 毎日新聞; 紀伊民報; 沖縄タイムズ; 北海道新聞; 財経新聞; SankeiBiz; CNET Japan; AFP BB News; Sweets News clip; ZDNet Japan; ORICON NEWS; excite newsへの転載.
12. 有井康博, 新しいスイーツ トーファン（豆蜂）の開発. 武庫川女子大学栄養科学研究所第9回公開シンポジウム公演.
13. 有井康博. (2021). 新しいスイーツ トーファン（豆蜂）の開発. 栄養科学研究雑誌, 10, 15-18.

デーツ残渣を利用した高付加価値化ソース原料の開発研究

研究代表者 広島大学大学院統合生命科学研究科 三本木至宏
中小企業研究責任者 オタフクソース株式会社 吉田充史

1. 背景：企業からの説明

・背景、事業課題

オタフクソース株式会社（以下、当社）の主力商品であるお好みソースの原料は、ナツメヤシの実、デーツである。デーツはミネラル分を多く含むなど栄養面で優れた原料である。当社では、デーツから皮や種を取り除いてピューレとし、それをソースの原料に用いている。これまで、その残渣はコストをかけて廃棄していたが、持続可能な食生産の考えからデーツ残渣の有効利用法を探っていた。

・大学との連携研究の具体的な内容

当社は、これまで廃棄していたデーツ残渣の利用、およびその高付加価値化を図るために、デーツ残渣およびデーツそのものの微生物発酵に関する研究が必要と考え、関連研究が実施可能な、広島大学の三本木至宏先生（研究代表者）および山本祥也先生に相談し、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

大学との連携研究を実施した結果、①デーツ残渣を乳酸

菌、*Levilactobacillus brevis* によって発酵させてGABA (gamma aminobutyric acid) を高生産する際に必要な酵素遺伝子の発現調節（下記4の論文1）、および②GABAを含むデーツ残渣発酵物による免疫賦活作用（下記4の論文2），に関する知見が得られた。特に②に関しては、デーツ残渣発酵物のみならずデーツ残渣を用いても同様の結果が得られている。これは、デーツ残渣の有効性を示すものであり、当社が近年注力しているデーツの販売促進事業に活かしたい。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

本事業開始前から広島大学と当社との共同研究が始まっていた（2016年に包括連携締結）。その過程で、デーツ残渣に乳酸菌を作用させることで、GABAの含量が対照実験の20倍近く増える条件を見出していた（Hasegawa *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2018）。さらに、関連する特許も出願・取得した（特許第6860150号、「GABA含有組成物の製造

方法、及びGABA含有組成物を含む食品」). 以上の実績を踏まえて本連携研究を進めた.

・研究の詳細

我々は、デーツ残渣を培地に用いて *L. brevis* が GABA を生産することをすでに見出している (Hasegawa *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2018). そこで、本連携研究では、まず将来的に微生物生菌体ではなく酵素製剤による GABA 生産の可能性を探るために、GABA 合成を触媒する酵素 Gad に関する知見を得た。具体的には、*L. brevis* ゲノムにコードされている 2 種の Gad のうち GABA 生産には GadB の寄与が大きいことを示すことができた (下記 4 の論文 1).

さらに、GABA には免疫抑制作用が見出されているため、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いて GABA を含むデーツ残渣発酵物による抗炎症作用を検証した。ところが、デーツ残渣発酵物はリボ多糖誘導性炎症応答を増大させたことより、抗炎症特性を見出すことはできなかった。次に、マウス脾臓細胞を用いてデーツ残渣およびデーツ残渣発酵物による免疫調節作用を解析したところ、病原体の排除や抗腫瘍作用に寄与する腫瘍壞死因子、TNF- α の產生を誘導することを見出した。また、TNF- α 產生はデーツ残渣発酵物においてより強く誘導され、この作用は GABA 受容体阻害剤を用いることで抑制されることを見出した (下記 4 の論文 2).

・考察と展望

本研究成果の論文 2 では、デーツ残渣およびデーツ残渣

発酵物が免疫賦活作用を有することを見出すことができた。また、発酵過程で生じる GABA がデーツ残渣の免疫賦活作用を向上し、デーツ残渣発酵物の強力な免疫賦活作用の発現に関与することを明らかにした。これらの結果より、デーツ残渣を乳酸菌で発酵することで、より強力な免疫賦活作用を示す、付加価値の高い食品素材の開発に成功した。今後は、免疫賦活作用を示すデーツ残渣中の成分の同定やこれら成分が GABA と相乗効果を示すかどうかを検証する予定である。

3. 謝辞

本研究を実施するにあたり、第2回中小企業産学・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感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

1. Hasegawa, M., Fujii S., Funato, K., Yoshida, A., Sambongi, Y. Expression of two glutamate decarboxylase genes in *Lactobacillus brevis*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 84, 1069–1072 (2020).
2. Hattori, K., Yamamoto, Y., Fujii, S., Kumrungsee, K., Hasegawa, M., Yoshida, A., Suzuki, T., Sambongi, Y. Fermented date residue extract mix containing gamma-aminobutyric acid augments the immune function of mouse splenocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 85, 1753–1758 (2021).

あまおう由来乳酸菌と沖縄もずくフコイダンの腸内フローラ改善効果

研究代表者 九州大学大学院農学研究院システム生物工学講座・教授 中山二郎
中小企業研究責任者 株式会社ヴェントゥーノ商品開発部・部長（現取締役）柴崎哲哉

研究概要

近年、食の健康機能として、腸内細菌を介するものが注目を浴びている。つまり、食成分が、数百種の腸内細菌コンソーシアムの機能に介入し、その健康効果を引き出すのである。本申請研究では、我々共同研究グループがその機能性に多大なる期待を寄せている、福岡県産いちご「あまおう」より分離された *Lactobacillus plantarum* AMAOU (あまおう乳酸菌) と、すでに健康食品としての効果が数多く取り上げられているフコイダンについて、腸内フローラを介する健康効果の発掘を目指し、実験動物への摂食試験によって新たな、腸内環境改善と各種免疫系向上作用を調査した。

研究背景・目的

人の腸内には、数百種、数十兆個の細菌が生息しており、それらは食物残渣を強力に発酵し、増殖を繰り返している。そして、その菌体成分は腸管免疫系を刺激し、代謝物は体内に吸収され全身免疫系や代謝恒常性に介入する。特に、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸は、腸内細菌の発酵代謝物の主産物で一日の生産量が 10 グラムに及ぶが、腸管細胞のエネルギー源となったり、宿主細胞の受容体に作用するホルモン様の機能を介して、免疫寛容を誘導したり、宿主細胞のエネルギー消費を活発化したりする重要な働きを担う。同時に腸内細菌の生産するポリアミンが宿主の寿命延伸効果を示すことも知られ注目されている。一方、発ガン性を有する二次胆汁酸や硫化水素、動脈硬化に関わるトリ

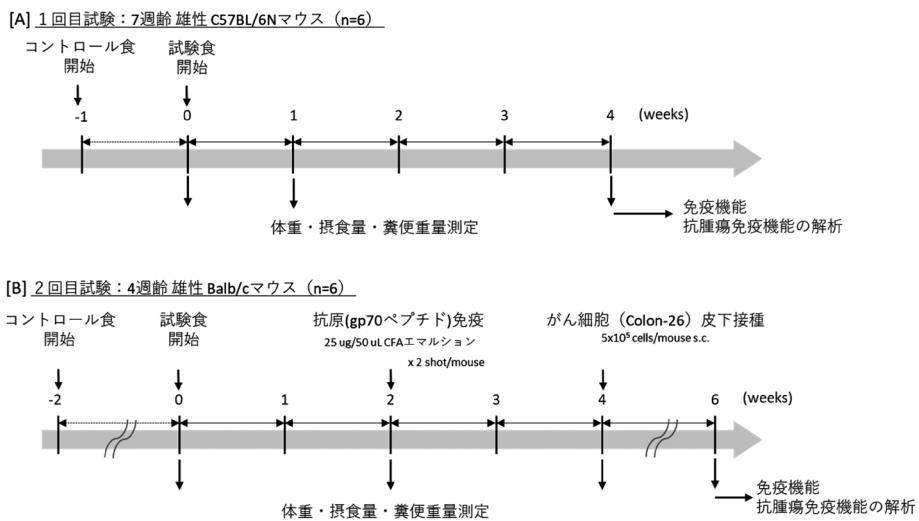


図1. 摂食試験プロトコール.

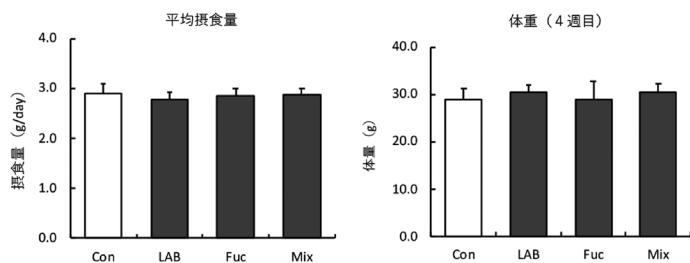


図2. 平均摂食量および体重.

メチルアミンなどの有害物質も腸内細菌により生産される。近年の腸内細菌分野の研究の進展から、これらの腸内細菌の功罪に関する情報がいっそう明確になってきており、腸内環境を如何に改善し、如何に健康効果を得るか、健康科学を基盤に戦略を展開させることも夢ではなくなってきた。

そのような中、我々は、2つの食品素材に着目し、腸内フローラへの影響を解析し、健康効果を検証することにした。一つは福岡特産のイチゴである「あまおう」から分離した乳酸菌 *L. plantarum* AMAOU（以下あまおう乳酸菌と称する）である。あまおう乳酸菌のような植物から分離される乳酸菌は、乳製品などから分離される乳酸菌とは異なる性質を示すことが多く、漬物などの乳酸発酵野菜を古来より摂取してきた日本人にとって、腸内フローラにおける相性も良いものと期待されている。実際、あまおう乳酸菌は加熱死菌体を用いた *in vitro* 試験において、有益菌であるビフィズス菌の増殖推進効果や有害菌であるウェルシュ菌の増殖抑制効果が示されており、さらには、マクロファージ様細胞株の活性化作用があることも示されている。もう一つは、オキナワモズク (*Cladosiphon okamurae*) に多く含まれる高分子多糖のフコイダンである。フコイダンはこれまでにその健康効果が注目され、抗腫瘍作用や免疫賦活作用など多くの健康効果を示す研究データが

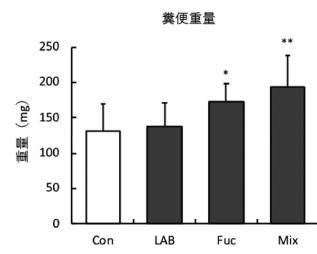


図3. 粪便重量.

蓄積されている食品成分である。また、日本人は世界でも珍しく、海藻の食文化が豊富な国で、日本人の腸内には海藻の多糖成分を分解する細菌が多いことも知られている。腸内フローラを介する食の健康効果については世界中で多くの研究が展開されているが、ここでは、これらの日本人に大変馴染みの深い二つの食品成分に着目し、腸内フローラを介したその健康効果について動物への摂食試験による各種免疫パラメーターの変動を中心に検証することにした。

方法

(1) 動物試験デザイン

動物試験は2回行った。1回目は7週齢雄性C57BL/6Nマウスを用いた。2回目は4週齢雄性Balb/cマウスを用い

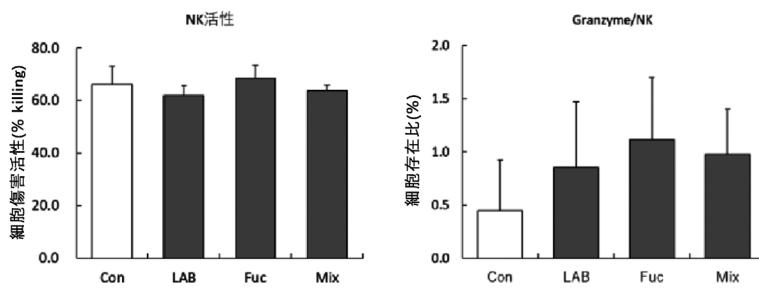


図4. 脾臓NK細胞における細胞傷害活性およびグランザイム産生NK細胞の存在比.

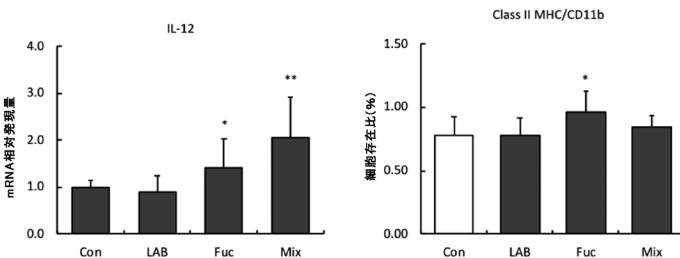


図5. 腸間膜リンパ節細胞における細胞性免疫関連指標の変化.

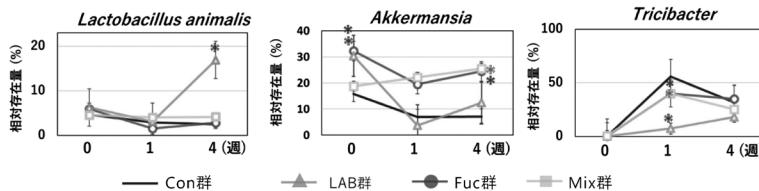


図6. 1回目動物試験における便中 *Lactobacillus animalis* と *Akkermansia* と *Tricibacter* の存在量の変化.
*: p<0.05 (Steel test)

た。これらの動物試験のスケジュールの概要は図1に示している。

1回目の試験では、被験試料には、あまおう苺果実より単離された乳酸菌株*L. plantarum* AMAOUの加熱死菌体粉末 (1.0×10^{11} 個/g相当) およびオキナワモズクより抽出されたフコイダンの乾燥粉末を用いた。摂食試験では、AIN-93G精製粉末飼料をコントロール食として用い、各被験試料を2%重量添加して試験飼料とした。摂食試験に供した7週齢雄性C57BL/6Nマウスは、日本チャールズリバーソリューションズ社より購入した。一週間の馴化飼育の後、試験群として、コントロール群(Con)、あまおう乳酸菌(LAB)群、フコイダン(Fuc)群およびあまおう乳酸菌+フコイダン(Mix)群を設け、各群6頭ずつを1つのケージで飼育し、図1に示すプロトコールに従って試験食を自由摂食させた。

2回目の試験は、同様に、日本チャールズリバーソリューションズ社より購入したBalb/cマウスを用いた。コントロール食による2週間の馴化飼育の後、実験食を6週間にわたって与え、2週目にがん抗原接種による免疫処置を行った。さらに、4週目にがん細胞を皮下接種し、6週目にマウスを屠殺した。

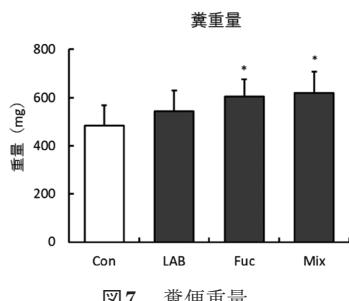


図7. 粪便重量.

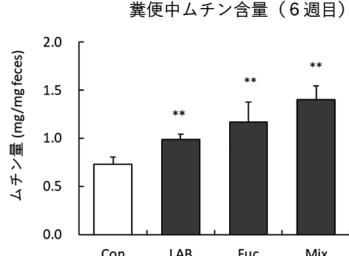


図8. 粪便ムチン含有量.

(2) 粪便細菌叢解析および免疫・生化学解析

1回目の試験では、コントロール食による1週間の馴化飼育の後、各群0, 1, 4週目の3点で糞便を回収し、糞便中

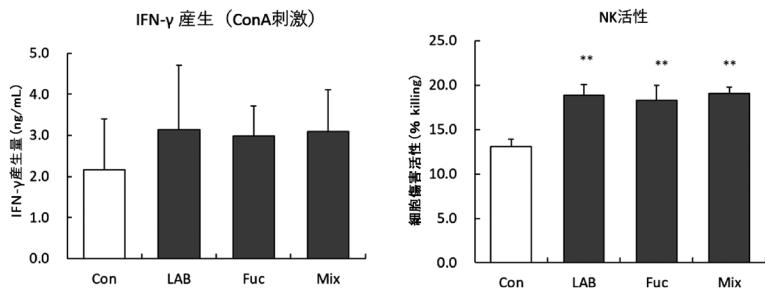


図9. 脾臓細胞における IFN- γ 産生および NK 活性.

細菌の 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を行うことで腸内細菌叢解析を明らかにした。4週目に解剖し、各種免疫パラメーターを測定した。

2回目の試験では、摂食期間中の腸内細菌叢の改善効果について、各群0, 2, 4, 6週目の4点で糞便を回収し、上記同様糞便中細菌の 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を行うことで腸内細菌叢解析を明らかにした。さらに、6週目の糞便中ムチン量の測定も行った。そして6週目に解剖し、各種免疫パラメーターを測定し、各摂食群における抗腫瘍ワクチン効果の比較評価を行った。

結果：I. 1回目試験

1. 飼育状況

図2に示す様に、各群の飼料摂取量および体重は、群間でわずかに異なるものの、有意差は認めなかった。1日平均摂取量 (2.9 g) から算出されるあまおう乳酸菌およびフコイダン摂取量は約 60 mg/day、体重 (25~30 g) 換算で 2000~2400 mg/kg/day であり、本試験条件において、マウスの行動や外見に異常（有害事象）は認められなかった。一方、糞便の平均重量は、Con群と比較して Fuc群および Mix群で有意に高値を示した（図3）。

2. 免疫指標の変化

全身性の免疫細胞が集まる脾臓から分離した細胞の免疫活性を測定した結果、特に顕著な影響は認められなかったものの、Con群と比較して Fuc群および Mix群でグランザイム産生NK細胞の存在比の上昇傾向が観察された（図4）。また、腸管免疫に関わる腸間膜リンパ節細胞では、細胞免疫の活性化指標となるサイトカイン IL-12 の発現レベルがフコイダン摂取によって上昇しており、腸管免疫系のマクロファージや樹状細胞が活性化していることが示唆された（図5）。

3. 粪便細菌叢の変化

腸内フローラの解析を行った結果、LAB添加食群において、プロバイオティクス作用が知られる *Lactobacillus animalis* が4週目で高値を示した。また、抗肥満・抗糖尿

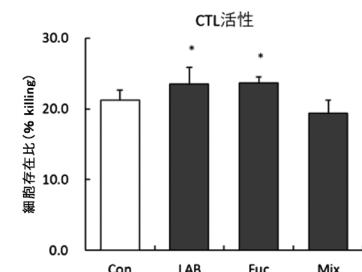


図10. 脾臓細胞における CTL 活性.

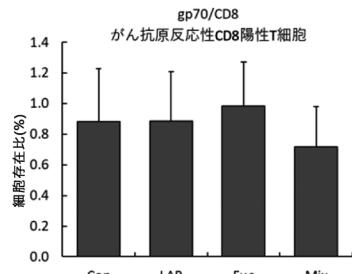


図11. 脾臓細胞におけるがん抗原特異的T細胞の割合.

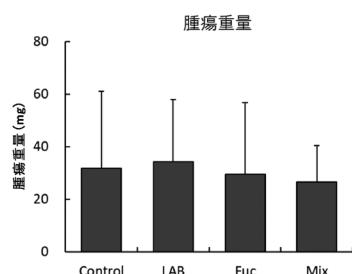


図12. 皮下移植がん細胞による腫瘍形成.

病作用やがん治療との相関性が報告されている *Akkermansia* は、フコイダン添加食群、MIX群において一定して高い割合で存在していた。

Turicibacter は肥満マウスに多いことや腸内細菌叢の乱れに関与するといわれている。本菌は特に一週目で、LAB群、Fuc群、Mix群で低値を示した（図6）。

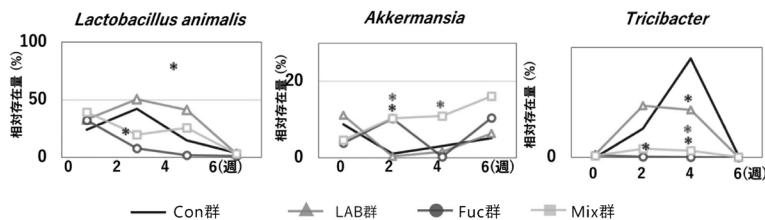


図13. 2回目動物試験における便中 *Lactobacillus animalis* と *Akkermansia* と *Turicibacter* の存在量の変化。
 *: p<0.05 (Steel test)

II. 2回目試験

1. 飼育状況

1回目の試験と同様に、飼料摂取量および体重に群間での有意差は認められず、1回目の試験とほぼ同じ測定値が得られた。また、マウスの外見上の異常は認められなかった。

2. 腸内環境指標の糞便重量（図7）は1回目試験と同様、Fuc群およびMix群でCon群に比べ有意に高値が示された。また、糞便中のムチン含量は、全ての試験食群でCon群より有意に高値を示し、特にフコイダンおよび併用摂取により増加することが示された（図8）。

3. 免疫指標の変化

図9に示すように、脾臓細胞において抗腫瘍免疫の増強に働くサイトカインであるインターフェロン (IFN)- γ の産生があまおう乳酸菌およびフコイダンの摂取によって亢進する傾向にあり、それに付随するNK細胞の活性化が観察された。また、がん抗原ワクチン効果に対する影響の評価項目については、細胞傷害性T細胞（CTL）のがん細胞殺傷活性がLAB群およびFuc群で有意に上昇し（図10）、Fuc群ではがん抗原gp70反応性T細胞が増加する傾向が観察された（図11）。加えて、これらがん特異的免疫細胞の活性化と厳密な相関関係は無かったものの、フコイダンを摂取した試験群において腫瘍形成が抑制される傾向が認められた（図12）。

4. 腸内細菌叢の変化

腸内フローラの解析を行った結果、LAB群においては、4週目に *Lactobacillus animalis* の有意な増加が見出された。また、Fuc群、Mix群においては、*Akkermansia* の増殖がみられた。さらに、すべての添加群において肥満マウスに多いとされる *Turicibacter* の減少が見出されたが、特にその傾向はMix群で顕著に見られた（図13）。

また、6週目に腸管バリア機能の指標である糞便中ムチン量と各細菌との相関解析を行った結果、*Turicibacter* とムチン量との間に負の相関が見られた（図14）。さらに各免疫指標と各細菌間の相関解析を行った結果、同じく *Turicibacter* とNK活性との間に負の相関が見られた（図15）。

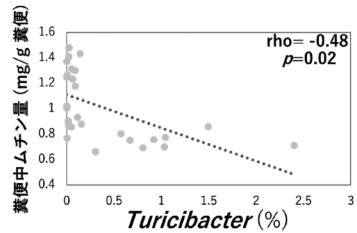


図14. 粪便中ムチン量と *Turicibacter* 存在比との相関解析。

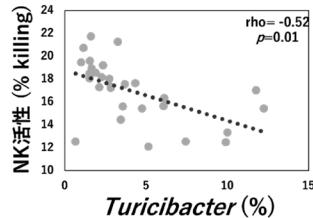


図15. NK活性と *Turicibacter* 存在比との相関解析。

考察

今回の試験では、あまおう乳酸菌およびオキナワモズクフコイダンを摂取したマウスにおいて糞便重量および糞便ムチン量の増加が観察され、各成分単独そして特に両者を併用摂取することで、便通の増加や腸管バリア機能の強化など腸内環境の改善に寄与する可能性が示された。

一方、免疫機能に関する評価においては、C57BL/6マウスとBalb/cマウスの2系統で全く同一の結果ではなかったものの、オキナワモズクフコイダンの摂取に伴うNK細胞の活性化亢進は共通して観察された。また、Balb/cマウスを用いた2回目の試験では、フコイダンだけでなくあまおう乳酸菌でも細胞性免疫の増強効果が認められた。以上の結果から、両食品成分は、免疫機能の増強を介して、がんやウイルス感染に対する生体防御能の向上に寄与することが期待された。

腸内細菌叢の変化は、別系統のマウスを用いたにもかかわらず、2回の実験で共通した傾向が見出された。まず、*L. plantarum* AMAOU添加食（LAB）群、フコイダン添加食（Fuc）群、およびその両者を同時に添加したMix群すべての群において、肥満マウスに多いとされる *Turicibacter* の減少が見られた。*L. plantarum* AMAOUでは、

同じく乳酸菌である *L. animalis* が増加した。フコイダン添加食群および *L. plantarum* AMAOU+フコイダン両添加食（Mix）群においては、抗肥満・抗糖尿病作用やがん治療との相関性が報告されている *Akkermansia* が増加した。さらに *Turicibacter* は腸内環境健康指標であるムチンと負に相関し、自然免疫の指標である NK 活性とも負に相関していた。以上のことから、*L. plantarum* AMAOU およびオキナワモズクフコイダンの腸内環境改善効果とそれに伴う免疫増強効果が示された。腸内環境の改善と腸内細菌叢の変化および各種免疫系の変動の間の関連性については、さらなる研究を行いより詳細に、可能であれば分子レベルで調査していく必要があると考えている。

参考文献・学会発表：

1. 宮崎義之, 中溝公次, 柴崎哲哉, 「いちご果実由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AMAOU を用いた食品素材の開発と機能評価」食品と開発, 2019, 54, 73-75.
2. 篠田あかり, 朴俊夏, 中野勇人, 柴崎哲哉, 宮崎義之, 中山二郎, 「免疫機能及び腸内環境に及ぼすあまおう乳酸菌およびフコイダンの摂食効果」, 2021年度日本農芸化学会仙台大会

謝辞

本研究は、日本農芸化学会中小企業産学・産官連携研究助成金の援助のもとに行われたものです。厚く御礼申し上げます。

オートファジーを亢進する新たな加工食品素材の産業応用研究開発

研究代表者：早稲田大学人間科学学術院 原太一
中小企業研究責任者：株式会社天真堂 久保田拓海

1. 背景：企業からの説明

・背景、事業課題（本事業を行うに至った背景）

にんにくは3,500年前から中央アジアなどで栽培されており、有機硫黄化合物のほか、ビタミン、ミネラル、テルペノイド、フラボノイドなど多くの栄養素や機能性成分が含まれた健康食材である。そのため、にんにくは古来より様々な予防医学的效果が認められることが報告されている。さらに、アメリカ国立がん研究所が行ったがん予防に関する127種対の重要食材をリスト化したデザイナーフーズ計画において、もっとも予防効果を示す食材に挙げられている。また、にんにくには高い滋養強壮効果があることも報告されている。

オートファジーは細胞のリサイクリングシステムに働く細胞内システムであり、神経変性疾患やがん、生活習慣病の発症予防に加え、健康寿命の延伸や美容においても重要なシステムであることが明らかになってきている。

・大学との連携研究の具体的な内容

株式会社天真堂では、オートファジーに働きかける食品素材を開発できないかと考え、古くから健康食材として知られるにんにくに着目した。そして、独自の製法によりにんにくが持つ機能性を最大限引き出すための加工法の開発を行った。開発した素材がオートファジーに与える影響を検討する研究が必要と考え、研究実施可能な早稲田大学人間科学学術院原太一教授に相談し、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

にんにくの加熱発酵により、元々のにんにくにはほとんど認められないオートファジー活性化作用を有する加工食品を開発することに成功し、目的的健康・美容シーズを得ることができた。また、開発したシーズが受精卵の初期胚発生率を向上させることができた。今後は、オートファジーを標的とした健康食品や不妊治療のサポートに繋がるサプリメントを開発し、少子高齢化対策事業を展開したい。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

オートファジーは細胞内のリサイクリングシステムの一つである。研究代表者らは、オートファジーが神経変性疾患やがんなどの加齢に伴って発症する疾患を予防することを明らかにしてきた（Nature, 2006）。また、腸細胞や角化細胞においてオートフランクス（オートファジーによる分解量）を定量的に測定する細胞を樹立し、オートファジーを活性化する食品成分や天然化合物を同定するとともに、そのオートファジーへの作用メカニズムの解析を進めている。また、オートファジーの活性を受精卵において測定方法を開発し、オートファジー活性の低い受精卵の初期発生率が極端に低下していることを明らかにしている（Sci.Rep., 2014）。これらの研究実績や技術の蓄積を本事業に活用し、オートファジー活性を亢進する加工食品の作用メカニズムの解析と初期胚発生に対する影響についての連

携研究を進めた。

・研究の詳細

株式会社天真堂が開発したにんにく由来加工食品（6種）について、オートファジーフラックスを測定した。そのうちの酵母発酵加熱にんにく（ファジオと命名）が顕著にオートファジー活性を亢進することを見出した。また、その作用機序として、オートファジーの主要な誘導条件である栄養飢餓シグナル（mTORシグナル伝達経路の抑制）とは異なるメカニズムでオートファジーを誘導できることを明らかにした。さらに、ニュートリゲノミクス解析により、ファジオによるオートファジー制御に関与する転写因子を同定した。加えて、ファジオで処理した精子と受精した受精卵は細胞分裂の停止を回避し、マウス初期胚発生率を著しく向上させることを明らかにした。この研究成果を踏まえ、ヒト試験を開始している。

・考察と展望

【オートファジーの観点から】

これまでに、レスベラトロールやカテキンなどのポリフェノールがオートファジーを亢進することが報告されている。また、これらの食品成分は、mTOR経路を抑制することでオートファジーを誘導することが分かっている。一方、本事業で開発したにんにく由来加工食品は、健康上のリスクが生じうる栄養飢餓シグナルには影響せずにオートファジーを誘導できることが示され、健康上の大好きなメリットがあるシーズとなると考えられる。また、栄養飢餓を模倣したオートファジー亢進食品と一緒に使用することでの相乗効果も期待される。

【初期胚発生率向上の観点から】

最近の研究から、不妊の約50%の原因が男性にあること示されている。しかし、男性をターゲットにした不妊分野の取り組みは女性に比べ遅れているのが現状である。ファジオで処理した精子はマウス初期胚の発生率を著しく向上させることから、男性不妊治療のサポートに繋がる有用シーズになると期待される。また、これまでの男性の不妊治療については、精子の量や運動率・奇形率改善による受精率を向上させることが主流だったが、初期胚発生という新たなアプローチからの男性をターゲットとした不妊治療戦略が可能となると考えられる。

以上、本事業で開発したオートファジー活性や初期胚発生率を向上する加工食品を用いて、さらなるメカニズム解析を行うことで学術的意義の高い食品の機能性に関する重要知見を明らかにできると考えられる。また、少子高齢社会における健康問題や少子化対策に資する商品開発を行っていくことで、社会的意義のある応用研究が展開できると考えられる。

3. 謝辞

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。

4. 成果報告および参考文献

【原著論文】

1. 植物発酵液SW（低分子コラーゲン含有）の摂取が女性の美白・美肌に及ぼす影響と安全性の検証：非盲検試験
本藤和彦、山下慎一郎、鈴木直子、原太一、和泉達也
New Food Industry 62 (5) 311-324, 2020年5月
2. High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test.
Yoshizaki K, Asai M, Hara T
Nutrients. 12 ((7)) 2036, 2020年7月
3. 酵母発酵にんにくのマウスの受精と初期胚発生に及ぼす影響の検討
吉崎嘉一、矢野敏史、諸富勝成、久保田拓海、原太一
薬理と治療 48 (7) 1145-1150, 2020年7月
4. 植物発酵液SWのメラニン産生抑制効果に関する研究
及川哲志、原太一
薬理と治療 48 (7) 1151-1158, 2020年7月
5. ヒト線維芽細胞の酸化ストレス障害およびコラーゲン遺伝子発現に及ぼす植物発酵液SWの影響
矢野敏史、及川哲志、大畑佳久、本藤和彦、山下慎一郎、鈴木直子、原太一
薬理と治療 48 (7) 1159-1165, 2020年7月
6. Bilberry Anthocyanins Ameliorate NAFLD by Improving Dyslipidemia and Gut Microbiome Dysbiosis.
Nakano H, Wu S, Sakao K, Hara T, He J, Garcia S, Shetty K, Hou DX
12 (11) 3252, 2020年10月
7. Identification of Dietary Phytochemicals Capable of Enhancing the Autophagy Flux in HeLa and Caco-2 Human Cell Lines
Kohta Ohnishi, Satoshi Yano, Moe Fujimoto, Maiko Sakai, Erika Harumoto, Airi Furuchi, Masashi Masuda, Hirokazu Ohminami, Hisami Yamanaka-Okumura, Taichi Hara (共責任著者), Yutaka Taketani
Antioxidants 9 (12) 1193-1193, 2020年11月27日
8. Autophagy in Health and Food Science
Satoshi Yano, Jinyun Wang, Taichi Hara
Current Pharmacology Reports 6 (6) 335-345, 2020

年12月

9. 植物由来微生物およびヒノキ樽に生息する微生物がもたらす自然発酵による食品の機能性とその実態
本藤和彦, 馬場亜沙美, 原太一, 和泉達也, 吉田雄介
New Food Industry 63 (2) 93-152, 2021年2月
10. Electrolyzed Hydrogen Water Protects against Ethanol-Induced Cytotoxicity by Regulating Aldehyde Metabolism-Associated Enzymes in the Hepatic Cell Line HepG2.
Satoshi Yano, Jinyun Wang, Shigeru Kabayama, Taichi Hara
Antioxidants (Basel, Switzerland) 10 (5) 2021年5月19日
11. ZSWIM8 is a myogenic protein that partly prevents C2C12 differentiation
Fumihiko Okumura, Nodoka Oki, Yuha Fujiki, Rio Ikuta, Kana Osaki, Shun Hamada, Kunio Nakatsukasa, Naoki Hisamoto, Taichi Hara, Takumi Kamura
Sci Rep. 11 (1):20880, 2021年10月
12. シダ植物イワヒバ由来成分の表皮角化細胞に対する細胞増殖と紫外線ストレス保護作用の検討
関根結夏子・塩田阜希・矢野敏史・原太一
薬理と治療, 50 (4), 527-533, 2022年
13. Genome-Wide RNA Sequencing Analysis in Human Dermal Fibroblasts Exposed to Low-Dose Ultraviolet A Radiation
Jinyun Wang, Satoshi Yano, Kun Xie, Yoshihisa Ohta, Taichi Hara
Genes 13 (6) 974-974, 2022年5月29日

【学会発表】

1. ヒト線維芽細胞における植物発酵液SW のIII型コラーゲン発現誘導作用
牧野磨音, 及川哲志, 大畑佳久, 矢野敏史, 山下慎一郎, 本藤和彦, 原太一
第74回日本栄養・食糧学会大会, 2020年5月
2. オートファジーを活性化する新奇機能性食品の栄養シグナル非依存的分子機構と作用成分の解明
矢野敏史, 山越正汰, 太田智絵, 宇都拓洋, 坂井麻衣子, 大西康太, 原太一
日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会, 2020年11月
3. 栄養素応答シグナル mTORC2 を介したリソーム活性制御機構の解明
坂井麻衣子, 大西康太, 増田真志, 大南博和, 奥村仙

示, 原太一, 竹谷豊

第74回日本栄養・食糧学会大会, 2020年5月

4. 新規機能性食品による mTORC1 シグナルに依存しないオートファジーの活性化機構と作用成分
矢野敏史, 山越正汰, 太田智絵, 宇都拓洋, 坂井麻衣子, 大西康太, 原太一
第74回日本栄養・食糧学会大会, 2020年5月
食品による栄養飢餓非依存性オートファジーの分子機構の解明
5. 線維芽細胞への UVA 照射は SASP 因子の発現増加により細胞老化を誘導する
田中千智, 稲川大地, 小田彩水, 松崎由葵, 青野茉, 前橋万里子, Wang Jinyun, 牧野磨音, 大畑佳久, 矢野敏史, 原太一
第46回日本香粧品学会, 2021年6月
6. オートファジーフラックスを亢進する食品成分の探索とその作用機序解析
大西康太, 矢野敏史, 藤元萌, 坂井麻衣子, 増田真志, 大南博和, 奥村仙示, 板倉英祐, 米村重信, 原太一, 竹谷豊
第515回日本農芸化学会関西支部大会, 2021年6月
7. 毛乳頭細胞の増殖と育毛関連遺伝子発現に対する海老名イチゴの機能性研究
謝涼晶, Wang Jinyun, 廣川隆彦, 宮内勇樹, 原園枝, 矢野敏史, 原太一
第26回日本フードファクター学会 学術集会, 2021年11月
8. D アミノ酸によるタンパク質代謝制御機構の解明
Wang Jinyun, 山越正汰, Xie Ku, 矢野敏史, 原太一
第26回日本フードファクター学会 学術集会, 2021年11月
9. アルコール性肝傷害における電解水素水による軽減作用のメカニズム解析
矢野敏史, Wang Jinyun, 横山繁, 原太一
第26回日本フードファクター学会 学術集会, 2021年11月
10. リソソーム分解系を亢進する食品成分の探索とその作用機序解析
大西康太, 坂井麻衣子, 増田真志, 大南博和, 奥村仙示, 大橋一登, 板倉英祐,
堀川一樹, 米村重信, 岩崎有作, 原太一, 竹谷豊
第94回日本生化学会大会・シンポジウム, 2021年11月
11. イワヒバの美容効果に関する機能性評価
塩田阜希, 関根結夏子, 矢野敏史, 原太一

- 日本農芸化学会2022年度大会, 2022年3月
12. シャルコー・マリー・トゥース病治療薬を志向した生薬成分の探索
牛之濱早紀, 山脇知実, 太田智絵, 原太一, 宇都拓洋
日本薬学会第142年会, 2022年3月
13. EGCG によって分泌される腸細胞由来エクソソーム内包タンパク質のプロファイリング解析
矢野敏史, 鈴木克彦, 原太一
第76回日本栄養・食糧学会大会, 2022年6月
14. オートファジー制御における細胞性粘菌由来の生物活性物質DIF-1 とその誘導体の機能解析
山田龍, 矢野敏史, 山越正汰, 菊地晴久, 久保原禪, 原太一
日本農芸化学会2022年度大会, 2022年3月
15. 細胞性粘菌由来の生物活性物質DIF-1 とその誘導体によるタンパク質代謝制御機構の解析
山田龍, 矢野敏史, 山越正汰, 菊地晴久, 久保原禪, 原太一
第76回日本栄養・食糧学会大会, 2022年6月
16. 皮膚の抗老化と UV 障害保護に関するイワヒバの機能性評価
塩田阜希, 関根結夏子, 矢野敏史, 原太一
第76回日本栄養・食糧学会大会, 2022年6月

17. スペルミンとスペルミジンバランスによるオートファジー制御機構の解析と機能性食品の開発
Xie Kun, 矢野敏史, 山越正汰, 太田智絵, 宇都拓洋, 坂井麻衣子, 大西康太, 久保田拓海, 原太一
第76回日本栄養・食糧学会大会, 2022年6月
18. 明日葉カルコンによるオートファジー制御機構の解析
王縉雲, Xie Kun, 矢野敏史, 原太一
第76回日本栄養・食糧学会大会, 2022年6月

【分担執筆】

- 原太一
ヘルスケア食品の開発におけるオートファジーの活用
FOOD Style21 2022年5月号, p. 85-88
- 原太一
アルコールによる管細胞障害を高濃度の「電解水素水」が軽減
週間エコノミスト 2021年8月号, p. 6-7

【その他】

- ・特許1件（取得）
- ・プレスリリース3件（2020年2件, 2021年1件）
- ・化粧品開発講演（2件）
- ・食品開発講演（2件）

日本酒のテロワールは何に由来するか

研究代表者 福島大学農学群食農学類 藤井 力
中小企業研究責任者 株式会社高橋庄作酒造店 高橋 亘

1. 背景：企業からの説明

ワイン業界で頻繁に使用される「テロワール」という言葉は、ワイン原料であるブドウが育った地域の気候や土壌、地形、水など、土地の特徴を表現するときに使われる。一方、日本酒では米づくりと日本酒製造は別々に行われるのが一般的で、日本酒のテロワールに関する研究はほとんど行われておらず、原料米の育った気候風土を日本酒と共にアピールすることはほとんどなかった。

当社は自ら栽培した米で日本酒製造を行う蔵の一つである。当社の純米吟醸「穣」という商品群は圃場違いの酒米を同一規格で製造した日本酒であるが、圃場ごとの個性があり、その理由について興味を持っていた。

平成31年、福島大学に食農学類が設置され、酒類製造に詳しい藤井教授が赴任、土壌の専門家の金子教授とともに理由解明のための研究を始めた頃に、藤井教授から声が

かかり、本助成金に共同で応募することとなった。

収穫や製造は年に一度きりで気候も毎年同一でないことから、日本酒のテロワールを完全に解明するには時間がかかるが、酒造りと米作りの関係の一端でも明らかになり、科学的根拠をもって純米吟醸「穣」の田んぼ違いの個性を説明することができるようになることを期待している。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

研究に関する背景

研究代表者藤井は酒類総合研究所という酒類に関する国の研究所出身であり、国税局や国税庁での酒類産業行政の実務経験もあり、酒類製造や微生物研究、官能評価法に関する経験があった。また、日本酒輸出の際、欧米を中心に日本酒のテロワールについて関心が高いことも知っていたが、入荷した酒米を目的の酒質に合わせるのが酒蔵の技術

といった考えから日本酒業界の関心があまり高くないことも知っていた。さらに、米の産業行政は農水省だが、酒類の産業行政は財務省（国税庁）が担っており、圃場の違いがどのように酒米に影響し、その酒米を使った場合にどのような酒質の違いが生じるかについて圃場から製成酒の酒質までを解析する研究はほとんど行われていなかった。

そのような中、研究代表者の藤井は福島大学金子教授と「農!と言える酒蔵の会」の設立総会に出席し、高橋庄作酒造店の「穀」という商品群では、圃場だけが異なる酒米を同一規格で製造した日本酒であるにもかかわらず、香味に明らかな違いがあることに気づき、この商品群を解析すれば、日本酒のテロワールとは何かという命題に近づけるのではないかと考えた。なお、「農!と言える酒蔵の会」は自家栽培を行う酒蔵が共同で酒造りと米作りの関係を解明することを目的に設立された組織である。

そこで、研究代表者の藤井から高橋庄作酒造店に声をかけ、本助成金に申請することを提案、連携して研究を行うことになった。本研究では、高橋庄作酒造店が各圃場の土壤の系統や施肥情報、田植え時期や出穂時期等の情報とともに、圃場ごとの原料米や麹、製成酒等を提供、藤井がそれらを分析し、その結果を情報交換することで連携しながら進めた。なお、使用酵母や温度経過等のノウハウや密度の高い情報も提供していただき、解析を進めた。

研究の詳細

実験方法等

ワインでは酒質に対する原料の影響が大きいが、日本酒では製造工程の影響が大きいことが知られている。特に製造工程（精米歩合や発酵経過等）や微生物（酵母や麹菌の種類）、もろみ中の成分（ミネラル含量等）が酒質に大きな影響を与える。酒質に影響を与える可能性がある工程と本研究の分析項目について図1にまとめた。なお、「穀」という商品群では、使用酵母は基本的には同じ、酒米も55%精米の五百万石と同じ、使用する水も同じ、製品のアルコール度数や日本酒度（酒の比重、エキス分等を反映する指標）も同じ規格となるよう発酵管理されており、それ以外の工程や成分等が影響を与える候補として考えられた。

酒米の田植えから製成酒の官能評価や分析結果がそろうまでは時間かかる。その年にできた酒米が製成酒となり分析や官能評価を行うまでに年度をまたがってしまう。初年度の製成酒分析では対応する米や麹が手に入らず、2年目の製成酒分析で、やっと米の栽培環境から製成酒の分析までがそろう。さらに、2年目で得られた栽培環境情報のある米で製造した製成酒の分析は3年目以降に行われることになる（図2）。

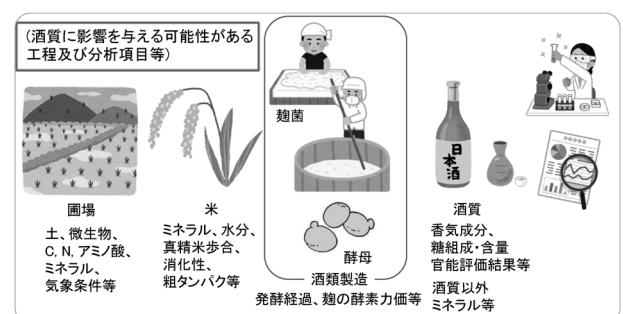


図1. 酒質に影響を与える可能性がある工程及び本研究で分析した項目等。

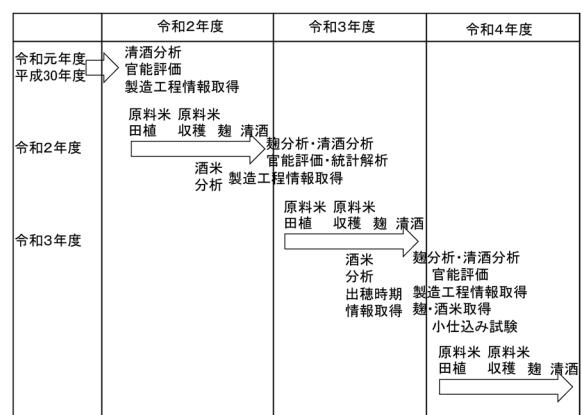


図2. 酒米栽培と製成酒製造・分析時期等と研究年度。
(令和2年度（2020年度）と令和3年度（2021年度）
が研究助成期間にあたる)

2019年の台風被害により2019年度産の酒米が壊滅的被害を受けたため、2020年度産の製成酒は1点しか入手することができなかつた。そのため、初年度（2020年度：令和2年度）はその時手に入った2019年度産の製成酒3点も含めて解析した。一方、2年目は2021年度産製成酒7点を入手でき解析した。これらの製成酒の原料米については2020年度に酒米統一分析法による分析も行った。なお、2年目に酒米の栽培温度の解析をした製成酒が上槽されたのは3月から4月にかけてであり、入手した7点は本助成金終了後の令和4年度に官能評価や解析することになる。

純米吟醸「穀」の商品群の圃場³⁾はいずれも近隣にあり、土壤は「荒久田統」か「関本統」のどちらかであった（表1）。荒久田統は「腐植土が厚く堆積してできた粘りのとても強い、黒色土壤。水持ちがよく養分に富む」土壤で、関本統は「阿賀川の流れで、砂礫上に泥土と腐植土が堆積した淡い黄灰色の土壤。保水力はやや低いが水はけがよい」土壤である³⁾。2019年に行った土壤分析の主な結果や圃場の特徴を、土壤の系統とあわせ表1に示す。

なお、有機栽培と書かれていない圃場は慣行栽培である³⁾。

表1. 入手した製成酒の土壌の系統、栽培法、圃場の土壌分析結果、圃場の特徴等。

商品	土壌	栽培法	土壤炭素	土壤窒素	Rock	圃場の特徴
花板境22	関本統		3.22 %	0.30 %	9.6 g	東西風抜けが良く、日照も充分
羽黒前27	関本統	有機	2.64	0.25	5.3	保肥力あまり高くない、柔らかく、四方風抜けの良い田んぼ
松原8	関本統		2.00	0.20	12.2	保水力はあまり高くない、南北風抜け良好、日照も長い田んぼ
羽黒西64	関本統	有機	1.99	0.19	5.6	保水力は高いが水は潤沢、四方風抜けの良い田んぼ
羽黒7	荒久田統		2.76	0.24	3.9	保水力の高い粘質の土で四方がひらけ、日照もやや長い
徳久118	荒久田統	有機	3.13	0.29	1.1	保水力高く、四方風抜け良好
羽黒46	関本統	有機	3.23	0.30	7.6	表土がとても細め細かく柔らか

2019年産製成酒と2020年度産製成酒の官能評価と分析結果について

本当に酒米の圃場ごとに酒質に違いがあるのか、仙台国税局鑑定官室の協力を得て5点法（評価が高いが1、低いが5）により6名で官能評価（味、香り、総合評価、コメント）を行った。その結果、それぞれの酒は評価やコメントが異なる結果となり、確かに酒質に違いがあることがわかった。総合評価を表2に示す。

製成酒の香気成分、有機酸、アミノ酸、グルコースについて成分分析を行った（表2）。有機酸はHPLC法で分析したが、ピルビン酸については酵素法で分析し直した。表2にはもろみ上槽時のアルコール濃度と日本酒度も示した。もろみ上槽時のアルコール濃度や日本酒度が大きく変わらないよう管理されて製造していることがわかった。

香気成分では酢酸イソアミル濃度に1.7倍、有機酸ではピルビン酸濃度に31倍、糖ではグルコース濃度に2.3倍の違いがあった。これらの違いは官能評価の結果に影響を与えておかしくない濃度の違いである。また、「松原8 2019」のコメントでは酵母の死滅が関与しているようなコメントがあり、アミノ酸組成分析でもメチオニンが多い等、発酵が進みすぎているため官能評価結果が悪かった可能性を考えられた。

そこで、2019年のもろみ経過簿を確認したところ、追水のタイミングや回数、品温経過に違いがあった（図3）。高橋庄作酒造店ではBMD曲線¹⁾とA-B直線¹⁾によりもろみを管理しており、上槽時に同じ成分（アルコール濃度や日本酒度）になるよう操作した影響が酒質に影響している可能性が考えられた。2019年の製成酒を比較すると、積算温度が低いほど、総合評価が高い結果となった（図3）。

もろみの温度経過に影響を与えるものとしては、原料米の消化性や麹の酵素力価、さらにK, Mg, P等のミネラル含量などがある。原料米の消化性は出穂後30日間の平均気温と相関が高い²⁾。品温経過や追水の頻度や量といった操作の違いが原料の違いによるものであれば酒米の性質の違いが影響した可能性があると考えられた。

なお、土壌の系統（関本統の羽黒前27及び松原8、荒久田統の羽黒7）では荒久田統の羽黒7でカプロン酸エチル

表2. 製成酒の官能評価結果及び分析結果。

	羽黒7 2019	羽黒前27 2019	松原8 2019	羽黒前27 2020
アルコール度数(%)	17.5	17.2	17.7	17.8
日本酒度	-2	-2.5	1	-3.5
官能評価結果	1.8	1.5	3.2	2.5
香気成分(ppm)				
アセトアルデヒド	24.9	22.5	18.5	21.2
酢酸エチル	133.8	117.5	109.7	116.7
nプロピルアルコール	91.8	94.9	94.1	83.9
iブチルアルコール	62.7	63.9	62.1	69.2
酢酸イソアミル	8.66	9.90	5.82	8.28
イソアミルアルコール	140.5	144.1	139.9	147.9
カプロン酸エチル	2.32	1.67	1.43	1.38
有機酸(ppm)				
クエン酸	110	106	104	112
ピルビン酸	47.2	90.3	2.9	37.2
リンゴ酸	174	187	139	187
コハク酸	353	342	317	335
乳酸	687	694	736	672
酢酸	42	45	46	35
グルコース(%)	1.6	1.2	0.7	1.1

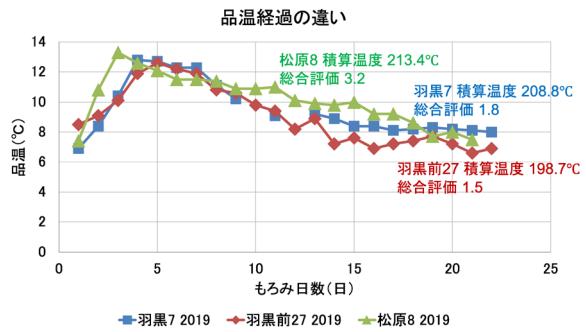


図3. 2019年製成酒の品温経過の違いと官能評価結果等。

濃度が高く、官能評価結果が高かったが、同じ羽黒前27でも年が異なれば同じ評価にならず、土壌の系統が酒質に与える影響は単純でないことが予想された。

2021年度産製成酒の官能評価と分析結果について

前年度と同様、製成酒の官能評価と成分分析を行った（表3）。官能評価は仙台国税局鑑定官室6名と藤井の計7名で行った。

仙台国税局鑑定官室の協力を得て5点法にて行った官能評価（味、香り、総合評価、コメント）の結果、それぞれの酒は評価やコメントが異なる結果となった。昨年度同様、圃場ごとの製成酒の酒質の違いがあることが明らかになった。7点の中では徳久114と松原8の官能評価結果が良好であった。

また、前年度に行った酒米分析結果のうち米の溶解性に関する主要な分析値やミネラルの含有量、麹の酵素力価分析等の結果を表4に示す。麹のP, K, Mgは仕込みに使用した55%精米におけるミネラル含量を評価するため測定した。—は麹の入手ができず、測定できなかったことを示す。

松原8の酒米分析結果としては糊化ピーク温度が低く、

表3. 高橋庄作酒造店が製造した「穢」の分析値等。

	羽黒 7	羽黒 4 6	羽黒前 2 7	羽黒西 6 4	花坂境 2 2	徳久 1 1 4	松原 8
総合評価	3.1	3.6	2.6	2.3	2.9	1.9	1.9
香り	2.6	3.6	2.4	2.4	3	2	1.4
味	3	3.4	2.4	2.3	2.9	2.1	2.1
もろみ日数	21	22	20	23	23	22	24
積算品温	199.4	177.0	169.8	209.0	215.5	185.9	207.4
平均品温	9.5	8.0	8.5	9.1	9.4	8.5	8.6
蔵元上槽時 アルコール	17.7	18.2	18.25	18.75	17.9	17.3	18
日本酒度	-1.5	0	-0.5	-1.5	-2	-1	-1
酸度	1.5	1.6	1.6	1.5	1.6	1.4	1.5
日本酒度	1.4	2.0	1.8	0.8	2.4	2.2	0.8
酸度 (mL)	1.7	1.5	1.7	1.5	1.6	1.5	1.5
アミノ酸度 (mL)	1.0	1.1	1.0	1.2	0.9	0.9	1.0
アセトアルデヒド (以下、ppm)	8.1	10.3	9.3	7.5	7.9	9.4	10.6
酢酸エチル	112.1	106.7	109.1	103.5	106.5	111.7	111.9
ノルマルプロビルアルコール	76.3	78.3	85.0	83.5	63.7	80.9	79.2
イソブチルアルコール	61.6	60.8	57.6	54.7	60.1	68.4	59.2
酢酸イソアミル	8.7	11.0	11.4	10.4	8.1	9.9	13.1
イソアミルアルコール	136.7	140.5	137.0	133.2	134.7	144.9	139.8
カプロン酸エチル	1.42	1.82	2.45	2.09	1.90	1.80	2.54
ビルビン酸 (ppm)	48	40	39	15	14	49	15
グルコース (%)	0.9	1.0	1.2	1.2	1.2	0.6	1.6

表4. 表3の製成酒に用いた酒米分析や気象データ、麹力価分析値等。

	羽黒 7	羽黒 4 6	羽黒前 2 7	羽黒西 6 4	花坂境 2 2	徳久 1 1 4	松原 8
みかけ精米歩合 (以下、%)	70.2	70.4	70.5	70.3	70.8	70.4	69.9
真精米歩合	75.2	75.0	76.5	75.7	75.2	76.7	76.0
碎米率	8.0	9.0	6.4	6.1	9.0	12.0	9.9
消化性brix	9.2	9.2	8.9	9.4	9.3	9.0	9.3
出穂後30日間の積算温度 (°C)	800.1	800.1	812.9	812.9	800.1	779.7	779.7
出穂後30日間の平均気温 (°C)	26.7	26.7	27.1	27.1	26.7	26.0	26.0
反収	9.1	8.6	8.4	8.2	9.2	9.0	9.8
糊化ピーク温度 (°C)	67.6	68.0	67.9	67.5	67.4	68.0	67.6
Pasting Temp (°C)	67.0	67.6	67.6	66.8	66.8	67.6	66.7
麹情報	黒判純吟 30g	黒判純吟 50g					
麹酵素活性 グルコアミラーゼ	135	150	145	161	181	155	153
αアミラーゼ	883	890	1,070	1,096	998	1,016	1,027
酸性カルボキシペプチダーゼ	1,845	1,797	1,864	2,431	3,251	2,313	2,011
麹のP	-	46.0	41.8	44.6	-	-	44.0
麹のK	-	42.7	43.2	41.8	-	-	39.8
麹のMg	-	3.6	2.8	3.3	-	-	3.2
カリウム (ppm/dry)	653.9	594.8	667.4	623.2	613.2	577.1	672.8

Pasting Temp が低く、消化性Brix が高く、比較的溶解性が高いことが考えられた。松原8の製成酒のグルコース濃度とカプロン酸エチル濃度・酢酸イソアミル濃度が高かった。一方、松原8の田植えは早く、出穂も7点の中では一番早かったが、出穂後30日間の平均気温は7点の中で一番低かった。出穂時期が遅くなれば、出穂後の平均気温は低くなるように思うが、この年は、7月中旬から8月中旬にかけて気温の低い時期があり、むしろ出穂の早い松原8の出穂後30日間の平均気温は低かった(表5・表6)。これらの結果は前年立てた仮説、すなわち原料米の溶解性や発酵の違いが酒質に影響を与えていたという仮説と一致する結果であった。

もう一つ官能評価結果が良好であった徳久114も松原8と同じ日の出穂で、出穂後30日間の平均気温は7つの圃場の中で一番低かった。酒米分析では糊化ピーク温度が高く、Pasting Temp が高く、消化性Brix が低く、比較的溶

解性が低いと考えられ、出穂後30日間の平均気温が低いことと矛盾する結果であった。製成酒のグルコースは低く、カプロン酸エチルや酢酸イソアミルも低めで酒米の溶解性は低いことが示唆された。原料米の溶解性が酒質に影響を与えていたという仮説とは一致したが、出穂後30日の平均気温から推測される溶解性とは一致しなかった。

気温は気象庁のアメダスで最も近隣の会津若松の気温を使用しており、実際に徳久114の圃場の気温データをとったわけではない。徳久114は、7つの圃場の中ではやや離れており、何かの要因により気温が低かった可能性を検証する必要がある。次年度はアメダスの数値ではなく、圃場の実際の気温を測定したい。

発酵に影響を与える別因子として、原料米が持ち込むミネラル含量がある。玄米と70%精白米のミネラル含量は測定していたが、仕込みに用いた55%精白米中のミネラル含量は測定していなかった。一部の麹は手元にあったこ

表5. 2020年の会津若松気温（気象庁アメダスより取得）。

7月26日	7月27日	7月28日	7月29日	7月30日	7月31日	8月1日	8月2日	8月3日	8月4日
24.9	24.5	22.8	22.1	23.3	22.3	24.4	25.1	25.5	26.8
8月5日	8月6日	8月7日	8月8日	8月9日	8月10日	8月11日	8月12日	8月13日	8月14日
27.7	28.1	25.5	23.4	24.9	27.9	29.3	26.6	27.3	26.4
8月15日	8月16日	8月17日	8月18日	8月19日	8月20日	8月21日	8月22日	8月23日	8月24日
26.9	26.5	27.3	26.9	26.2	27.6	27.8	27.7	26.7	27.3
8月25日	8月26日	8月27日	8月28日	8月29日	8月30日	8月31日	9月1日	9月2日	
27.2	28.2	29.2	30.1	29.5	28.3	24.7	25.4	27.6	

表6. 田植え時期と出穂日、稲刈り日、収量（俵/反）。

	田植え	出穂	稲刈り	収量（俵/反）
羽黒 7	5月20日	7月30日	9月6日	9.1
花板塊 22	5月20日	7月30日	9月6日	8.57
羽黒 46	6月2日	7月30日	9月15日	8.4
羽黒前 27	5月27日	8月3日	9月7日	8.2
羽黒西 64	5月27日	8月3日	9月15日	9.2
松原 8	5月16日	7月26日	9月8日	9.78
徳久 114	5月29日	7月26日	9月19日	9

とから、原料米の含量と大きく変わらないと考え、麹中のK, Mg, P含量を測定した（表4）。

測定できた4つの麹中のK, Mg, P含量には、発酵に影響を与えるほど大きな違いはなかった。4つの圃場から取れた原料米で製造した製成酒のもろみ経過には違いがあり、圃場が原料米中のミネラル含量に影響して品温経過を変えている可能性は低いと思われた。また、麹の酵素力価も大きな違いはないように思われた。

なお、令和3年に栽培した米や麹、製成酒も入手したが、これらの分析は現在行っている。また、入手した米や麹を用いて、温度経過を全く同一にした発酵試験を行う予定である。

考察と展望

日本酒の酒質に影響を与えるテロワールはあるのか、あるとしたら何が要因なのか解明するため、圃場違い以外はほぼ同じ条件、同じ規格で製造された高橋庄作酒造店の商品群純米吟醸「穀」について、土壤や栽培環境、製造工程、酒米や麹酵素力価、製成酒の分析や官能評価を行った。その結果、次のことがわかった。

1. 原料米品種や精米歩合等の製造条件や製成酒の一般成分値がほぼ同じで、気象条件もほぼ同じ近隣の圃場別に製造された製成酒であっても、官能評価結果や香気成分含量に違いがみられた。
2. 高橋庄作酒造店では、もろみ経過をBMD曲線やA-B直線を参考により変えており、今回分析の7つのもろみ経過にも違いがあった。品温経過の違いが酒質の違いの主因である可能性が示唆された。
3. 酒米分析の結果、消化性に違いがあることがわかった。消化性の違いが、BMD管理、A-B直線管理によるもろみ経過を変え、香気成分生成に影響し、官能評価結果が異なった可能性が考えられた。
4. 聞き取り調査の結果、圃場は近いが、田植え時期や出穂時期にも違いがあることがわかった。気象環境がほ

ぼ同じ近隣でも、出穂後の平均気温が酒米の消化性に影響を与えている可能性が考えられた。

5. 発酵に影響を与える可能性があるK, Mg, Pといったミネラル含量は土壤の系統が異なっても、もろみ経過に影響を与えるほどの違いはなかった。土壤中のミネラル含量の違いが原料米に影響し、発酵に影響した可能性は少ないと考えた。
6. 土壤の系統の違いでグループ化できるような違いは見られなかった。
7. 栽培方法（有機栽培か慣行栽培か）についてもグループ化できるような違いは見られなかった。

今回の解析結果からは、これまで言っていたように、微生物の種類や製造工程が酒質に与える影響が大きく、圃場ごとの違いはそれほど大きないと考えられる結果となった。一方、田植え時期の違いなどが原料米の溶解性に影響し、製成酒の規格（アルコール濃度や日本酒度）をそろえるために製造工程に違いが生まれ、酒質に影響を与えている可能性が示唆された。田植え時期により異なる気象条件の影響を受けることを考えると、同じ圃場でも年によって同じ傾向の酒質にならないことも理解できる。今後は気温データをアメダスから取得するのではなく、圃場ごとに取得し、より精緻な気温情報をもとに消化性との関係を調べたい。

なお、昨年栽培した原料米は発酵に影響を与えるミネラル含量に違いが見られた。土壤の系統だけでなく施肥情報とセットとすることにより、酒米が発酵に影響を与える可能性について解析したいと考えている。

おって、高橋庄作酒造店のような銘醸蔵であっても、麹作りや日本酒製造を全く同じように制御することは難しい。今後は栽培された酒米や麹を用いた小規模の製造試験によって解析することで違いがあるのかどうか解析したい。

今回は近隣の圃場で同じ仕込み水を用いて比較した。一方、全国で考えれば気候や田植え時期の違いは大きく、酒米の消化性には大きな違いがあると思われる。また、仕込み水のMg, P, Kは発酵の強さを通じて酒質に影響することが知られている。ワインの畠違いのような微視的なテロワールが酒質に与える影響は少ないかもしれないが、圃場の地理的位置、仕込み水の違いによる酒質の違いは十分にあり得る。

消化性の違いが香気成分に与える影響については、最近、酒類総合研究所の奥田が報告している⁴⁾。日本酒のテロワールに関する多くの研究により科学的解明が進むよう努力していきたい。

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深く感謝申し上げます。なお、本研究の進行にあたり、官能評価については仙台国税局鑑定官室武藤室長をはじめとする鑑定館室員の皆さま、土壤分析については福島大学の金子教授、酒米統一分析法による酒米分析については酒類総合研究所の奥田副部門長・高橋主任研究員と連携して行いました。また、香気成分分析やアミノ酸分析、有機酸分析等の機器分析にあたっては福島県ハイテクプラザの機器を借

用し、分析いたしました。ここに深く感謝申し上げます。

4. 参考文献

- 1) 日本醸造協会編：増補改訂最新酒造稿本（財団法人日本醸造協会、東京）p. 164-166 (1996)
- 2) 岡崎直人、君塚 敦、木崎康造、小林信也：醸協84 (11), 800-806 (1989)
- 3) <http://aizumusume.ala9.jp/jyo/jyo.html> (2022.6.28閲覧)
- 4) 奥田将生、上用みどり、包 紅彬、高橋 圭、磯谷敦子、向井伸彦、岸本 徹、神田涼子、飯塚幸子、伊豆英恵、藤田晃子、山田 修：醸協116 (12), 839-852 (2021)

水生植物成長促進剤としての共生微生物の事業化のための研究

研究代表者 北海道大学大学院地球環境科学研究院 森川正章
中小企業研究責任者 Green Earth研究所 杉浦 純

1. 背景：企業からの説明（※500字程度を目安に）

・背景、事業課題

水生植物ウキクサは、たんぱく質・カロチノイド・でんぶんを高含有するとともに、高い単位面積収率を有している。また、でんぶん部分は糖化することでバイオ燃料やバイオプラスチック原料にもなる。さらには、排水中のミネラルを肥料として吸収し生育できることから排水浄化作用を有するなど、循環型社会構築のための新たな起爆剤として期待されている。こうした優れた効果を有するウキクサの商用生産のために、生産コストが課題となっている。コストを下げる最もシンプルな方法は、収量の拡大である。

こうした中、研究代表者らが発見した成長促進細菌群を、ウキクサに接種することで、収量を2倍以上に増大することが確認されている。これらの細菌群の一部は、イネやレタスなどにも有効性が示されており、水耕作物に対する成長促進効果も期待できる。

・大学との連携研究の具体的な内容本研究では、成長促進細菌の最適な増殖条件等を確立するとともに、事業化に向けたスケールアップを目指す。この研究により、共生微生物を水生植物の成長促進剤として使うことで、収量を拡大し、生産コストを下げ、水生植物ビジネスを成長させる共通プラットフォームを提供することが可能となる。また、成長促進微生物の野菜植物工場への展開を見据え、外部企業委託による効果評価も行った。

・成果による事業への期待効果

(1) 有用微生物の最適培養条件の確立

生産コストの低コスト化を念頭にPGPB23の培養条件の検討を行った。

➢培養効率化を向上させる培養条件の確立

・低コスト化を実現させるために最も有用な方法はジャーファーメンターを用いた高密度化培養である。まず、初めにジャーファーメンターを用いて、フラスコを用いた培養よりも高密度化培養が可能であるかどうかの検証を行った。培地はフラスコでの培養と同様にLB培地（酵母エキス、バクトリップトン、食塩）を用いた。ジャーファーメンターの制御パラメータは培養液中の溶存酸素濃度が飽和濃度の50%を維持するように攪拌スピードを変動させる条件とした。

その結果、フラスコ培養に比べて、初期の比増殖速度は1.3倍に増大したが、菌体密度を示す濁度（OD₆₀₀）は同程度の結果となった。微生物の培養に使用されているLB培地では温度、pH、溶存酸素濃度を一定に保ち、好気条件を維持したとしても、高密度化が難しいと考え、高密度化培養が可能となる培地組成の検討を起こった。

➢高密度化培養を実現する培地組成の検討

高密度化培養を実現したとしても培地原料が嵩むとコストへの影響が軽微になってしまうため、培地の中でも、コストへのインパクトの大きいと考えられる酵母エキスやバ

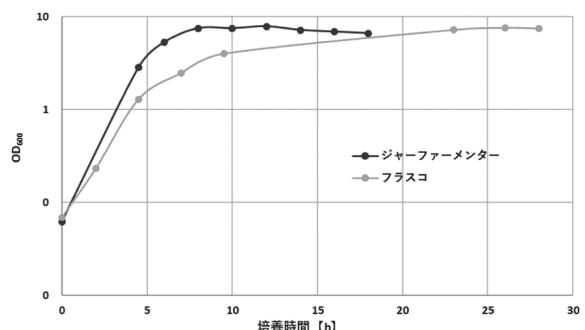


図1. フラスコとジャーファーメンターでのPGPB23増殖曲線。

クトトリプトンの代替品として、前者については、Corn Steep Liquor (CSL)，後者については、大豆ペプトンに代替えして培養試験を実施した。培養条件は前回と同様に培養液中の溶存酸素濃度が飽和濃度の50%程度を維持するように攪拌スピードを変動させる条件とした。培地組成は酵母エキス量を1/5倍に削減とバクトトリプトンの代替品の大豆ペプトンに変更した①酵母エキス+大豆ペプトン培地、さらに酵母エキスをCorn Steep Liquor (CSL)に変更した②CSL+大豆ペプトン培地の2種類で行った。

その結果、初期の比増殖速度はLB培地に比べて、①酵母エキス+大豆ペプトン培地と②CSL+大豆ペプトン培地はそれぞれ、0.94倍、0.83倍に低下していた。菌体密度を示す濁度(OD₆₀₀)は①酵母エキス+大豆ペプトン培地だと3.8倍に増加していたが、②CSL+大豆ペプトン培地は0.38倍に低下していた。

①酵母エキスと大豆ペプトン培地の1L当たりの培地原料は1/4程度あり、菌体密度を示す濁度(OD₆₀₀)は3.8倍、上昇していることから生産コストは単純計算でも15倍近くの削減に成功している。

以上、さらなる培地組成の検討より、現状以上の高密度化培養も可能であり、さらなる生産コストの削減が期待できる結果となった。

(2) 成長促進細菌群の用途拡大植物工場を製造販売する企業に3種類のウキクサ成長促進細菌について水耕野菜への影響評価を依頼した。その結果、PGPB23が通常の20倍に希釀した養液において、作物の成長を促進する効果が確認できた。これは将来、少ない養液で作物を生産できる可能性を示唆するものであり、環境低負荷農業の視点から興味深い結果と言える。一方、最終的な作物の収穫量(新鮮重量)は通常濃度の養液にくらべて約50%に留まったことから、実用技術としてさらに開発すべき課題も明らかとなつた。また、PGPB6その他1種の成長促進細菌については水耕野菜に有意な効果は見られなかつた。

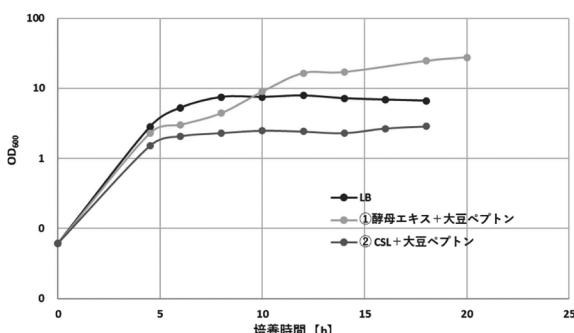


図2. 低コスト培地でのPGPB23増殖曲線。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景動物に限らず植物もまたその表層や内部に共生する微生物を保持している。動物と同様に微生物にとって、植物と共生することには光合成作用でつくりだされる栄養分を享受できる利点がある。一方、植物にとって病原菌は困り者であるが病原菌を排除してくれるものや、成長を助けてくれる作用をもった細菌も根粒菌をはじめ多く知られている。しかしここれまでの植物にまつわる共生の研究は食糧野菜や穀物あるいは樹木など土壌植物を対象とするものがほとんどであった。2010年私たちは、北海道大学植物園に自生しているアオウキクサの表層から植物の成長速度をおよそ2倍に加速する付着細菌(Plant Growth-Promoting Bacteria: PGPB23, 学名Acinetobacter calcoaceticus P23)を発見した[1]。すなわち、一旦無菌化したコウキクサなどのウキクサ植物にPGPB23を共生させると無菌コウキクサに比べて葉(葉状体という)の数がどんどん増える。あらかじめPGPB23を表層に付着優占化したコウキクサが下水二次処理水や河川水など環境水中において良好に生育し、野生コウキクサに比べてやはり2倍程度のコウキクサバイオマス生産速度や水質浄化速度を示すことをJST-ALCAプロジェクト研究において実証した[2, JPMJAL1108]。興味深いことに、その成長促進因子はさまざまな土壌微生物が生産するインドール酢酸やシデロフォアなどの低分子化合物とは異なっている。多くの外生共生細菌は植物表面などに付着する為の接着剤として細胞外多糖を分泌するが、PGPB23が分泌する細胞外多糖がウキクサ成長促進因子であり、これが植物細胞を刺激あるいは保護して成長促進していると考えている[3]。

・研究の詳細

PGPB23などの成長促進細菌を商品化するためには、その流通保管における保存性を評価しておくことは必須である。そこでPGPB23およびPGPB16について、凍結乾燥処理を行い長期間の常温における保存試験を行つた。保護液として、グルタミン酸ナトリウム3g, アドニトール1.5g, L-システイン-塩酸0.05g, 0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)/100mL溶液を用いて凍結乾燥した。その結果、初期細胞数 7.5×10^8 のPGPB23保存試料は、6ヶ月後において 2.2×10^8 の生細胞数を維持できることがわかつた。すなわち、輸送過程およびユーザーでの保管に冷凍庫や冷蔵庫が不要であることを意味する。一方、別のPGPB6保存試料は、初期細胞数 1.6×10^8 が2週間で 4.1×10^6 に大きく減少したもの、その後6ヶ月後では 1.9×10^6 であった。

・考察と展望

今回、PGPB23の生産コストを大幅に削減することに成功し、日本国内の発酵受託会社に生産委託した場合、培養

コストのみで 0.89 円/ 10^{10} と試算できた。

また、凍結乾燥細胞の常温保存安定性が十分に高いことを確認すると共に、野菜植物工場への活用可能性の兆しが認められた。今回は、研究計画期間内に製品化することはできなかつたが、いずれ共同開発が再開できることを期待している。本課題ではウキクサを対象とした研究開発は実施しなかつたが、低炭素化水処理プロセスのツールおよび安価有用バイオマスとしてのウキクサ効率生産への期待は大きい。昨年10月よりウキクサと最適成長促進細菌の組み合わせを切り札とした「タイ国・生物循環グリーン経済実現に向けたウキクサホロビオント*資源価値の開拓」と題した地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム：SATREPS を5年計画で開始している。*宿主生物と共に存

する微生物の総体。この事業には日本企業も参画しており、产学協働をさらに推進して実社会への貢献を目指したい。

3. 謝辞

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。

4. 成果報告および参考文献

1. 特許第5303176号「新規水草根圈微生物」
2. 特許第6429143号「植物成長強化剤及びそれを用いた植物栽培方法」
3. 特許第6800484号（WO 2017002929）「植物の生長を促進する方法、植物生長促進物質を製造する方法及びこれらに利用されるタンパク質」

5. 第48回研究奨励金報告書

第48回研究奨励金報告書

新規がん転移抑制剤の創製を目指した PPM1F 阻害剤の遊走・浸潤阻害活性の評価

広島大学大学院 統合生命科学研究科
秋月一駿

研究の背景と目的

細胞内シグナル伝達の根幹をなすタンパク質のリン酸化反応は、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼによって厳密に制御されている。したがって、これらの酵素の発現異常は細胞内シグナル経路を搅乱させ、結果的にがんをはじめとする各種疾患を引き起こす。

当研究グループが世界にさきがけて発見したホスファターゼ PPM1F (CaMKP/POPX2) は、近年、悪性がんとの関連報告が相次いでおり^{1,2)}、徐々に注目を集めつつある酵素である。特に遊走・浸潤能の高いヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231)において PPM1F は高発現しており、PPM1F のノックダウンにより MDA-MB-231 細胞の遊走・浸潤が顕著に減少することから¹⁾、PPM1F が乳がんの転移に関与することが示唆されている。

我々のグループは以前、PPM1F を *in vitro* で特異的に阻害する化合物として 1-amino-8-naphthol-4-sulfonic acid (ANS) と 1-amino-8-naphthol-2,4-disulfonic acid (ANDS) といった、いくつかのアミノナフトール系化合物を同定したが (図1)³⁾、つい最近我々は、これらの阻害剤の処理により MDA-MB-231 細胞の遊走が顕著に阻害されることを見出した。このことは本阻害剤が悪性乳がんに対する新規がん転移抑制剤になる可能性を示唆している。しかしながら現時点では、ANS や ANDS 処理によって細胞内在性 PPM1F が阻害されているかどうかは未だ明らかでない。そこで本研究では ANS、ANDS 処理による MDA-MB-231 細胞の遊走阻害が、内在性 PPM1F を特異的に阻害した結

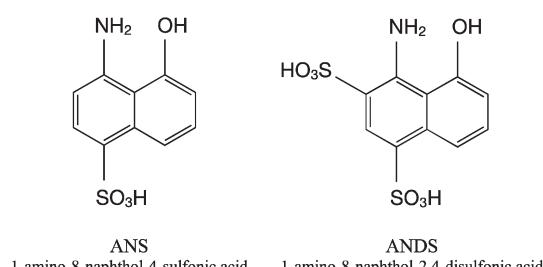


図1. PPM1F 阻害剤の構造。

果によるものかどうかを明らかにすることを目的に研究を行った。

これまでの研究経過

① ANS, ANDS 处理による CaMKI のリン酸化への影響評価

PPM1F の生理的な基質として考えられるタンパク質としてはプロテインキナーゼである Ca^{2+} /カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK)、p21活性化キナーゼ (PAK)、細胞接着タンパク質であるインテグリンなどが挙げられる。そこで本研究では、MDA-MB-231 細胞に CaMK の一つである CaMKI を過剰発現させ、CaMKI のアチベーションループ内の Thr のリン酸化を検出するリン酸化部位特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、PPM1F 阻害剤の処理によって CaMKI のリン酸化レベルが亢進するかどうか調べた。その結果、未処理の場合 (DMSO) と比較して、 $30 \mu\text{M}$ の ANS, ANDS の処理により CaMKI のリン酸化レベルが亢進していることが判明した (図2)。特に ANS では統計的な有意差を持って、平均的に 3 倍以上のリン酸化の亢進が認められた。また PPM1F を阻害しない ANS の不活性アナログであるナフ

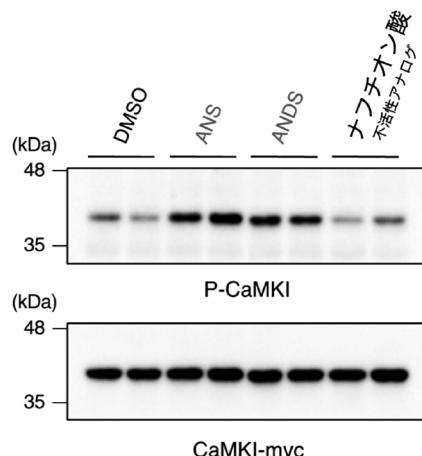


図2. 阻害剤処理による CaMKI のリン酸化への影響。

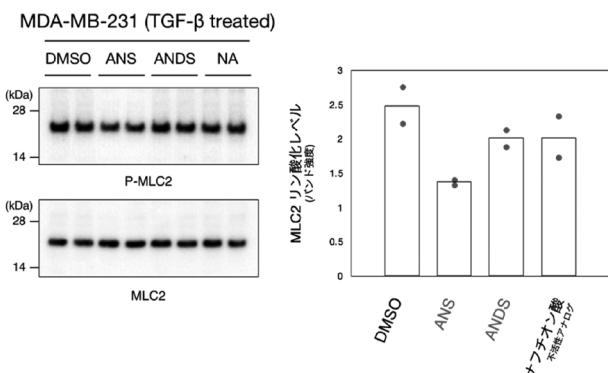


図3. 阻害剤処理による MLC2 のリン酸化への影響.

チオニ酸を処理した場合にはリン酸化CaMKI レベルの増加は見られなかった。このことから、PPM1F 阻害剤 ANS, ANDS は細胞内へと膜透過して内在性PPM1F を阻害したため、基質である CaMKI のリン酸化が高いレベルで維持されたと考えられる。このことは、ANS, ANDS 处理により見られた MDA-MB-231 細胞の遊走阻害が、内在性 PPM1F が阻害された結果であることを強く示唆する。

詳しい分子メカニズムに関しては不明だが、PPM1F を過剰発現／ノックダウンすることで、ストレスファイバーの形成に必要なミオシン軽鎖 (MLC2) のリン酸化がそれぞれ亢進／減少することが報告されている^{1,2)}。すなわち、PPM1F は MLC2 のリン酸化レベル亢進に寄与することが示唆されている。そこで本研究では ANS, ANDS の処理によって、細胞内在性 MLC2 のリン酸化が変動するかどうか検討した。その結果、ANS で処理した場合では MLC2 のリン酸化が減少傾向にあることがわかった(図3)。これが本当であるならば、PPM1F の脱リン酸化活性が MLC2 のリン酸化亢進に寄与することを示す初めてのデータとなる。今後は再現実験を行い、DMSO 処理と比較して統計的な有意差が認められるかどうか検証していく。

② MDA-MB-231 細胞に対する ANS, ANDS の毒性評価

ANS, ANDS は MDA-MB-231 細胞の遊走を顕著に阻害する。したがって、これらの阻害剤は乳がんの転移を抑制する薬剤開発のためのリード化合物になる可能性があるが、本阻害剤の細胞毒性については今のところ不明であった。そこで、PPM1F 阻害剤 ANS, ANDS の処理が MDA-MB-231 細胞に対して細胞毒性を示すかどうか、Cell

counting Kit-8 とトリパンブルー染色によって調べた。実験の結果、遊走阻害活性を示した 30 μM 程度の濃度では、ANS, ANDS は MDA-MB-231 細胞に対してほとんど毒性を示さないことが明らかになった。このことは、ANS, ANDS 处理による MDA-MB-231 細胞の遊走阻害が細胞毒性によるものではなく、内在性CaMKP を阻害した結果であることを補強すると同時に、これらの阻害剤が毒性の少ない転移抑制剤創製に向けたリード化合物になる可能性を示唆している。今後は CaMKP を恒常に発現している別の細胞等に対しても細胞毒性を示さないかどうか確認する必要がある。

まとめ

我々のグループが見出した PPM1F 阻害剤 ANS, ANDS は、細胞毒性なく乳がん細胞 MDA-MB-231 の遊走を顕著に阻害することが明らかになった。また本研究から、ANS, ANDS の処理により、MDA-MB-231 細胞に発現させた CaMKI のリン酸化レベルの亢進が認められた。これらの結果は、ANS, ANDS が PPM1F に作用することで、細胞内 PPM1F 活性が減弱され、その結果として細胞遊走が阻害されることを強く示唆する。今後、ANS, ANDS の特異性のさらなる向上に加え、細胞毒性、個体レベルでの毒性試験などのデータを得ることができれば、これらの阻害剤を基にしたがん転移抑制剤開発の新しい可能性を提供できると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜わ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) Jurmeister et al. (2011): MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. Mol. Cell. Biol., 633–651.
- 2) Luo et al. (2015): miR-149 represses metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting actin-regulatory proteins PPM1F. Oncotarget, 6, 37808–37823.
- 3) Sueyoshi et al. (2007): Inhibitors of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase family (CaMKP and CaMKP-N). Biochem. Biophys. Res. Commun., 363, 715–721.

植物における空気中のジャスモン酸メチルによる病害および虫害抵抗性の向上機構の解明

北海道大学大学院農学研究院
北岡直樹

背景および目的

植物は匂い物質とも言える揮発性有機化合物を用いて近傍の植物とコミュニケーションをとっている。この個体間コミュニケーション物質の一つにジャスモン酸メチル(MeJA)がある。MeJAは植物ホルモンであるジャスモン酸(JA)のメチルエステル体であり、病原菌や食植動物に攻撃された植物が放出した空気中のMeJAを近傍の植物が感知し、病原菌や食植動物に対する抵抗性を増強させ天敵の襲来に備えていると考えられている。しかしながら、MeJAはJA類の受容体であるCoronatine-Insensitive 1(COII)への結合活性を有さないことから、植物体内でMeJAは活性型へと代謝されていると予想される。本研究では、空気中より吸収したMeJAの植物体内における代謝機構の解明を目的として研究を行った。

研究結果および考察

まず初めに、半密閉容器内のシロイスナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の近傍に重水素標識したMeJAを吸わせたろ紙を置くことで、空気中より吸わせたMeJAの植物体内での代謝を調べた。その結果、JA、12-ヒドロキシジャスモン酸(12-OH-JA)、および12-ヒドロキシジャスモン酸イソロイシンの顕著な蓄積が見られた一方で、ジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)はほとんど蓄積しなかった(図1)。この結果より、空気中より伝播されたMeJAは、JAへの加水分解、12-OH-JAへの水酸化、そしてイソロイシンと

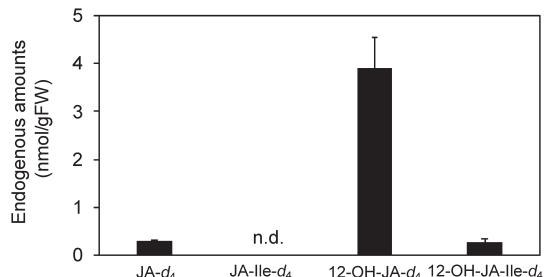


図1. MeJA-d₅を空気伝搬処理したシロイスナズナにおけるJA-d₄, JA-Ile-d₄, 12-OH-JA-d₄, および12-OH-JA-Ile-d₄の蓄積量。

の縮合を経て12-OH-JA-Ileへと変換されると仮説を立て(図2)、以降の研究を進めることとした。

これまで、CYP94ファミリーに属するシトクロムP450によって触媒されるJA-Ileの水酸化が唯一の報告のある12-OH-JA-Ile生成経路であった^{1,2)}。12-OH-JA-IleがJA-Ileを中間体とする経路では合成されないと明らかにするため、cyp94b1およびcyp94b3の機能欠損株に、空気伝播によりMeJAを処理し、処理後の植物体内における

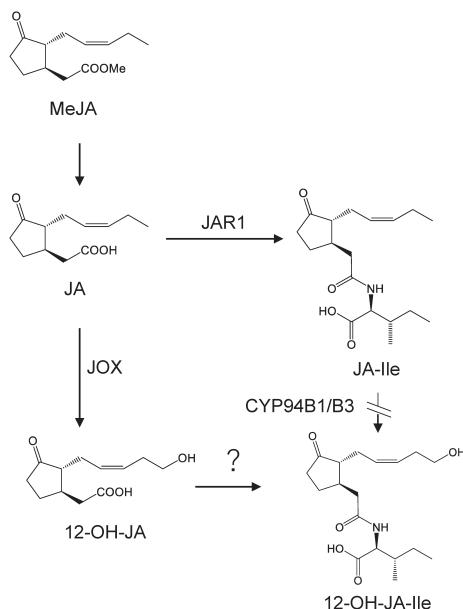


図2. 本研究で存在が示唆された空気伝播MeJAから12-OH-JA-Ileへの代謝経路。

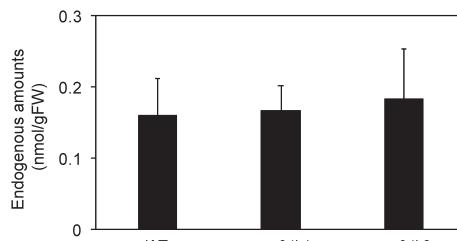


図3. MeJA-d₅を空気伝搬処理したシロイスナズナ野生株、cyp94b1機能欠損株、およびcyp94b3機能欠損株における12-OH-JA-Ile-d₄の蓄積量。

12-OH-JA-Ile の蓄積量を確認した。その結果、全ての変異株において野生株と同程度の 12-OH-JA-Ile の蓄積量が確認され（図3），現在知られている CYP94B1 および CYP94B3 による JA-Ile の水酸化を介さない経路によって 12-OH-JA-Ile が生成しているという仮説が支持された。

続いて、MeJA を空気伝搬処理した植物における JA 生合成・代謝に関わる遺伝子の転写量を調べた。その結果、JA と JA-Ile の水酸化に関わる *JOXs* および *CYP94B3* 遺伝子の転写量が著しく増加することが明らかとなった。一方で、JA から JA-Ile への変換に関わる *JAR1* 遺伝子の転写量の増加は緩慢であった。本結果も、空気中より吸収された MeJA が、植物体内で JA への加水分解、12-OH-JA への水酸化を経て、12-OH-JA-Ile へと変換されるという仮説に一致する結果である。

JA-Ile と同じく 12-OH-JA-Ile も COI1 へ結合するが、12-OH-JA-Ile の結合能は JA-Ile のものより低いことが明らかとなっている。植物は、「自身が病原菌や食植動物の攻撃されたときの高活性型の JA-Ile による強い防御応答」

と「近傍の植物が攻撃されそのシグナルを受け取ったときの低活性型の 12-OH-JA-Ile による抵抗性の増強」というように、高活性型と低活性型を巧妙に使い分けている可能性がある。JA-Ile を経由しない 12-OH-JA-Ile 合成経路の解明、さらには低活性型である 12-OH-JA-Ile の植物体内での生理作用を明らかにするために、12-OH-JA から 12-OH-JA-Ile への反応を触媒する酵素の同定、および、同酵素遺伝子の破壊株の表現型の解析を現在進めている。

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

- Koo, A. J.; Cooke, T. F.; Howe, G. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108, 9298.
- Kitaoka, N.; Matsubara, T.; Sato, M.; Takahashi, K.; Wakuta, S.; Kawaide, H.; Matsui, H.; Nabeta, K.; Matsuura, H. *Plant Cell Physiol.*, 2011, 52, 1757.

緑色光をエネルギー源とする環境調和を指向した 含酸素複素環合成法の開発

横浜国立大学大学院
田中健太

1. 背景・目的

フラボノイドに代表される含酸素複素環は様々な食品に含まれる栄養素の基本骨格として重要な化学構造であり、これまでに金属触媒や有機金属反応剤を利用した様々な合成法が開発してきた。一方で、金属試薬に由来する不純物は毒性発現の要因となることに加えて、希少金属の使用や金属廃棄物の処理にまつわる高コスト化等の解決すべき課題が残されており、反応工程における金属の使用を最小限に抑えた新たな手法を開発することは重要な課題である。

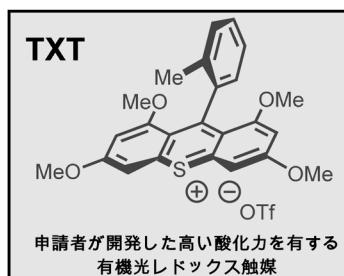


Fig. 1

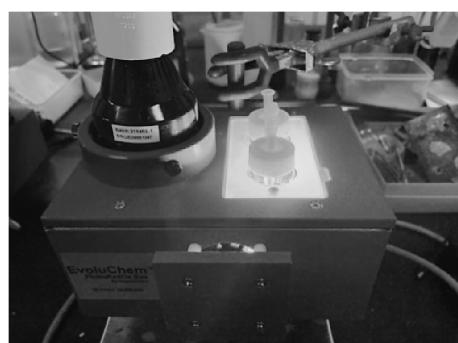
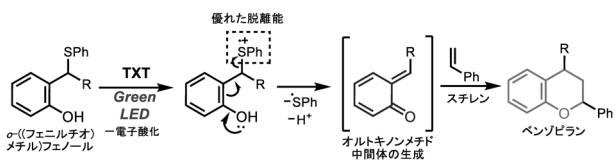
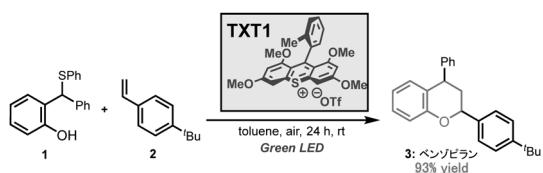


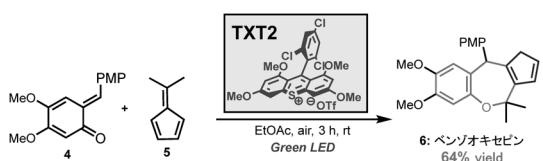
Fig. 2



Scheme 1



Scheme 2



Scheme 3

ドックス触媒の利用を通じて、金属試薬を用いない環化付加反応による含酸素複素環化合物の合成を実現することを目的として研究を行った。

2. 研究方法

20 mL バイアル管に基質、光レドックス触媒 (TXT 5.0 mol%), 溶媒を加え、Green LED を照射した。TLC を用い原料の消失を確認したのち、カラムクロマトグラフィーにより生成物を単離した。

3. 結果・考察

硫黄原子は酸化されやすく、それに伴って良い脱離基となることが知られている。そこで申請者は、高い酸化力を有する有機光レドックス触媒を用いることにより、*o*-((フェニルチオ)メチル)フェノール **1** の硫黄原子に対する一電子酸化反応を進行させることができれば、フェノールの酸素原子による電子供与を通じて硫黄原子の脱離反応が進行し、高い反応性をもつオルトキノンメチド中間体が生じるものと考えた (Scheme 1)。

そこで、TXT1触媒5.0 mol% 存在下、*o*-((フェニルチオ)メチル)フェノール **1** とスチレン **2** を基質として Green LED 照射を照射する条件において環化付加反応の検討を行ったところ、反応の進行が確認され含酸素複素環化合物

であるベンゾピラン **3** を収率93%で得ることに成功した (Scheme 2)。この結果から、高い酸化力を有する TXT によって *o*-((フェニルチオ)メチル)フェノール **1** の一電子酸化が進行し、短寿命活性種であるオルトキノンメチドが発生したと考えられる。

この結果に着想を得て、TXT2触媒5.0 mol% 存在下、オルトキノンメチド **4** とフルベン **5** を基質として利用した新たな環化付加反応を検討したところ、環員数の異なるベンゾオキセピン **6** を 64% で得ることに成功した (Scheme 3)。

4. 結言

本研究では申請者が独自に開発した有機光レドックス触媒と可視光を利用した種々の環化付加反応により、含酸素複素環化合物であるベンゾピランやベンゾオキセピンの金属試薬を使用しない合成手法を開発することに成功した。今後は本研究で確立した合成手法を用いることによりナリングエニンなどの様々な含酸素複素環を主骨格とする天然物の効率的合成法の開発を検討する予定である。

5. 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。

6. 発表論文

- Tanaka, K.; Asada, Y.; Hoshino, Y. A New Cycloaddition Profile for ortho-Quinone Methides: Photoredox-Catalyzed [6 + 4] Cycloadditions for Synthesis of Benzo[b]cyclopenta[e]oxepines. *Chem. Commun.* **2022**, 58, 2476–2479.
- Tanaka, K.; Kishimoto, M.; Tanaka, Y.; Kamiyama, Y.; Asada, Y.; Sukekawa, M.; Ohtsuka, N.; Suzuki, T.; Momiyama, N.; Honda, K.; Hoshino, Y. Moderately Oxidizing Thioxanthylium Organophotoredox Catalysts for Radical-Cation Diels-Alder Reactions. *J. Org. Chem.* **2022**, 87, 3319–3328.

7. 参考文献

- Tanaka, K.; Kishimoto, M.; Asada, Y.; Hoshino, Y.; Honda, K. *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 13858–13870.
- Tanaka, K.; Asada, Y.; Hoshino, Y.; Honda, K. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18, 8074–8078.
- Tanaka, K.; Iwama, Y.; Mami, K.; Ohtsuka, N.; Hoshino, Y.; Honda, K. *Org. Lett.* **2020**, 22, 5207–5211.

子宮内膜上皮細胞の分泌腺形態への分化を誘導する天然物の探索

香川大学農学部応用生物科学科
花木祐輔

研究背景・目的

子宮壁の最内層を構成している子宮内膜細胞は、エストロゲン刺激によって増殖し、続くプロゲステロン刺激によって分泌腺や脱落膜へと分化する。子宮内膜はこれらの変化によって受精卵の着床（妊娠）に備え、妊娠が成立しなかった場合には剥離して子宮外へ排出される（月経周期、図1）。子宮内膜細胞は、子宮筋層に浸潤したり、卵巢や腹膜などに転移したりすることで子宮腺筋症や子宮内膜症を引き起こす。本細胞は浸潤・転移後も増殖と剥離を周期的に繰り返すことから、月経期に強い痛みを引き起こして患者の生活の質を著しく低下させている。さらに、これらの疾患は罹患率が非常に高く、不妊症の合併例も多いことから社会的にも大きな問題となっている。

近年、子宮内膜に存在する幹細胞が上記疾患の発症要因の一つとして挙げられている¹⁾。未分化かつ再生能力が高い幹細胞が、子宮内膜以外の組織に生着している可能性が考えられる。さらに、病変の周辺組織では炎症を伴いながら纖維化が亢進することも報告されている²⁾。以上より、未分化細胞や纖維環境下にある細胞に対して選択的に作用する薬剤を見つければ、新しい予防・治療法の開発につながる可能性がある。そこで本研究では、子宮内膜がん由来HHUA細胞を用いて分泌腺形態への分化を促進する化合物の探索を計画した。また、I型コラーゲンゲル上にてHHUA細胞を培養し、炎症刺激による形態変化を抑制する化合物を探査した。

研究成果

① HHUA細胞の女性ホルモン感受性の確認

HHUA細胞は機能的なプロゲステロン受容体を発現しており、がん細胞株でありながら正常な子宮内膜上皮細胞と同様の分化能を有していることが報告されている³⁾。そこでまず、HHUA細胞をプロゲステロンで処理し、過去の報告通りに分化が誘導されるかどうか調べた。しかし、今回購入したHHUA細胞ではプロゲステロン添加による形態変化は認められなかった。長年に渡って継代培養が繰り返されるうちに、樹立当初よりも受容体の発現量が低下してしまった可能性が考えられた。ポジティブコントロー

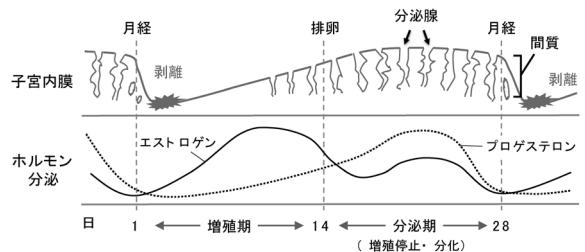


図1. ホルモン分泌ならびに子宮内膜の周期変化。

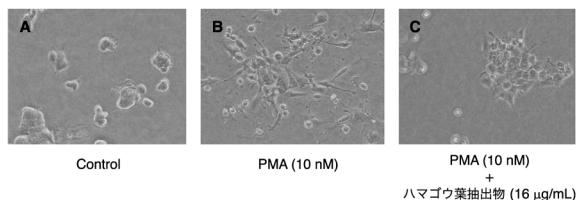


図2. HHUA細胞の形態変化。

ル化合物であるプロゲステロンに対する細胞応答を確認できなかっただため、分泌腺への分化を誘導する天然物の探索は一旦断念することにした。

②コラーゲンゲル上で培養したHHUA細胞の炎症刺激に対する応答

当初の予定を変更し、I型コラーゲンゲル上で培養したHHUA細胞に対して様々な薬剤を処理することで形態変化が引き起こされるかどうか調べた。I型コラーゲンは上皮細胞の土台である基底膜には存在せず、主として間質や筋層に発現している。したがって、HHUA細胞のゲル上培養によって、子宮内膜上皮細胞が筋層に浸潤した後に形成される纖維化病変組織に近い環境を再現できると考えた。

プロテインキナーゼC活性化剤であり、強力な炎症誘導物質として知られるphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で処理したところHHUA細胞の顕著な形態変化が認められた（図2B）。PMA処理後のHHUA細胞は線維芽細胞様の紡錘形であり、周囲の細胞と接着することなく重なり合って増殖することから、浸潤・転移能が増大していることが示唆された。一方、通常のプラスチックディッ

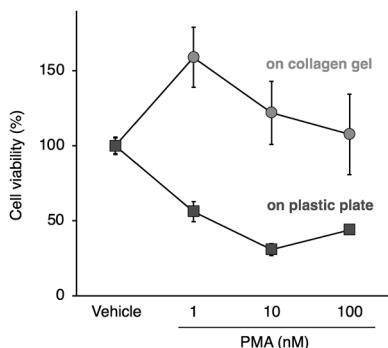


図3. PMA の HHUA 細胞に対する毒性.

シユ上で培養した HHUA 細胞に対して PMA 处理した場合には、形態変化より早く細胞死が誘導されて生存率が大幅に低下した（図3）。以上の結果は、筋層に浸潤して I型コラーゲンと接触している子宮内膜上皮細胞は、炎症環境下でもアポトーシスを回避し、更なる浸潤・転移能を獲得することを示唆している⁴⁾。

③HHUA 細胞の形態変化抑制物質の探索

炎症刺激による HHUA 細胞の形態変化を抑制する化合物は、子宮腺筋症・内膜症の治療薬としての可能性を有している。そこで、藁草・生藁として用いられている 20 種程度の植物素材から含有成分を抽出し、PMA が誘導する形態変化を抑制するかどうか調べた。その結果、シソ科植物であるハマゴウおよびミツバハマゴウの葉抽出物が顕著

な抑制活性を示した（図2C）。現在、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって粗抽出物の精製を行い、活性 fraction に含まれる化合物の同定を進めている。

まとめ

本研究では子宮内膜由来 HHUA 細胞が、I型コラーゲンゲル上とプラスチックディッシュ上とではまったく異なる薬剤応答を示すことを見いだした。今後、I型コラーゲンと接触している子宮内膜上皮細胞に対して特異的に作用する薬剤を探索することによって、子宮腺筋症・内膜症のような病変患部の線維化を伴う疾患の治療薬開発や発症メカニズムの解析を進めていく。

謝辞

本研究の遂行にあたり、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いたします。

参考文献

- 1) Masuda, H. et al., *PLoS ONE* **2010**, 5, e10387.
- 2) Guo, S.-W. and Groothuis, P. G., *Hum. Reprod. Update* **2018**, 24, 577–598.
- 3) Ishiwata, I. et al., *Gynecol. Oncol.* **1984**, 17, 281–290.
- 4) Hanaki, Y. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (DOI: 10.1093/bbb/zbac136).

6. 第75回国際会議出席費補助金 報告書

第75回国際会議出席費補助金報告書

ゴードン会議 海洋天然物化学部会 参加報告書

東北大学農学研究科天然物生命化学分野
長 由扶子

開催期日：2022年3月6日～3月11日

開催場所：アメリカ合衆国、ベンチュラ

1. 学会の概要

参加の準備

ゴードン会議海洋天然物部会（Environmental Roles, Biological Targets and Applications）は、2022年3月6日から11日にアメリカ合衆国カリフォルニア州ベンチュラのFour points by Sheraton Ventura Harbor Resort ホテルにて開催された。コロナ禍での対面学会の開催ということで、招待の打診をいただいてから参加に至るまでに通常とは異なる準備が必要であった。座長からは途中オンライン開催もあり得るというようなメールをいただいたため、日本農芸化学会事務局の方にもご心配をおかけしてしまった。1月末に対面での開催が決定してうれしい反面、感染状況がおちついていないカリフォルニア州に渡航することへの不安も大きく、大学の許可もおりないので、待機期間10日間に培養株が死滅するのではないかなど、不安はつのるばかりであった。出発直前にカリフォルニア州の感染者数が激減して日本政府から帰国者の待機期間短縮の方針が発表されたことで、待機の必要がなくなったことは大変ありがたかった。出発準備の中でも出国前1日以内の陰性証明書取得について最も気がかりであった。成田空港でのPCR検査を予約したが、HPには最短2時間と書いてあっても場合によってはもっと時間がかかるというので夕方5時発の飛行機を予約しているにもかかわらず、仙台から朝い

ちばんの新幹線で成田空港にむかった。空港のPCRセンターで血中酸素濃度や血圧測定後に唾液を採取し、結果を待っている間は気が気ではなく、3時間後に陰性証明書を受領した際にはとても安堵してようやく空腹を感じた。

会場周辺の様子

さて学会である。会場のあるベンチュラはロサンゼルス空港から車で1時間半ほどの港町である（写真1）。3月のカリフォルニアの日差しはまぶしく、青い空の下に多くのヨットが並ぶ素敵な眺めを楽しんだ。

ゴードン会議とは

1931年の夏、後にゴードン研究会議となる第1回会議が開催された。ニール・E・ゴードン教授がこの会議を始めた目的は研究の最前線にいる科学者を集めて、その分野の最新の知見をあらゆる側面から徹底的に議論し、互いに刺激することで研究の新しい方向性を見出すことであったといわれている。当初は化学の会議であったが、徐々に範囲が広がり現在では803もの部会がある。会場での写真撮影、録音、録画は一切禁止されるうえ、内容を参加者以外に伝えないという誓約を求められる。

2022年のゴードン会議海洋天然物化学部会は参加者320名ほどで、招待講演者39名、ポスター発表者101名であった。

欧米の海洋天然物化学者には女性が多い。講演者やセッションの進行役のジェンダー割合にも気を配ってあり、会議冒頭の座長（座長も女性）の挨拶においてもその数が公表された。キャンセルがあったため、バランスよく依頼す



写真1.



写真2.

るのにかなり苦労されたようであった。講演会場の入り口にはプロフェッショナルな礼節を重んじる文化を創造する取り組みにご協力くださいという看板（ジェンダー、宗教、人種、民族性、年齢及び障害などでの差別的な行動や発言をしてはいけないという内容）があるのが印象的であった（写真2）。

会場はとてもなごやかな雰囲気で服装もカジュアルが正式なので、ジーンズにTシャツ姿の参加者が多い。会場となったホテルで1週間毎日朝日晚の食事を共にし、自由なディスカッションをするというのはコロナ禍の2年間を黙食とオンライン会議で過ごした身には少々不安もあったが、覚悟を決めて参加した。内容は前述のような事情で詳しくは記載できないが、気候変動から新薬の開発まで非常に幅広く聞きごたえのあるものであった。最終日の午前中には東大の松永茂樹先生がセッションの進行役を務められた。セッション後にはスクリプス海洋研究所のMoore先生から松永先生のご退官がこの3月であること、これまで海洋天然物化学を牽引してこられたことを称えて全員起立して拍手でお祝いしようと声掛けがなされた。さらに最後のセッションでは昨年亡くなった上村大輔先生の追悼講演もあり、研究者としての功績だけでなく、臨床応用も実現されたこと、教育者としても優れた方だったことが述べられた。会場に響き渡った敬意を示す盛大な拍手のことを知っている日本からの参加者が私だけだったので、ここに記録させていただく。COVID-19の感染拡大がなければもっと大勢の日本人もともに記憶できたのだろうと思うととても残念である。

筆者の発表

筆者は2日目（3月7日）に“Solving the Mystery of Saxitoxin Biosynthesis in Dinoflagellates: Turn-over, Sub-

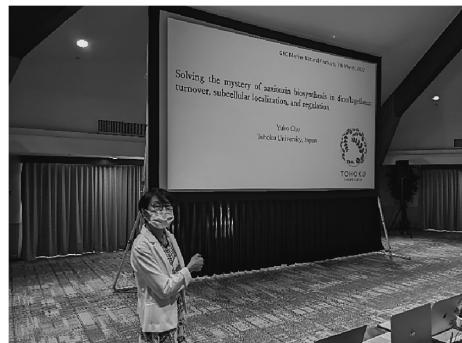


写真3.

cellular Localization and Regulation”というタイトルで発表した（写真3）。

麻痺性貝中毒の原因となる渦鞭毛藻におけるサキシトキン類縁体の生合成の代謝、生合成酵素の局在及び制御について講演し、活発な議論を交わした。講演後には多くの参加者からとてもよかったですとの感想をいただけて、長年の努力が報われた気がした。食糧生産、公衆衛生の基盤となる知見を世界中から集まった参加者に周知するとともに、異なる視点からの意見を聞くことができ、非常に有意義であった。なお本報告書に掲載している筆者の写真は特別に自分自身のスライドのタイトル部分だけにするという条件でGRC事務局から許可をいただき、座長のMcPhail先生に会場内で撮影していただいたものである。とてもフレンドリーな方で細やかな気配りをいただき、心から感謝している。

今回の参加にあたっては多くの方にご心配をおかけしたことここにお詫びしたい。

最後に、本会議への参加にあたり、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。

NAD依存型酵素を利用した基質拡散律速型バイオセンサーの構築

京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻
吉川達徳

出席会議：環太平洋国際化学会議2021（オンライン開催）

背景・目的

電気化学バイオセンサーは、酵素反応と電極反応を共役させて基質を触媒的に電解し、その電気信号（一般的には電流）に基づいて定量を行う。酵素の高い基質特異性を利用して、本デバイスは試料中の対象成分を選択的かつ高感度に検出することが可能である。酵素反応と電極反応を仲介するために通常はメディエーターと呼ばれる低分

子の酸化還元活性物質が用いられる（図1）。そのような反応系はメディエーター型酵素電極反応（MET型反応）と呼ばれる。

MET型反応を利用した電気化学バイオセンサーで得られる応答（ i ）は式（1）のように表される。

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_d} + \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_e} \quad (1)$$

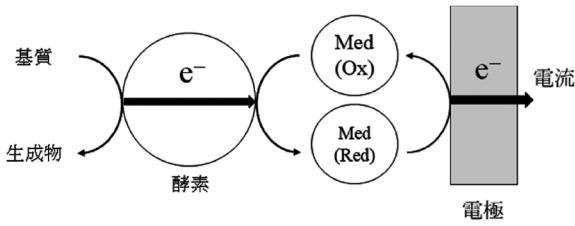


図1. MET型反応の概略図。

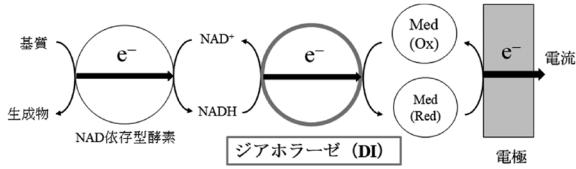


図2. DIを利用したMET型反応。

ここで、 i_d は基質の拡散に律せられる電流、 i_k は酵素反応速度に律せられる電流、 i_e は電極反応速度に律せられる電流を指す。センサーの応答を安定させるためには、変動要因の多い酵素反応速度と電極反応速度を高め、変動要因の少ない基質の拡散を律速段階とする必要がある。

一般的に酸化還元酵素は一方の基質に対する特異性が低いため、MET型反応によりバイオセンサーに適用可能である。だが多くのNAD依存型酵素はNADに対する基質特異性が高い点、及びNADHの電極反応が遅い点が課題となるため、本酵素のみでバイオセンサーを構築することは現実的ではない。したがって、NADHとの反応性が比較的高いテトラゾリウム系化合物と組み合わせることで、センサーとして利用してきた。しかし、NADHとの反応速度を担保するために大量のテトラゾリウム系化合物を添加する必要があるため、その酸化還元状態の制御が困難となり、センサーの特性が安定しないという問題があった。

そこで本研究では、少量のメディエーターでNADの迅速な再生を実現するため、*Bacillus stearothermophilus*由来のジアホラーゼ(DI)を介したMET型反応に着目した。そしてNAD依存型酵素と組み合わせることにより、基質拡散律速型バイオセンサーの実現を試みた(図2)。

結果・考察・展望

NAD依存型グルコース脱水素酵素(NAD-GDH)をモデル酵素として選び、DIおよび電極との反応性が高い

-aminophenolをメディエーターとして用いた。まずは実

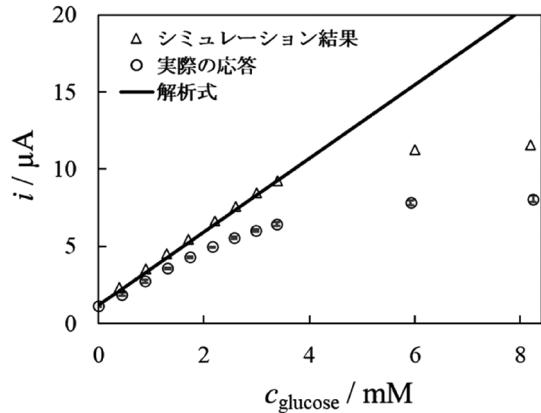


図3. センサー応答の解析。

※グルコース濃度が1.5 mM程度までは基質の拡散に律速された応答が得られた。

測した酵素反応速度のパラメーターを用いて反応拡散方程式の数値シミュレーションを行い、NAD-GDHとDIによる二酵素共役MET型反応が基質の拡散に律速される条件を探査した。その結果、電極の厚さが500 mm、NAD-GDHが8 mM、DIが30 mM存在する条件ならば、グルコース濃度が4 mMよりも低い場合にセンサーの応答が拡散律速電流の解析式から得られる理論値と一致すると示された(図3.△及び実線)。

数値シミュレーションの結果に基づいて、厚さ500 mm、幅1 cmのバンド電極を作用極としてセンサーを構築したところ、グルコースの濃度に比例する応答が得られた(図3.○)。その際、グルコース濃度が0~1.5 mM程度の範囲では、実際の応答とシミュレーション結果はよく一致した。さらに、構築したセンサーの感度はNAD-GDH及びDIの濃度変化に影響を受けなかった(図省略)ことから、基質の拡散に律速された安定性の高いバイオセンサーを実現できたと結論付けた。

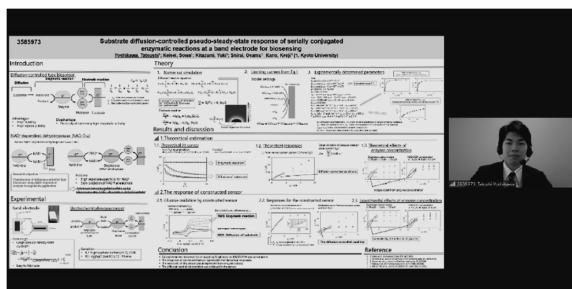
本センサーは、NAD-GDHを様々なNAD依存型酵素に置換することで多様な化合物の安定的なセンシングに展開できる。またMET型反応に対して、酵素が電極と直接電子授受を行う反応系は直接電子移動型反応(DET型反応)と呼ばれる。DIのDET型反応が実現すればメディエーターに起因するセンサー特性の問題を解消できると期待される。今後はDIのDET型反応を利用して電気化学バイオセンサーの構築も実現したいと考えている。

謝辞

本研究の発表を行うに当たり、ご支援賜りました公益財団法人農芸化学会に深く感謝いたします。

出席証明書類

下に発表場面の写真を添付しております。



7. 2020年度農芸化学女性研究者賞 報告書

2020年度農芸化学女性研究者賞報告書

脂肪酸の栄養状態で変化する生体応答の制御機構に関する研究

お茶の水女子大学基幹研究院 市 育代

背景・目的

哺乳動物はn-3系及びn-6系多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生体内で合成できず、食事から摂取する必要があり、これらの脂肪酸は必須脂肪酸ともよばれる。リノール酸(18:2n-6)や α -リノレン酸(18:3n-3)などのC18PUFAは脂肪酸不飽和化酵素のFADS1やFADS2、脂肪酸伸長酵素のELOVL5によりアラキドン酸(20:4n-6)やEPA(20:5n-3)、DHA(22:6n-3)などの \geq C20PUFAへと代謝され、膜機能や免疫応答など生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。そして、食事由来のPUFAが欠乏すると、皮膚障害や生殖機能異常、易感染症、脂肪肝などがみられることが知られている。また、体内のC18PUFAから \geq C20PUFA合成の律速酵素であるFADS2の欠損マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えると \geq C20PUFAの産生が阻害されることが知られている。そこで、本研究では、必須脂肪酸欠乏食を与えたFADS2欠損マウスの肝臓の表現型を調べることで、欠乏という観点から \geq C20PUFAの新たな生理作用を検討した。

方法・結果

雄性C57BL6J由来野生型マウスに通常食(CONT食)あるいは必須脂肪酸欠乏食(DEF食)を与え、4週間飼育した(WT-CONT群またはWT-DEF群)。FADS2欠損マウスにはDEF食を4週間与えた(KO-DEF群)。

1. 必須脂肪酸欠乏食を与えたFADS2欠損マウスにおける肝臓の脂肪蓄積と要因

肝臓のC18PUFA量は必須脂肪酸欠乏食を摂食したWT-DEF群とKO-DEF群においてWT-CONT群の30%程度まで減少した(図1A)。一方、 \geq C20PUFA量はWT-DEF群においてWT-CONT群の70%程度まで維持されていたのに対し、KO-DEF群ではWT-CONT群の20%以下まで減少していた。したがって、FADS2は \geq C20PUFA量の維持に重要であることが分かった。また、肝臓重量はKO-DEF群で増加しており(図1B)、肝臓の中性脂肪量(TAG)とコレステロール量もKO-DEF群で4倍以上増加

していた(図1C,D)。我々が知る限り、必須脂肪酸欠乏食を与えた通常のマウスにおいて肝臓のコレステロールの顕著な蓄積は報告されていないことから、FADS2を介して産生される \geq C20PUFAは肝臓のコレステロール蓄積に對して抑制的に作用することが示唆された。

次に、肝臓に中性脂肪量が蓄積した要因を調べたところ、KO-DEF群は他の2群と比較してFas, Acc, Scdといった脂質合成関連遺伝子の発現が著しく上昇していた(図2A)。そして、これらの遺伝子の転写を制御する

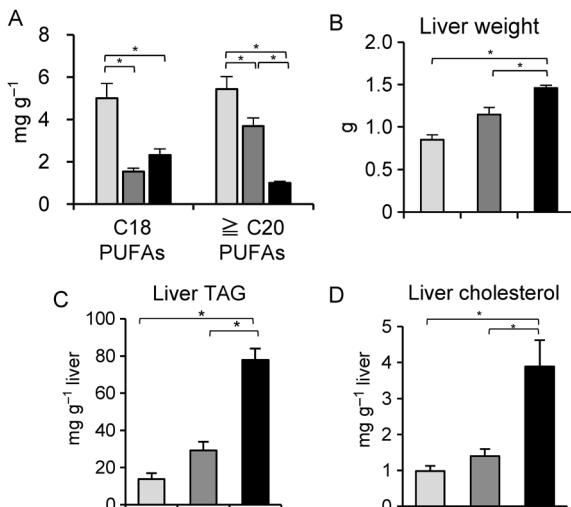


図1. 肝臓の脂肪酸組成と中性脂質の蓄積。

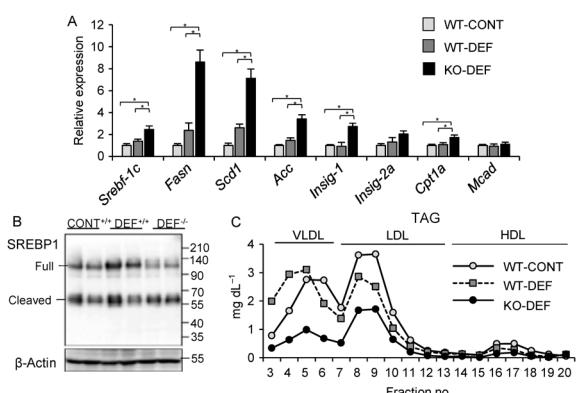


図2. 肝臓における中性脂肪蓄積の要因。

SREBP-1の活性化も認められた(図2B)。さらに、KO-DEF群では血漿の中性脂肪濃度やApoB100タンパク質量、肝臓から血中の脂質の移行を担うVLDLのTAG量が低下していた(図2C)。したがって、FADS2を介した≥C20PUFAの欠乏により、肝臓ではSREBP1の活性化を介した脂肪合成の亢進とVLDL分泌を介した肝臓から血中への脂質移行が低下することで肝臓の中性脂肪量が増加したことがわかった。また、KO-DEF群ではコレステロール合成に関与する遺伝子の発現が上昇していた。しかし、これらの遺伝子発現を制御する転写因子SREBP-2の活性化は認められなかった。また、胆管へのコレステロールの排出や胆汁酸への変換に関与する遺伝子の発現もみられなかった。以上の結果より、FADS2欠損マウスにおける肝臓のコレステロール蓄積は合成亢進が要因であることが示唆された。本研究より、≥C20PUFAは肝臓の中性脂肪やコレステロールの蓄積において重要な役割を担っていること、さらに≥C20PUFAは必須脂肪酸欠乏下でもFADS2を介してその量が維持されていることがわかった¹⁾。

2. FADS2を介した≥C20PUFA欠乏マウスの肝臓における代替的な脂質の変化

PUFAは膜リン脂質のアシル鎖として存在して膜に可動性をもたらすことから、PUFA含有リン脂質は膜機能の維持に必須である。生体内で≥C20PUFAが欠乏すると、欠乏を代償する脂肪酸代謝の変化が生じて恒常性が保たれる可能性がある。そこで本研究では、必須脂肪酸欠乏食を与えたFADS2欠損マウスにおける肝臓のリン脂質のPUFAの解析を行った。リン脂質のアシル鎖の組成を解析した結果、KO-DEF群で特異的にシアドン酸(20:3^{5,11,14})という非メチレン介在型不飽和脂肪酸が検出され、特にホスファチジルエタノールアミン(PE)の存在量が多くかった。FADS2欠損マウスにおけるシアドン酸はリノ一

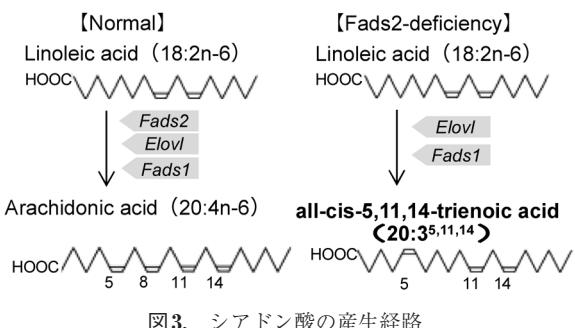


図3. シアドン酸の产生経路。

ル酸(18:2n-6)がELOVL5による炭素鎖の伸長とFADS1による二重結合の導入を受けて產生されたと考えられる(図3)。また、FADS2欠損マウスのPEでは20:5n-3や22:5n-3も増加していたことから、欠乏したPUFAの減少を補うための代償性の代謝が働いた可能性がある。

本研究ではFADS2を介して產生される≥C20PUFAが肝臓の正常な脂質代謝の維持に重要であることが示唆された。これまでFADS2の活性減少と非アルコール性脂肪肝(NAFLD)の発症に正の相関があることが報告されている。したがって、NAFLD患者などでは病態の進行を軽減するために、食事における≥C20PUFAの不足を回避する必要性が示唆された。また、FADS2欠損マウスではリン脂質において代償性の脂肪酸組成の変化が観察されたことから、哺乳動物ではリン脂質の≥C20PUFAの欠乏を補填する代替的な脂質代謝の変化が生じる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Ablation of fatty acid desaturase 2 (FADS2) exacerbates hepatic triacylglycerol and cholesterol accumulation in polyunsaturated fatty acid-depleted mice, Y. Hayashi, HC. Lee-Okada, E. Nakamura, N. Tada, T. Yokomizo, Y. Fujiwara, I. Ichi*, FEBS letters, 595, 1920–1932, 2021.

糸状菌を用いた植物香気成分の抗菌機構の解析

農業・食品産業技術総合研究機構 西村麻里江

1. 背景・目的

植物の香気成分は香料、医薬としてだけではなく、防虫・抗菌剤等、多岐にわたり利用されている。多くの香気成分は疎水性であり、そのため細胞膜構造にダメージを与えて抗菌性を発揮すると推測されている。その中にはメントールのように冷涼刺激受容体をはじめとした細胞膜のイオンチャネルに作用することが知られているものもあるが¹⁻³⁾、多くの香気成分ではその抗菌性発動の全体像は明らかになっていない。そこで、本研究では糸状菌*Aspergillus oryzae* および *Penicillium italicum* のトランスクリプトーム解析データを用いて、香気成分Aが抗菌性を発揮する機構の解析を試みた。

2. 結果・考察

寒天培地上で培養した *A. oryzae* (以下 Ao) と *Penicillium italicum* (以下 Pi) に対して、香気成分Aを暴露した菌糸でのトランスクリプトーム解析を行った。公開されている代謝パスウェイ情報を用いて連続した一連の代謝パスウェイを決定し、さらにこのパスウェイを構成する遺伝子を決定した。各代謝パスウェイにおいて（制御される遺伝子）／（構成する全遺伝子）の散布図を作成し（図1）、AoとPiで共通して有意に制御を受けていると考えられる代謝パスウェイを選別した。

これらの代謝パスウェイのうち Ao と Pi で共通して、発現する遺伝子が増えている（upregulate されている）パスウェイは 55、減少している（downregulate されている）パスウェイは 32 であった。Upregulate されているパスウェイには、細胞膜に局在するタンパク質を含むパスウェイや細胞膜の維持に関わるパスウェイ等が含まれていた。そこで、upregulate されていた代謝パスウェイに対する阻害剤を添加した培地上で培養した Ao および Pi を香気成分 A に暴露したところ、生育の抑制がみられた（図2）。

次に、Ao および Pi で共通して発現比が 1.5 倍以上であり、増減のパターンが同じ遺伝子を抽出した。その中から 11 の転写因子を選び出した。これらの転写因子の破壊株における化合物 A に対する感受性は確認した。興味深いことにこれらの 11 の転写因子破壊株のうち 3 株は、A とは構造が異なる抗菌性の香気成分 B に対しても感受性を示した（図3）。

今後の詳細な解析が必要ではあるが、本研究から糸状菌において香気成分 A の作用に関わる代謝パスウェイ及び転写因子のセットを抽出することができた。

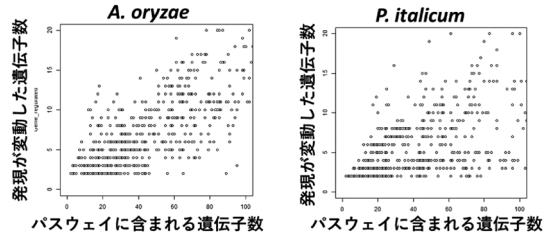


図1. 代謝パスウェイを構成する遺伝子の変動解析。
散布図の中で左上に行くほど発現が変動する遺伝子を多く含み、パスウェイが制御を受けていることを示す。

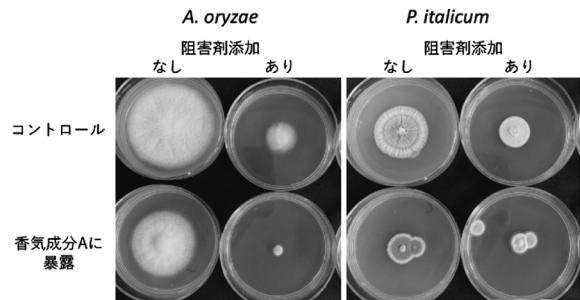


図2. 阻害剤添加による香気成分 A に対する菌の感受性。

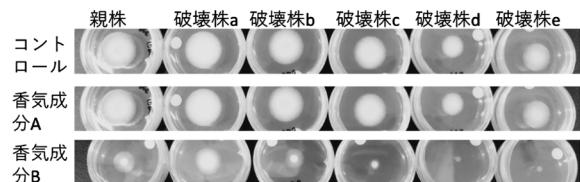


図3. 転写因子破壊株の香気成分に対する感受性試験。

謝辞

本研究を行うにあたり、東北大学阿部敬悦先生、五味勝也先生にはディスカッションおよび菌株のスクリーニングでご協力いただきました。ここに感謝申し上げます。

参考文献

- Oz M et al. (2017) Cellular and Molecular Targets of Menthol Actions. *Front. Pharm.*, Article 472.
- Kamatou GPP et al. (2013) Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochem.* 96, 15-25.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinnah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid.-based Complement. Altern.* Article ID 3012462, 2016.

8. 2020年度農芸化学若手女性 研究者賞報告書

2020年度農芸化学若手女性研究者賞報告書

糸状菌におけるリグノセルロース分解酵素遺伝子の 発現制御機構に関する分子生物学的研究

三重大学大学院生物資源学研究科 國武絵美

糸状菌は自然環境に存在する多様な炭素源を分解することが可能であり、この能力は古くから醸造や発酵に使用されてきた。また多糖分解酵素などの糸状菌由来の酵素が多く分野で利用されている。近年のバイオマス資源の有効利用の観点から、糸状菌由来のセルラーゼやヘミセルラーゼの重要性はさらに高まっている。これら酵素の安価な供給が求められるが、酵素生産制御メカニズムに関しては十分に解明されているとは言い難く、これが酵素生産コスト低減に対する障壁のひとつとなっている。

報告者はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を研究対象としてセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現制御機構の解明を目指し研究を行っており、転写誘導とカーボンカタボライト抑制 (CCR) の両面から解析を進めている。転写誘導には特異的転写活性化因子が必須であり、セルラーゼ遺伝子では ClrB が関与する。本研究では ClrB の転写活性化機構の解明を目的として、ClrB の細胞内局在性の制御の解析を行った。一方、CCRにおいては従来知られていた転写抑制因子 CreA が関わる経路とは独立して cAMP シグナル伝達関連因子依存的な新規経路をセルラーゼにおいて見出している。本研究ではこれがヘミセルラーゼ遺伝子にも関与しているのかを調べるとともに、新規 CCR 経路の下流で機能すると予想される転写因子の機能解析を行った。

1. ClrB の細胞内局在解析

ClrB はセルラーゼ遺伝子の誘導条件で機能するが、*clrB* 遺伝子の転写レベルでは大きな発現変動が見られないことから、タンパク質レベルで活性が制御されていると予測した。そこで ClrB に緑色蛍光タンパク質を融合し、細胞内局在を観察したところ、セルラーゼの誘導物質であるセロビオース存在下において核での蛍光が観察された。グリセロールやグルコース存在下では細胞質に存在する一方でセロビオースとグルコース共存下においても核局在性が見られたことから、ClrB はセロビオースのシグナルに

応答して核に移行することが明らかとなった。また推定核移行シグナルの変異体では核局在性が失われ、また C 末端欠損体ではセロビオースの有無にかかわらず、常に核局在性を示すようになることが分かった。C 末端切除 ClrB はセルラーゼ遺伝子の転写活性化機能も失っていたことから、C 末端領域が転写活性化機能と細胞内局在の制御機能に重要であることが示唆された。

2. ヘミセルラーゼ遺伝子の PkaA/GanB 依存的 CCR

*A. nidulans*において CCR に関与する転写抑制因子として CreA が知られているが、報告者らはセルラーゼ遺伝子の CCR には CreA 非依存的経路が存在し、それに cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PkaA) とその上流因子である三量体 G タンパク質 α サブユニット (GanB) が関わることを見出している (Kunitake et al. (2019) Curre Genet 65: 941–952)。そのためヘミセルラーゼ遺伝子の CCR にも CreA 非依存的・PkaA/GanB 依存的経路が関与するかに興味が持たれた。代表的なヘミセルラーゼ遺伝子であるキシリナーゼとマンナナーゼの CCR について知見を得るために、*creA*, *pkaA*, *ganB* 遺伝子破壊株における各酵素遺伝子の発現を比較した。その結果、これら遺伝子にも PkaA/GanB 依存的 CCR が関与することが判明した。培養条件によって CreA と PkaA/GanB の CCR への関与の強さは異なるが、特にグルコースによる抑制時において PkaA/GanB が強く機能することが明らかとなった。(Kunitake et al. (2022) AMB Express 12: 126)

3. PkaA/GanB 依存的 CCR に関わる新規転写因子の機能解析

PkaA/GanB 依存的 CCR を解明するには PkaA の下流因子、つまり PkaA に活性が制御される因子の同定が重要である。共同研究先である名古屋大学大学院小林哲夫教授の研究室において、GanB により制御されると報告されているプロテアーゼ生産を指標に PkaA の基質の候補が探索さ

れ、DNA結合ドメインを持つ転写因子Aが発見された。プロテアーゼの生産は *ganB* 破壊株では消失する一方で、因子A遺伝子欠損株では増加し、*ganB*と因子A遺伝子の二重破壊株では因子A遺伝子の単独欠損株と同じ表現型を示した。反対にセルラーゼの発現には因子A遺伝子の欠損は影響を与えないが、*ganB*欠損との組み合わせにより *ganB*破壊株で脱抑制したセルラーゼの発現が失われた。以上より、因子Aは GanB の下流でプロテアーゼ遺伝子の転写を抑制すること、セルラーゼの CCR を引き起こす何らかの因子を制御することが遺伝学的に示された。PkaA/GanB 依存的CCR の直接的な原因を探るには未知遺伝子の同定が必要であるため、因子Aの解析にはプロテ

アーゼ遺伝子の制御を中心に進めた。因子Aが主要なプロテアーゼ遺伝子 *prtA* の転写抑制因子であると予想し、因子Aを大腸菌で発現させ、精製したものを用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、*prtA* プロモーターへの結合が観察された。また、因子Aは *in vitro*においてマウス由来cAMP依存性プロテインキナーゼによりリン酸化されることが Phos-tag SDS-PAGE により確認され、因子Aが PkaA により活性が制御される可能性が示された。（日本農芸化学会2021年度大会にて発表）今後、因子Aの詳細な認識配列の決定およびリン酸化によるDNA結合活性の制御の解析を進め、因子Aによるプロテアーゼやセルラーゼ遺伝子の発現制御機構を明らかにしていく。

シアル酸含有糖鎖の合成研究および細胞膜ドメイン解析のための糖脂質プローブの開発

東海国立大学機構岐阜大学糖鎖生命コア研究所 河村奈緒子

背景・目的

細胞膜構成成分のひとつであるシアル酸含有糖脂質（ガングリオシド）は、細胞膜ドメイン（脂質ラフト）の形成により細胞内外のあらゆるシグナル伝達に深く関与している。ところが、ドメインにおけるガングリオシドの振舞いや機能の詳細はこれまで不明であった。我々は、これまで、ガングリオシドを可視化する蛍光プローブを化学合成により作成し、その1分子イメージングを行うことで、生細胞上における脂質ラフト形成を捉えることに成功した（N. Komura *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2016）。さらに、脂質ラフトの構造を調べることを目的に、分子捕捉性プローブの開発へと研究を進めてきた。本研究では、ガングリオシドの化学合成における課題の解決に取り組み、プローブ合成の迅速化を目指した。さらに、ガングリオシドプローブの種類の拡張と細胞膜上でのケミカルバイオロジー研究に取り組んだ。

ガングリオシドの効率的合成法の開発

ガングリオシドの化学合成における大きな課題は、糖鎖へのシアル酸の立体選択的導入である。そのため、従来法では合成の序盤で单糖に対するシアリル化反応を行い、副生する立体異性体を確実に分離した後に糖脂質構造へと導く経路をとっていた。しかし、この合成法では、シアル酸導入後にプローブへと誘導するための多段階で煩雑な変換工程を要していた。この問題を解決するため、近年我々が

報告したシアル酸の完全な立体選択的導入法（N. Komura *et al.* *Science* 2019）を利用した新たなアプローチを考案した。すなわち、合成の終盤でシアル酸を糖脂質へ導入する経路を考案した。この際に課題となる糖脂質の有機溶媒に対する難溶性を克服するため、*p*-tert-butylbenzoyl (TBBz) 基（S. Asano *et al.* *Org. Lett.* 2019）で水酸基を保護した糖脂質受容体を設計した。実際に、この糖脂質受容体はシアリル化反応で必要とされる低温条件においても、ジクロロメタンに対して良好に溶解した。そして、二環性シアル酸供与体によるグリコシル化反応を行った結果、極めて高収

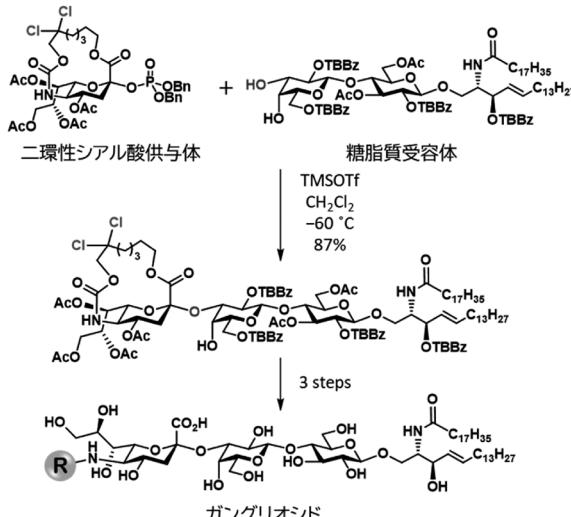


図1. ガングリオシドの新しい合成アプローチ。

率かつ完全な立体選択性でガングリオシド骨格を構築することに成功した（図1）(M. Takahashi *et al.* *Org. Biomol. Chem.* 2020)。さらに、その後は、亜鉛と酢酸を用いた二環性シアル酸の架橋部開裂、遊離となつた5位アミノ基の修飾（アセチル基、グライコリル基等）、脱保護反応の3工程のみで最終化合物へ導くことが可能であることを確認した。以上より、シアル酸を合成終盤に導入する新たなアプローチにより、簡便なガングリオシド合成法を見出した。

ガングリオシドプローブの合成と応用

続いて、前述の手法をプローブ合成へと応用した。目的に応じたラベルを最後に導入できるようにするために、シアル酸9位水酸基をアミノ基で置換したガングリオシドの合成を計画した。それに向け、まずは9位の水酸基をトリフルオロアセトアミド基で置換した二環性シアル酸供与体を新たに合成した。この供与体と糖脂質受容体のグリコシリ化反応を行つた結果、ガングリオシド骨格を良好な収率で得た。続いて、シアル酸の架橋部の選択的開裂や保護基の除去を経て、シアル酸9位が遊離のアミノ基となつたガングリオシドへと誘導した。最後に、蛍光色素や光反応性基をアミド化により導入することで、1分子イメージング用の蛍光プローブ及び分子捕捉用の光反応性プローブの合成

を達成した。以上のような新規合成法により、主要なガングリオシドのひとつであるラクト系ガングリオシドの蛍光プローブを新たに開発した。

これまでに合成した蛍光プローブの1分子イメージングにより、ガングリオシドに共通する、脂質ラフト形成時の振舞いが明らかになりつつある。また、光反応性プローブを用いたガングリオシド親和性タンパク質の捕捉実験も現在進めている。今後も引き続き分子プローブを用いたケミカルバイオロジー研究により、細胞膜ドメインの理解を深めていきたいと考えている。

謝辞

農芸化学若手女性研究者賞の助成金をもとに、本研究を発展させるために重要な成果を得ることができました。日本農芸化学会の関連の先生方に厚く御礼申し上げます。本研究は岐阜大学糖鎖生命コア研究所（iGCORE）生理活性物質学研究室で行われたものであり、安藤弘宗教授をはじめ研究に携わった研究室の皆様に心より御礼申し上げます。そして、プローブ開発におきまして多大なお力添えをいただきました沖縄科学技術大学院大学の楠見明弘教授、岐阜大学・iGCOREの鈴木健一教授に深く感謝申し上げます。

未知の中心的代謝酵素の探索と性状解析 —生命の多様性および進化の理解を目指して—

理化学研究所環境資源科学研究センター 千葉洋子

1. 研究の背景および目的

受賞者は、生物の代謝経路および酵素がどのような進化の過程を経て生まれ、複雑化していったのかという疑問に対し、現存生物の代謝の多様性を理解することで解を得ようとしている。具体的には、CO₂固定経路の進化を理解するために、現存生物がどのようなCO₂固定経路およびそれと密接な関係にあるグリシン・セリンの生合成経路・酵素を有しているか明らかにすることを目指している。本背景のもと、本研究ではゲノム情報のみからではセリンの生合成経路が不明である下記のバクテリア3種を用いて、セリン生合成経路の有無の確認および関与する酵素の探索を行つた。

A) *Thermosulfidibacter takaii* は Aquificota門（旧 Aquifae門）に属し、還元的クエン酸回路を用いて CO₂ を唯一の炭素源として増殖することが可能である。以前、受賞

者は本門に属する *Hydrogenobacter thermophilus* が type 2 phosphoserine phosphatase (PSP) を用いてセリンを生合成することを発見した (Chiba *et al.* *J Biol Chem.* 2012; **287**: 11934-)。 *H. thermophilus* は PSP 活性を有するタンパク質 PspA に加えて、PspA と高いアミノ酸配列の相同性を有するものの PSP 活性を欠く PspB を有する。これまでに全ゲノムが解読済みの Aquificota門生物はすべて PspA ホモログを有し、加えて多くが PspB ホモログも有す。しかし、近年ゲノムが解読された *T. takaii* は type 2 PSP ホモログを 1 コピー (TST_0280) しか有しておらず、これが PSP であるかは不明であった。そこで、本タンパク質の系統的位置および機能を解析することを目的とした。

B) *Thermodesulfatator indicus* は還元的アセチル CoA 経路を用いて独立栄養的に増殖することがゲノム情報から

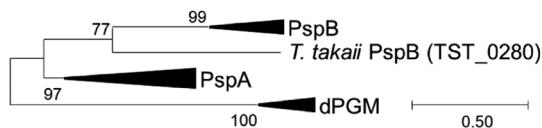


図1. 最尤法から求めた TST_0280 の系統的位置
dPGM: cofactor-dependent phosphoglycerate mutase (外群).

示唆されている。しかし、本菌は3段階の酵素反応を経てセリンを生合成する“phosphorylated pathway”的最初の2酵素の候補遺伝子を有するものの、最後の反応を触媒するPSPの候補遺伝子を欠く。また、グリシンとセリンの変換反応を触媒する酵素遺伝子を有するものの、セリン以外からグリシンを生合成する代謝経路をゲノム情報から予測することができない。そこで、本生物のグリシン・セリンの生合成経路とそれに関与する酵素の同定を目的とした。

2. 方法と結果

A) *T. takaii* の PSP 候補 (TST_0280) のアミノ酸配列を、Aquificota 門に属する他生物の PspA および PspB とアライメントした。その結果、TST_0280 は PspA に特異的かつ PSP 活性に重要な His85 および C 末端の残基群を欠くことが明らかとなった。本アライメントを用いて系統解析を行ったところ、TST_0280 は PspB と姉妹群を形成した(図1)。以上のことから、TST_0280 の配列は PspA よりも PspB に近いと結論付けられた。

次に TST_0280 を大腸菌にて発現し、精製した。TST_0280 は PSP 活性 (P-L-Ser に対する脱リン酸活性) を示したが、タンパク質当たりの比活性は PspA のそれと比較して 2 枠低かった。加えて様々な基質に対する脱リン酸活性を検討したところ、TST_0280 は P-L-Thr に対して最も高い活性を示したが、その生理的意味は不明である。

以上の結果および Aquificota 門における *T. takaii* の系統的位置を総合し、TST_0280 は PspB に属すると結論付けた。*T. takaii* は全ゲノム情報が既知の Aquificota 門の中で唯一 PspA を欠き、PspB のみを有する生物である。*T. takaii* の PspB が細胞内で PSP として機能しセリン生

合成に寄与している可能性は現時点では低いが、今後さらなる検証が必要である。本成果は American Society for Biochemistry and Molecular Biology の年会である Experimental Biology 2021 「Characterization of a Non-Classic Type Phosphoserine Phosphatase Homolog in *Thermodesulfidibacter takaii*, a Thermophilic, Autotrophic Bacterium in the Phylum Aquificae」で発表した。

B) *T. indicus* のグリシン、セリン生合成経路を推定するために、安定炭素同位体標識を用いた分子内安定同位体プロービングを用いて *T. indicus* 細胞内における代謝の流れを可視化した。本手法は標識された部位を特定可能であり、また感度が高く微量の試料で分析可能であるという利点がある。¹³C 標識化合物を添加して培養した本菌中のタンパク質を加水分解し、得られたアミノ酸を誘導体化後、GC-MS 分析に供した。その結果、phosphorylated pathway を経てセリンが作られ、セリンからグリシンが生合成されることを示唆するラベルパターンが得られた。そこで本菌の細胞破碎液を用いて活性測定を行ったところ、PSP 活性が検出された。現在、本 PSP 活性を担うタンパク質の同定を進めている。なお、本研究の一部は日本農芸化学会 2020 年度大会「分子内安定同位体プロービングを用いた好熱性独立栄養性細菌の炭酸固定経路の検証」にて報告した。

3. 謝辞

本研究は、理化学研究所環境資源科学研究センター生体機能触媒研究チームで行ったものであり、中村龍平チームリーダーおよび Marie Wintzer テクニカルスタッフを筆頭に研究室員のサポートを受けました。また、安定同位体標識実験は海洋研究開発機構の布浦拓郎博士・澄田智美博士ら、および北海道大学の力石嘉人教授らとの共同研究として行われました。さらに、農芸化学若手女性研究者賞および JSPS 科研費 JP19K15745 の助成を受けました。本研究を遂行することをサポートしてくださった全ての方に深く感謝いたします。

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 © 2022 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（2022）

2022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
